

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GEISON EDUARDO CAMBRI

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS PÓS-TRANSCRICIONAIS NA REGULAÇÃO
DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM TRIPANOSSOMAS



CURITIBA

2011

GEISON EDUARDO CAMBRI

AVALIAÇÃO DE MECANISMOS PÓS-TRANSCRICIONAIS NA REGULAÇÃO
DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM TRIPANOSSOMAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Área de Concentração em Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências- Bioquímica.

Orientador: Prof^a Wanderson Duarte da Rocha

Co-orientadora: Prof^a Rose Adele Monteiro

CURITIBA

2011

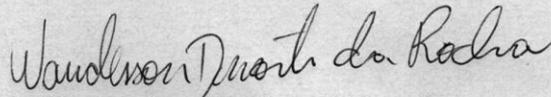
TERMO DE APROVAÇÃO

GEISON EDUARDO CAMBRI

**AVALIAÇÃO DE MECANISMOS PÓS-TRANSCRICIONAIS NA REGULAÇÃO
DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM TRIPANOSSOMAS**

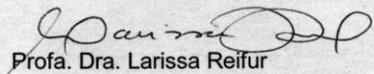
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências – Bioquímica no Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR



Prof. Dra. Larissa Reifur

Departamento de Patologia Básica, UFPR



Prof. Dr. Jaime Paba

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

Curitiba, 24 de Fevereiro de 2011.

Agradecimentos

Inicialmente à Deus, pela constante busca da plenitude de espírito.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha e Profa. Dra. Rose Adele Monteiro. Pela orientação, dedicação, paciência e atenção dispensada nesses anos.

Ao grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio, representados aqui pelos professores Dr. Emanuel Maltempi de Souza e Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, pela utilização do espaço, equipamentos e reagentes.

À professora Eva Carnieri pela orientação no estágio em Docência.

Ao Valter Antônio de Baura e Roseli Prado por toda ajuda e atenção.

Aos pesquisadores Dra Andrea R. Ávila e Stenio Perdigão Fragoso do Instituto Carlos Chagas (ICC/FioCruz) e a doutoranda Mariana Serpeloni, pelo auxílio nas transfecções de DNA com *Trypanosoma cruzi*.

Ao doutorando Rafael Luís Kessler pela ajuda na utilização do citômetro de fluxo e processamento de dados.

Ao Prof. Dr. Luís Cláudio Fernandes pela utilização do leitor de placas TECAN.

Às agências Fundação Araucária, CAPES/REUNI e CNPq pelo financiamento da pesquisa.

Aos amigos do Laboratório GFP, Mônica “Monicão”, Laiane, Normanda (a mineira mais baiana que eu conheço), Letícia, Rodrigo, Ana Paula, Simone e Bruno, pelos momentos de descontração e discussão de pesquisa. Vocês são demais!

À galera da 279 e 275, especialmente pelo doutorando Marco Kadowaki, pela ajuda constante e amizade.

Aos amigos e amigas do Departamento de Bioquímica, Luís “Saguí”, Fábio “Cido”, Hudson, Alex “Mano”, Carol Heyse, Thiago, Beth, Andréia, Paulo, Arquimedes, Anelis, Marcelão, Flávio, pelos cafezinhos, auxílios pessoal e profissional, subidas de montanha, escalada e por toda diversão!

Aos meus amigos e amigas Felipe “Zóio”, Daniel “Xuxumuco”, Renan “Zezim”, Vinícius “Jusé”, Fernando “Amigão”, Luciana “Percega”, Bodas, Bia, Vitão, Gregory, Luís Henrique, Rodrigo “Digas”, Bruno “careca”, Wendell “Mends”, Mari, Suzana, Bel e Ana “Nana” Flávia, por todo o companheirismo, conversas, conselhos, atenção, ajuda e alegriiii! Quanta alegria!

À galera do Maraca, que em tão pouco tempo já nos tornamos grandes amigos! TU MARACA!

Aos meus pais Gerçi Caetano Cambri (*in memorian*) e Marli Maria Cambri por minha criação, educação, todo apoio, atenção e amor recebido. Tudo o que sou devo a eles.

Aos meus irmãos Michel Alexandro Cambri, Michelle Cambri e minha cunhada Tathyana Cambri por toda amizade, conversas e apoio, amo vocês!

Ao meu filho Caetano, por toda alegria, felicidade e amor.

RESUMO

A genômica funcional é um campo em ascensão, o que se deve em parte ao número crescente de sequências de genomas publicados, o que tende a aumentar com o advento de novas plataformas de sequenciamento. Para elucidar a função gênica em tripanossomas, há um conjunto de técnicas e metodologias que podem ser empregadas. Uma delas é a expressão heteróloga utilizando promotores regulados por repressor de tetraciclina. No entanto, alguns relatos demonstraram que há uma certa fraqueza no controle da expressão de genes tóxicos na ausência do indutor, e este fato pode limitar os avanços de diversas abordagens pós genômica. Além disso, estes sistemas requerem prévia modificação de células, que é trabalhoso e pode resultar em mudanças fisiológicas, tais como a patogenicidade dos microorganismos. Partindo desta premissa, nós projetamos dois vetores de expressão em tripanossomas, um para *Trypanosoma brucei*, que regula a expressão gênica no nível transcricional pelo promotor GPEET com operadores de tetraciclina (Tet) e pós-transcricionalmente por moléculas de *riboswitches*, ribozimas sensíveis à tetraciclina. O segundo grupo de plasmídeos foi projetado para regular a expressão gênica em *Trypanosoma cruzi* apenas pós-transcricionalmente por moléculas de *riboswitches*. As construções foram criadas usando pLEW 100 e pRock como vetores parentais para *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente. Os níveis de regulação por *riboswitch* inativado por tetraciclina atingiu cerca de 3 a 4 vezes no aumento da expressão do gene repórter RLUC, utilizando Tet a 1 µg/mL. Por outro lado, o *riboswitch* ativado por Tet provocou redução cerca de 2 vezes na expressão do gene repórter nas mesmas condições. Além disso, nossos dados demonstraram uma possível influência negativa sobre níveis de expressão gênica em *T. cruzi* quando doses elevadas de tetraciclina (10 µg/mL) foram testadas. Nossas tentativas iniciais mostraram que *riboswitches* são funcionais nestes organismos e podem ser usados para regular a expressão gênica em tripanossomas. No entanto, este sistema deve ser melhorado para obter maiores níveis de regulação. Sugerimos que mudanças no número e/ou na posição dos *riboswitches* podem contribuir para incrementar a regulação neste sistema.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, Genômica funcional, *Riboswitches*.

ABSTRACT

Functional genomics is a growing field which is partly due to the increasing number of published genomes, a fact which tends to improve with the advent of new sequencing platforms. To elucidate the gene function in trypanosomes, there is a large number of techniques and methodologies to be employed. One of these is the heterologous expression using promoters regulated by tetracycline repressor. However, some reports have shown that there is some weakness at the expression control of toxic genes in the inducer absence, and this fact can limit the advances of various post genomic approaches. Moreover, these systems require previous cellular modification, which may be laborious and can also result in physiological changes, such as microorganism pathogenicity. On this assumption, we designed two trypanosomes expression vectors, one for *Trypanosoma brucei* which regulates gene expression at the transcriptional level by GPEET promoter with tetracycline (Tet) operators and post-transcriptionally by *riboswitch* molecules (Ribo), ribozymes sensible to tetracycline. The second group of plasmids was designed to regulate gene expression in *Trypanosoma cruzi* only post-transcriptionally by the same *riboswitch* molecules. The constructs were created using pLEW 100 and pROCK as parental vectors for *T. brucei* and *T. cruzi*, respectively. The regulation levels by *riboswitch* inactivated by tetracycline reached about 3 to 4 fold increase in expression of the RLUC reporter gene, using Tet at 1 µg/mL. On the other hand, the *riboswitch* activated by Tet provoked around 2 times down regulation of the reporter gene at the same conditions. Furthermore, our data demonstrated a possible negative influence on gene expression levels in *T. cruzi* using higher doses of tetracycline (10 µg/mL). Our initial attempts showed that *riboswitches* are functional in these organisms and can be useful to regulate gene expression in trypanosomes. However, this system should be improved to get higher regulation levels. We suggest that changes on the number and/or location of the *riboswitches* may contribute to develop a better system.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, Functional genomics, *Riboswitches*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	22
Figura 2	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Figura 3	Mecanismos de ação de alguns <i>Riboswitches</i>	34
Figura 4	Esquema de seleção de aptâmeros por SELEX.....	36
Figura 5	Representação da estrutura e funcionamento do <i>Riboswitch</i> regulado por tetraciclina.....	38
Figura 6	Modelo de regulação da expressão gênica utilizando domínio desestabilizador (DD).....	40
Figura 7	Esquema do vetor pLEW 100.....	48
Figura 8	Ilustração representativa do vetor plasmidial pROCK GFPHygro.....	50
Figura 9	Etapas de clonagem para obtenção das construções para testar o efeito das ribozimas <i>switches</i> em <i>T. brucei</i> utilizando o vetor pLEW 100.....	65
Figura 10	Perfil de restrição dos vetores pLEW RLUC Ribo 1-4 digeridos por <i>XbaI</i> e <i>XhoI</i>	66
Figura 11	Atividade de luciferase em formas procíclicas de <i>T. brucei</i> transfectadas de forma transiente com as construções pLEW 100 RLUC Ribo 1 a 4.....	68
Figura 12	Clonagem e ensaio de restrição dos clones obtidos dos vetores pRock RLUC Ribo 1 a 4.....	71
Figura 13	Atividade relativa de luciferase de Renilla em ensaios de transfecção transiente em <i>T. cruzi</i> utilizando os vetores pRock RLUC Ribo 1 a 4.....	73
Figura 14	Atividade de luciferase em culturas contendo as construções pRock RLUC Ribo 1 a 4 de forma estável na ausência de ligante.....	75
Figura 15	Efeito de tetraciclina na modulação de RLUC regulada por <i>Riboswitches</i>	77
Figura 16	Atividade de luciferase regulada por <i>riboswitches</i> em concentrações de 0,1 e 1 µg/mL de tetraciclina.....	80
Figura 17	Análise comparativa da estrutura secundária predita da ribozima em fusão com a porção 3'UTR proveniente da construção com a estrutura descrita anteriormente.....	81

Figura 18	Esquema ilustrativo demonstrando construção do vetor plasmidial pROCK GFPDD.....	84
Figura 19	Análise por FACS da fluorescência de GFP em formas estáveis integrativas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	86
Figura 20	Comparação de sequências entre o domínio desestabilizador e proteínas homólogas de <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	87
Figura 21	Esquema do produto de expressão esperado do gene regulado inserido no vetor pRock.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estirpes de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.....	45
Tabela 2	Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	46
Tabela 3	Antibióticos utilizados.....	51
Tabela 4	Sequência dos <i>primers</i> utilizados.....	57
Tabela 5	Estruturas de <i>Riboswitches</i>	58
Tabela 6	Compilação de resultados publicados utilizando sistemas de regulação da expressão gênica.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp: Ampicilina.

ATP: Adenosina trifosfato

BlastP: do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool for Protein sequence*.

Bleo: Bleomicina, na língua inglesa denominada *phleomycin*.

BSA: Albumina do Soro Bovino, do inglês, *Bovine Serum Albumin*.

cDNA: DNA complementar.

DD: Domínio desestabilizador.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

dNTP: Desoxiribonucleosídeo trifosfato.

dsRNA: RNA dupla fita, do inglês, *double strand RNA*.

EDTA: Ácido etileno-diamino-tetracético, do inglês, *EthyleneDiamine Tetraacetic Acid*.

EP: Prociclina formada pelo dipeptídeo, contendo os resíduos de aminoácidos: Ácido Glutâmico (E) e Prolina (P).

FACS: do inglês, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*.

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo.

FLUC: Luciferase de Vagalume, do inglês, *Firefly Luciferase*.

FMN: Flavina Mononucleotídeo.

GAPDH: Gliceraldeído – 3 – Fosfato – Desidrogenase.

GFP: Proteína Fluorescente Verde, do inglês, *Green Fluorescent Protein*.

gGAPDH: Gliceraldeído – 3 – Fosfato – Desidrogenase – glicossomal.

GPEET: Prociclina formada pelo pentapeptídeo contendo os resíduos de aminoácidos: Glicina (G), Prolina (P), Ácido Glutâmico (E) e Treonina (T).

HEK: células embrionárias de rim humano, do inglês, *Human Embryonic Kidney*.

HeLa: linhagem celular humana, sua nomenclatura é proveniente do nome de Henrietta Lacks.

HEPES: 4- (2-hydroxietyl) - ácido 1-piperazinaetanesulfônico.

HigroR: gene que codifica para proteína que confere resistência à higromicina.

hRLUC: do inglês, *humanized Renilla luciferase*.

Hygro: Higromicina.

ICC: Instituto Carlos Chagas.

IR: Região Intergênica, do inglês, *Intergenic Regions*.

KOAc: Acetato de Potássio.

LA: meio de cultura Luria Bertani acrescido de ágar.

LB: meio de cultura Luria Bertani.

LIT: meio de cultura infusão de fígado e triptose, do inglês, *Liver Infusion Triptose*.

Lmj: *Leishmania major*.

LPG: Lipofosfoglicanas, do inglês, *LipoPhosphoGlycan*.

mRNA: RNA mensageiro.

mTOR: Alvo de rapamicina em mamíferos, do inglês, *mammalian target of rapamycin*.

Neo: Neomicina.

NeoR: gene que codifica para proteína que confere resistência à neomicina.

OMS: Organização Mundial da Saúde.

ORF: Fase de leitura de uma molécula de RNA, do inglês, *Open Reading Frame*.

PARP: Proteína de acídica repetitiva de formas procíclicas, do inglês *procyclic acid repetitive proteins*.

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*.

PhleoR: gene que codifica a proteína que confere resistência à bleomicina.

POI: Proteína de Interesse, do inglês, *Protein Of Interest*.

qPCR: PCR quantitativa.

RBS: Sítio de ligação ao ribossomo, do inglês, *Ribosome Binding Site*.

RFP: Proteína Fluorescente Vermelha, do inglês, *Red Fluorescent Protein*.

RLUC: Luciferase de *Renilla*, do inglês, *Renilla LUCiferase*.

RNA pol.: RNA polimerase.

RNA: Ácido ribonucléico.

RNAi: RNA de interferência.

RNAp: promotor de RNA.

RR: RLUC Ribo (*Riboswitch*).

rRNA: RNA ribossômico.

SAP: Fosfatase Alcalina de Camarão, o inglês, *Shrimp Alkaline Phosphatase*.

SAS: Sítio Aceptor de Sequência Líder, do inglês, *Splice leader Acceptor Site*.

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês, *sodium dodecyl sulfate*.

SELEX: Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial, do inglês, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*.

siRNA: pequeno RNA de interferência, do inglês, *short interfering RNA*.

SL: Sequência Líder, do inglês, *Splice leader*.

Taq: *Thermus aquaticus*.

Tc: *Trypanosoma cruzi*.

tc: tetraciclina.

teo: teofilina

Tet: tetraciclina.

TetR: Proteína repressora de tetraciclina.

TPP: Tiamina piro-fosfato.

tRNA: RNA transportador.

UTR: região não traduzida, do inglês, *Untranslated Region*.

VSGs: glicoproteínas variantes de superfície, do inglês *variant surface glycoproteins*.

yEGFP: Proteína verde fluorescente aprimorada à leveduras, do inglês, *yeast Enhanced Green Fluorescent Protein*.

YFP: Proteína Fluorescente Amarela, do inglês, *Yellow Fluorescent Protein*.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	17
2 – REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 <i>Trypanosoma brucei</i> E A DOENÇA DO SONO	19
2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> E A DOENÇA DE CHAGAS.....	23
2.3 ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMAS.....	26
2.4 SISTEMAS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMAS.....	29
2.5 MECANISMOS DE REGULAÇÃO GÊNICA POR MOLÉCULAS DE RNA (RIBOZIMAS E <i>RIBOSWITCHES</i>).....	32
2.6 REGULAÇÃO GÊNICA POR DOMÍNIO DESESTABILIZADOR (DD)	39
3 - JUSTIFICATIVA	42
4 – OBJETIVOS	44
4.1 OBJETIVO GERAL	44
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
5 – MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1 BACTÉRIAS.....	45
5.2 PARASITOS.....	45
5.2.1 <i>Trypanosoma brucei brucei</i>	45
5.2.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
5.3 PLASMÍDEOS.....	46
5.3.1 pLEW 100	47
5.3.2 pROCK GFP Hygro.....	49
5.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	51
5.5 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA ANÁLISE DOS MODELOS DE REGULAÇÃO PROPOSTOS	52
5.6 MANIPULAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	52
5.6.1 ENSAIOS DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DO DNA.....	52

5.6.2 POLIMENTO DE EXTREMIDADES DE DNA DIGERIDAS POR ENDONUCLEASES.....	52
5.6.3 TRATAMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA COM FOSFATASE ALCALINA	53
5.6.4 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA	53
5.7 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE <i>E. coli</i> COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO	53
5.8 OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	54
5.9 ELETROFOROSE EM GEL DE AGAROSE	55
5.10 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE	56
5.11 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES.....	56
5.12 AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS DE DNA POR PCR.....	56
5.13 INICIADORES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO DE CLONES E AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	57
5.14 MOLÉCULAS DE RIBOZIMAS SWITCHES.....	57
5.15 TRANSFECCÃO DE PARASITOS.....	58
5.15.1 TRANSFECCÃO ESTÁVEL DE <i>T. b. brucei</i>	58
5.15.2 TRANSFECCÃO ESTÁVEL DE <i>T. cruzi</i>	59
5.15.3 TRANSFECCÃO TRANSIENTE DE <i>T. b. brucei</i> E <i>T. cruzi</i>	60
5.16 ATIVIDADE DE LUCIFERASE DE <i>Renilla</i> (RLUC).....	60
5.17 PROCESSAMENTO E NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DE LUMINESCÊNCIA.....	61
5.18 ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DE GFP POR CITOMETRIA DE FLUXO	61
6 – RESULTADOS	62
6.1 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>T. brucei</i> POR RIBOSWITCHES.	62
6.1.1 – CONSTRUÇÃO DOS VETORES PLEW 100 COM REGULAÇÃO ADICIONAL POR RIBOSWITCHES.....	63

6.1.2 – AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO PROMOVIDA POR PLEW 100 RLUC <i>RIBOSWITCHES</i>	67
6.2 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>T. cruzi</i> POR <i>RIBOSWITCHES</i>	70
6.2.1 – CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO REGULADA POR <i>RIBOSWITCHES</i> EM <i>T. cruzi</i>	70
6.2.2 – TESTES DO SISTEMA DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR <i>RIBOSWITCHES</i> EM <i>T. cruzi</i> EM ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE.	72
6.2.3 – TESTES DO SISTEMA DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR <i>RIBOSWITCHES</i> EM PARASITOS CARREGANDO DE FORMA ESTÁVEL OS PLASMÍDEOS pROCK RLUC RIBO 1 A 4	74
6.3 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>T. cruzi</i> POR DOMÍNIO DESESTABILIZADOR (DD)	82
6.3.1 – CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO REGULADA POR DD EM <i>T. cruzi</i>	82
6.3.2 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE EM FUSÃO COM DOMÍNIO DESESTABILIZADOR EM VETOR pROCK GFPDD	83
7 – DISCUSSÃO	88
8 - CONCLUSÕES	95
9 - PERSPECTIVAS.....	96
10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1 – INTRODUÇÃO

As tripanossomíases são doenças que assolam milhares de pessoas e animais domésticos e silvestres a cada ano, tornando-se problemas de saúde pública em diversos países, demonstrando sua relevância médica e econômica. Mais especificamente a tripanossomíase africana, também conhecida como doença do sono, é causada pelo protozoário *Trypanosoma brucei* e tem incidência de aproximadamente 17616 pessoas a cada ano com 50 mil a 70 mil casos relatados, podendo ainda ocasionar patologia à animais domésticos, conhecida como *Nagana*. Por outro lado tem-se a tripanossomíase americana, conhecida pelo nome de Doença de Chagas, que possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, que infecta de 16 a 18 milhões de indivíduos e cerca de 60 milhões de pessoas estão sob risco de transmissão.

Os tripanossomatídeos além de apresentarem relevância médica pelas doenças que causam também apresentam relevância em vários aspectos moleculares, já que possuem particularidades em seu mecanismo de controle de expressão gênica, sendo características não usuais em eucariotos.

Sabendo-se da relevância do estudo destes organismos, aliada a inexistência de tratamentos eficazes e com baixos níveis de efeitos colaterais, bem como a publicação dos genomas destes protozoários, vários grupos tem realizado estudos de genômica funcional para elucidação da informação contida no código genético. Estas abordagens visam em última estância identificar e caracterizar prováveis alvos para desenvolvimento de novas drogas e tratamentos.

Apesar dos grandes avanços na manipulação da expressão gênica para os estudos de genômica funcional em tripanossomas, principalmente em *T. brucei*, a expressão finamente regulada de genes exógenos e ou endógenos ainda necessita de aprimoramento. Os modelos de estudo envolvendo controle de expressão gênica por promotores controlados pelo repressor de tetraciclina, apesar de bem estudados, ainda apresentam um nível de vazamento da expressão, o que tem comprometido e que poderão comprometer estudos no parasito. O vazamento caracteriza-se como níveis detectáveis do produto de expressão gênica, mesmo quando o processo de expressão está reprimido. Além disto, neste sistema de expressão a manipulação da

expressão fica restrita a linhagens previamente modificadas para expressão dos componentes que fazem parte do sistema de regulação, logo a expressão controlada em cepas com características de interesse (como virulência e/ou resistência a drogas diferenciada) fica limitada pela necessidade de modificação prévia. Em algumas situações, tem sido mostrado que a manipulação e ou manutenção em meios de cultivo por longos períodos alteram características do organismo cultivado, como por exemplo, a patogenicidade.

Esta situação nos impulsionou a tentar aliar ao sistema de regulação pelo repressor de tetraciclina o mecanismo de RNA *switches*, também conhecidos como *riboswitches* (neste trabalho será utilizado *riboswitches* de ribozimas sensíveis a tetraciclina), minimizando os efeitos de vazamento da expressão. Os *riboswitches* também terão sua potencialidade testada de forma isolada para possível utilização em parasitos que não tenham sido modificados geneticamente. Neste sistema idealizado poderemos tentar modular a expressão gênica pela ativação ou inibição da atividade de ribozima, dependendo do *riboswitch* avaliado, promovendo ou bloqueando a auto-catálise do mRNA do gene que se deseja expressar.

Por fim, planejamos um segundo sistema de regulação da expressão gênica a ser utilizado em *T. cruzi* no nível pós-traducional, por fusão de um Domínio Desestabilizador (DD) a uma proteína de interesse, que garante modulação dos níveis celulares da proteína pela presença de um ligante específico. O sistema de regulação por DD já foi testado em leishmanias, demonstrando ser um sistema robusto de regulação da expressão gênica.

Desta forma, o presente trabalho tem o intuito de gerar vetores plasmidiais de regulação da expressão gênica em *T. cruzi* e *T. brucei*, a fim de contribuir com o campo da genômica funcional destes organismos.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Trypanosoma brucei* E A DOENÇA DO SONO

A Tripanossomíase Africana, ou doença do sono, é uma zoonose endêmica da África subsaariana, ocasionada pelo protozoário hemoflagelado, da ordem Kinetoplastida, *Trypanosoma brucei*, e transmitida pela saliva de insetos contaminados, do gênero *Glossina* (mosca tsé-tsé). Os agentes etiológicos da doença são considerados, atualmente, subespécies, indistinguíveis morfológicamente, de *T. brucei*, sendo estas: *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei brucei*. As duas primeiras subespécies do parasito são as que causam a tripanossomíase africana humana, enquanto que a terceira causa uma doença conhecida como *Nagana* em animais como gado, ovelhas e cabras (REY, 2001).

T. b. gambiense é o agente causador da enfermidade no Oeste Africano, tendo o homem como principal hospedeiro. O aparecimento de manifestações clínicas é lento, podendo demorar meses a anos para o surgimento das mesmas. Enquanto que *T. b. rhodesiense* é responsável pela forma clínica do Leste Africano, e tem como principais hospedeiros animais e o gado bovino, e sua infecção em humanos leva ao rápido aparecimento da moléstia, com sua evolução reduzida a semanas ou poucos meses (WELBURN *et al.*, 2001). O que leva à caracterização da primeira forma como crônica e a segunda como uma forma aguda da patologia (BARRETT *et al.*, 2003).

A tripanossomíase africana humana é associada a severos distúrbios nas funções do sistema nervoso, que incluem sintomas extrapiramidais e neuropsiquiátricos, alterações sensoriais e mudanças no padrão de sono do paciente. Devido a este último sintoma a patologia também é conhecida por doença do sono (KENNEDY, 2004).

O desenvolvimento da enfermidade se dá em dois estágios. Após a infecção inicial os tripanossomas permanecem localizados em uma lesão não supurativa, ou cancro, que se desenvolve no sítio da picada do inseto contaminado, levando ao estágio inicial da doença, ou estágio hemolinfático, em que o parasito dissemina-se

pelo sistema sanguíneo e linfático. Clinicamente o paciente apresenta episódios febris, dor de cabeça, linfadenopatia e possível aparecimento de erupções cutâneas. Após surgimento do primeiro estágio os protozoários passam a invadir diversos tecidos, como: baço, fígado, coração e por fim o sistema nervoso central, gerando o estágio tardio ou encefálico. Dentre os sintomas patológicos os neurológicos envolvem distúrbios mentais como: irritabilidade, falta de concentração e alterações na personalidade do enfermo. O envolvimento do sistema motor gera convulsões, espasmos musculares e em alguns casos paralisia. Com a progressão da doença o paciente torna-se indiferente ao seu ambiente e com dificuldades para despertar do sono. Pessoas infectadas não tratadas evoluem para coma e morte (RODGERS, 2009).

Apenas quatro drogas são registradas para o tratamento da tripanossomíase humana africana: pentamidina, suramina, melarsoprol e eflornitina. No entanto, todos eles têm certo nível de toxicidade. Pentamidina e suramina são normalmente utilizados na primeira fase ou no início das infecções por *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, sendo que melarsoprol é normalmente utilizado na segunda fase em ambas as formas da doença e a eflornitina é usada apenas na segunda fase das infecções *T. b. gambiense*, uma vez que foi mostrado não ser eficaz contra a doença causada por *T. b. rhodesiense* (http://www.who.int/trypanosomiasis_african/diagnosis/en/index.html). Alternativamente está sendo testada a combinação terapêutica entre eflornitina e nifurtimox contra *T. b. gambiense* em estágios tardios, apesar de essa escolha ainda encontrar-se em níveis de testes clínicos (WILKINSON & KELLY, 2009).

Em 2004 o número de casos reportados caiu para 17.616 e a estimativa era de 50.000 a 70.000 casos. Os últimos dados, de 2006, apontam para uma queda na taxa de incidência da patologia, para 11.868 novos casos (http://www.who.int/trypanosomiasis_african/en/index.html; SIMARRO, JANNIN & CATTAND, 2008). Entretanto tais indícios devem ser analisados com precaução, já que as áreas de maior contaminação estão concentradas em regiões rurais, pobres e com infra-estrutura médica ruim, o que pode implicar em obscuridade da real situação da doença (BRUN *et al.*, 2010).

Trypanosoma brucei, apesar de apresentar diversas subespécies, tem seu ciclo biológico comum a todas, intercalando entre mamíferos (homem, gado bovino, ovelha, equinos, etc) e insetos do gênero *Glossina sp.*, o que caracteriza a doença como uma zoonose (Figura 1). No intestino médio do inseto, as formas sanguíneas adquiridas do animal infectado, diferenciam-se de tripomastigotas sanguíneas para tripomastigotas procíclicas, passam então a se proliferar e dirigem-se até as glândulas salivares da mosca tse-tsé, onde permanecem livres ou fixados ao epitélio pela extremidade flagelar, e continuam a multiplicar-se ativamente, adotando a forma de epimastigotas (também denominada procíclica), não infectante aos mamíferos. No fim desta evolução, os parasitos diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, que são altamente infectantes quando inoculadas em seu hospedeiro vertebrado (homem e/ou outros animais dependendo da subespécie), onde passam a diferenciar-se em formas tripomastigotas sanguíneas, e proliferam-se, por divisão binária, do sangue a outros locais, como linfa e líquido espinhal (REY, 2001).

As formas procíclicas são longas e achatadas e apresentam o cinetoplasto na proximidade do núcleo e tem seu bolso flagelar partindo lateralmente do corpo celular, desta forma o flagelo parte longe da extremidade anterior, mas mantém-se colado à membrana do citossomo por uma prega da bainha flagelar denominada membrana ondulante. As formas tripomastigotas, em geral também são longas e achatadas, porém possuem a localização do cinetoplasto e bolsa flagelar na região posterior do citossomo, tendo então o flagelo percorrendo toda a extensão do corpo celular, aderido pela membrana ondulante. Entretanto formas sanguíneas de tripomastigotas podem apresentar-se como formas curtas e grossas, ou intermediárias, mas sempre com o mesmo posicionamento da bolsa flagelar e cinetoplasto (MATTHEWS, 2005).

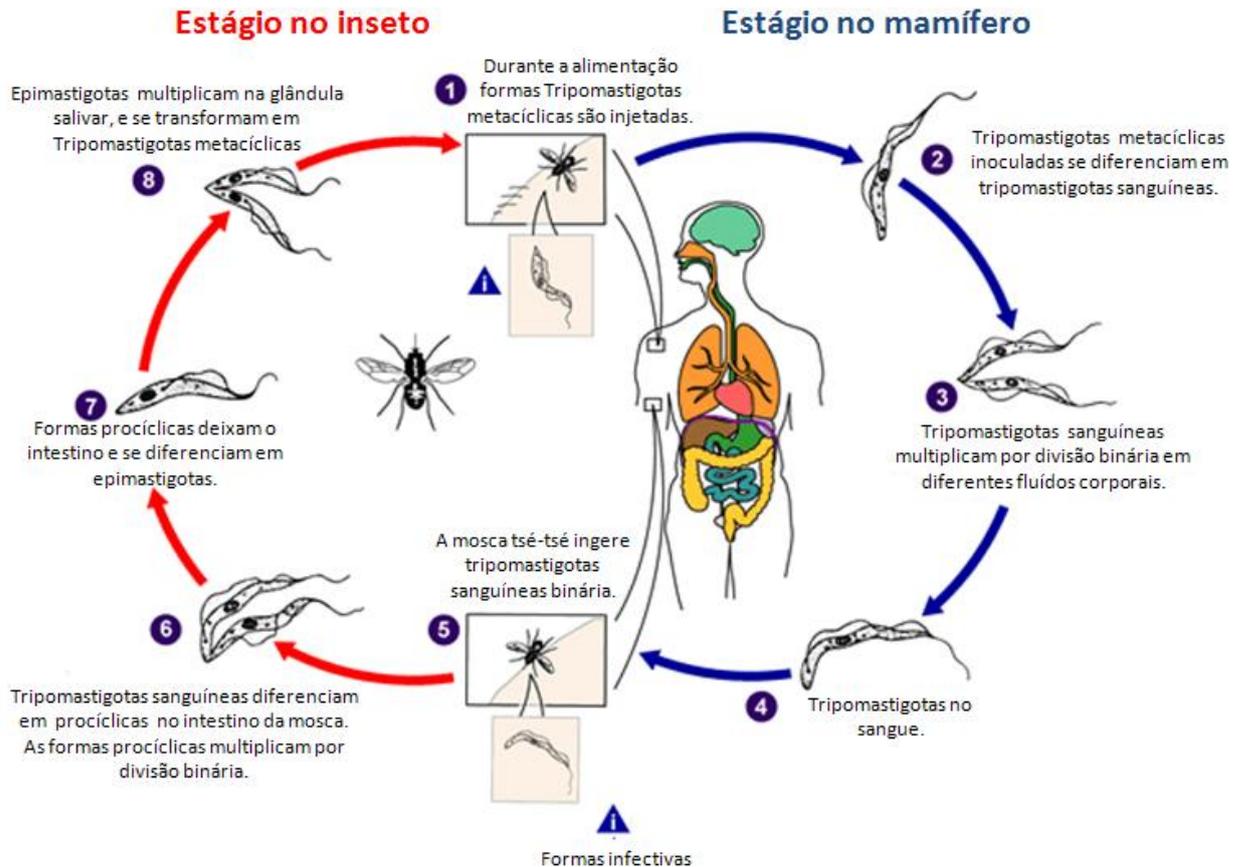


Figura 1 – Ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*.

Durante a picada do inseto, a mosca tsé-tsé infectada (*Glossina* sp.) injeta formas tripomastigotas metacíclicas no tecido epitelial do mamífero, aqui representado pelo homem. Os parasitos entram no sistema linfático e passam então à circulação sanguínea (1). Dentro do hospedeiro vertebrado, eles se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas (2) e disseminam-se pelo corpo atingindo outros fluidos corporais (p.ex., linfa e líquido espinhal), dividindo-se por fissão binária (3). Todo o ciclo de vida de *T. brucei* é representado por estágios extracelulares. A mosca tsé-tsé infecta-se ao ingerir sangue de mamíferos contaminados (4, 5). No intestino médio do inseto, os parasitos se diferenciam em formas tripomastigotas procíclicas, multiplicando-se por fissão binária (6), ao sair do intestino médio, eles se transformam em formas epimastigotas (7). Esta forma atinge as glândulas salivares do inseto e continua a se multiplicar por fissão binária (8). O ciclo no estágio do hospedeiro invertebrado dura aproximadamente 3 semanas. Seres humanos são os principais reservatórios para o *T. b. gambiense*, mas esta subespécie pode ser encontrada também em outros animais. Enquanto que animais silvestres são o principal reservatório para *T. b. rhodesiense*.

Fonte:

Adaptado de *Centers for Disease Control & Prevention / Division of Parasitic Diseases*

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Frames/S-Z/TrypanosomiasisAfrican/body_TrypanosomiasisAfrican_Page1.htm (acesso em 25/02/2010)

2.2 *Trypanosoma cruzi* E A DOENÇA DE CHAGAS

A Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é endêmica dos países do continente Americano, e tem como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, protozoário da ordem Kinetoplastida, que semelhante ao *T. brucei* apresenta como característica morfo-fisiológica marcante a presença do cinetoplasto. O *T. cruzi* pertence à família Trypanosomatidae, que parasita tanto mamíferos quanto numerosas espécies de hemípteros hematófagos da família Reduviidae (hospedeiros invertebrados) (REY, 2001).

O parasito é transmitido por insetos contaminados pelo *T. cruzi* e foi descrita por Carlos Chagas em 1909, o qual também caracteriza no mesmo trabalho características morfológicas do protista no sangue periférico, seu ciclo no tubo digestório do inseto e a forma de transmissão a seres vertebrados, identificando assim o causador, o agente transmissor e o modo de transmissão da moléstia. Entretanto, o contágio por *T. cruzi* não é exclusivamente por meio das fezes de insetos, podendo ocorrer também por transfusão sanguínea, congenitamente, transplante de órgãos parasitados e por ingestão de alimentos contaminados (TARLETON *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

O último relatório publicado pela Organização mundial da Saúde (OMS) em 2005 revela a existência de 16 a 18 milhões de indivíduos infectados e cerca de 60 milhões de pessoas sob risco de adquirir a infecção, o que ainda tem como agravante a inexistência de tratamentos quimioterápicos e vacinas eficientes para o combate da doença. As únicas drogas existentes para o combate a moléstia são benzonidazol e nifurtimox que apresentam certa eficácia apenas quando utilizadas na fase aguda de apresentação da doença, porém ambas possuem efeitos colaterais severos, requerem longo tempo de tratamento e sua eficiência de tratamento é variável (RASSI Jr, RASSI & MARIN-NETO, 2009).

Após a infecção, a doença é dividida em duas fases: uma aguda e outra crônica. Na primeira fase verifica-se parasitemia no sangue periférico dos pacientes e alguns dos sintomas são inespecíficos, como febre e inchaço dos nodos linfáticos (podendo ocasionalmente ocorrer reações inflamatórias no local de entrada do

parasito e edema inflamatório palpebral). Este estágio é seguido por uma condição crônica em que a resposta imune celular do hospedeiro limita o protozoário apenas para os tecidos do organismo infectado, porém não é capaz de erradicar o invasor. Este quadro clínico é nomeado por alguns autores como indeterminado, que pode perdurar por anos ou décadas, sustentando por demasiado tempo uma reação de inflamação, o que faz com que em 30-40% dos casos haja desenvolvimento de um ou mais sintomas da fase crônica da doença, sendo estas: cardiomiopatia Chagásica, problemas digestivos e neuropatias. A mais severa destas manifestações é a cardiomiopatia Chagásica que pode levar a falência do órgão por congestão e consequente morte do indivíduo (TARLETON *et al.*, 2007; URBINA, 2009).

A distribuição da patologia é dividida em áreas endêmicas e não endêmicas. No entanto alguns fatores como: aumento na migração populacional, novas rotas de transmissão, múltiplos vetores de transmissão e reservatórios, resistência a inseticidas e distúrbios ecológicos, geram uma alta heterogeneidade no comportamento epidemiológico de cada região. As regiões endêmicas consistem nos países da América Central e América do Sul, sendo que os vetores de transmissão para cada região são *Rhodinus prolixus* e *Triatoma infestans* (popularmente conhecido como barbeiro), respectivamente. Enquanto que os países não endêmicos são EUA, Canadá, Espanha, França, Suíça, Austrália e Japão, tendo como principal motivo para o aparecimento da moléstia a migração populacional (Revisado por LESCURE *et al.*, 2010).

O ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi* envolve estágios alternados entre hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (insetos vetores), nomeado, portanto como heteroxênico (Figura 2). Pode-se considerar 3 principais estágios de desenvolvimento do parasito, sendo estes: epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas. As formas epimastigotas são formas replicativas que habitam o intestino médio dos vetores de transmissão e se multiplicam extracelularmente, tais formas ao atingirem o intestino posterior do inseto se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas (não replicativas). As formas tripomastigotas são carregadas junto das fezes do barbeiro durante o ato de hematofagia, e são capazes de infectar o hospedeiro vertebrado atravessando fissuras na pele e a membrana de mucosas, e consequentemente invadem diferentes tipos celulares.

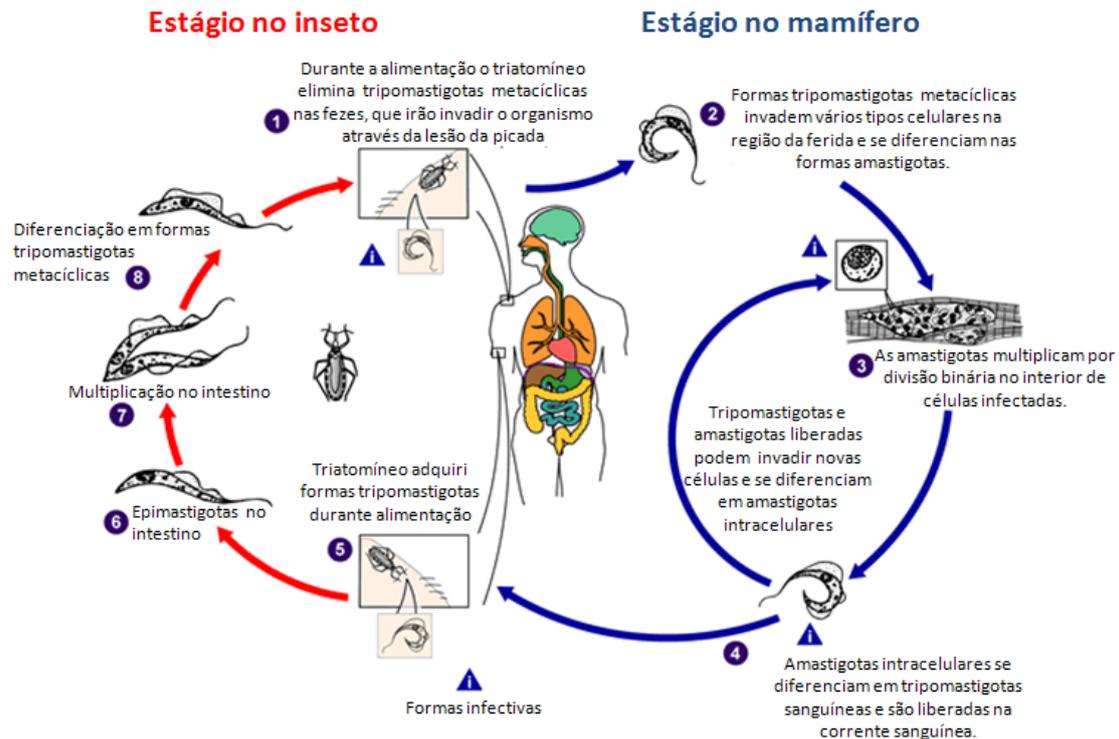


Figura 2 – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

O inseto triatomíneo infectado ao sugar o sangue do mamífero libera pelas fezes formas tripomastigotas metacíclicas próximo ao local da picada. Estas formas adentram o organismo hospedeiro pela lesão ocasionada pela picada do barbeiro ou por mucosas intactas, como a conjuntiva ①. Dentro do mamífero, as tripomastigotas metacíclicas invadem as células próximas ao local de incursão, onde se diferenciam em formas amastigotas ②. As amastigotas se multiplicam por fissão binária ③ e diferenciam-se em formas tripomastigotas e são então liberadas na corrente sanguínea como tripomastigotas sanguíneas ④. Estas formas infectam diversos tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, nos locais de infecção. As manifestações clínicas podem ser resultado deste ciclo infectivo. Diferentemente de *T. brucei* as formas tripomastigotas sanguíneas não se replicam. A replicação ocorre somente quando o parasito adentra uma célula ou é ingerido pelo inseto. O hospedeiro invertebrado contamina-se ao sugar sangue de mamíferos que contenham parasitas circulantes ⑤. As formas tripomastigotas ingeridas diferenciam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto ⑥. Os parasitos multiplicam-se no intestino médio ⑦ e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas (infectivas) no intestino posterior ⑧. O *Trypanosoma cruzi* também pode ser transmitido por transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, infecção transplacentária e por acidentes laboratoriais.

Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control & Prevention / Division of Parasitic Diseases*

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/ImageLibrary/S-Z/TrypanosomiasisAmerican/body_TrypanosomiasisAmerican_il9.htm (acesso em 11/01/2011)

Intracelularmente, estas se diferenciam em formas amastigotas, que possuem capacidade de replicação. Após eventos de divisão e rompimento da membrana celular invadida, as formas amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas (esta diferenciação também pode ocorrer intracelularmente) que podem invadir novas células ou serem adquiridas por inseto durante o ato de sucção sanguínea, reiniciando-se o ciclo biológico do *T. cruzi* (BRENER *et al.*, 2000).

2.3 ASPECTOS GERAIS DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMAS

A classe dos tripanossomatídeos, que além de *T. cruzi* e de *T. brucei* inclui o gênero *Leishmania* (agente causador da leishmaniose), apresenta não só importância do ponto de vista médico, mas também pela particularidade de vários aspectos moleculares peculiares em seu mecanismo de controle da expressão gênica que serão descritos abaixo.

Os tripanossomas têm seus genomas divididos em nuclear e mitocondrial. O *T. cruzi* (cepa CL Brener) possui um genoma nuclear de cerca de 60,3 Mb organizado em 41 pequenos cromossomos (WEATHERLY *et al.*, 2009; EL-SAYED *et al.*, 2005), enquanto que *T. brucei* apresenta 11 cromossomos longos, totalizando 26 Mb (BERRIMAN *et al.*, 2005). Já o genoma mitocondrial é composto por concatâmeros de milhares de minicírculos (0,5 a 2,5 Kb) e algumas dúzias de maxicírculos (20 a 40 Kb). Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente análogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, e codificam para rRNAs e subunidades do complexo respiratório. Por outro lado, os minicírculos codificam para RNAs guias que promovem modificação nos transcritos provenientes dos maxicírculos, por meio de extensivas inserções ou deleções de resíduos de uridina em um processo nomeado editoração (edição) de RNA, alterando-se desta forma a fase de leitura destes transcritos (STUART & PANIGRAHI, 2002; DE SOUZA, ATTIAS & RODRIGUES, 2009).

O genoma nuclear dos tripanossomatídeos está organizado em grandes agrupamentos policistrônicos, onde dezenas a centenas de genes codificadores para proteínas estão arranjados sequencialmente na mesma fita de DNA, podendo

ser transcritos em divergência (na direção do telômero) ou em convergência (contrário ao telômero). Tal padrão foi encontrado inicialmente em *Leishmania major* (MYLER *et al.*, 1999), e confirmados em *T. brucei* e *T. cruzi* com a publicação de seus respectivos genomas. Nestes trabalhos também foi descrito que os genes de uma mesma unidade policistônica não estão relacionados entre si, não fazendo parte de uma mesma via metabólica (para uma revisão: MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2009).

Sendo a transcrição policistônica nestes organismos, há inicialmente formações de pré-mRNAs que necessitam de maturação para formar unidades funcionais de leitura. A maturação destes transcritos primários ocorre por dois processos, conhecidos por *trans-splicing* e poliadenilação, ao qual no primeiro, por meio de duas reações de transesterificação há adição de uma estrutura de aproximadamente 39 nucleotídeos, nomeada mini-exon ou sequência líder (do inglês, *splice leader*), na extremidade 5' do RNA. Ambas as reações são interdependentes e ocorrem em conjunto (LEBOWITZ *et al.*, 1993) por meio do reconhecimento de um dinucleotídeo AG adjacente a uma região rica em polipirimidina, desta forma, o reconhecimento deste sinal faz com que seja adicionada a sequência líder a um gene específico e que a cauda poli-A seja adicionada ao gene a montante deste gene, porção 3' (TEIXEIRA & DAROCHA, 2003; CLAYTON & SHAPIRA, 2007).

Outra característica peculiar é o fato de que grande maioria dos genes em tripanossomatídeos não possui introns, sendo que o processo de *cis-splicing*, o qual promove retirada desta sequência da molécula de RNA, foi encontrada apenas no gene que codifica para poli(A) polimerase (MAIR *et al.*, 2000). Similarmente foi encontrado um único isotipo dos genes de tRNA, RNA transportador para tirosina, que contém um intron em sua sequência (PADILLA-MEJÍA *et al.*, 2009; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2009).

No que se diz respeito aos 3 tipos de polimerases de RNA (RNA pol. I, II e III) descritos em eucariontes superiores, todos já foram identificados e descritos em tripanossomatídeos (DAS, BANDAY & BELLOFATTO, 2008), bem como regiões promotores para polimerase do tipo I e III, entretanto não foi possível identificar regiões promotores conhecidas para RNA pol II, com exceção de um promotor para

o gene que codifica para a sequência líder (*spliced leader*, ou mini-exon) (GILLINGER & BELLOFATTO, 2001). No entanto ativação da transcrição de genes por modificações estruturais, acetilações, em histonas já foram descritos em *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. (THOMAS *et al.*, 2009; SIEGEL *et al.*, 2009; RESPUELA *et al.*, 2008).

O *T. brucei*, mais especificamente, apresenta variações em suas condições no processo de transcrição, o qual ocorre pela RNA polimerase II e I, para os genes constitutivos de manutenção de funções celulares básicas e genes envolvidos na expressão de proteínas de superfície, respectivamente. Entre as proteínas de membrana estão as glicoproteínas variantes de superfície (VSGs – do inglês *variant surface glycoproteins*), que são codificadas por uma família multigênica (aproximadamente 1.000 genes) cuja expressão é controlada pelo mecanismo de variação antigênica de formas sanguíneas que permite a expressão de apenas uma das cópias por vez (GLOVER & HORN, 2006). O processo de variação antigênica é um fenômeno clássico de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, sendo descrito posteriormente fenômeno similares em outros organismos como *Plasmodium falciparum* e *Giardia lamblia* (FIGUEIREDO & SCHERF, 2005; PRUCCA *et al.*, 2008). Por outro lado, quando o parasito diferencia-se em formas procíclicas (forma presente na mosca tsé-tsé), sua camada de superfície logo é alterada para a presença de proteínas repetitivas denominadas conjuntamente prociclinas, sendo que EP (contêm repetições do dipeptídeo ácido glutâmico e prolina) e GPEET (contêm pentapeptídeo repetitivo). Estas também são conhecidas como PARP (do inglês *procyclic acid repetitive proteins*). Apesar de estas proteínas serem de superfície e alternarem em expressão ao longo do ciclo de vida, ambas as classes localizam-se em regiões genômicas diferentes, sendo as VSGs encontradas em regiões sub-teloméricas e as prociclinas em regiões intragenômicas, posicionadas em repetições. A variação na expressão destas proteínas evidencia a importância do sistema de maturação e processamento das moléculas de RNA mensageiro neste organismo (NAVARRO, PEÑATE & LANDEIRA, 2007).

É importante ressaltar que o mecanismo de RNAi (RNA de interferência), descoberto por Fire *et al.* (1998) em *Caenorhabditis elegans*, o qual corresponde ao silenciamento de genes guiado pela complementaridade de bases entre RNAs pequenos (siRNAs), gerados pelo fenômeno, e o mRNA alvo, também foi descrito

em alguns Tripanossomatídeos, tais como: *T. brucei* (NGO *et al.*, 1998), *Trypanosoma congolense* (INOUE *et al.*, 2002) e *Leishmania braziliensis* (subgênero *Viannia*) (LYE *et al.*, 2010). Este mecanismo teve grande impacto no que se diz respeito à caracterização dos genes de *T. brucei*, já que nos três primeiros anos de descoberta do fenômeno (1998 a 2001), pelo menos 17 genes foram estudados pelo bloqueio de expressão. Adicionado a isto, com o avanço da era genômica, o sequenciamento do genoma de *T. brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005) gerou uma enorme quantidade de informações de sequências, que desde então tem sido utilizada para elucidação da função de genes por meio do RNAi. Contudo, para se realizar estudos de genômica funcional em um organismo também é necessário ter como ferramenta sistemas de expressão bem regulados para superexpressão ou complementação ou até mesmo para expressão de genes de outros organismos bem desenvolvidos.

Ademais o fenômeno de RNAi está ausente em outros tripanossomatídeos, tais como, *T. cruzi* (DAROCHA *et al.* 2004), *L. major* e *L. donovani* (ROBINSON & BEVERLEY 2003) (revisado por ULLU & CHAKRABORTY, 2004) devido ausência de genes da maquinaria de silenciamento em seus genomas. Desta forma, os estudos de genômica funcional nestes organismos ficam ainda mais dependentes de sistemas de regulação da expressão gênica eficientes.

2.4 SISTEMAS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMAS

Em estudos de genômica funcional em Tripanosomatídeos tem sido utilizados tanto vetores para expressão transiente, onde usualmente de 3 a 48 horas após a introdução do DNA (transfecção) os transfectantes são analisados, sem ocorrer seleção por marca de resistência, quanto estável, que na maioria dos casos são construções que promovem integração em regiões específicas do genoma por recombinação homóloga, utilizando DNAs lineares (DAROCHA *et al.*, 2004; GHEDIN *et al.*, 1998; WIRTZ, HOEK & CROSS, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 1999). No caso de *T. cruzi* e *Leishmanias*, que não apresentam a maquinaria de RNAi, os vetores que são mantidos de forma epissomal (extra-cromossômica) após terem sido selecionados

na presença de drogas específicas (KELLY *et al.*, 1992). As características básicas desses vetores, é que parte da sua informação é para manutenção em *E. coli* (plasmídeos comerciais), sendo que a parte responsável pela manutenção no parasito contem: região codificadora de gene de resistência (p. ex.: NeoR, HigoR e PhleoR) com regiões regulatórias 5' e 3' intergênicas (UTR + regiões contendo as polipirimidinas) de genes constitutivos de alta expressão (p.ex.: actina, GAPDH), região de clonagem do gene de interesse flanqueada por regiões regulatórias 5' e 3' intergênicas de genes regulados de acordo com o interesse na expressão, e por último, regiões para a recombinação gênica no caso de vetores integrativos. Para expressão do gene de interesse tem sido utilizado diferentes regiões regulatórias, por exemplo, 3' intergênica de amastina (glicoproteína de superfície preferencialmente expressa em formas amastigotas) de *T. cruzi* e de *Leishmania* foi utilizado para expressão de gene marcador (GFP – *Green Fluorescent Protein*) e gene suicida em formas amastigotas (GHEDIN *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 1999). Nestes sistemas de expressão o pesquisador não tem como interferir de forma mais eficiente para controlar a expressão.

Um importante passo para o desenvolvimento de sistemas de expressão regulados em diversos organismos foi a descoberta de T7 RNA polimerase (T7RNAP) em 1970 por Chamberlin e colaboradores ao verificarem a presença de outra RNA polimerase em *Escherichia coli* infectadas com fagos T7, que não a da própria bactéria. Vários estudos posteriores contribuíram para elucidar vários aspectos da natureza desta enzima. A T7RNAP é uma proteína de 98 KDa, proveniente do bacteriófago T7 que apresenta domínio de polimerização homólogo ao da família da DNA Polimerase I, não correlacionado com as multi-subunidades das polimerases de RNA. Além disso, possui em sua porção N-terminal uma estrutura única, de aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, responsável pelo reconhecimento de seu promotor de iniciação. Esta estrutura assume diferentes conformações estruturais durante o reconhecimento do promotor e ao longo do processo de transcrição, formando um túnel por onde o ácido ribonucléico nascente emerge e só é dissociado da enzima quando a transcrição tem seu fim. Tendo assim, o *promoter clearance* e a alta processividade de reação da enzima, explicado pela sua estrutura, composta por uma subunidade de seis alfa-hélices, um *loop*

específico e um domínio H, e suas alterações ao longo do processo (Revisado por STEITZ, 2009).

Devido sua elevada processividade, e não necessidade de fatores adicionais, diversas pesquisas têm buscado a transgenia de T7RNAPol em eucariotos para superexpressão de proteínas evitando a utilização de promotores do próprio organismo. Em 1998, Wirtz, Hoek e Cross publicaram um artigo revelando a criação de linhagens de *T. brucei* que contêm genes para expressão de T7 RNA polimerase e proteína repressora de tetraciclina (TetR), como por exemplo a linhagem 29:13. Essas linhagens permitem a expressão gênica regulada, utilizando-se cassetes contendo genes de interesse sob regulação de promotores para T7RNAP (promotor T7) regulado por operadores para o repressor de tetraciclina (TetR). Demonstrando assim, um sistema de expressão controlado pela presença da tetraciclina e com expressão de proteínas de 200 a 1000 vezes maior do que utilizando promotores inerentes ao tripanossomatídeo (RNA polimerase II), tanto em suas formas sanguíneas quanto procíclicas.

Posteriormente o mesmo sistema de expressão e regulação foi utilizado em estudos de nocautes de genes em *T. brucei* (WIRTZ *et al.*, 1999), geração de RNA dupla fita (dsRNA) para silenciamento gênico utilizando-se maquinaria de RNA de interferência (RNAi) neste mesmo tripanossoma (LACOUNT *et al.*, 2000).

Este sistema de expressão regulado por T7RNAP/TetR também foi transferido para *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma cruzi* (INOUE *et al.*, 2002; DAROCHA *et al.*, 2004; TAYLOR & KELLY *et al.*, 2004). Sendo que a modulação alcançada para formas epimastigotas de *T. cruzi*, utilizando-se como gene repórter o gene de luciferase, foi de 25 a 37 vezes no aumento da expressão protéica na presença de tetraciclina, quando comparadas com situações de ausência do antibiótico, para os trabalhos de DaRocha e colaboradores (2004) e Taylor e Kelly (2004), respectivamente.

Apesar desse sistema de expressão ser aplicável em várias situações, deve-se ressaltar que a expressão regulada pelo repressor de tetraciclina apresenta vazamento (WIRTZ, HOEK & CROSS, 1998; DAROCHA *et al.*, 2004; TAYLOR & KELLY, 2006), que pode comprometer os estudos em parasitos como *T. cruzi* que não obtiveram grande taxa de regulação. Por exemplo, Barrett, LaCount & Donelson,

2004, constataram que a expressão de Cre recombinase mesmo na ausência do indutor tetraciclina era suficiente para comprometer a viabilidade das culturas, uma vez que esta recombinase parece ser tóxica a diversos tipos celulares. Desta forma decidimos testar em tripanossomas sistemas adicionais de controle da expressão regulada, mas também por ribozima sensível a metabólito ou de DD (domínio desestabilizador).

2.5 MECANISMOS DE REGULAÇÃO GÊNICA POR MOLÉCULAS DE RNA (RIBOZIMAS E *RIBOSWITCHES*)

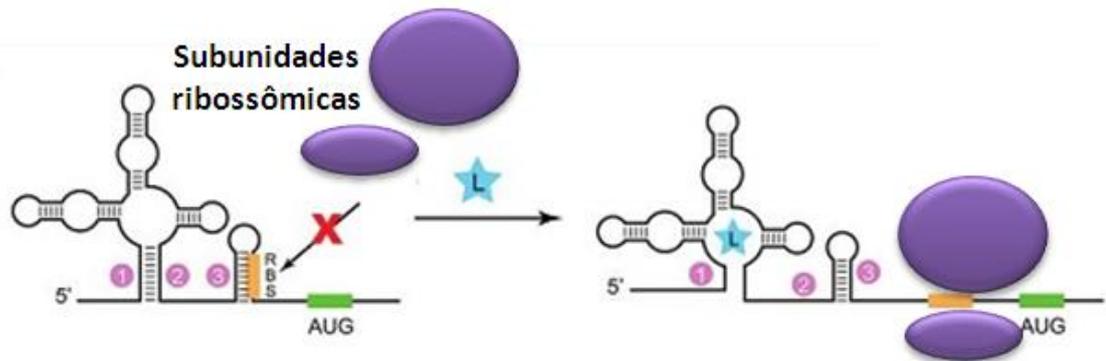
Ao longo dos últimos 40 anos, as moléculas de RNA têm ganhado espaço no que se diz respeito ao descobrimento de sistemas de regulação das funções celulares. Antes consideradas apenas como intermediários entre o código genético e a formação de proteínas, pelo pilar central da biologia molecular, agora envolvidas em controle de expressão gênica, em nível de transcrição e tradução seja em organismos procariontes ou eucariontes.

Dentre uma infinidade de moléculas de RNAs capazes de atuar como enzimas ou como sensores no processo de monitoração do ambiente podemos citar as ribozimas, que estão divididas em ribozimas de clivagem, que em ação *cis* ou *trans* atuam em moléculas de RNA, sejam elas, transportadores ou mensageiros, e ribozimas de *splicing*, que como o próprio nome sugere, tem sua ação, em *cis*, na excisão de introns na sequência de mRNAs, necessitando as vezes da presença de co-fatores e outras moléculas como água, proteínas e nucleosídeos (revisado por SERGANOV & PATEL, 2007). Além das ribozimas, há também a presença dos “RNA switches”, também conhecidos como *riboswitches*, que são oligoribonucleotídeos presentes em alguns RNAs mensageiros que possuem uma sequência complexa que leva à formação de uma estrutura capaz de reconhecer metabólitos, tão especificamente quanto às proteínas. Grande maioria dos *riboswitches* foi descrita em procariontes, e usualmente têm seu modo de ação em *cis*, atuando na regulação da expressão de genes tanto em nível de transcrição quanto de tradução (WINKLER & BREAKER, 2005). A ação durante a transcrição

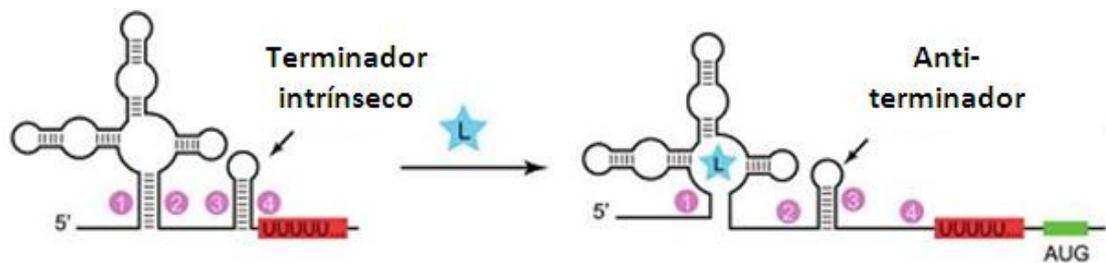
implica na formação, ligante dependente de uma estrutura de terminação ou de anti-terminação na molécula de RNA, impedindo ou permitindo a continuidade do processo de transcrição, respectivamente. Enquanto que no nível traducional as mudanças conformacionais da molécula exibem ou escondem a sequência de sítio de ligação ao ribossomo (RBS – do inglês *Ribosome Binding Site*), também conhecida como sequência de Shine-Dalgarno, alterando a taxa de tradução de um determinado mRNA. Naturalmente o sistema de regulação por influência na transcrição ocorre principalmente em bactérias Gram-positivas, enquanto que na tradução ocorre nas Gram-negativas. Tal comportamento não é restrito a cada classe de bactérias e as moléculas de *riboswitches* apresentam flexibilidade, podendo ter sua função intercambiada entre estas eubactérias. Além destes dois mecanismos de atuação, os *switches* de RNA podem promover estabilização ou clivagem de sua própria estrutura quando da presença ou ausência de seu ligante específico (Figura 3) (revisado por TOPP & GALLIVAN, 2010).

A descoberta dos *riboswitches* se deu no início dos anos 2000 em estudos onde não foram identificadas proteínas envolvidas no processo de regulação gênica em *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, mas sim do controle por moléculas de RNA, que reconheciam compostos de Flavina (Flavina Monocucleotídeo, FMN e Flavina Adenina Dinucleotídeo, FAD) ou de coenzima B₁₂ para o controle de expressão do gene *btuB*, respectivamente (NAHVI *et al.*, 2002; revisado por RANTL, 2004). Em relação à sua distribuição filogenética, todas as classes de *riboswitches* endógenos estão presentes em eubactérias, com exceção ao *riboswitch* sensível à Tiamina Piro-Fosfato (TPP), que foi encontrada em *archaea* e em eucariotos (WACHTER, 2010). Os *riboswitches* estão geralmente presente na região 5'UTR (do inglês, *Untranslated Regions*, regiões não traduzidas) dos mRNAs que controlam, podendo estar também em regiões 3'UTR, como ocorre em algumas espécies de algas diatomáceas, musgos e plantas superiores. Sua estrutura é composta por um aptâmero e uma plataforma de expressão. O primeiro é responsável pelo reconhecimento e ligação

A)



B)



C)

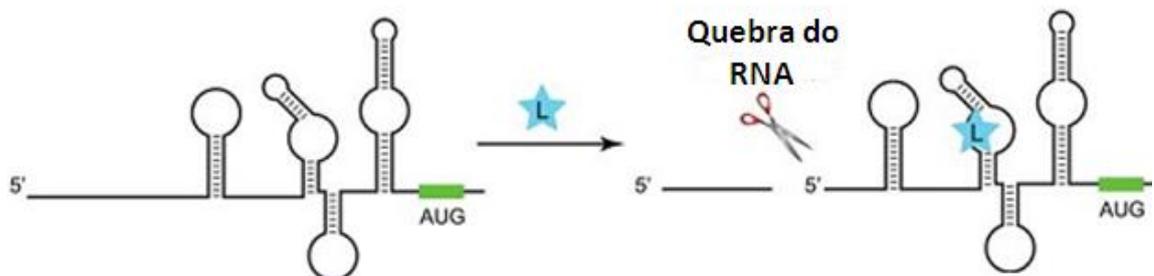


Figura 3 – Mecanismos de ação de alguns *Riboswitches*. No *painel A* é mostrado o modo de ação do *riboswitch* onde a sequência de ligação ao ribossomo é exposta devido a formação de pareamento de bases entre as regiões 2 e 3 a montante da mesma devido a interação com o ligante (L). Em *B*, a formação de um terminador prematuro de transcrição (grampo das regiões 3 e 4 + poli-U) é impedido pela associação ao ligante que forma um grampo de 2 e 3. Em *C*, a clivagem do RNA induzida pela ligação ao RNA reduz a expressão gênica.

Fonte: Adaptado de TOPP & GALLIVAN 2010.

ao metabólito específico, e devido esta característica possui uma sequência nucleotídica e estrutura secundária altamente conservada, entretanto este mesmo fato não implica em modos de ação iguais entre aptâmeros que reconhecem o mesmo ligante. A segunda tem participação em gerar a resposta ocasionada pelo primeiro, e apresenta um alto grau de variação, até mesmo entre espécies próximas, o que reflete na diversidade de sua função e modo de ação (MANDAL & BREAKER, 2004). Além disso, os *riboswitches* são discriminados em duas classes. Os *riboswitches* de classe I, no qual o bolsão de ligação do aptâmero ao ligante está restrito a um único sítio e a estrutura do RNA é altamente pré-moldada. Nesta classe, a ligação ao metabólito acarreta em poucas mudanças conformacionais na estrutura do aptâmero. Em contraste, os de classe II têm seu bolsão de ligação biparticionado e uma mudança global em sua arquitetura ocorre ao se ligarem à molécula específica (WACHTER, 2010).

De uma maneira geral os *riboswitches* são regulados por moléculas relacionadas ao gene a qual controlam, promovendo uma resposta *feedback* ao processo de regulação. O estudo dessas moléculas não apenas contribui para a elucidação dos processos de expressão gênica naturais dos organismos, como também possibilita a montagem de novas moléculas de *riboswitches* capazes de serem inseridas em organismos para atuarem como ferramenta de genômica funcional, na regulação da expressão de genes de interesse. Além destas situações, descobriu-se que alguns antibióticos, que anteriormente não possuíam o mecanismo de ação estabelecido, podem agir em parte, sobre as estruturas dos *switches* de RNA (BLOUNT & BREAKER, 2006). Por fim, descobriu-se a existência e, portanto a oportunidade de se arquitetar *riboswitches* com mais de um aptâmero, para que estes atuem conjuntamente atingindo uma regulação digital, fazendo com que haja respostas diferenciadas pela presença de um ou dois ligantes (revisado por TOPP & GALLIVAN, 2010).

Em 2007, Win & Smolke publicaram um trabalho demonstrando uma plataforma inédita para regulação pós-transcricional da expressão gênica em leveduras. Tal sistema foi construído utilizando-se como elemento regulatório uma molécula de ribozima “cabeça de martelo” (do inglês, *hammerhead ribozyme*) por apresentar uma rápida cinética de auto-clivagem, constatada em diversos organismos, além de ser uma estrutura pequena e de fácil manejo.

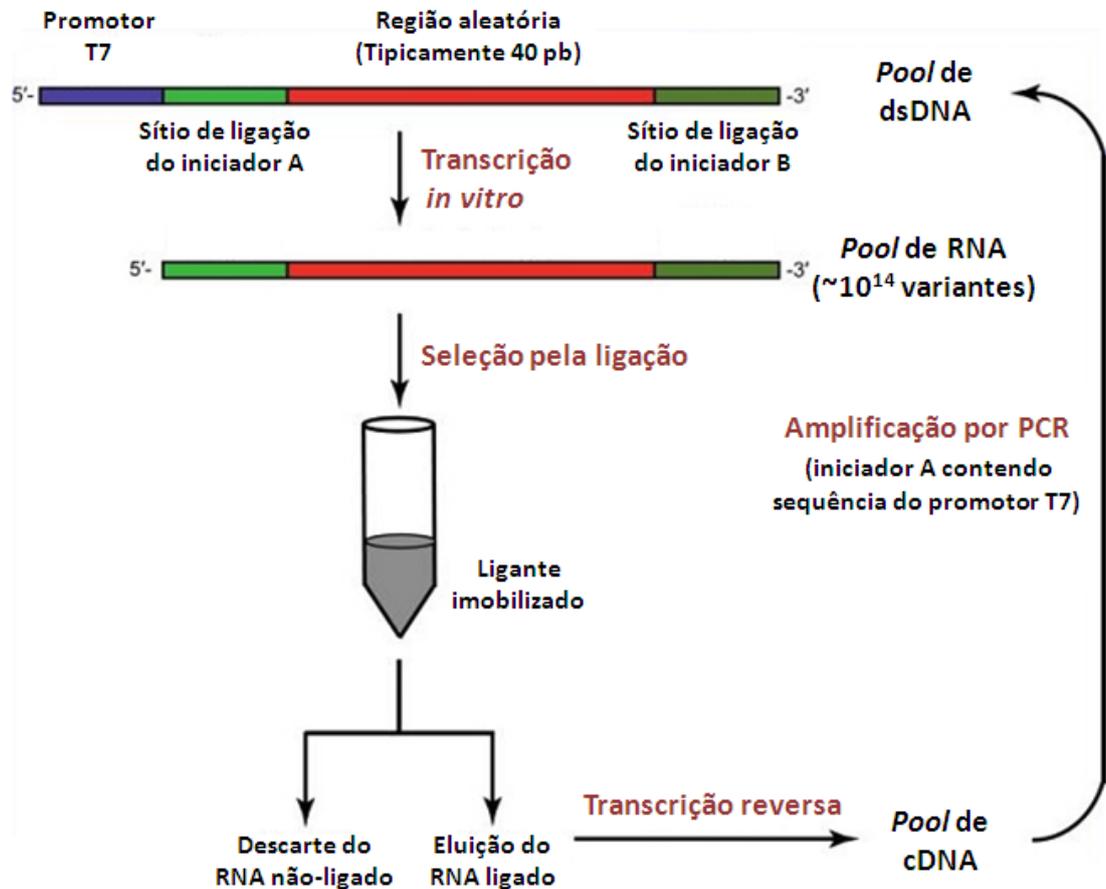


Figura 4 – Esquema de seleção de aptâmeros por SELEX.

Sequências aleatórias de RNA são geradas por transcrição *in vitro* a partir de uma biblioteca genômica, gerando-se um *pool* de RNA. Este *pool* é inserido em uma coluna de afinidade contendo o antibiótico de interesse para seleção. A coluna é então lavada para que apenas as moléculas que se ligaram ao ligante (metabólito) permaneçam na coluna. Os RNAs ligados são eluídos com uma solução do mesmo ligante que se encontra na matriz e passam por processo de transcrição reversa gerando-se um *pool* de cDNA. Para se obter moléculas ligadoras ao ligante por alta afinidade este *pool* de cDNA é amplificado e submetido à vários ciclos de seleção (enriquecimento). Este sistema de seleção de RNAs pode ser utilizado para um amplo tipo de pequenas moléculas, como ATP e *prions*.

Fonte: Adaptado de TOPP & GALLIVAN, 2010.

Foram acopladas a esta ribozima aptâmeros selecionados pelo sistema SELEX (do inglês, *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Sistema este que se baseia em seleção de moléculas de RNA em uma mistura de RNAs com sequências aleatórias que possuam afinidade ao metabólito de interesse imobilizado covalentemente em uma coluna (Figura 4). Tais componentes (aptâmero e ribozima) foram inseridos na porção 3'UTR do gene *his5* (necessário para a biossíntese de histidina) e ilhados por sequência espaçadoras a fim de se minimizar alterações pelo ambiente em que foram inseridas e melhorar sua portabilidade entre organismos.

A partir do sistema mencionado no parágrafo anterior, Win e Smolke criaram uma série de módulos reguláveis que na presença ou ausência do ligante (a saber, um regulado por teofilina e outro por tetraciclina) podem permitir ou inibir a auto-clivagem da ribozima cabeça de martelo (ROSSI, 2007). Tal estrutura foi nomeada de “*ribozyme switch*” e parte do mesmo princípio dos *riboswitches* (Figura 5).

Além disso, duas formas de transmissão de informação entre o aptâmero e a ribozima foram testadas (uma baseada no deslocamento da fita de RNA e outra no deslizamento da fita de ácido ribonucléico). A primeira consiste em duas formas estruturais da molécula de RNA que estão em equilíbrio, e em apenas uma delas o sítio catalítico é funcional, e a ligação do metabólito ao aptâmero favorece uma das formas. A outra se baseia na propriedade de movimentação local de bases no RNA, o que faz com que pequenas mudanças na estrutura local sejam propagadas ao longo da molécula. A presença do ligante faz com que haja este “escorregamento” e o sítio catalítico tenha sua estrutura remodelada. Apesar das duas formas testadas apresentarem níveis de repressão da expressão gênica muito próxima, quando testados com GFP (entre 17 e 18 vezes), o sistema que se baseia no deslocamento da fita de RNA foi o escolhido entre os dois, por apresentar menores alterações funcionais quando sequências da “*ribozyme switch*” são modificadas, a fim de testar qual apresenta melhor modulação (WIN & SMOLKE, 2007; ROSSI, 2007).

Devido à potencialidade deste sistema, decidimos, portanto, combinar as plataformas de “*ribozyme switch*” sensível a tetraciclina (WIN & SMOLKE, 2007) com construções que permitem o controle da expressão de genes ao nível transcricional por promotores que são regulados por repressor de tetraciclina (WIRTZ *et al.*, 1999)

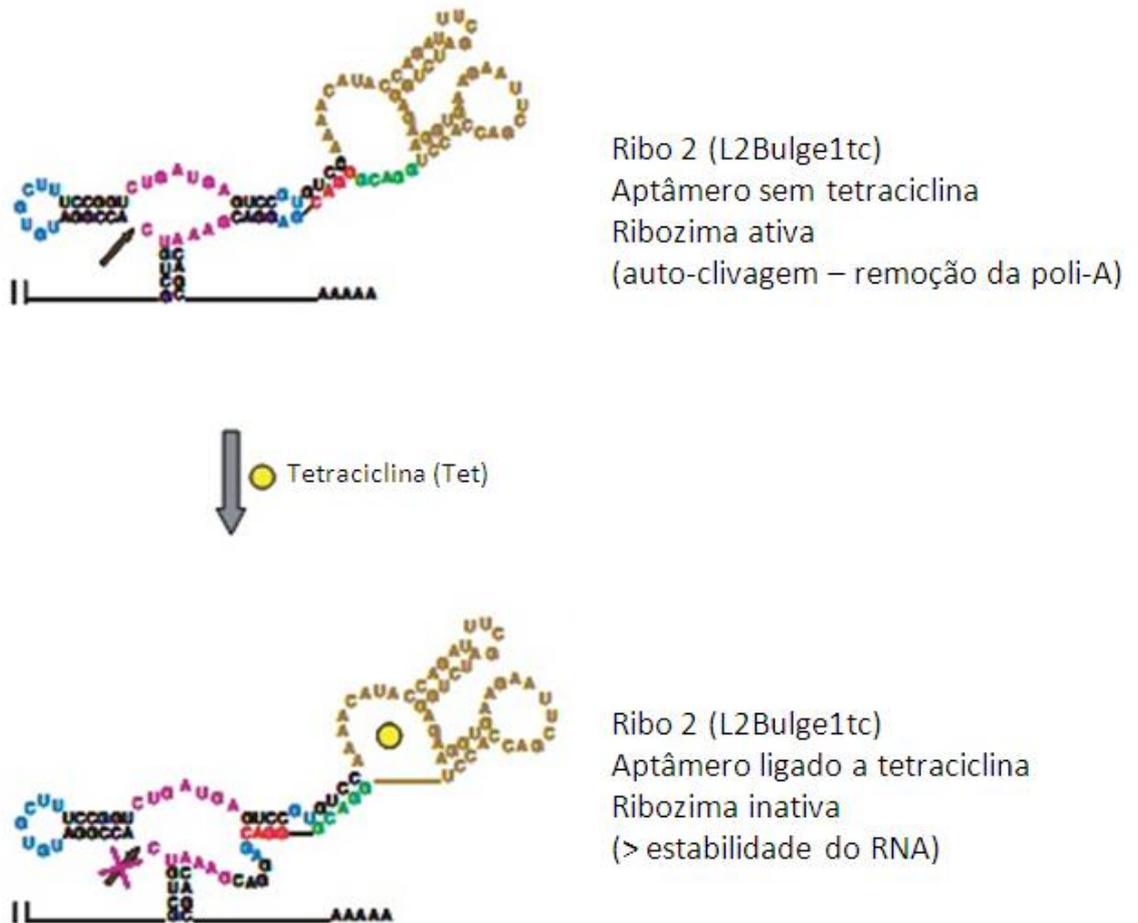


Figura 5 – Representação da estrutura e funcionamento do *Riboswitch* regulado por tetraciclina.

A estrutura do *riboswitch* encontra-se inicialmente em sua forma ativa, ou seja, na ausência de indutor o sítio catalítico promove clivagem da estrutura fazendo com que a cauda poli-A do mRNA seja removida, o que direciona o ácido ribonucléico para degradação. Na presença de tetraciclina, a ligação do aptâmero a mesma promove alteração da estrutura da molécula de *riboswitch*, fazendo com que o sítio catalítico assuma outra conformação estrutural, impedindo a clivagem do mRNA e inativando a ribozima. Desta forma, o mRNA mantém sua estabilidade podendo ser traduzido. A sequência em roxo representa o sítio catalítico. A sequência em amarelo representa o aptâmero de reconhecimento à tetraciclina. As sequências em azul são estruturas chamadas de *bulge*, necessárias para a arquitetura da molécula de *riboswitch*, e conseqüentemente de sua função. O sítio de clivagem do mRNA é apontado pela flecha escura.

Fonte: Adaptado de WIN & SMOLKE, 2007.

a serem testados em *Trypanosoma brucei*. Ou utilizar esta estrutura no controle da expressão em *T. cruzi*, utilizando vetor de expressão gênica constitutiva.

Optamos por ribozima sensível a tetraciclina, a fim de minimizar a interferência de mais um fator no metabolismo celular, uma vez que tetraciclina já é utilizada no controle transcricional. Como já descrito por Deans e colaboradores (2007) o controle da expressão em mais de um nível permite um melhor ajuste nos níveis da proteína desejada.

2.6 REGULAÇÃO GÊNICA POR DOMÍNIO DESESTABILIZADOR (DD)

Em busca de outros sistemas de manipulação da expressão por fatores exógenos independente de modificação gênica para expressão de proteínas adicionais (por exemplo moléculas repressoras) encontramos uma plataforma, que diferentemente das descritas em *T. brucei* e *T. cruzi*, atua em nível pós-traducional. Seu funcionamento ocorre pela fusão de uma proteína de interesse a um polipeptídeo conhecido como Domínio Desestabilizador (DD), que se não estabilizado por algum ligante específico direciona o peptídeo de fusão ao complexo de degradação ubiquitina-proteossomo, influenciando assim a concentração proteica dentro da célula.

O sistema inicialmente descrito por Banaszynski e colaboradores (BANASZYNSKI *et al.*, 2006) utiliza-se desta metodologia, tendo como domínio desestabilizador o polipeptídeo FKBP12, proveniente da família de proteínas mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*), que assume conformação estável quando na presença de rapamicina ou de um análogo (Shld1) (Figura 6). Tal sistema foi utilizado para estudo de função proteica em organismos como *Plasmodium falciparum* (ARMSTRONG & GOLDBERG, 2007), onde o sistema foi utilizado para testes com gene repórter da proteína amarelo fluorescente, YFP (do inglês, *yellow Fluorescent Protein*) e funcionalmente para o gene endógeno de falcipaina-2, demonstrando regulação modulada para ambos os genes com diferença estatística para os padrões demonstrados nos ensaios de *Western blot* para YFP, e contagem



POI = *Protein Of interest* (Proteína De Interesse)
 DD = Domínio Desestabilizador

Figura 6 – Modelo de regulação da expressão gênica utilizando domínio desestabilizador (DD).

A fusão genética de uma proteína de interesse (POI) ao polipeptídeo conhecido como Domínio Desestabilizador (DD) faz com que após os processos de transcrição tradução a proteína fusionada seja instável, promovendo direcionamento da mesma à degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo. Quando na presença de ligante, aqui representado pela rapamicina, ou análogo, o polipeptídeo DD é estabilizado e conseqüentemente a proteína não é direcionada à degradação, mantendo-se em suas concentrações celulares normais.

Fonte: Adaptado de BANASZYNSKI *et al.*, 2006

diferencial de parasitos contendo fenótipo negativo para o gene testado (vacúolo alimentar inchado) em concentração de 0,5 μM de indutor (Shld1).

O mesmo sistema também foi avaliado em *Toxoplasma gondii* (HERM-GOTZ *et al.*, 2007), onde foi testado para os genes repórteres de GFP e YFP com DD fusionada nas porções C e N-terminal, respectivamente. Ademais os genes funcionais da proteína motora TgMyoA e duas versões de proteínas- G, Rab1 e Rab1 A, também foram testados. Os resultados demonstram novamente eficiência de regulação com doses de 1 μM para YFP e os genes funcionais e 3 μM para GFP, além de se provar útil na modulação da expressão de genes com características dominante-negativas, como no caso do homólogo de Rab1 A (a proteína Rab1 A DN), que em presença de Shld1 diminui infectividade do parasito (fenótipo negativo), fato não constatado na presença do indutor.

Mais recentemente o sistema de regulação da expressão gênica por DD foi descrito em duas espécies de *Leishmanias*, *L. major* e *L. braziliensis* (MADEIRADASILVA *et al.*, 2009), testando-se a modulação por fusão de DD à porção N-terminal da proteína YFP e de genes endógenos de proteínas glicoconjugadas lipofosfoglicanas (LPG). Além de demonstrar variação na taxa de fluorescência do gene repórter com baixos níveis de expressão na ausência do indutor, verificou-se presença de fenótipos celulares esperados quando na ausência (susceptibilidade à lise celular pelo sistema complemento) e presença de Shld1 que garantiu resistência à lise nas concentrações de 1 μM de indutor. Demonstrando-se assim, um sistema robusto de regulação dose-dependente com baixa taxa de expressão na ausência do indutor.

3 - JUSTIFICATIVA

Os protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são organismos comumente estudados devido sua importância no campo da medicina, uma vez que são agentes causadores da doença de Chagas e doença do sono, respectivamente. Ambas as doenças assolam milhares de pessoas, tendo como área endêmica a América Latina para doença de Chagas, e a África subsaariana para doença do sono. Além disso, novos casos vêm sendo descritos em áreas consideradas não endêmicas, como por exemplo, em alguns países europeus como Espanha e Itália. Ademais, esses organismos pertencem a uma classe denominada tripanossomatídeos, que apesar de eucariontes apresentam peculiaridades em seus aspectos biomoleculares.

No que se diz respeito ao foco biomolecular de estudo destes parasitos, a genômica funcional vem a contribuir para explicação de funções gênicas e mecanismos de regulação da expressão de genes. Na tentativa de elucidação da função dos genes alguns plasmídeos foram criados com o intuito de funcionarem como mecanismos que regulem a expressão de genes constitutivos do parasito, podendo ser integrados ao genoma do mesmo. Um exemplo para este tipo de abordagem é a utilização de promotores regulados por operadores de tetraciclina para regulação da transcrição do gene de interesse. Essa forma de regulação está presente em vetores de expressão gênica tanto para *T. brucei* (WIRTZ *et al.*, 1999) como para *T. cruzi* (DAROCHA *et al.*, 2004; TAYLOR & KELLY, 2006). Entretanto pode se verificar que esses sistemas de regulação não apresentam um controle fino de sua expressão, uma vez que mesmo quando o sistema está reprimido (ausência de tetraciclina), pode-se detectar níveis do produto da expressão do gene que está sendo regulado. Além disto, é necessária a modificação prévia dos organismos para expressão dos componentes presentes no sistema de regulação, que estão ausentes no tripanossoma. A necessidade de alteração prévia do parasito faz com que o estudo em cepas com características específicas, como virulência diferenciada e/ou resistência à drogas, fica limitada. Ademais, tem-se verificado que a manipulação e ou manutenção em meios de cultivo por um longo período de tempo pode alterar algumas características do organismo de estudo, como por exemplo, a patogenicidade do parasito.

Desta forma decidimos aprimorar o sistema de regulação por operadores de tetraciclina, ao aliar mais uma forma de controle de expressão. O mecanismo escolhido foi o de *riboswitches*, ao qual utilizamos as moléculas de RNA *switches* descritas por Win e Smolke em 2007, que modulam a estabilidade do transcrito, do gene de interesse, pela presença de ligante (tetraciclina). Assim poderemos avaliar se houve melhora no controle fino da regulação de expressão gênica no sistema descrito em *T. brucei*, e também avaliar a capacidade de regulação por *riboswitches* em tripanossomas. Paralelamente propomos criar um novo sistema regulatório em *T. cruzi*, utilizando-se apenas moléculas de RNA *switches*. Esse novo sistema teria como vantagem o fato de não necessitar de linhagens de parasitos previamente modificados.

Por fim, temos o interesse de avaliar outra forma de regulação da expressão gênica em nível diferente do pós-transcricional. Assim, iremos avaliar a potencialidade da modulação da expressão gênica em nível pós-traducional em *T. cruzi* ao fusionar à uma proteína de interesse um polipeptídeo conhecido como Domínio Desestabilizador (DD). A molécula de DD garante a modulação dos níveis celulares da proteína fusionada pela presença de um ligante específico.

4 – OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a potencialidade dos mecanismos de *riboswitches* e de domínio desestabilizador no controle da expressão heteróloga em tripanossomas.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Obter *T. cruzi* e *T. brucei* expressando RLUC de forma estável e ou transiente sob regulação de *riboswitches*;
- 2 Avaliar a eficiência de regulação da expressão por *riboswitches* pela atividade de luciferase em diferentes condições em parasitos carregando os vetores de interesse;
- 3 Obter parasitos carregando plasmídeo para expressão de GFPDD;
- 4 Avaliar o nível de regulação pós-traducional pelo domínio desestabilizador pela expressão de GFPDD nos parasitos.

5 – MATERIAL E MÉTODOS

5.1 BACTÉRIAS

As estirpes de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Estirpes de *Escherichia coli* utilizadas

Estirpe	Característica	Resistência	Referência
TOP 10	<i>hsdR</i> , <i>mcrA</i> , <i>lacZ</i> ΔM15, <i>recA</i>	Streptomicina	INVITROGEN
XL1 BLUE	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> , <i>sup E44</i> , <i>realA1</i> , <i>lacZ</i> ΔM15	Tetraciclina	STRATAGENE

5.2 PARASITOS

5.2.1 *Trypanosoma brucei brucei*

Neste estudo foram utilizadas formas procíclicas da linhagem celular de *T. b. brucei* 29:13, gentilmente cedidas pela Dra Andrea R. Ávila do Instituto Carlos Chagas (ICC/FioCruz). Estas apresentam como característica uma cópia do gene de T7 RNA polimerase, 2 cópias do gene repressor de tetraciclina (TetR) e os genes para resistência a neomicina (NeoR) e higromicina (HigroR). Essas modificações para obtenção da linhagem 29:13 foram realizadas por Wirtz e colaboradores (1999) introduzindo os vetores pLEW 29 (HigroR) e pLEW 13 (NeoR).

5.2.2 *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa híbrida CL Brener (ZINGALES *et al.*, 1997) foram utilizadas aqui por ser a cepa cujo genoma foi quase completamente

seqüenciado. O parasito foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Santuza Maria Teixeira.

5.3 PLASMÍDEOS

Os plasmídeos utilizados para manipulação e clonagem de DNA estão listados na Tabela 2.

Tabela 2 – Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Característica	Referência
pLEW 100	Locus de integração no genoma de <i>T. brucei</i> : região espaçadora dos genes de rRNA. Confere resistência à bleomicina e permite expressão de genes exógenos pelo promotor de GPEET regulado por 2 operadores de tetraciclina.	WIRTZ <i>et al.</i> , 1999
pBlueScript	lacZ, promotores T3, T7 e lac, resistência à ampicilina	STRATAGENE
pRL TK	Vetor comercial que carrega luciferase de <i>Renilla</i>	PROMEGA
pRzS 1 a 4	Contém yEGFP (GFP modificada para melhor expressão em leveduras) regulada por <i>Riboswitches</i> distintos	WIN & SMOLKE, 2007
pROCK GFP HYGRO	Locus de integração no genoma de <i>T. cruzi</i> : β -tubulina. Confere resistência à higromicina e permite expressão de genes exógenos pelo promotor de rRNA ribossômico e/ou pelo locus de integração.	DAROCHA <i>et al.</i> , 2004
pGEM T easy	Plasmídeo comercial que permite ligação de <i>amplicons</i> obtidos pela <i>Taq</i> DNA polymerase. Possui promotores T7 e SP6 e o gene lacZ e confere resistência à ampicilina	PROMEGA

5.3.1 pLEW 100

O vetor pLEW 100 foi descrito por Wirtz e colaboradores em 1999 para ser utilizado em *Trypanosoma brucei*. Este vetor apresenta em sua estrutura uma sequência homóloga a região espaçadora de genes para rRNA, a qual é utilizada como sequência de integração ao genoma do parasito. Para este feito, o vetor é linearizado por enzima de restrição *NotI*, tornando toda a construção genética pela sequência de integração.

O gene repórter presente no plasmídeo é o de luciferase de vagalume (FLUC, do inglês, *Firefly LUCiferase*), controlado por promotor da proteína de superfície de membrana, a prociclina GPEET. Este promotor garante maiores níveis de expressão gênica quando comparado a taxa de transcrição de genes de expressão constitutiva, expressos por RNA polimerase do tipo II, além de ser regulado por dois operadores de tetraciclina. A FLUC sendo uma proteína heteróloga possui a montante de sua sequência, regiões que garantem bons níveis de adição de sequência líder, sendo estas GPEET SAS (do inglês *Splice leader Acceptor Site*) e GPEET 5'UTR. Do mesmo modo há uma sequência da região não codificadora do gene da aldolase – Aldo 3'UTR - a jusante para garantia de adição de cauda poli-A. Este plasmídeo pode ser utilizado tanto em ensaios de transfecção transiente quanto estável, já que apresenta o gene que confere resistência à bleomicina, expresso por promotor da T7 RNA polimerase não regulado. Seguindo a mesma lógica utilizada para a proteína FLUC, o gene de resistência à bleomicina possui sequências que o flanqueiam para que a adição de sequência líder e cauda poli-A seja garantida, sendo estas as regiões não codificadoras do gene da actina, 5'UTR presente a montante do gene e 3' UTR a jusante. O esquema representativo deste vetor pode ser verificado na Figura 7.

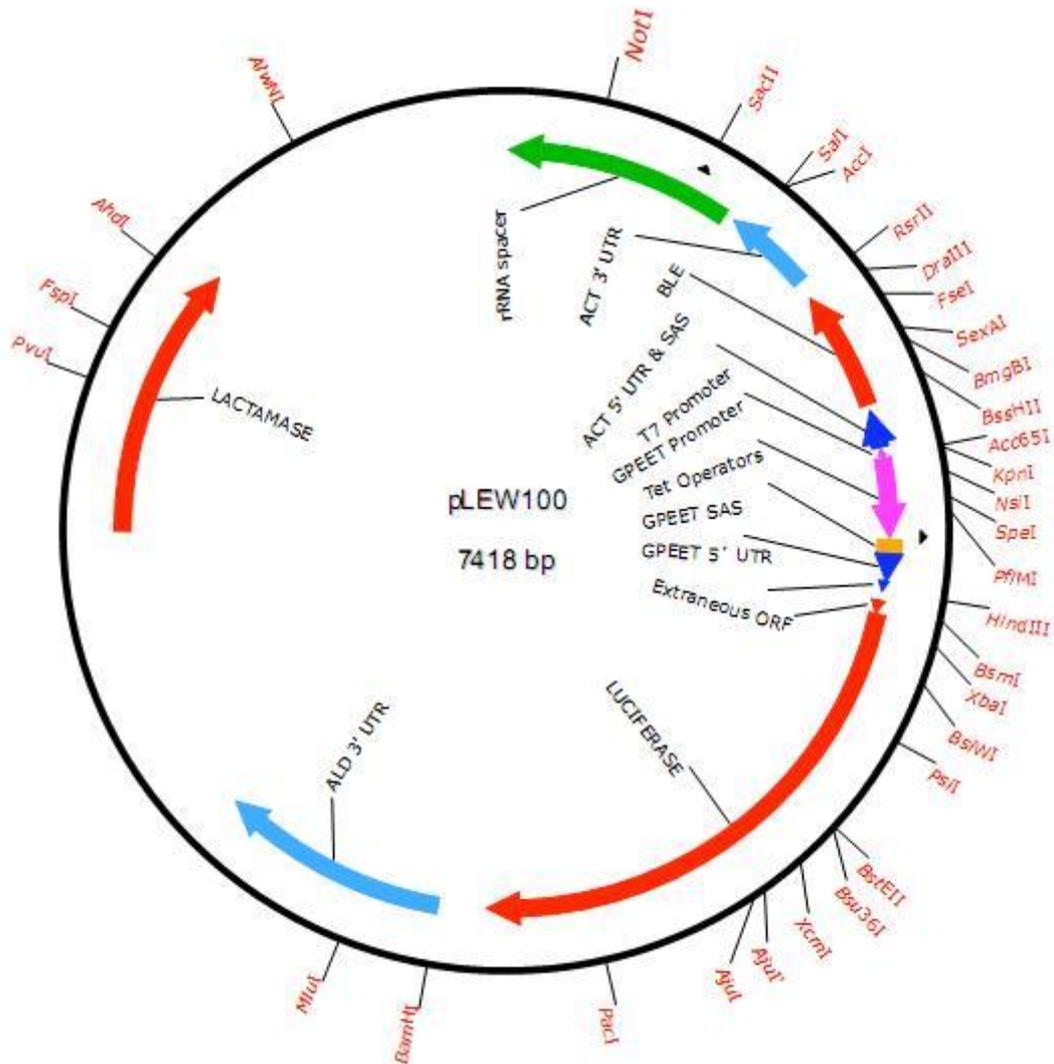


Figura 7 – Esquema do vetor pLEW 100. Modelo ilustrativo das seqüências presentes no plasmídeo pLEW 100. As flechas coloridas se referem aos genes a qual codificam ou simplesmente a uma seqüência de DNA não necessariamente traduzidas. Os comprimentos em que as flechas estão representadas são proporcionais ao número de pares de nucleotídeos da seqüência, além disso, a direção da mesma aponta o sentido em que a seqüência é transcrita. Ao lado do vetor pode se verificar sítios de restrição das endonucleases descritas em vermelho fora do círculo.

5.3.2 pROCK GFP Hygro

O plasmídeo pROCK GFP Hygro é uma variante do plasmídeo descrito inicialmente por DaRocha e colaboradores (2004), nomeado pROCK GFP Neo, ao qual fez-se a troca do gene de resistência para neomicina pelo gene que garante resistência à higromicina (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). O gene repórter presente na estrutura do plasmídeo é a proteína verde fluorescente, que é flanqueado por sítios de restrição *Xba*I e *Xho*I a montante e a jusante, respectivamente, garantindo fácil retirada desta sequência do vetor de DNA, o que permite a inserção de outros genes repórteres desejados. Para que os processos de maturação do pré-RNA (adição de sequência líder e cauda poli-A) possam ocorrer sem maiores problemas há uma sequência HX1, proveniente da região 5'UTR do gene *TcP2β* de *Trypanosoma cruzi*, que antecede a sequência de GFP, e uma sequência que compreende parte da região codificadora e inter-codificadora do gene de gGAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase glicossomal) de *T. cruzi*.

A região de integração ao genoma do parasito é o *locus* correspondente à proteína de citoesqueleto β -tubulina de *Trypanosoma cruzi*, o qual possui um sítio de restrição da endonuclease *Not*I que permite linearização do vetor, permitindo que as sequências da proteína de citoesqueleto flanqueiem toda a sequência de DNA a ser integrado. Há ainda a presença de um promotor de rRNA a montante de GFP. Entretanto não se pode afirmar que a expressão do gene repórter é exclusiva a este promotor, pois o gene pode também ser expresso constitutivamente nos níveis de expressão para β -tubulina. Uma representação ilustrativa do vetor plasmidial descrito neste item pode ser visualizada na Figura 8.

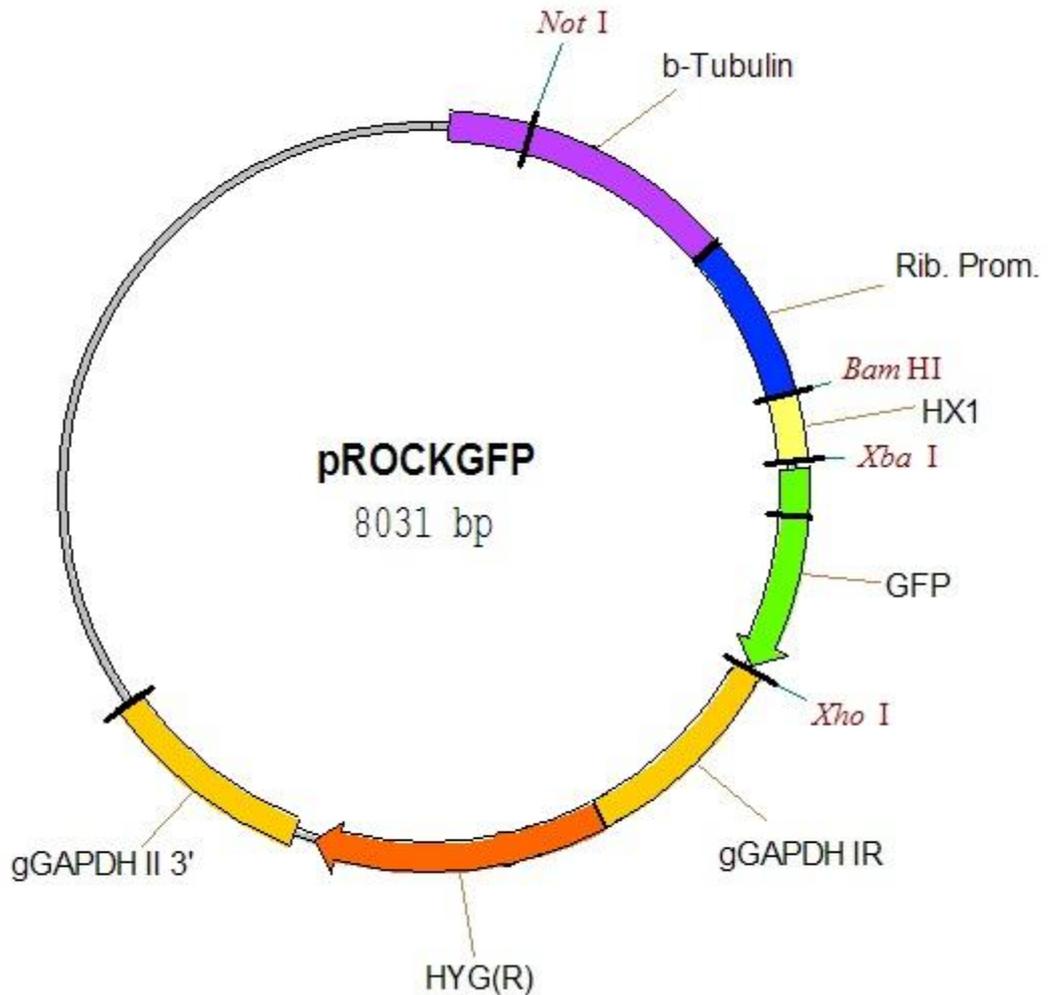


Figura 8 – Ilustração representativa do vetor plasmidial pROCK GFP Hygro. Representação das seqüências presentes na estrutura do plasmídeo pROCK GFP Hygro. As seqüências codificadoras para proteínas estão representadas por setas coloridas, sendo que o comprimento da mesma é proporcional ao número de nucleotídeos da seqüência de DNA, e suas direções apontam o sentido em que ocorre a transcrição. As caixas coloridas correspondem às seqüências de DNA não codificantes para proteínas, podendo ser regiões promotores, UTRs ou regiões intergênicas (IR, do inglês *Intergenic regions*). Alguns sítios de restrição para endonucleases estão descritos em vermelho escuro, fora do círculo. HYG(R): gene de resistência à higromicina. gGAPDH: gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase glicossomal. HX1: região 5'UTR do gene *TcP2β* de *Trypanosoma cruzi*.

5.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) (SAMBROOK *et al.*, 1989) (10 g de triptona; 5 g de extrato de levedura; 10 g de NaCl; ajustar pH para 7,0 e o volume para 1 L), sob agitação de 160 rpm a uma temperatura de 37°C ou em meio sólido LA (meio LB acrescido de 1,5% ágar p/v), em estufa à 37°C, levando-se em consideração o antibiótico de seleção para a resistência de cada bactéria ou plasmídeo introduzido.

O cultivo de formas procíclicas de *T. b. brucei* foi realizado a 28°C em meio SDM79 (Marca LGC) suplementado com soro fetal bovino a 10%. E antibióticos apropriados.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio LIT (do inglês, *Liver Infusion Tryptose*) ou em meio M199, ambos suplementados com soro fetal bovino inativado a 10%.

Na Tabela 3 encontra-se uma relação dos antibióticos utilizados, com seus respectivos organismos e concentrações de uso.

Tabela 3 – Antibióticos utilizados

Antibiótico	Concentração	Organismo
Ampicilina (Amp)	250 µg/mL	<i>E. coli</i>
Tetraciclina (Tet)	10 µg/mL	<i>E. coli</i>
Bleomicina (Bleo)	5 µg/mL	<i>T. brucei</i>
Higromicina (Hygro)	100 µg/mL	<i>T. cruzi</i>
Higromicina (Hygro)	50 µg/mL	<i>T. brucei</i>
Neomicina (Neo/G418)	25 µg/mL	<i>T. brucei</i>

Os Antibióticos foram preparados conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989) ou indicação do fabricante. Sendo os mesmo adicionados aos meios de cultura no momento de uso.

5.5 CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA ANÁLISE DOS MODELOS DE REGULAÇÃO PROPOSTOS

A construção dos vetores de controle da expressão gênica propostos neste trabalho ocorreu em *Escherichia coli* para posterior transfecção no parasito desejado, seja ele *T. b. brucei* ou *T. cruzi*, seguindo protocolos padrões de clonagem. Uma descrição dos passos e etapas realizados para a geração destes plasmídeos será descrita no item Resultados e Discussão.

5.6 MANIPULAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

5.6.1 ENSAIOS DE RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DO DNA

Os plasmídeos foram submetidos a ensaios de restrição enzimática com as enzimas apropriadas e seguindo recomendações especificadas nos catálogos dos fabricantes (NEB Biolabs, Promega, Invitrogen, GE Healthcare).

5.6.2 POLIMENTO DE EXTREMIDADES DE DNA DIGERIDAS POR ENDONUCLEASES

Os fragmentos de DNA que foram digeridos por endonucleases e que necessitaram de polimento de extremidade a fim de se formar pontas cegas, passaram por reação contendo os seguintes reagentes com suas respectivas concentrações finais de reação: BSA 1X, Klenow *buffer* 1X, 100 µM dNTPs, 5 U de enzima Klenow. Mantidos em incubação a 37°C por 1 hora.

5.6.3 TRATAMENTO DE FRAGMENTOS DE DNA COM FOSFATASE ALCALINA

Os fragmentos de DNA, mais especificamente os vetores plasmidiais que foram digeridos com enzimas de restrição e tiveram suas extremidades tratadas para formação de pontas cegas passaram por desfosforilação de sua extremidade 5', com o intuito de se evitar a ligação das extremidades do mesmo fragmento, quando reagidas em presença de enzima de ligação. A reação ocorreu na presença de 1 U da enzima *SAP* (do inglês, *Shrimp Alkaline Phosphatase*) adicionada a própria reação de polimento de extremidade. A reação foi mantida a 37°C por 1 hora. A enzima foi inativada ao incubar-se a reação a 65°C por 15 minutos.

5.6.4 LIGAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA

Para a ligação dos fragmentos de DNA (vetores e insertos) foram utilizados de 5 a 20 ng dos DNAs previamente digeridos em reação contendo 10% de tampão de enzima T4 ligase e 1% de enzima T4 ligase, incubados a 4°C *overnight*.

A ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM T *easy* foi realizada conforme instrução do fabricante, o qual indica uma reação de volume final de 10 µL, contendo 0,2 µL do vetor (10 ng), 4 U de enzima T4 ligase, 5 µL de tampão de ligase (fornecido pelo kit – pGEM T *easy*, Promega), e 10 ng do *amplicon*.

5.7 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS DE *E. coli* COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO

As células competentes das cepas de *E. coli* XL1 Blue e TOP 10 foram preparadas como descrito abaixo. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio LB e incubada a 37°C sob agitação de 150 rpm por 12 horas. Após este período 1 mL da pré-cultura foi transferido para 200 mL de meio SOB (bacto triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; cloreto de sódio 0,5 g/L; cloreto de potássio 0,186

g/L) com subsequente incubação a 30°C sob agitação de 150 rpm até que se atinja $OD_{600nm} = 0,3 - 0,4$. As bactérias foram coletadas por centrifugação refrigerada (4°C) por 10 minutos a 5.000 rpm (Eppendorf *Centrifuge* 5804 R) e suspensas em 50 mL de $MgCl_2$ resfriado. Posteriormente as células foram centrifugadas sob refrigeração (4°C) por 10 minutos a 4.000 rpm (Eppendorf *Centrifuge* 5804 R), ressuspendidas em 90 mL de $CaCl_2$ gelado e mantidas em gelo durante 30 minutos. Novamente a suspensão foi centrifugada sob refrigeração (4°C) por 10 minutos a 4.000 rpm (Eppendorf *Centrifuge* 5804 R) e a este *pellet* adicionou-se 2 mL de $CaCl_2$ (85 mM em glicerol 15% p/v) estéril e refrigerado, com subsequente distribuição em alíquotas de 100 μ L que foram mantidas em freezer a -80°C.

As alíquotas das células competentes foram transformadas com volumes de 1-4 μ L de reação de ligação ou do plasmídeo desejado e mantidas em gelo por 30 minutos. Após este tempo, procedeu-se um choque térmico nas bactérias, as quais do gelo passaram a banho-maria a 37°C por 1 minuto e posteriormente voltaram ao gelo por 3 minutos. A recuperação das células ocorreu adicionando-se 800 μ L de meio SOC (meio SOB acrescido de 20 mmol/L de glucose; 5 mL/L de cloreto de magnésio e 2,4 g/L de sulfato de magnésio) e incubação em estufa a 37°C por 1 hora com subsequente plaqueamento em meio LA, contendo antibiótico apropriado, e incubação a 37°C por um período de 16-24 horas.

5.8 OBTENÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

Mini-prep: As colônias de bactérias crescidas em meio líquido, conforme descrito no item 5.4 foram, incubadas por 12 horas e em seguida direcionadas ao isolamento do DNA plasmidial segundo método de lise alcalina modificado (SAMBROOK *et al.*, 1989), com exclusão da etapa de extração com fenol e clorofórmio. Quatro mililitros de cultura crescida foram centrifugadas a 13.400 rpm durante 1 minuto, descartando-se o sobrenadante e suspendendo as células em 250 μ L de solução P1 (Glicose 55 mM, Tris-HCl 25 mM e EDTA 10 mM). Em seguida foram adicionados 250 μ L de solução P2 (SDS 1% e NaOH 0,2 M), homogeneizando-se gentilmente a amostra com posterior adição de solução P3 (60

mL de KOAc 5 M em 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água), seguida de nova homogeneização e centrifugação a 13.400 rpm por 25 minutos. O resíduo insolúvel foi descartado, enquanto que os ácidos nucleicos presentes no sobrenadante foram precipitados com igual volume de isopropanol (~750µL), e levados a centrifugação a 13.400 rpm por 20 minutos, descartando-se, em seguida o sobrenadante. O sedimento após ser lavado com etanol 70% (v/v) e seco foi dissolvido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) contendo RNase a 10 µg/µL.

Maxi-preps: Os clones construídos para a transfecção e análise em *T. b. brucei* foram inoculados e preparados em maior escala e maior grau de pureza, utilizando-se o *kit* QIAGEN PLASMID MAX KIT. A técnica consiste na lise alcalina seguida de cromatografia de troca iônica como descrito no manual da QIAGEN, porém, partindo-se de um volume de cultura bacteriana maior (51-250 mL).

A quantificação das soluções de DNA foi feita em espectrofotômetro NANODROP 2000 (Thermo Scientific) em comprimento de onda na faixa de 260 nm.

5.9 ELETROFOROSE EM GEL DE AGAROSE

Os procedimentos de eletroforese em gel de agarose seguiram descrição de Sambrook *et al.* (1989), utilizando-se tampão TBE 1X (Tris-borato 40 mM e EDTA 1 mM, pH 8,3). As amostras de DNA foram misturadas a 5 µL de Fsuds (azul de bromofenol 0,8%, ficol 10%, xileno cianol 0,4%, SDS 1%, EDTA 1,8 mM) com posterior aplicação nos poços do gel de agarose previamente preparado. A corrida eletroforética ocorreu a 100 mV e o gel foi tratado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos. A revelação do gel ocorreu sob incidência de luz ultravioleta em transiluminador EC3 System – UVP BioImaging Systems (UVP, Inc. Upland, CA/USA).

5.10 PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE GEL DE AGAROSE

Para a obtenção de fragmentos de DNA após corrida de eletroforese em gel de agarose foi utilizado um *kit* de purificação (GE *Healthcare*) seguindo orientação do fabricante.

5.11 SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

O sequenciamento dos clones foi realizado segundo método de Sanger *et al.* (1977), utilizando-se *primers* adequados ao clone construído. As reações com dideoxynucleotídeos fluorescentes presentes do “*dye terminator kit*” (AMERSHAN PHARMACIA BIOTECH) foram realizadas de acordo com instruções do fabricante e analisadas no seqüenciador ABI *Prism 377* (Applied Biosystems).

5.12 AMPLIFICAÇÃO DE SEGMENTOS DE DNA POR PCR

As sequências de DNA amplificadas para utilização nas etapas de clonagem ou diagnóstico de clones foram feitas utilizando-se cerca de 5 a 200 ng de DNA molde em uma reação contendo a concentração final dos seguintes reagentes: *Taq buffer* +KCl - MgCl₂ 1X; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0.5 µM de cada *primer* a ser utilizado e 2u de enzima *Taq* polimerase.

As condições utilizadas no termociclador foram: 1º passo – 92°C por 2 minutos; 2º passo: 30 ciclos a 92°C por 30 segundos, seguido por extensão a 52°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; e no 3º passo: 72°C por 10 min.

5.13 INICIADORES UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO DE CLONES E AMPLIFICAÇÃO POR PCR

Os oligonucleotídeos utilizados como *primers* neste trabalho estão na Tabela 4, com sua respectiva sequência de anelamento ao DNA molde.

ARA-GFP-F-*Xba*I e ARA-DD-R-*Xho*I-stop foram utilizados para amplificação de GFP na construção de pROCK GFPDD. M13 *Forward*, M13 *Reverse*, ARA-DD-R-*Xho*I-stop e ARA-DD-R-*Bam*HI-stop foram utilizados para diagnóstico de clones desejados na construção pGEM GFPDD. O *primer* RLUC 3'*out* foi utilizado para sequenciamento dos clones obtidos nas construções pROCK RLUC Ribo e pLEW RLUC Ribo.

Tabela 4 – Sequência dos *primers* utilizados

<i>Primer</i>	Sequência nucleotídica
ARA-GFP-F- <i>Xba</i> I	5' GCTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3'
ARA-DD-R- <i>Xho</i> I-stop	5' CCGCTCGAGCTATTCCGGTTTTAGAAAGCTCCACAT 3'
ARA-DD-R- <i>Bam</i> HI-stop	5' CGGGATCCCTATTCCGGTTTTAGAAAGCTCCACAT 3'
M13 <i>Forward</i>	5' GTTTTCCCAGTCACGAC 3'
M13 <i>Reverse</i>	5' TTCACACAGGAAACAG 3'
RLUC 3' <i>out</i>	5' ATGCACCTGATGAAATGGG 3'

5.14 MOLÉCULAS DE RIBOZIMAS SWITCHES

As moléculas de ribozimas *switches* (*riboswitches*) utilizadas nas construções dos vetores de expressão gênica pLEW 100 RLUC Ribo e pROCK RLUC Ribo, foram às mesmas utilizadas no estudo de Win e Smolke (2007) e gentilmente

cedidas pela Dra. Christina D. Smolke (California Institute of Technology, Pasadena CA-USA). A Tabela 5 resume algumas informações a respeito das mesmas.

Tabela 5 – Estruturas de *Riboswitches* (WIN & SMOLKE, 2007)

Nomenclatura original	Nomenclatura utilizada neste trabalho	Atividade em ausência de Tet	Atividade na presença de Tet
<i>L2 Bulge1 tc</i>	Ribo 1	Auto-clivagem de mRNA	Mantém estrutura do <i>riboswitch</i> mantendo a estrutura do mRNA
<i>L2 Bulge off tc</i>	Ribo 2	Mantém estrutura do <i>riboswitch</i> mantendo a estrutura do mRNA	Auto-clivagem de mRNA
<i>sTRSV</i>	Ribo 3	Sempre ativa, promove clivagem de mRNA	
<i>sTRSV contl</i>	Ribo 4	Sempre inativa, mantém estrutura do mRNA	

5.15 TRANSFEÇÃO DE PARASITOS

5.15.1 TRANSFEÇÃO ESTÁVEL DE *T. b. brucei*

As linhagens de *T. brucei* da estirpe 29:13 (WIRTZ *et al.*, 1999) foram transfectadas por eletroporação utilizando-se protocolo descrito em LaCount *et al.* (2002), com cerca 10 µg de DNA plasmidial linearizado com *NotI* (WIRTZ *et al.*, 1999). A cultura de formas procíclicas em fase logarítmica (5×10^6 parasitos/mL) foi centrifugada e ressuspensa em tampão de eletroporação (120 mM de KCl; 0,15 mM de CaCl₂; 10 mM de KHPO₄⁻; 25 mM de HEPES; 2 mM de EDTA; 5 mM de MgCl₂; 69 mM de sacarose; pH 7,6). Aproximadamente 400 µL desta solução foi

misturada com a quantidade do plasmídeo acima descrita, transferida para cuveta de eletroporação (0,4 cm) e submetida a dois pulsos (em intervalos de 10 segundos) de 1.500V e 25 μ F em eletroporador BioRad Gene Pulser. Após este procedimento todo o volume da solução foi transferido para 5 mL de meio SDM79 completo, contendo antibiótico desejado, para a seleção dos parasitos que receberam o plasmídeo de interesse, e incubou-se a 28°C por cerca de 14 dias, realizando-se quando necessário repiques das culturas quando estas atingiam fase estacionária do crescimento do parasito.

5.15.2 TRANSFEÇÃO ESTÁVEL DE *T. cruzi*

As cepas de *T. cruzi* CL Brener foram cultivadas mantendo-as em fase de crescimento exponencial (até 2×10^7 parasitos/mL) e coletadas por centrifugação a 2.000 rpms por 5 minutos e suspendidas em tampão de eletroporação para concentração de 1×10^8 parasitos/mL (120 mM de KCl; 0,15 mM de CaCl_2 ; 10 mM de KHPO_4^- ; 25 mM de HEPES; 2 mM de EDTA; 5 mM de MgCl_2 ; 69 mM de sacarose; pH7,6) e transferidas para cuvetas de eletroporação (0,2 cm) de modo a atingirem concentração de 4×10^7 parasitos/mL em um volume de 400 μ L para cada cuveta, adicionando-se 50 μ g de DNA plasmidial, linearizado por *NotI*, seguido de 3 pulsos (intervalados por um tempo de 10 segundos) de 0,3 KV à 500 μ F e 800 ohms em eletroporador BioRad Gene Pulser. Após este procedimento todo o volume da solução foi transferido para 5 mL de meio LIT (Infuso de fígado, DIFCO 10 g/L; NaCl 4 g/L; Na_2HPO_4 8 g/L; KCl 400 mg/L; Glicose 1 g/L; Triptose 5 g/L; Hemina 0,2%, preparada em NaOH 0,05 M, 10 mL/L) ou M199 (CultiLab) completo, contendo antibiótico desejado, para a seleção dos parasitos que receberam o plasmídeo de interesse, e incubou-se a 28°C por cerca de 30 dias, realizando-se quando necessário repiques das culturas quando estas atingiam fase estacionária do crescimento do parasito.

5.15.3 TRANSFEÇÃO TRANSIENTE DE *T. b. brucei* E *T. cruzi*

Os parasitos transfectados para análise transiente passaram pelos mesmos passos descritos no item anterior, respeitando-se os parâmetros de eletroporação para cada parasito, com a diferença de que ao invés do DNA plasmidial estar linearizado o mesmo encontrava-se em sua forma circular.

5.16 ATIVIDADE DE LUCIFERASE DE *Renilla* (RLUC)

Os ensaios de luciferase foram realizados utilizando-se o kit *Dual-Glo[®] Luciferase Assay System*, seguindo orientação do fabricante (Promega) com algumas modificações, onde alíquotas de 5×10^6 células, previamente tratadas com diferentes concentrações de tetraciclina e diferentes tempos de exposição ao antibiótico, foram sedimentadas por centrifugação, retirando-se o sobrenadante e suspendidas em 100 μ L de tampão de lise, seguido de etapa de congelamento e descongelamento. Os restos celulares foram sedimentados por centrifugação curta a 13.400 rpm (em centrífuga Eppendorf – *Cetrifuge 5415 C*). Posteriormente 20 μ L do lisado foram transferidos para placa de 96 poços (*Corning*) de fundo chato e coloração escura, com adição de 20 μ L do reagente *Dual-Glo[®] Luciferase*, seguido da adição de 20 μ L do reagente *Dual-Glo[®] Stop-Glo[®]* (contendo Coelenterazina, substrato para a reação da luciferase de *Renilla*). Após adição dos reagentes, incubou-se por 10 minutos para que a reação ocorresse, seguido de leitura em leitor de placas Tecan *Infinite 200*, utilizando-se *software i-control* em modo de luminescência. Sendo que as condições de leitura foram de 15 segundos de leitura por poço a 24°C.

5.17 PROCESSAMENTO E NORMALIZAÇÃO DOS DADOS DE LUMINESCÊNCIA

Os dados de luminescência de luciferase de *Renilla* obtidos no item 5.16 de Material e Métodos foram processados utilizando *software* Excel (*Windows*) e GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, EUA). A atividade de luminescência foi normalizada em relação a 10 mil parasitas. E os resultados de RLUC apresentados como atividade relativa, foram gerados a partir da razão entre os dados obtidos com as culturas de células induzidas (+Tet) pelas não induzidas (-Tet).

5.18 ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DE GFP POR CITOMETRIA DE FLUXO

A leitura da atividade de GFP foi realizada por citometria de fluxo (FACS, do inglês, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) em citômetro FACSCALibur (BD Biosciences). A atividade obtida provém da leitura de 20 000 eventos (células). O processamento dos dados obtidos foi feito utilizando-se *software* WinMDI versão 2.9.

6 – RESULTADOS

6.1 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *T. brucei* POR RIBOSWITCHES.

Nosso grupo de pesquisa tem interesse em expressar genes com certa toxidez (p.ex. Cre recombinase) ou geração de nocautes induzidos de genes tidos como essenciais (p.ex. MSH2 – proteína envolvida no mecanismo de reparo de DNA) para estudos de função gênica em tripanossomas. Sendo assim, resolvemos testar um controle mais refinado da expressão de genes exógenos em *Trypanosoma brucei* utilizando o plasmídeo parental pLEW 100 (ver item 5.3.1 de Material e Métodos). Este vetor permite superexpressar genes em formas procíclicas devido à presença de um promotor de alta taxa de transcrição em sua estrutura, além de possibilitar um controle transcricional, uma vez que este possui operadores para ligação do repressor de tetraciclina. Contudo, este promotor regulado, apresenta taxa de vazamento, evidenciada pela expressão de Cre recombinase (BARRET, LACOUNT & DONELSON, 2004), desta forma resolvemos testar a adição da estrutura de *riboswitch*, com o intuito de minimizar os efeitos de vazamento da expressão gênica por regulação ao nível pós-transcricional. Além disto, estaremos avaliando o comportamento destas moléculas de RNA em tripanossomatídeos, cujo controle da expressão ocorre principalmente a nível pós-transcricional.

É importante ressaltar, que conforme mencionado na revisão bibliográfica, as moléculas de *riboswitch* aqui utilizadas foram as mesmas utilizadas no estudo de Win e Smolke (2007) e gentilmente cedidas pela Dra Christina D. Smolke (California Institute of Technology, Pasadena CA-USA). Brevemente, há 4 estruturas distintas de RNA, a qual aqui denominaremos Ribo1 (*riboswitch* 1) até Ribo4. O Ribo1 apresenta atividade auto-catalítica, que é inativada pela alteração conformacional induzida pela ligação de tetraciclina, ou seja, a presença do ligante deve promover elevação na taxa de expressão gênica. Esta mesma estrutura foi nomeada de *L2 Bulge1 tc* por Win e Smolke (2007). Já a estrutura originalmente conhecida como *L2 Bulge off tc*, aqui nomeada de Ribo2, possui atividade de ribozima inativada na ausência do ligante, que contrariamente a Ribo1, é ativada na presença do antibiótico, passando então a desestabilizar a estrutura do mRNA, inviabilizando o processo de tradução,

o que diminuiria a expressão do gene regulado. Como controles, há um controle negativo, ao qual nomeado inicialmente de *sTRSV* (ribozima parental), e aqui denominado Ribo3, encontra-se sempre ativo, impedindo a expressão gênica, enquanto que o controle positivo utilizaremos Ribo4, que corresponde a uma ribozima sempre inativa, portanto não influenciando na taxa de tradução.

Para estudar a regulação da expressão utilizando gene repórter foram necessárias diversas etapas de clonagem a fim de obter as construções desejadas (descritas no próximo item).

6.1.1 – CONSTRUÇÃO DOS VETORES PLEW 100 COM REGULAÇÃO ADICIONAL POR *RIBOSWITCHES*

Utilizamos como estrutura principal para a criação do vetor a ser construído o plasmídeo pLEW 100 descrito por Wirtz e colaboradores em 1999, tal plasmídeo, permite a integração do cassete de expressão no *locus* de DNA que codifica para rRNAs, e tem como gene repórter a Luciferase de vagalume, abreviada como FLUC (do inglês, *Firefly Luciferase*), expressa por promotor da proteína de superfície, a prociclina GPEET, que garante maior expressão do gene a qual controla quando comparado com a taxa de transcrição de genes de expressão constitutiva, expressos por RNAPol II. Este plasmídeo pode ser utilizado tanto em ensaios de transfecção transiente quanto estável, já que apresenta o gene que confere resistência à bleomicina, expresso por promotor da T7 RNA polimerase não regulado. Pode-se verificar a descrição mais detalhada desse vetor em Material e Métodos na Figura 7.

Para clonar o gene repórter de interesse sob regulação adicional do *riboswitch*, tivemos que utilizar uma sequência de passos de clonagem (Figura 9). Brevemente, quatro plasmídeos, pRzS 1 a 4, foram digeridos pelas endonucleases *XhoI* e *BamHI*, liberando um fragmento de DNA contendo γ EGFP (do inglês *yeast Enhanced Green Fluorescent Protein*, gene repórter otimizado para sua expressão em leveduras) seguido à jusante pela sequência nucleotídica das ribozimas *switches*. Este fragmento, por sua vez, foi ligado a um plasmídeo comercial,

pBluescript, previamente digerido pelas mesmas enzimas de restrição acima listadas, formando um plasmídeo intermediário denominado pBS-RzS. Em seguida, o gene repórter de levedura do vetor intermediário foi retirado pela digestão com as enzimas *SpeI* e *AvrII*, sendo substituída pela luciferase de *Renilla*, abreviada por RLUC (do inglês, *Renilla Luciferase*) obtida do plasmídeo comercial pRL-TK por restrição enzimática com as enzimas *NheI* e *XbaI*. Apesar de endonucleases distintas terem sido utilizadas, as mesmas apresentam extremidades compatíveis, o que possibilitou a reação de ligação. Após obtenção deste plasmídeo, contendo o gene para RLUC e a sequência do *riboswitch*, o mesmo foi digerido por enzimas *XbaI* e *XhoI*, afim de se liberar o fragmento contendo RLUC e respectivo *riboswitch*, para que este seja transferido para o vetor pLEW 100. Paralelamente o vetor pLEW 100 teve que ser preparado de forma a conter os sítios apropriados para ligação do segmento contendo a ribozima regulada. Brevemente, o plasmídeo pLEW 100 foi digerido com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*, e posteriormente religado. O próximo passo foi digerir o vetor com *XbaI* e *XhoI* liberando um fragmento de pouco menos de 100 pares de bases. Após restrição as pontas coesivas formadas pela ação das endonucleases foram preenchidas pela enzima Klenow e ligadas pela enzima T4 ligase. Estas etapas permitiram então que houvesse inserção de uma sequência nucleotídica contendo RLUC, seguida à jusante pelas sequência dos *riboswitches* de interesse. Os vetores de *T. brucei* contendo RLUC regulada ao nível transcricional e pelas ribozimas foram denominados de pLEW RLUC Ribo1, pLEW RLUC Ribo2, pLEW RLUC Ribo3 e pLEW RLUC Ribo4.

Optamos pela não utilização dos genes repórteres que codificam para yEGFP e pela troca de FLUC, proveniente do pLEW 100 pela proteína RLUC, devido sua maior estabilidade e maior sensibilidade de detecção da atividade (Manual da Promega; ARAUJO *et al.*, 2011).

O perfil de restrição dos vetores pLEW RLUC Ribo 1 a 4 digeridos com *XbaI* e *XhoI* ou *NotI* estão mostrados na Figura 10. A clonagem dos fragmentos em pLEW 100 foram confirmadas por sequenciamento.

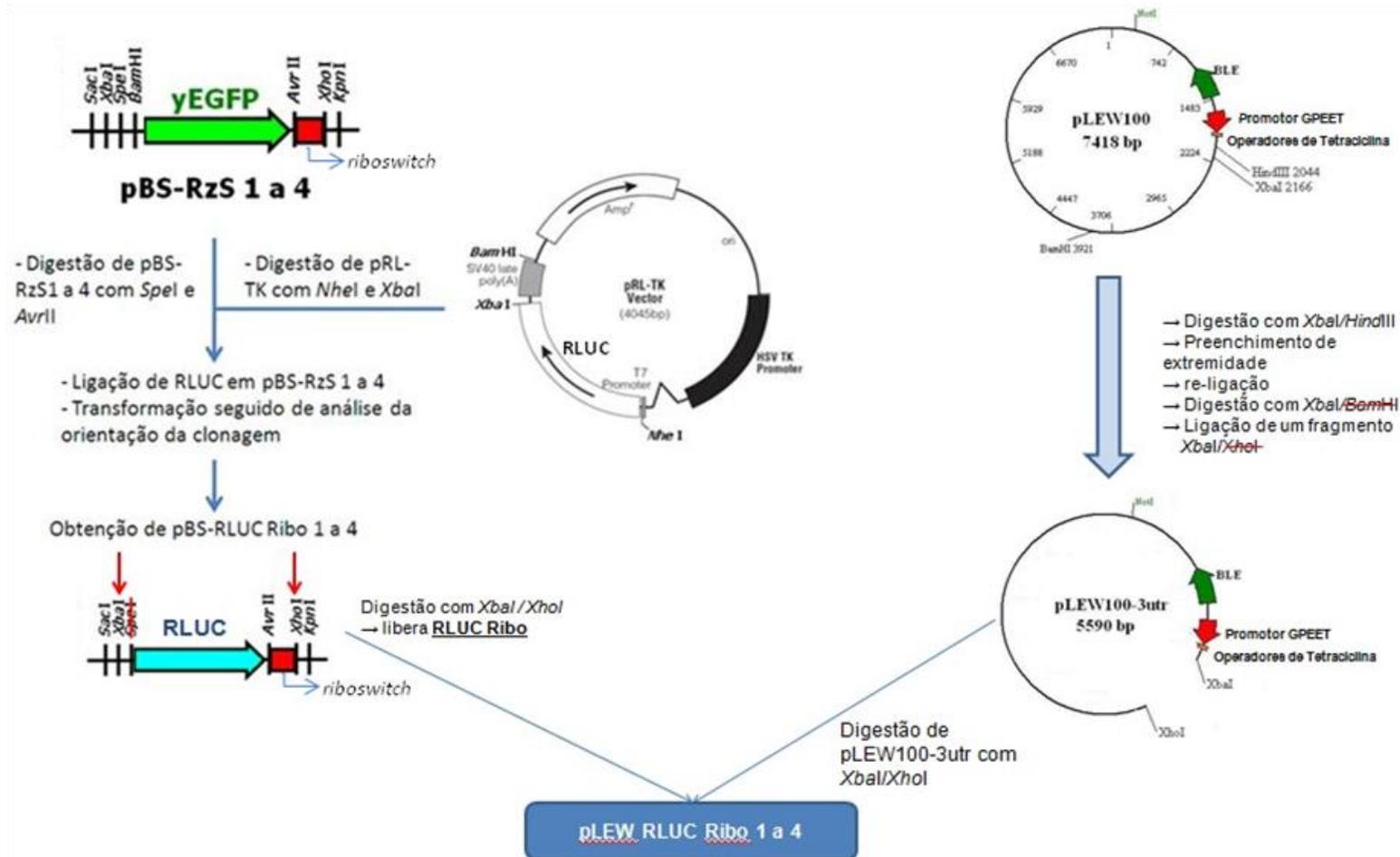


Figura 9 – Etapas de clonagem para obtenção das construções para testar o efeito das ribozimas *switches* em *T. brucei* utilizando o vetor pLEW 100 . Esquema ilustrativo dos processos de clonagem para a construção dos vetores de regulação da expressão gênica a serem utilizados em *T. brucei*, denominados pLEW RLUC Ribo 1 a 4. Brevemente, as ribozimas utilizadas neste trabalho, estavam anteriormente clonadas em vetor pBluescript, optamos pela troca do gene repórter de yEGP pela luciferase de *Renilla*, o que posteriormente gerou o fragmento RLUC + Ribozima que foi inserido em vetor pLEW 100 previamente tratado. As endonucleases que estão cortadas por uma reta vermelha, representam seus respectivos sítios de restrição perdidos ao longo das etapas.

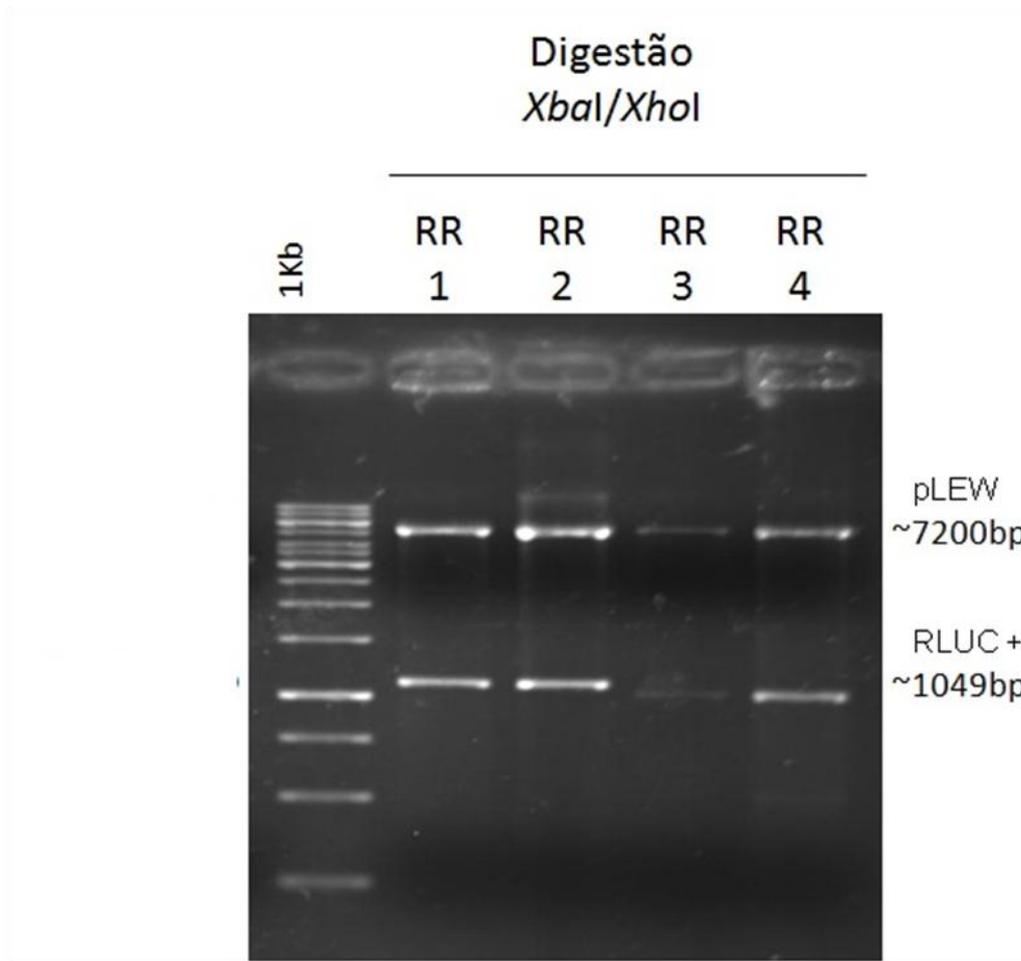


Figura 10 - Perfil de restrição dos vetores pLEW RLUC Ribo 1-4 digeridos por *XbaI* e *XhoI*. Amostras de DNA plasmidial dos vetores pLEW RLUC Ribo 1 a 4 foram digeridas pelas endonuclease *XbaI* e *XhoI* e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% a 100 Volts por 45 minutos. RLUC+Ribo corresponde ao fragmento de pouco mais de mil pares de base compreendendo a sequência que codifica para o gene de luciferase de *Renilla* mais as sequências de Ribo 1 a 4, nomeadas em cada coluna pela abreviação RR. O fragmento de DNA nomeado ao lado corresponde a um fragmento de aproximadamente 7200 pares de bases referente ao corpo do plasmídeo liberado após digestão. O *ladder* utilizado para marcação do tamanho dos fragmentos foi o 1Kb (Fermentas).

6.1.2 – AVALIAÇÃO DA REGULAÇÃO PROMOVIDA POR PLEW 100 RLUC RIBOSWITCHES

Uma vez construídos os vetores descritos no item anterior, decidimos avaliar inicialmente a eficiência de regulação do sistema e ensaios de transfecção transiente de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* seguida da quantificação da atividade de luciferase (RLUC). Desta maneira, 10 µg de DNA plasmidial circular, correspondente a cada vetor (pLEW 100 RLUC Ribo 1 a 4) foram transfectados e subsequentemente transferidos para 5 mL de meio de cultura SDM 79 suplementado com soro bovino inativado. Esta cultura foi então dividida em duas partes, sendo que em uma das partes adicionou-se tetraciclina na concentração de 1 µg/mL, enquanto que a outra permaneceu sem adição do indutor. As culturas de parasitos foram então incubadas por 24 horas a 28°C, tendo a atividade de luciferase de *Renilla* mensurada após este período.

Como se pode observar na Figura 11, as construções genéticas demonstraram, exceto pela construção pLEW RLUC Ribo3, um aumento na expressão de RLUC quando na presença do indutor em relação a situação sem tetraciclina. Este resultado pode ser facilmente explicado pelo fato de que em todos os casos o gene de RLUC está regulado ao nível transcricional pelo repressor de tetraciclina. Quanto à construção pLEW RLUC Ribo3, a regulação transcricional ocorreu mas esta foi contida pela ação da ribozima sempre ativa, que promoveu a clivagem da estrutura do mRNA, impedindo a tradução do mesmo à proteína. O mesmo se esperaria da construção genética contendo *riboswitch 2*, já que esta, na presença de tetraciclina passaria da forma inativa, para a forma ativa, o que acarretaria em diminuição da expressão gênica. A taxa de luminescência gerada por pLEW RLUC Ribo 2 apresentou-se diminuída quando comparada ao controle de expressão, que é regulado apenas pelo promotor (pLEW RLUC Ribo4). Entretanto o efeito da diminuição de atividade ainda está distante do controle negativo (*riboswitch 3*), uma razão para este comportamento seria que a concentração de tetraciclina utilizada é suficiente para liberação do repressor do promotor mas ainda insuficiente para ativação da ribozima. Isto seria devido a características da própria ribozima.

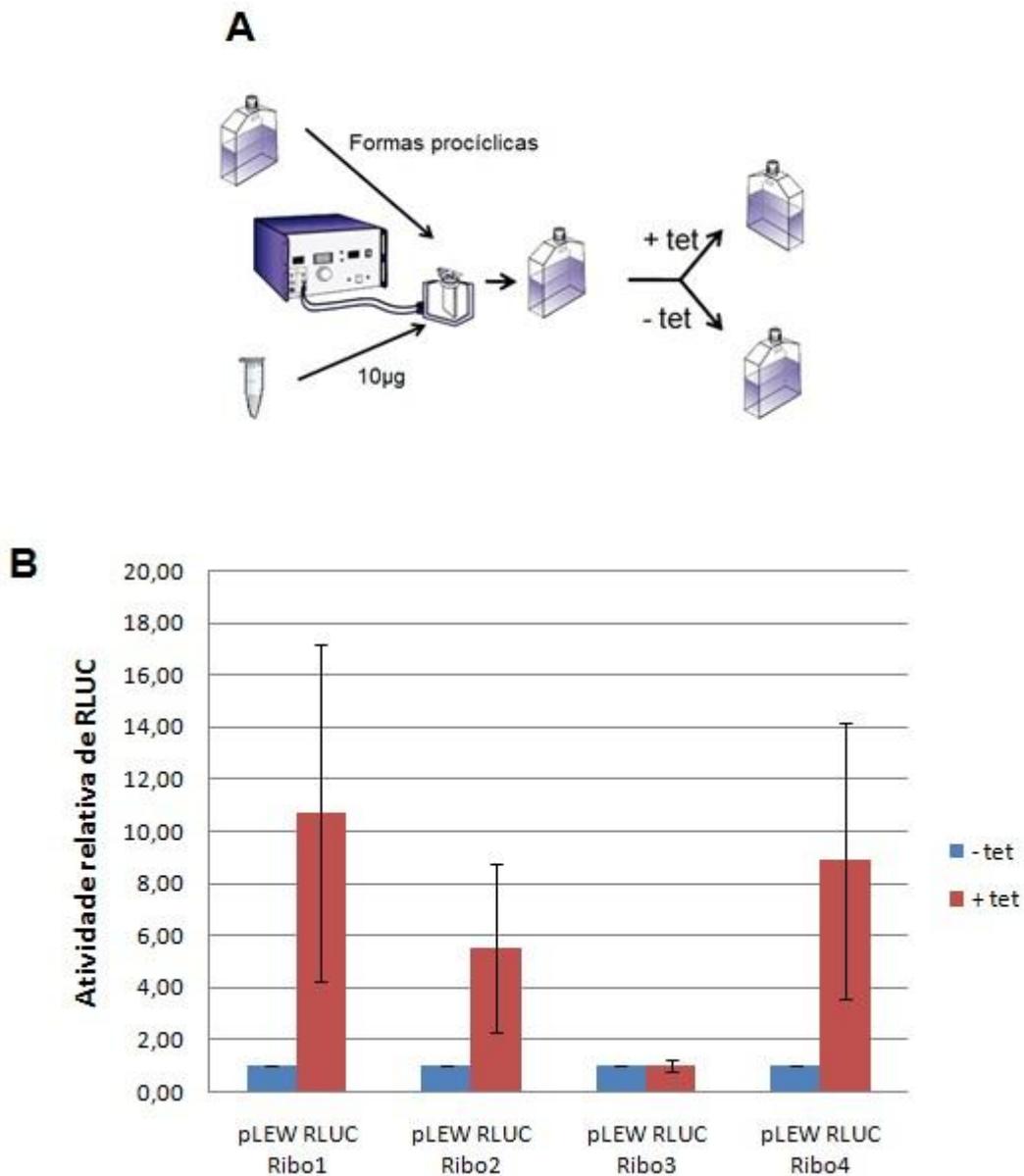


Figura 11 – Atividade de luciferase em formas procíclicas de *T. brucei* transfetadas de forma transiente com as construções pLEW 100 RLUC Ribo 1 a 4. *Painel A:* Esquema representativo da etapa de transfecção transiente em *Trypanosoma brucei*, onde formas procíclicas do parasito foram eletroporadas (aproximadamente 4×10^7 parasitos) juntamente com 10 μ g de DNA do vetor plasmidial circular desejado, em seguida transferidas para 5 mL de meio de cultura SDM 79, esta cultura foi dividida em duas partes, de forma a uma receber tetraciclina (1 μ g/mL) e outra não. Após 24 horas de cultivo, 2mL de cultura foram utilizados para ensaio de luciferase. *Painel B:* Avaliação do perfil de regulação da expressão gênica por promotor GPEET/TetR e *Riboswitch*, mensurada pela atividade de RLUC. A atividade relativa é obtida através da razão entre o valor de luminescência absoluta obtido com indução de tetraciclina pela luminescência absoluta expressa sem indutor. A leitura da luminescência foi feita em leitor de placas TECAN *Infinite 200* utilizando-se *software i-control*. Ensaio realizado em duplicata.

O sistema de regulação contendo *riboswitch* 1 demonstrou-se eficiente no controle da taxa de expressão de luciferase de *Renilla* pois na presença do indutor foi capaz de aumentar em mais de 10 vezes a taxa de expressão do gene, demonstrando um efeito repressor quando na ausência do antibiótico e tendo efeito de superexpressão, quando ativado. Este resultado é equiparável ao controle positivo (*riboswitch* 4). Evidenciando desta forma a capacidade do sistema em ser “ativado” e “desativado”.

Apesar dos resultados mostrados aqui serem compatíveis com o sistema de regulação proposto, o que se esperaria deste sistema de regulação é que sua taxa no aumento da expressão gênica fosse similar ao encontrado por estudos que utilizaram sistemas de expressão regulados por promotores *PARP* utilizando luciferase de vagalume (WIRTZ & CLAYTON, 1995; WIRTZ *et al.*, 1999). Nestes ensaios transientes em *T. brucei* foram descritos elevações na taxa de expressão do gene repórter na ordem de mil a dez mil vezes quando comparados aos sistemas não induzidos. Uma provável explicação na discrepância desses dados poderia ser a contribuição de diferenças na taxa de transfecção alcançada e diferenças nos genes repórteres utilizados.

Em uma alternativa para melhor avaliar o controle na regulação de expressão de genes das construções pLEW RLUC Ribo 1 a 4 seria a obtenção de culturas transfectadas de forma estável, ou seja, com o plasmídeo integrado ao genoma do organismo. Porém após algumas tentativas utilizando diferentes preparações de DNA apenas as construções pLEW RLUC Ribo 2 e 3 foram capazes de gerar populações resistentes ao antibiótico bleomicina. Desta forma, não teríamos como comparar a eficiência de regulação, uma vez que não tínhamos o controle de ribozima inativa (máximo de expressão).

Paralelamente às tentativas de determinação da eficiência de regulação da expressão por *riboswitches* utilizando vetores de integração apenas em *T. brucei*, também transferimos o cassete de regulação RLUC Ribo 1 a 4 para vetores não regulados ao nível transcricional que podem ser utilizados em *T. cruzi*. O que nos levou a construção dos cassetes de regulação gênica descritos no item a seguir.

6.2 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *T. cruzi* POR RIBOSWITCHES.

6.2.1 – CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO REGULADA POR RIBOSWITCHES EM *T. cruzi*

Com o intuito de se gerar vetores de expressão gênica regulados apenas por moléculas de *riboswitch* para serem utilizados em *Trypanosoma cruzi* utilizamos como vetor parental o plasmídeo pRock GFP Hygro, um variante do plasmídeo pRock GFP Neo descrito por DaRocha e colaboradores em 2004 (DAROCHA *et al.*, 2004; REGISDASILVA *et al.*, 2006). Basicamente, este vetor apresenta como característica uma região de recombinação no locus do gene que codifica a proteína de citoesqueleto β -tubulina, e a regulação da expressão gênica a nível transcricional não é controlada por molécula exógena, ou seja, a taxa de transcrição tende a ser constitutiva. O pRock GFP Hygro também contem o gene que codifica para a proteína verde fluorescente, GFP, e o gene de resistência a higromicina, ambos flanqueados por regiões não traduzidas, UTRs (do inglês *Untranslated Region*), que garantem a expressão destes genes ao longo do ciclo de vida do parasito. Para a inserção da sequência de desoxiribonucleotídeos que codificam para RLUC regulada pelas moléculas de *Riboswitch*, o vetor pRock GFP Hygro, foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I para permitir a troca de GFP por RLUC regulada. Paralelamente os vetores pBS RLUC Ribo 1 a 4 foram digeridos pelas mesmas endonucleases, liberando-se um fragmento contendo RLUC seguido a jusante da sequência do *riboswitch* que foi então ligado ao vetor pRock previamente digerido, gerando-se assim os vetores pRock RLUC Ribo 1 a 4 (Figura 12A). A comprovação da clonagem destes fragmentos foi realizada por restrição com as enzimas *Xba*I e *Xho*I (Figura 12B).

6.2.2 – TESTES DO SISTEMA DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RIBOSWITCHES EM *T. cruzi* EM ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE.

A fim de avaliar o comportamento das moléculas de *riboswitch* na qualidade de reguladoras da expressão gênica em tripanossomatídeos utilizamos as construções pRock RLUC Ribo 1 a 4 descritas no item anterior em ensaio de transfeção transiente em *Trypanosoma cruzi*. Sendo assim, 4×10^7 parasitos foram eletroporados juntamente com 50 µg de DNA plasmidial circular e em seguida transferidos para 10 mL de meio de cultura LIT suplementado com 10% de soro bovino fetal, como descrito em Material e Métodos (item 5.17.3). Cada cultura de células transfectadas foi separada em dois volumes, onde uma das culturas recebeu a adição de 1 µg/mL de tetraciclina e em seguida incubou-se os meios de culturas a 28°C por 24 horas. Após tempo de incubação procedeu-se experimento de determinação da atividade de luciferase de *Renilla* utilizando 4 mL das culturas, o que resultou nos dados apresentados na Figura 13.

Os resultados confirmam o funcionamento dos *riboswitches* no controle de expressão gênica para o organismo testado. Como pode ser evidenciado na Figura 5B, extratos de epimastigotas carregando o vetor pRock RLUC Ribo 1 induzidas com tetraciclina obtiveram atividade de luciferase 4 vezes maior que os extratos de culturas não induzidas. Por outro lado, a estrutura capaz de promover autoclivagem do mRNA (Ribo 2) na presença do indutor apresentou queda de pouco mais de 50% na luminescência. Os controles não regulados, negativo (Ribo 3) e positivo (Ribo 4), corroboraram os resultados de modulação do sistema, pois em ambos não ocorre alteração na expressão de RLUC quando na presença do indutor. Cabe ressaltar que os valores de luciferase obtidos para culturas carregando pRock RLUC Ribo3 apresentaram valores de atividade próximas da de fundo (*background*) do teste.

Devido ao fato dos ensaios de transfeção transiente e os valores absolutos de atividade sofrerem grande variação, em parte devido à taxa de transfeção variável nos experimentos acrescidos às variações no ensaio de atividade, e a necessidade de se testar a regulação em diferentes condições, decidimos realizar ensaios de transfeção estável.

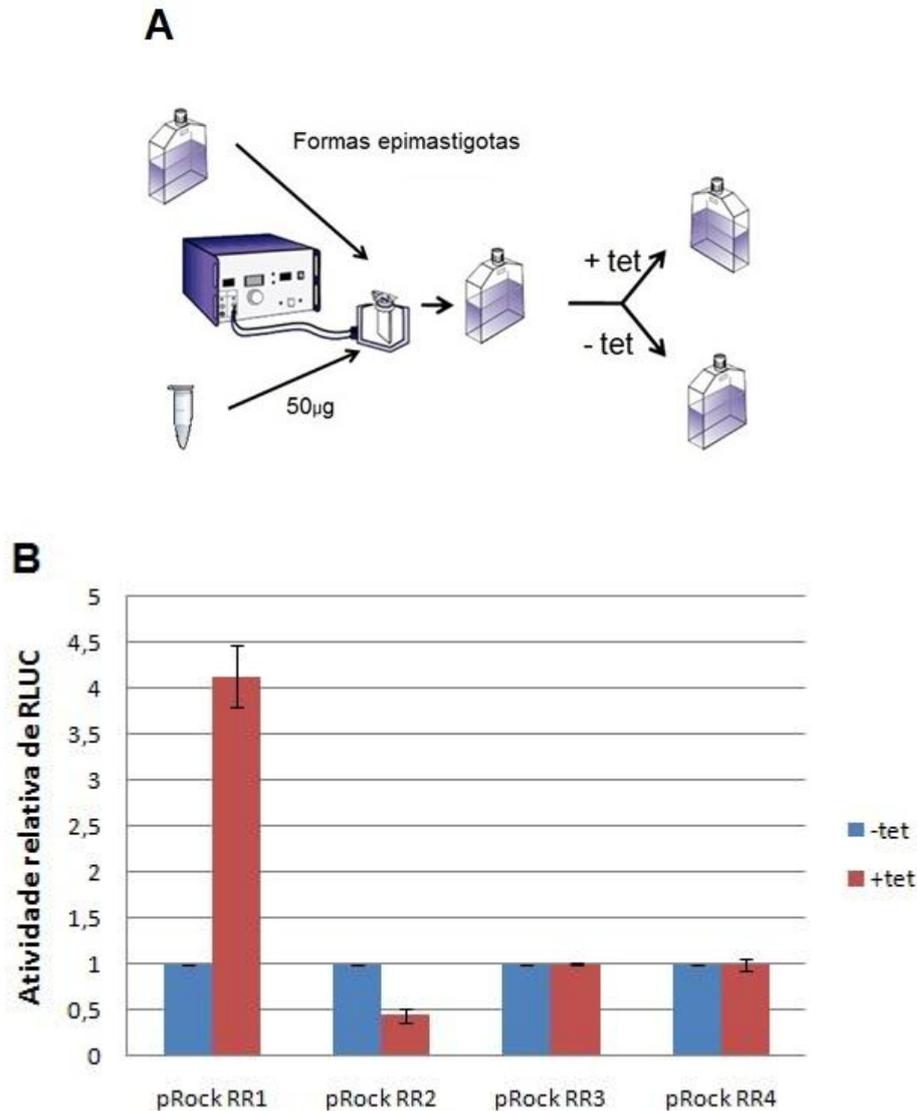


Figura 13 – Atividade relativa de luciferase de Renilla em ensaios de transfecção transiente em *T. cruzi* utilizando os vetores pRock RLUC Ribo 1 a 4. *Painel A* representa o fluxograma do ensaio para análise da regulação da expressão de RLUC por tetraciclina. Formas epimastigotas ($\sim 4 \times 10^7$ parasitos) em fase exponencial de crescimento de *T. cruzi* foram eletroporadas com 50 μg de DNA circular das construções pRock RLUC Ribo1 a 4 (pRock RR1 a RR4). Após transfecção transiente, estes parasitos foram transferidos separadamente para 10 mL de meio LIT, sendo esta cultura dividida em duas partes, tendo sido adicionado tetraciclina para 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (+tet) em uma parte e outra não (-tet). Vinte e quatro horas após eletroporação/incubação com tetraciclina, parasitos de 4 mL da cultura foram coletados e submetidos ao ensaio de atividade de luciferase (ver Material e Métodos). *Painel B* – Avaliação do perfil de regulação da expressão gênica exclusivamente por *Riboswitch*, mensurada pela atividade de RLUC. Os dados de luminescência estão expressos relativos às culturas não induzidas, ou seja, as atividades relativas são obtidas pela razão entre o valor de luminescência absoluta obtido na presença de tet e na ausência. A luminescência foi medida em leitor de placas TECAN *Infinite 200* utilizando-se *software i-control*. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.2.3 – TESTES DO SISTEMA DE REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RIBOSWITCHES EM PARASITOS CARREGANDO DE FORMA ESTÁVEL OS PLASMÍDEOS pROCK RLUC RIBO 1 A 4

Sabendo-se do funcionamento do sistema em ensaios de transfecção transiente, iniciamos os testes em células carregando de forma estável os plasmídeos desejados. Para isto culturas transfectadas com pRock RLUC 1 a 4 foram submetidas a protocolos de seleção com antibiótico Higromicina. Basicamente, as populações carregando as construções genéticas pRock RLUC Ribo 1 a 4 foram obtidas a partir da seleção de uma alíquota das culturas das transfecções transiente. Ou seja, parte do volume das culturas transfectadas foi mantida em condição de cultivo sob pressão de seleção do antibiótico higromicina (100 µg/mL), sendo as populações selecionadas após morte da cultura *mock* (parasitos transfectados nas mesmas condições dos demais, porém sem receber DNA plasmidial). O tempo de cultivo para que houvesse esta seleção foi de aproximadamente 45 dias, obtendo-se assim as amostras de populações de *T. cruzi* resistentes ao antibiótico contendo vetor de expressão regulada pRock RLUC Ribo 1 a 4.

A expressão de RLUC nas populações na ausência de ligante (tetraciclina) foram medidas para avaliar a taxa de expressão basal das RLUC reguladas (Ribo 1 e 2). Como pode ser visto na Figura 14, a população de parasitos expressando RLUC de forma não regulada (pRock RLUC Ribo 4 – RR4) gerou cerca de 2,5 vezes mais atividade de RLUC que as populações carregando RLUC regulada por tetraciclina (pRock RLUC Ribo 1 e 2 – RR1 e RR2). Comparando-se a atividade de RLUC não regulada (RR4) com a regulada pela ribozima sempre ativa (pRock RLUC Ribo3 – RR3) a eficiência de repressão pela ribozima foi de cerca de 100 vezes, o que em valores absolutos de luminescência seria de $216.051 \pm 198.420,14 / 10^6$ parasitos em RR4 contra $2011,33 \pm 1752,28 / 10^6$ parasitos em RR3. Este dado de repressão da expressão de RLUC em culturas carregando pRock RLUC Ribo3 é uma evidência indireta da instabilidade do transcrito após sofrer auto-clivagem (AUSLANDER, KETZER & HARTIG, 2010). Um resultado próximo ao ideal seria

que, nesta situação, RR1 se comportasse como RR3 e que RR2 fosse semelhante a RR4.

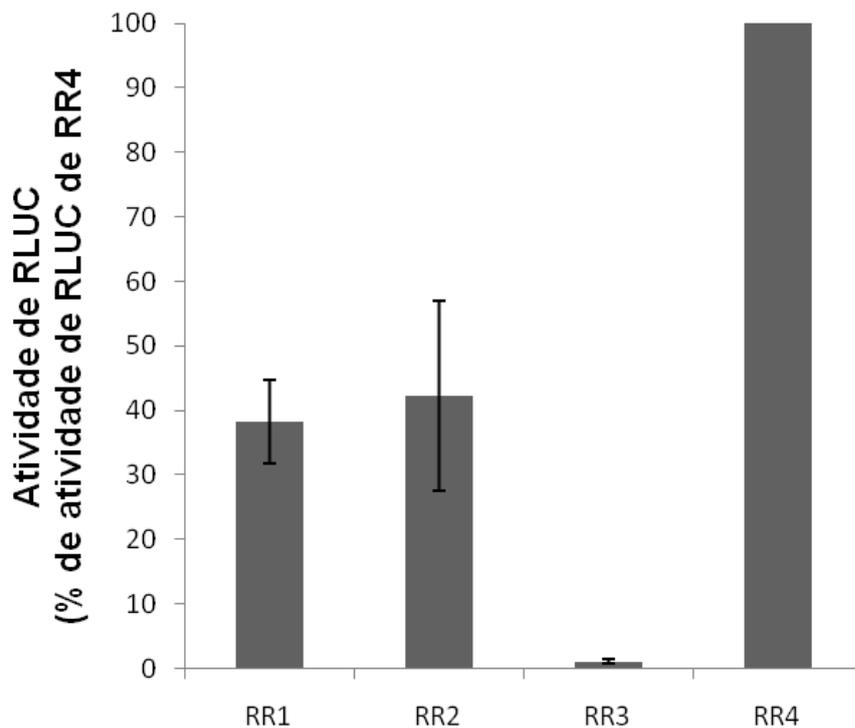


Figura 14 – Atividade de luciferase em culturas contendo as construções pRock RLUC Ribo 1 a 4 de forma estável na ausência de ligante. Níveis de luminescência para as culturas estáveis epissomais de *T. cruzi* contendo pRock RLUC *Riboswitch* 1 a 4 (RR1 a RR4) não induzidas por tetraciclina originadas de formas epimastigotas de *T. cruzi* ($\approx 4 \times 10^7$ parasitas) eletroporadas com 50 μg de DNA plasmidial circular e transferidas para meio de cultura LIT com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Higromicina. O tempo de seleção dos parasitos contendo os cassetes de expressão pRock RLUC Ribo 1 a 4 foi de aproximadamente 45 dias. RR – RLUC *Riboswitch*. Resultado obtido de 6 experimentos distintos.

Estas populações de *T. cruzi* expressando de forma estável RLUC foram submetidas a ensaios de regulação da atividade de luciferase de *Renilla* utilizando-se tetraciclina nas concentrações de 1 e 10 µg/mL em diferentes tempos de incubação (0, 24 e 48 horas). Nestes ensaios os resultados de atividade de luciferase foram normalizados em relação ao número de parasitos utilizados no experimento e em relação às culturas na ausência do ligante. Estes resultados estão apresentados na Figura 15.

Novamente, como pode ser visto na Figura 15, o *riboswitch* 1 apresentou-se eficaz na modulação da expressão de RLUC, já que aumentou em mais de 3 vezes a atividade de luciferase quando induzida por tetraciclina na concentração de 1 µg/mL, reforçando-se assim o dado obtido na transfecção transiente. Esta diferença de atividade de RLUC é estatisticamente significativa. Por outro lado, o *riboswitch* 2 apresentou um padrão de repressão muito parecido com o anterior, ou seja, uma tendência na redução da expressão de aproximadamente 50% na presença do antibiótico 1 µg/mL, corroborando seu padrão de modulação da expressão. Contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto este resultado torna-se menos significativo, quando se analisa a taxa de regulação da ribozima sempre ativa (Ribo3) e da inativa (Ribo4), que apesar de não sofrerem regulação por tetraciclina, apresentaram certa redução na atividade de RLUC. Uma das explicações para este fenômeno, seria um efeito não específico da tetraciclina na redução da expressão, que talvez seja menos evidente em pRock RLUC Ribo1 por compensação pela indução. Sendo assim é possível que o efeito da indução por tetraciclina seria ainda maior pelo *riboswitch* 1.

Em relação ao tempo de incubação com tetraciclina pode-se dizer que o *riboswitch* 1 (ribozima inativada por tetraciclina) tende a manter um aumento proporcional na expressão de RLUC ao longo das 48 horas, não permitindo concluir por este experimento que tenha sido atingido o máximo de expressão regulada positivamente. O mesmo não se pode afirmar em relação à *riboswitch* 2 (ribozima ativada pelo indutor), já que após 24 horas houve pronunciamento da queda de atividade de RLUC que se manteve até as 48 horas.

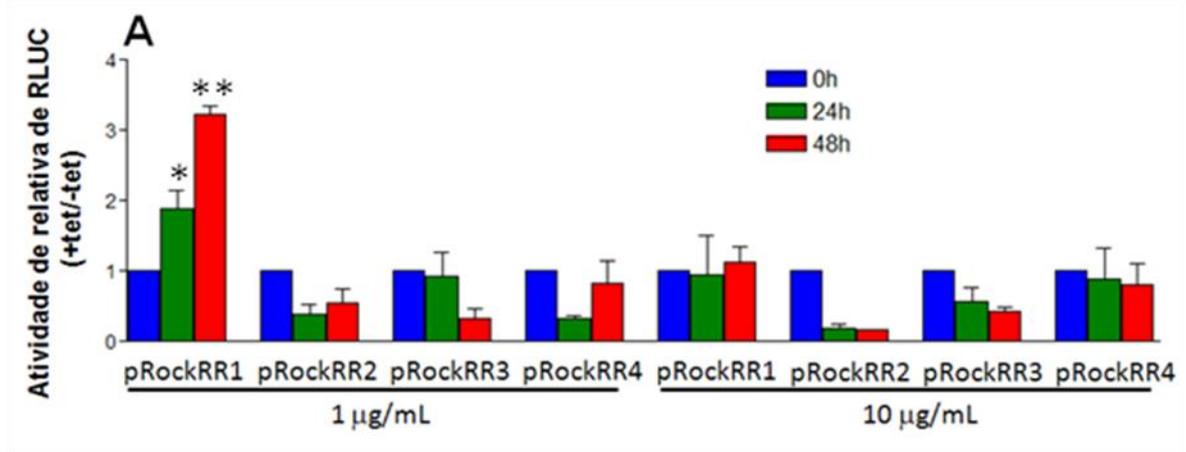


Figura 15 – Efeito de tetraciclina na modulação de RLUC regulada por *Riboswitches*. Atividade relativa de RLUC em ensaios com culturas de formas epimastigotas carregando na forma estável e epissomal das construções pRock RLUC Ribo 1 a 4 (pRock RR1 a RR4). Neste ensaio foram testados os efeitos de tetraciclina nas concentrações de 1 e 10µg/mL por 0, 24 e 48 horas de incubação. A atividade relativa de RLUC em extratos de culturas foi mensurada e normalizada pelo número de parasitos presentes no ensaio. Os dados estão expressos relativos às culturas não induzidas. A luminescência foi medida em leitor de placas TECAN *Infinite 200* utilizando-se *software i-control*. Experimento realizado em triplicata. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$ para análises estatísticas entre pRockRR1 induzidas com 1 µg/mL de tetraciclina.

Analisando-se os transfectantes quando submetidos à modulação na concentração de 10 µg/mL de tetraciclina, obteve-se um resultado inesperado, como pode ser visto na Figura 15. Todos os cassetes, a exceção do cassete contendo *riboswitch 1*, tiveram queda na taxa de atividade, independente de como RLUC seja regulada. Contudo, também se pode observar que houve redução na atividade de RLUC, desde que não foi notada elevação na expressão de RLUC, como visto com 1 µg/mL do indutor. É importante ressaltar que o mecanismo de ação deste antibiótico, que liga com a subunidade ribossômica 30S em procariotos e através de interação com rRNA 16S, impede a ligação do aminoacil-tRNA ao seu sítio acceptor, afetando desta forma o processo de tradução de proteínas (SEMENKOV *et al.*, 1982; revisado por GRIFFIN *et al.*, 2010). O resultado obtido aqui (Figura 15) gera evidência de uma possível interferência da tetraciclina no processo de tradução de *Trypanosoma cruzi*. Fato semelhante foi descrito por Taylor e Kelly (TAYLOR & KELLY, 2006), onde concentrações maiores do que 1 µg/mL do antibiótico acarretavam em menor aumento na taxa de expressão de genes regulados por promotor T7 em *T. cruzi*.

Tomando conhecimento do perfil de modulação da expressão gênica demonstrado pelo sistema de regulação usando a concentração de 1 µg/mL do ligante e a toxicidade apresentada a 10 µg/mL, resolvemos testar o comportamento dos *riboswitches* na presença de 0,1 µg/mL de tetraciclina e repetindo-se a dosagem de 1 µg/mL do antibiótico. Neste ensaio, os transfectantes foram submetidos a um ensaio semelhante ao descrito anteriormente a exceção de que foram testados nas concentrações de 0,1 e 1 µg/mL de tetraciclina estendendo-se o tempo de incubação por até 96 horas. Lembrando-se que os experimentos foram normalizados pelo número de parasitos presentes em cada ensaio e relativizados perante culturas não induzidas e em mesmas condições de cultivo.

Como mostrado na Figura 16, foi obtido o mesmo padrão de regulação da expressão gênica apresentado nos ensaios anteriores, em que o *riboswitch 1* na presença do ligante elevou a atividade RLUC, enquanto que *riboswitch 2* diminuiu intensidade do gene repórter e *riboswitches 3* e *4* tendem a não provocar drástica alteração na atividade, com uma certa flutuação de leitura de luminescência. Entretanto o perfil de modulação encontrado neste experimento para pRock RLUC Ribo 1 com 1 µg/mL de tetraciclina mostrou-se levemente diferente do previamente

descrito, já que sua taxa de aumento na expressão gênica no tempo de 48 h foi reduzida de $3,2 \pm 0,2$ para 2,4 vezes, tendo seu ápice de aumento na leitura de luminescência em 2,9 vezes no tempo de 72 h. Porém, este ensaio sugere que este nível de indução esteja próximo do máximo, uma vez que ocorreu queda na atividade. Diferentemente do que ocorre à *riboswitch* 1, a estrutura 2, na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ de tetraciclina, atinge seu máximo de redução na atividade de luciferase de *Renilla* em 24 h, e assim permanece ao longo do tempo até 96 h, mantendo sua taxa de repressão sempre em níveis próximo a 2 vezes. Estes dados obtidos corroboram os resultados obtidos na Figura 15.

Em relação à redução na concentração do ligante para 0,1 $\mu\text{g/mL}$ nota-se que também ocorre tendência na redução nos níveis de regulação da expressão do gene repórter, alcançando-se 1,5 vezes de indução (pRock RLUC Ribo1) e repressão máxima de 0,8 vezes (pRock RLUC Ribo2). Estas taxas de regulação com RLUC estão aquém das desejáveis para estudos de genômica funcional.

Sabendo-se que o mecanismo de ação das moléculas de *riboswitch* é dependente de sua estrutura, pois por meio de sua conformação irá ocorrer reconhecimento do ligante e ter sua ação auto-catalítica determinada em sua plataforma de expressão, decidimos avaliar possível interferência da sequência 3'UTR na estrutura secundária das moléculas de *riboswitches*. Esta preocupação surgiu uma vez que não obtivemos níveis de regulação tão altos quanto os descritos na literatura. Nesta predição utilizamos o programa mFOLD, disponível no sítio <http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=mfold>.

Na Figura 17A é mostrada a estrutura predita pelo programa mFOLD da fusão entre a sequência de RNA correspondente a ribozima sempre ativa (Ribo3) e a sequência de gGAPDH (gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase glicossomal) clonada a jusante, sendo que a extremidade 5' corresponde ao nucleotídeo adjacente ao códon de parada do gene que codifica para luciferase de *Renilla* e a 3' o nucleotídeo imediatamente anterior ao início da calda poliA determinada por Kendall *et al.* (1990).

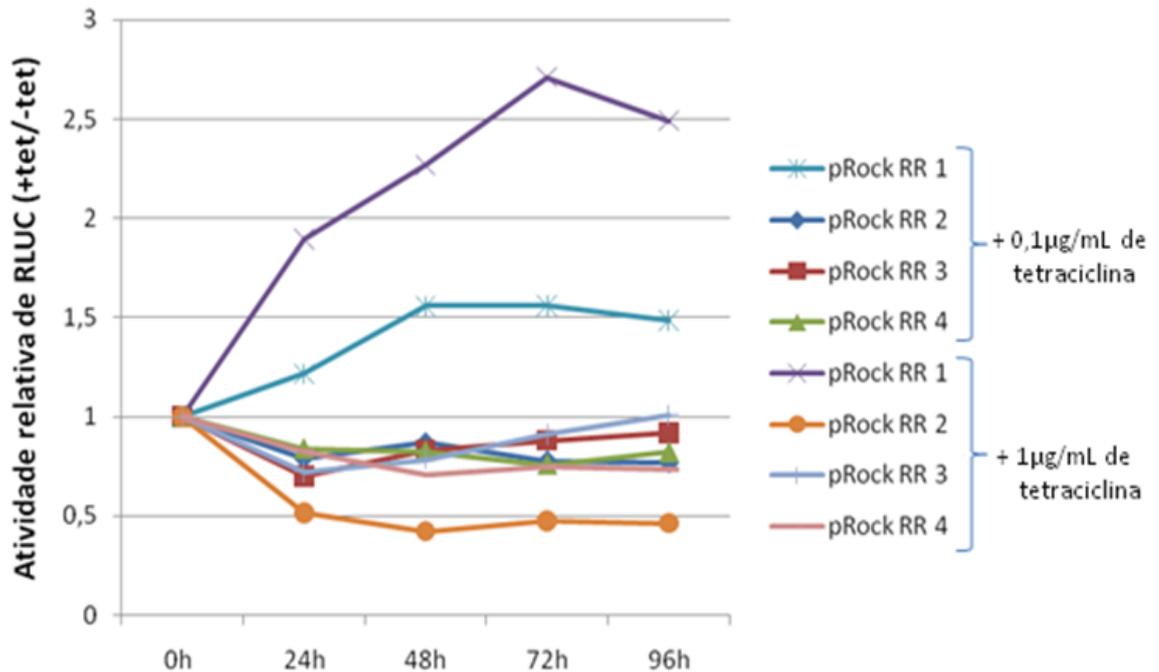


Figura 16 – Atividade de luciferase regulada por *riboswitches* em concentrações de 0,1 e 1 µg/mL de tetraciclina. Culturas de formas epimastigotas carregando os plasmídeos pRock RLUC Ribo 1 a 4 (pRock RR1 a RR4) foram submetidas ao ensaio de regulação da expressão de RLUC na presença de 0,1 e 1 µg/mL de tetraciclina (tet), nos tempos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. A atividade relativa de RLUC em extratos de culturas foi mensurada e normalizada pelo número de parasitos presentes no ensaio. Os dados de luminescência foram medidas em leitor de placas TECAN *Infinite 200* utilizando-se *software i-control* e correspondem a um único ensaio e estão expressos relativos às culturas não induzidas. Ensaio realizado em duplicata.

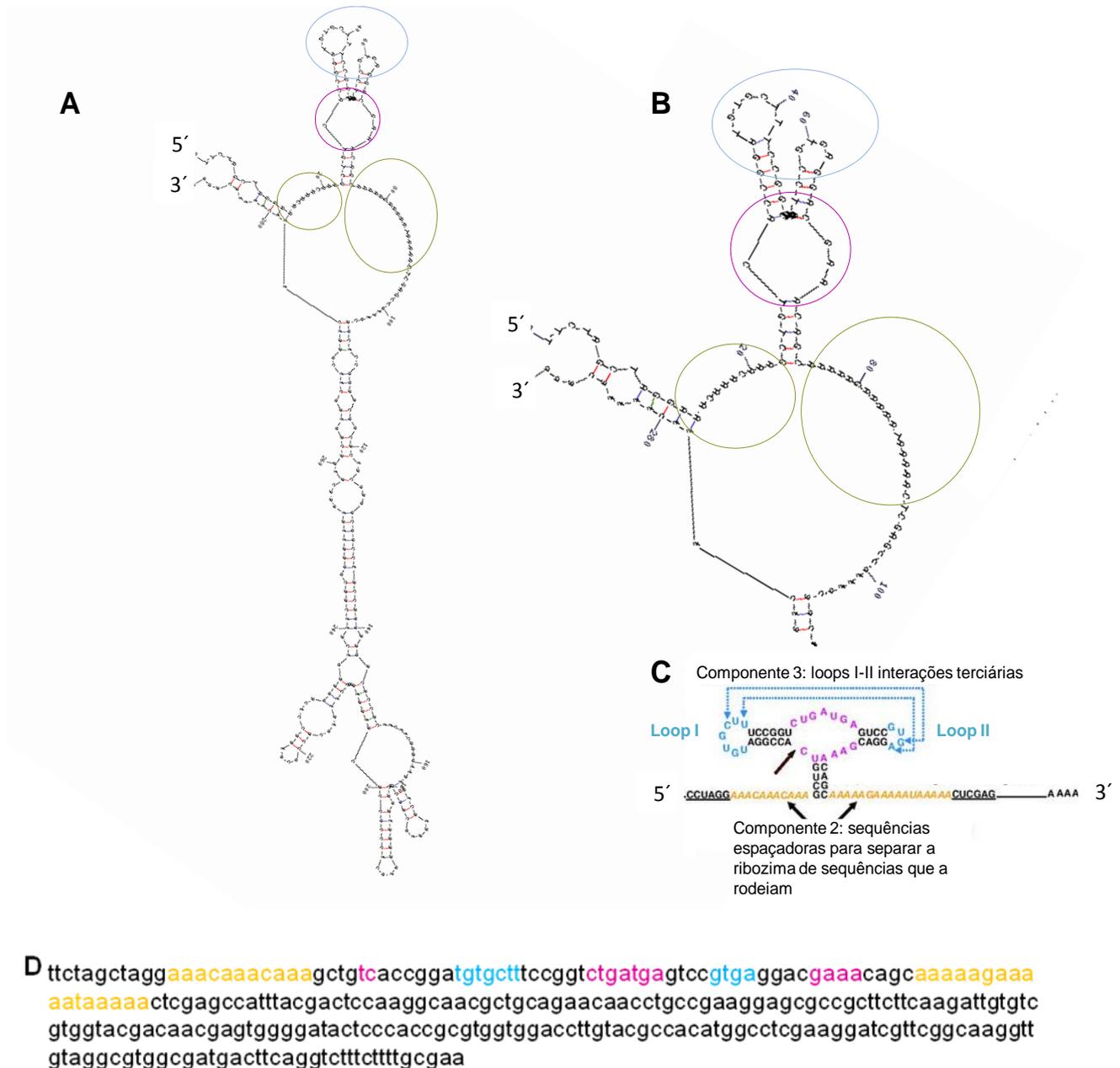


Figura 17 – Análise comparativa da estrutura secundária predita da ribozima em fusão com a porção 3'UTR proveniente da construção com a estrutura descrita anteriormente. A – Estrutura predita da sequência que contém a ribozima sempre ativa (Ribo 3), desde o nucleotídeo imediatamente após o códon de parada de RLUC até o nucleotídeo anterior a cauda poli-A. Esta estrutura foi predita pelo programa mFOLD nas condições padrões sugeridas pelo *software*. **B** – Ampliação da região da estrutura do painel A que contém a ribozima. **C** – Adaptação da estrutura da ribozima “cabeça de martelo” utilizada por WIN & SMOLKE (2007) destacando suas regiões. Nucleotídeos em azul correspondem a sequências necessárias para formação da estrutura conformacional necessária para a molécula ser funcional, em amarelo as sequências espaçadoras responsáveis por insular a estrutura da ribozima, e em roxo a plataforma de expressão (sítio catalítico). A seta que aponta entre os dinucleotídeos UC e AC indica o ponto de auto-clivagem da ribozima. Os círculos coloridos em **A** e **B** são correspondentes às cores utilizadas em **C** para se especificar as sequências que compõem a estrutura da molécula da *riboswitch* 3. **D** – Sequência de nucleotídeos de Ribo 3 utilizada para predição da estrutura secundária.

O *software* forneceu 6 possíveis estruturas para a sequência utilizada, sendo que a escolha da estrutura a ser utilizada foi a que apresentou menor valor de energia livre de Gibbs (fornecido pelo programa). Interessante ressaltar que em todas as estruturas fornecidas pelo mFOLD, a estrutura da ribozima se manteve constante, variando muito pouco em sua conformação, o que provavelmente se deve à presença das sequência espaçadoras (conforme indicado na Figura 17C), que promovem isolamento das estruturas das *riboswitches* utilizadas, minimizando efeitos externos que possam interferir na formação de sua estrutura secundária. Logo, com a comparação das estruturas secundárias teórica (retirado de WIN & SMOLKE, 2007 – Figura 17C) e predita pelo programa mFOLD da ribozima mais 3'UTR, sugerimos que os baixos níveis de regulação da expressão gênica encontradas neste trabalho têm chances reduzidas de serem atribuídas a formação de estruturas incompatíveis com atividade auto-catalítica. Apesar de menos provável, não podemos excluir a possibilidade da ligação de fatores protéicos no 3'UTR afetar o *riboswitch*, ou o contrário.

6.3 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *T. cruzi* POR DOMÍNIO DESESTABILIZADOR (DD)

6.3.1 – CONSTRUÇÃO DE VETORES PARA EXPRESSÃO REGULADA POR DD EM *T. cruzi*

Outro objetivo deste presente estudo, em colaboração com a prof. Dra. Andrea Ávila do Instituto Carlos Chagas (ICC)/Fiocruz – Curitiba-PR, foi a criação de um vetor de regulação da expressão gênica modulado por polipeptídio conhecido como Domínio Desestabilizador (DD) a ser utilizado em *T. cruzi*. A molécula de DD fusionada ao gene de interesse confere instabilidade à proteína, que na presença do ligante, como, por exemplo, Shld1, um análogo à rapamicina, estabiliza a proteína. A instabilidade estrutural da proteína a direciona para degradação pelo sistema ubiquitina-proteossomo. Desta forma pode-se obter um cassete de expressão gênica com regulação a nível pós-traducional.

O primeiro passo foi a obtenção do plasmídeo contendo o gene da proteína verde fluorescente (GFP) fusionada com Domínio Desestabilizador na porção 3', em vetor pROCK GFP Hygro. A construção deste cassete de expressão gênica será descrita a seguir.

A fim de se obter o cassete de expressão gênica regulada em *T. cruzi* por Domínio Desestabilizador inicialmente amplificou-se um fragmento de DNA que codifica GFP em fusão na região C-terminal com o domínio desestabilizador (GFPDD – 1116 pb), utilizando um plasmídeo e iniciadores gentilmente cedidos pela Dra. Andrea Ávila. Este produto de amplificação foi clonado em vetor pGEM T easy e a orientação de clonagem determinada por restrição enzimática. O fragmento de DNA correspondente a GFPDD foi obtido por restrição com as enzimas *SpeI* (extremidade compatível com *XbaI*) e *XhoI* e inserido nos sítios de *XbaI* e *XhoI* de pRock GFP Higo (Figura 18).

O produto de amplificação com a enzima *Pfu polymerase* subclonado em pRock GFP Higo, gerando pRock GFPDD Higo, foi sequenciado com cobertura confiável de 82% da sequência de GFPDD.

6.3.2 – MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE EM FUSÃO COM DOMÍNIO DESESTABILIZADOR EM VETOR pROCK GFPDD

Para realização das atividades de regulação da expressão gênica utilizando o DD, o DNA da construção pRock GFPDD Higo foi linearizado com enzima de restrição *NotI* e eletroporado em *T. cruzi* conforme descrição em Material e Métodos. A cultura transfectada foi submetida ao protocolo de seleção com antibiótico apropriado (higromicina 100 µg/mL).

O perfil de modulação da expressão gênica do cassete de expressão pROCK GFPDD em *T. cruzi* foi realizado com os indutores Shld1 (1 µM e 50 nM) e rapamicina (50 nM) nos tempos de incubação de 0, 4, 12 e 24 horas e analisados por citometria de fluxo no aparelho FACSCalibur. A auto-fluorescência de formas epimastigotas da cepa selvagem (CL Brener) na presença de indutor foi utilizada como controle no ensaio.

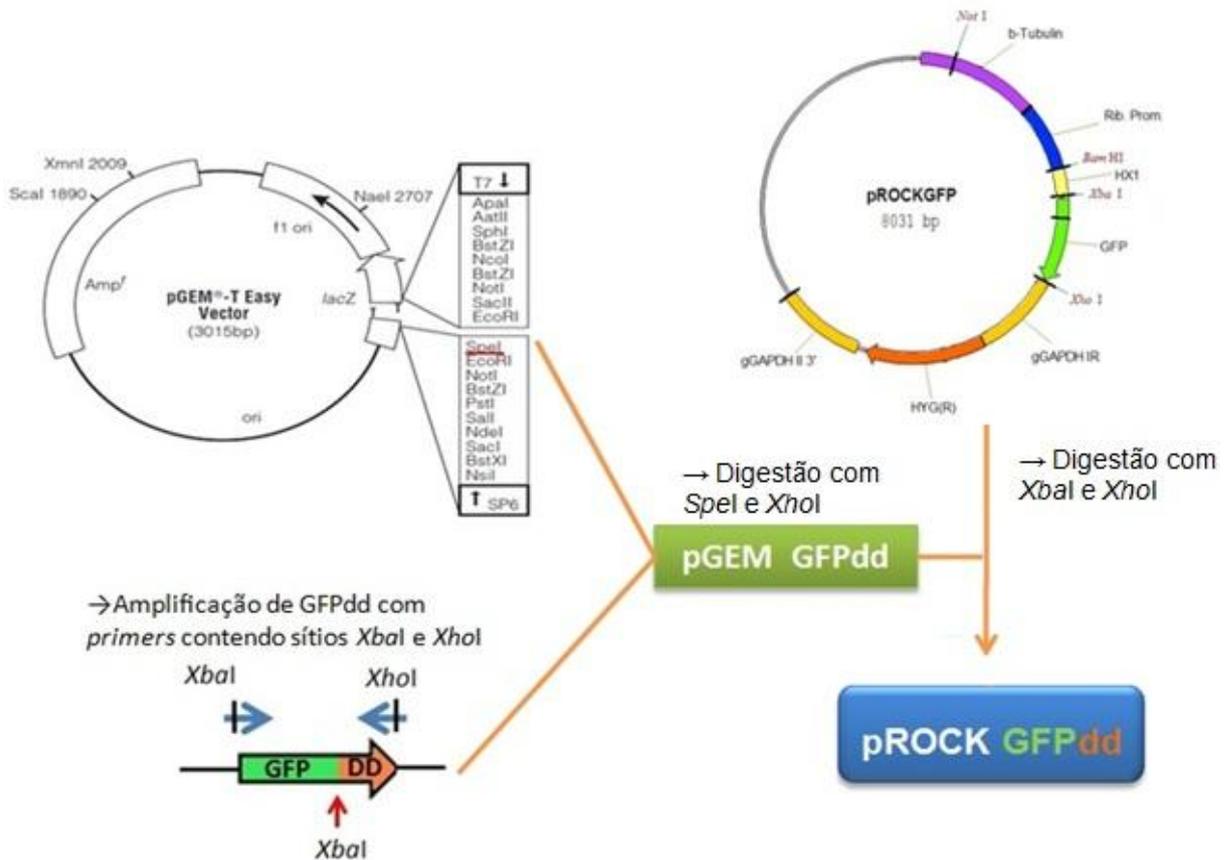


Figura 18 - Esquema ilustrativo demonstrando construção do vetor plasmidial pROCK GFPDD. Ilustração demonstrando as etapas de clonagem necessárias para se gerar o plasmídeo pROCK GFPDD a ser transfectado em *Trypanosoma cruzi*. O fragmento contendo GFPDD foi amplificado por *primers* específicos, representados pelas setas azuis, em seguida o *amplicon* foi clonado em vetor pGEM T- easy originando pGEM GFPDD que foi digerido pelas enzimas de restrição *SpeI* e *XhoI*, resultando no fragmento GFPDD posteriormente ligado ao vetor pROCK GFP Hygro previamente digerido com *XbaI* e *XhoI*. As barras escuras que cortam os *primers* utilizados para amplificação de GFPDD correspondem a sítios de restrição presentes na sequência nucleotídica. A seta em vermelho indica sítio de restrição para enzima *XbaI* presente entre GFP e DD.

Em ensaio preliminar, independentemente do tempo de indução os parasitos apresentaram o mesmo padrão de indução obtido com 24 h na presença dos indutores. Como pode ser visto na Figura 19, não houve diferença nos níveis de fluorescência do controle negativo, parasitos contendo a construção para expressão de GFPDD sem indutores, em relação aos parasitos na presença de indutores.

A escolha destas concentrações de Rapamicina e Shld1 para estabilização do polipeptídeo DD e conseqüentemente da proteína a ele fusionada, GFP, foi feita conforme descrição de artigo publicado por Madeira da Silva e colaboradores (2009). Estes autores utilizaram esta abordagem para regular a expressão gênica de genes repórter (YFP – *Yellow Fluorescent Protein*) e endógeno (lipofosfoglicana - LPG) em duas espécies de leishmania (*L. major* e *L. braziliensis*), obtendo máxima fluorescência dos parasitos testados com 1 μ M destes indutores do sistema. A utilização de 50 nM de indutor foi escolhida, uma vez que esta concentração foi capaz de induzir a expressão em leishmania, e além disto esta concentração também foi testada em *T. brucei* (JULIEN *et al.*, 2007) para indução de outro sistema de regulação da expressão gênica sistema.

Comparando-se os níveis de regulação obtidos em Madeira da Silva *et al.* (2009), com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se verificar que com dados neste experimento a regulação pós-transcricional por DD é ineficiente ou inexistente em *T. cruzi* nas condições testadas, já que o padrão de fluorescência obtido por citometria de fluxo não mostrou nenhuma alteração no padrão de fluorescência. Contudo, evidenciamos um deslocamento no nível de fluorescência dos parasitos carregando a construção pRock GFPDD quando comparados com parasitos selvagens, semelhante a Madeira da Silva *et al.* (2009).

Uma vez que o processo de regulação estava presente em leishmania decidimos avaliar se *T. cruzi* possui as potenciais proteínas alvos para rapamicina. Para isto realizamos pesquisa de homologia nos bancos de dados TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) utilizando a sequência de DD que foi fusionada a GFP. Os resultados da pesquisa de BlastP (*Basic Local Alignment Search Tool for Protein sequence*) no banco de dados de *T. cruzi* e *L. major* estão compilados na Figura 20. Os dados de alinhamento múltiplo mostram claramente um grau de conservação entre as sequências de *T. cruzi* e *L. major* analisadas com DD, sendo o grau de conservação maior entre as proteínas dos tripanossomatídeos. Desta forma, este

resultado preliminar de não regulação pelo domínio desestabilizador em *T. cruzi* pode ser devido às condições de indução testada. Sendo assim pretendemos futuramente testar a modulação da expressão gênica com linhagens transfectantes em diferentes fases de crescimento, e talvez do ciclo de vida.

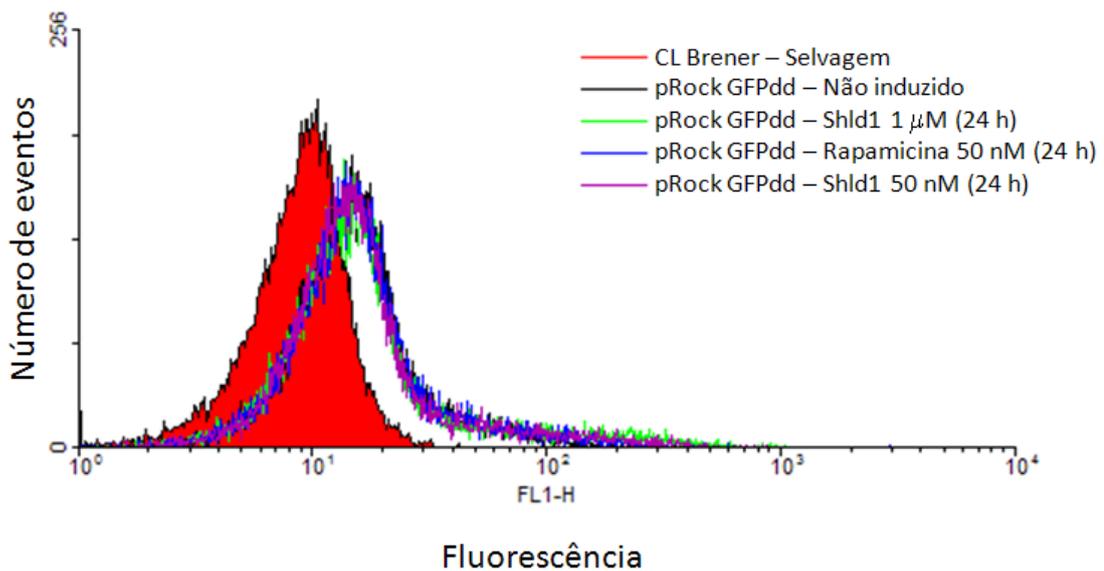


Figura 19 – Análise por FACS da fluorescência de GFP em formas estáveis integrativas de *Trypanosoma cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* contendo construção pRock GFPDD de forma estável e integrativa foram cultivadas na presença ou ausência de Rapamicina ou seu análogo Shld1 por 24 horas e tiveram fluorescência mensurada por citometria de fluxo (FACS), em citômetro FACSCalibur para 20.000 eventos (células). O histograma representa a fluorescência corresponde às diferentes populações celulares cultivadas nas diferentes situações, representadas ao lado da imagem. Os dados foram processados por software WinMDI versão 2.9.

A

DD		MGVQVETISPGDGRTFPKRGQTCVVHYTGMLEDGKKVD-SSRDRNKPFKFMLGK	53
LmjF36.0230	1	MGVIRTVMKAGSGAT-PKPGQITIVHCTGYLADGKKKFWSTHDDKNPFTFNVGV	53
LmjF22.1430	6	VVMDKIIIEGDGKTIIPRSGSVVTLDYIGYLEDGSKFD-STLERGKPFVFRVGC	56
Tc00.1047053508169.69	1	MGVTRQVLSAGNG-VQPKAGDKITVHCTGYLANGRKKFWSTLDNNEPFAFRVGL	56
Tc00.1047053508323.84	7	VLMDKIIIEGDGKTIIPRQGSIVTLDYVGFDPDGRFRD-STIERGKPFVFRVGC	57
DD	54	QEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAGATGHPGI-IPPHATLVFDVELLK	132
LmjF36.0230	54	GQVIRGWDEGMQMQLGETAELLMTADYAYGDRGFPAWNIIPSNALLFEIELLK	107
LmjF22.1430	57	GEVIKGDAGIIQMSKGRSKLTMPPTLAYGGTGFPGL-IPPNATIVFEVTLL	108
Tc00.1047053508169.69	57	GQVIRGWDEGMLMSTGEKAEKMSGDYAYGKKGFPWGIIPDADLIFEIELLK	107
Tc00.1047053508323.84	58	GEVIKGDGEGIVQMSKGRSRLTIIPPSLAFGSTGFPGM-IPPDTVIVFEVTLL	109

B

Identificação	Descrição	Tamanho	Identidade	Similaridade	Valor de E
LmjF22.1430	Potencial proteína de ligação FK506 1 (<i>L. major</i>)	111	55/103 (53%)	73/103 (70%)	3,5e-28
LmjF36.0230	Peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerase (<i>L. major</i>)	109	54/108 (50%)	69/108 (63%)	1,1e-22
Tc00.1047053508323.84	Potencial peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerase (<i>T. cruzi</i>)	112	51/103 (49%)	73/103 (70%)	1,6e-26
Tc00.1047053508169.69	Potencial peptidil-prolil <i>cis-trans</i> isomerase (<i>T. cruzi</i>)	109	54/108 (50%)	71/108 (65%)	4,0e-23

Figura 20 – Comparação de sequências entre o Domínio Desestabilizador e proteínas homólogas de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*. No *painel A*, sequências de aminoácidos de proteínas ou potenciais alvos do sistema mTOR em *L. major* e *T. cruzi* em comparação quanto ao grau de homologia em relação ao polipeptídeo Domínio Desestabilizador utilizado neste trabalho. *Painel B*, dados relativos à análise do alinhamento entre as sequências comparadas em *A*. Os aminoácidos sombreados por cinza são idênticos entre os polipeptídeos comparados. Os traços ou espaços vazios representam *gaps* introduzidos pelo *software* para melhor alinhamento entre as sequências. As sequências iniciadas pela nomenclatura Lmj são correspondentes a *Leishmania major*, enquanto que as iniciadas pela nomenclatura Tc, correspondem a *Trypanosoma cruzi*.

7 – DISCUSSÃO

Inicialmente, escolhemos o plasmídeo pLEW 100 devido sua alta taxa de expressão em formas procíclicas de *T. brucei* garantida pelo promotor de GPEET/TetR (Repressor de tetraciclina), permitindo um aumento de 1000 a 10000 vezes na taxa de expressão do gene repórter regulado pelo mesmo (WIRTZ & CLAYTON, 1995; WIRTZ *et al.*, 1999). Contudo, tais níveis de modulação na expressão podem ser variáveis entre os clones selecionados de uma mesma cultura, como por exemplo, em Wirtz *et al.*, (1999) onde a atividade de repressão de luciferase por TetR entre os clones é variável de 100 a 500 vezes. Outro exemplo foi demonstrado em LaCount *et al.* (2000) pela variação nos fenótipos apresentados pelo nocaute da proteína de adesão flagelar *FLA1* entre os diferentes clones. Pode-se citar ainda Taylor e Kelly (2006) onde houve verificação de atividades de luciferase em níveis basais de 700 a 5000 unidades relativas de luminescência, bem como níveis distintos de indução pelo sistema criado, que variam de 2 a 37 vezes no aumento da expressão gênica. De uma forma geral, apesar do sistema criado por Wirtz *et al.* (1999) apresentar uma excelente taxa de regulação, ainda ocorre vazamento de expressão na ausência de indutor, percebido quando utilizado para expressão do gene de Cre recombinase (BARRETT, LACOUNT & DONELSON, 2004). Entretanto, em nossos ensaios de transfecção transiente não obtivemos o mesmo sucesso de regulação descrito anteriormente, e uma provável explicação para esses resultados sejam prováveis diferenças de eficiência nos ensaios de transfecção, uma vez que não atingimos níveis elevados de luminescência nesses ensaios utilizando as mesmas quantidades de DNA e condições de eletroporação. Por outro lado, obtivemos maior sucesso quando testamos os *riboswitches* no vetor de expressão estável *T. cruzi*, onde concentraremos nossas análises.

A regulação da expressão gênica modulada por *riboswitches* foi testado em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) controlando o gene de GFP (WIN & SMOLKE, 2007). Semelhante ao utilizado aqui esses *riboswitches* foram inseridos na região 3'UTR, ou seja, anterior ao sítio de poliadenilação. No trabalho de Win e Smolke (2007) foram utilizados como sensores para ribozima, aptâmeros de reconhecimento de teofilina (dimetilxantina utilizada como fármaco antiasmático) e posteriormente para interação de tetraciclina (utilizados neste projeto de mestrado).

O primeiro aptâmero demonstrou atividades de regulação de 8 e 23,4 vezes no aumento da taxa de expressão de GFP, quando na presença de 1 mM (188 µg/mL) e 5 mM (900 µg/mL) de teofilina, respectivamente. Nos ensaios de repressão foi alcançada uma taxa máxima de 17,2 vezes de redução na expressão do gene repórter na presença de 900 µg/mL do ligante. Enquanto que a estrutura regulada por tetraciclina apresentou elevação na fluorescência de GFP na ordem de 21 e 29,5 vezes quando induzido por 0,25 mM (111 µg/mL) e 1 mM (444 µg/mL) de antibiótico, respectivamente. Tais valores de regulação obtidos por Win e Smolke (2007) permitem uma maior amplitude no controle da expressão gênica. Este sistema comparado com os dados obtidos em *T. cruzi* com pRock RLUC Ribo 1 (para regulação positiva) e pRock RLUC Ribo2 (regulação negativa) apresenta níveis de regulação, tanto positiva, quanto negativa, superiores aos descritos por nós, entretanto as concentrações de indutores utilizadas foram extremamente elevadas (180 a 900 vezes maior) à utilizada aqui. Infelizmente, apesar da tetraciclina ser bastante utilizada na manipulação da expressão em tripanossomatídeos (WIRTZ *et al.*, 1999; WIRTZ & CLAYTON 1995; WIRTZ, HOEK & CROSS 1998; DAROCHA *et al.*, 2004; TAYLOR & KELLY, 2006; YAN *et al.*, 2002; YAO *et al.*, 2007), na nossa tentativa em incrementar a concentração de antibiótico para 10 µg/mL apresentou certo nível de toxidez reduzindo a taxa de expressão independente do *riboswitch*. É provável que a toxidez da tetraciclina seja devido a sua atuação no processo de tradução como em procaríotos. Ademais, um recente estudo demonstrou melhora no tratamento de animais (camundongos e gado) infectados com *Trypanosoma congolense* resistentes as drogas convencionais, quando combinado fármacos tradicionais com tetraciclina, promovendo maior sobrevivência, sendo que 50% dos animais tiveram parasitemia controlada (DELESPAUX *et al.*, 2010). Apesar do mecanismo de ação não ter sido elucidado, gera-se uma evidência de certa toxicidade de tetraciclina ao tripanossoma.

Recentemente, Ausländer, Ketzer e Hartig (2010) utilizaram *riboswitches* com aptâmeros de reconhecimento à teofilina localizados na região 5'UTR para estabilização ou desestabilização de mRNA, pela remoção da estrutura do 5' *cap*. Neste trabalho, utilizando os genes repórteres hRLUC (do inglês, *human Renilla luciferase*, ou seja RLUC modificada para melhor expressão em célula de humanos) e eGFP em células de mamíferos, notou-se que códons de início (AUG) alternativos

presentes no *riboswitch* interferiam drasticamente na eficiência de expressão (75 a 91 vezes) quando comparados com a construção controle (sem *riboswitch*). Após mutações para eliminação de AUG alternativos na sequência do *riboswitch*, Ausländer, Ketzer e Hartig (2010) atingiram nível de repressão semelhantes aos obtidos aqui para transfectantes carregando pRock RLUC Ribo2, mesmo utilizando concentrações elevadas de ligante (1 a 5 mM).

É importante destacar que a decisão de testar a regulação por *riboswitches* inseridos após a região codificadora em tripanossomas também se deveu a presença de dois potenciais códons de início alternativo, além de outros quatro dinucleotídeos AG (potenciais sítios aceptores de *Spliced Leader*) presentes na ribozima sempre ativa (Ribo3) que poderiam tornar o processo de regulação mais ineficiente ou ausente. Assim como constatado por Ausländer, Ketzer e Hartig (2010). Em nosso cassete de expressão (esquema do mRNA maduro Figura 21), talvez fosse interessante testar a utilização do *riboswitch* mais distante do códon de parada numa tentativa de se otimizar os resultados obtidos.

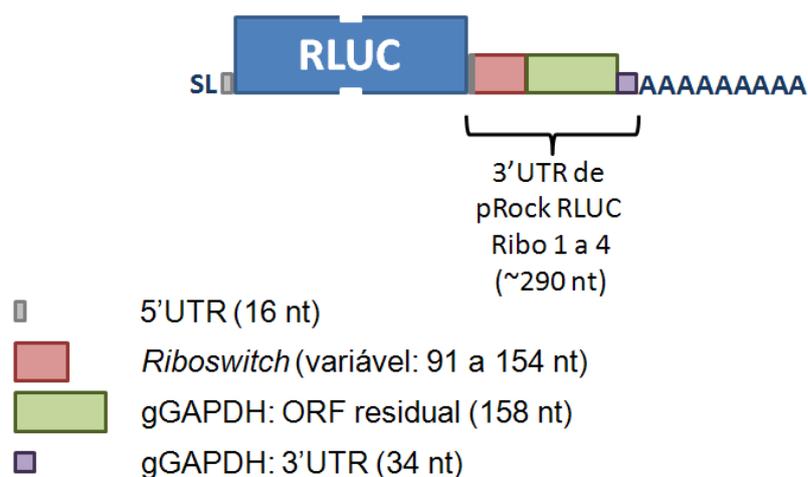


Figura 21 – Esquema do produto de expressão esperado do gene regulado inserido no vetor pRock.

Suess *et al.* (2003) apresentaram outro sistema de regulação da expressão gênica descrito em *S. cerevisiae*, modulado por aptâmero de reconhecimento à tetraciclina que, como o trabalho descrito anteriormente, promove estabilização ou desestabilização da sequência iniciadora de tradução AUG. Este sistema oferece uma regulação na expressão de GFP de 1,8 a 6 vezes na presença de 111 µg/mL de tetraciclina. Esta variação encontrada se deve a variação da posição do *riboswitch* em relação ao AUG, sendo que os mais próximos da extremidade 5'UTR (próximo ao *cap*) são menos eficientes. Nesta mesma linha de raciocínio, no trabalho publicado em 2004, Suess e colaboradores (SUESS *et al.*, 2004) demonstraram um sistema de regulação da expressão gênica em *Bacillus subtilis*, onde o *riboswitch* era responsivo à presença de teofilina, fazendo com que em resposta à indução, houvesse um “deslizamento” na estrutura do RNA impedindo a ligação do Ribossomo ao mRNA. Este sistema, apresentou eficiência de repressão da atividade de β-galactosidase em 8 vezes, além de demonstrar que quanto mais distante se encontrava a molécula reguladora do sítio de ligação ao ribossomo (RBS), menor a eficiência de regulação.

Em trabalho mais recente (WEIGAND & SUESS, 2007), do mesmo grupo do parágrafo acima, os autores alteraram a localização do *riboswitch* melhorando o nível de regulação por repressão com tetraciclina. Neste trabalho foi testada a utilização de *riboswitches* em regiões de introns, bem como o número de moléculas de *riboswitch* em diferentes introns de GFP. A otimização deste sistema em leveduras alcançou taxa de repressão de expressão de até 32,5 vezes, utilizando-se dois *riboswitches* (um em cada intron) e tetraciclina a 111 µg/mL.

Em comparação com outros sistemas de regulação, que não por *riboswitches*, Taylor e Kelly (2006), descrevem a utilização de promotor T7 regulado por operadores de tetraciclina (T7/Tet) para modulação da expressão de genes em *Trypanosoma cruzi*. Estes autores obtiveram uma taxa de regulação positiva de 2 a 37,1 vezes em 24 horas de indução para o gene repórter de luciferase de vagalume (FLUC) e de 3,3 a 239 vezes em 5 dias de incubação para o gene da proteína fluorescente vermelha (RFP). Ambos os resultados são para 0,5 µg/mL de tetraciclina. Estes resultados mostram que uma combinação de T7/Tet com o *riboswitch* 1 (ribozima inativada por tet) poderá pelo menos dobrar a eficiência de regulação do sistema.

Vale ressaltar ainda, que em todos os trabalhos descritos neste tópico houve etapa de clonagem da população carregando a construção de interesse. Este procedimento não foi concluído neste trabalho devido à falta do tempo necessário para esta etapa, que exige aproximadamente 60 dias para obtenção de clones *T. cruzi* crescendo em fase exponencial. Este procedimento está em andamento. Sabe-se que diferentes clones transformados com a mesma construção genética podem exibir padrões de expressão do gene repórter e níveis de atividades regulatórias diferentes, o que já foi verificado em vários trabalhos descritos neste tópico e outros mais que se utilizaram de organismos como *T. brucei* (WIRTZ *et al.*, 1999) e *T. cruzi* (PIRES *et al.*, 2007). Contudo, cabe frisar que houve coerência nos níveis de regulação obtidos nos ensaios de transfecção transiente e com a população resistente de *T. cruzi*.

Outra explicação para a diferença apresentada na eficiência de regulação da expressão gênica por *riboswitches* no sistema criado neste trabalho com o de Win e Smolke (2007) e os demais trabalhos é a relação dos níveis de proteína gerados à partir de seus respectivos genes repórteres nos diferentes estágios de vida celular do parasito (fase lag, log e estacionária) e a taxa de degradação protéica. Desta forma, uma hipótese gerada é que o sistema aqui descrito pode diminuir os níveis de mRNA, porém a taxa de degradação da proteína RLUC não acompanha a mesma proporção e velocidade do evento anterior (desestabilização do mRNA) apresentando assim valores de luminescência que não refletem a real situação de regulação de expressão gênica. A resposta para tal questionamento pode ser respondida por experimentos de *Northern blot* e qPCR, que demonstrariam os níveis de mRNA no interior da célula. Portanto se faz necessário testes do sistema de regulação por *riboswitches* em tripanossomas com diferentes genes repórteres e por metodologias distintas.

A análise global destes trabalhos, que estão compilados na Tabela 6, indica que a utilização de *riboswitches* também requererá maiores esforços, testando variantes nas construções gênicas, tais como, posição da sequência regulatória e tipo de par aptâmero/ligante, para otimização do sistema em tripanossomas.

Tabela 6 – Compilação de resultados publicados utilizando sistemas de regulação da expressão gênica

Sistema	Tipo celular (Gene testado)	Modulação positiva c/Lig : s/Lig★	Modulação negativa s/Lig : c/Lig★	Concentração do ligante	Referência
Ribozima com aptâmero de reconhecimento pelo ligante (<i>riboswitch</i>) localizado no 3'UTR	<i>S. cerevisiae</i> (GFP ^a)	21 – 29,5x (tet ^b) 8 – 23,5x (teo ^c)	17,2x (teo ^c)	111 e 444 µg/mL (tet ^b) 188 – 900 µg/mL (teo ^c)	Win & Smolke, 2007
Ribozima com aptâmero de reconhecimento pelo ligante (<i>riboswitch</i>) localizado no 5'UTR	Células HEK e HeLa (GFP ^a e hRLUC ^d)	-----	1,7x ^a e 3x ^d	188 – 900 µg/mL (teo ^c)	Ausländer, Ketzer & Hartig, 2010.
Ribozima com aptâmero de reconhecimento pelo ligante (<i>riboswitch</i>) localizado no 5'UTR	<i>S. cerevisiae</i> (GFP ^a)	-----	1,8 – 6x (tet ^b)	111 µg/mL (tet ^b)	Suess <i>et al.</i> , 2003
Ribozima com aptâmero de reconhecimento pelo ligante (<i>riboswitch</i>) localizado no 5'UTR	<i>B. subtilis</i>	-----	8x (teo ^c)	10 mM	Suess <i>et al.</i> , 2004
Ribozima com aptâmero de reconhecimento pelo ligante (<i>riboswitch</i>) localizado em intron	<i>S. cerevisiae</i> (GFP ^a)	-----	1,3 – 6,2x (1 <i>riboswitch</i> em diferentes posições no intron) 11 – 32x (2 <i>riboswitches</i> em diferentes introns em posições distintas)	111 µg/mL (tet ^b)	Weigand & Suess, 2007
T7 RNA Polimerase regulada pelo repressor de tetraciclina	<i>T. cruzi</i> (FLUC ^e)	2 – 37,1 (tet ^b)	-----	0,5 µg/mL (tet ^b)	Taylor & Kelly, 2006
	<i>T. cruzi</i> (RFP ^f)	3,3 - 239 (tet ^b)	-----	0,5 µg/mL (tet ^b)	

Legenda da Tabela 6

★ forma de normalização, sendo valor expressão com ligante/sem ligante (c/Lig : s/Lig) para indução e o inverso para análise de repressão.

^a – Gene repórter que codifica a proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)

^b – Tetraciclina

^c – Teofilina – também conhecido como dimetilxantina, molécula relacionada a cafeína, droga utilizada no tratamento de doenças respiratórias como a asma.

^d – Gene repórter que codifica a proteína luciferase de Renilla modificada para melhor expressão em células humanas (*human Renilla Luciferase*)

^e – Gene repórter que codifica a proteína luciferase de vagalume (*Firefly Luciferase*)

^f – Gene repórter que codifica a proteína fluorescente vermelha (*Red Fluorescent Protein*)

8 - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- 1 As moléculas de *riboswitches*, reguladas por indutor exógeno, são funcionalmente ativas em tripanossomas, contribuindo para formulação de um sistema de modulação da expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*;
- 2 O sistema de controle de expressão gênica criado nesta dissertação apesar de não apresentar níveis ideais de indução e repressão para o gene repórter RLUC, demonstra níveis de regulação da atividade de luminescência próximos aos descritos na literatura;
- 3 Os dados da regulação da atividade de GFP fusionada à DD são ainda inconclusivos em relação a sua funcionalidade perante modulação da expressão gênica em *T. cruzi*, necessitando de ensaios adicionais.

9 - PERSPECTIVAS

Os dados gerados neste trabalho permitem que algumas conclusões sejam obtidas em relação aos sistemas de modulação da expressão gênica em *Tripanossomas*, entretanto, alguns ensaios devem ser feitos com o intuito de se aprimorar os dados, tais como:

- Clonagem dos parasitos contendo os cassetes de regulação da expressão gênica;
- Utilização de análogos da tetraciclina que possam apresentar menor efeito inespecífico e ainda modular a expressão gênica.
- Realização de ensaios de *Northern blot* e qPCR para validação dos dados, e avaliar a contribuição de meia-vida de RLUC nas taxas de regulação;
- Avaliações de outros arranjos dos *riboswitches* (posição e número) no controle da expressão;
- Testar o sistema para nocautes condicionais de genes endógenos.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMSTRONG CM, GOLDBERG DE. An FKBP destabilization domain modulates protein levels in *Plasmodium falciparum*. **Nat Methods**. 2007 Dec;4(12):1007-9. Epub 2007 Nov 11.

AUSLÄNDER S, KETZER P, HARTIG JS. A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. **Mol Biosyst**. 2010 May 10;6(5):807-14. Epub 2010 Feb 26.

BANASZYNSKI LA, CHEN LC, MAYNARD-SMITH LA, OOI AG, WANDLESS TJ. A rapid, reversible, and tunable method to regulate protein function in living cells using synthetic small molecules. **Cell**. 2006 Sep 8;126(5):995-1004.

BARRETT B, LACOUNT DJ, DONELSON JE. *Trypanosoma brucei*: a first-generation CRE-loxP site-specific recombination system. **Exp Parasitol**. 2004 Jan-Feb;106(1-2):37-44.

BARRETT, M.P.; BURCHMORE, R.J.; STICH, A.; LAZZARI, J.O.; FRASH, A.C.; CAZZULO, J.J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **Lancet**. 2003 Nov 1;362(9394):1469-80.

BERRIMAN M, GHEDIN E, HERTZ-FOWLER C, BLANDIN G, RENAULD H, BARTHOLOMEU DC, LENNARD NJ, CALER E, HAMLIN NE, HAAS B, BÖHME U, HANNICK L, ASLETT MA, SHALLOM J, MARCELLO L, HOU L, WICKSTEAD B, ALSMARK UC, ARROWSMITH C, ATKIN RJ, BARRON AJ, BRINGAUD F, BROOKS K, CARRINGTON M, CHEREVACH I, CHILLINGWORTH TJ, CHURCHER C, CLARK LN, CORTON CH, CRONIN A, DAVIES RM, DOGGETT J, DJIKENG A, FELDBLYUM T, FIELD MC, FRASER A, GOODHEAD I, HANCE Z, HARPER D, HARRIS BR, HAUSER H, HOSTETLER J, IVENS A, JAGELS K, JOHNSON D, JOHNSON J, JONES K, KERHORNOU AX, KOO H, LARKE N, LANDFEAR S, LARKIN C, LEECH V, LINE A, LORD A, MACLEOD A, MOONEY PJ, MOULE S, MARTIN DM, MORGAN GW, MUNGALL K, NORBERTCZAK H, ORMOND D, PAI G, PEACOCK CS, PETERSON J, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, RAJANDREAM MA, REITTER C, SALZBERG SL, SANDERS M, SCHOBEL S, SHARP S, SIMMONDS M, SIMPSON AJ, TALLON L, TURNER CM, TAIT A, TIVEY AR, VAN AKEN S, WALKER D, WANLESS D, WANG S, WHITE B, WHITE O, WHITEHEAD S, WOODWARD J, WORTMAN J, ADAMS MD, EMBLEY TM, GULL K, ULLU E, BARRY JD, FAIRLAMB AH, OPPERDOES F, BARRELL BG, DONELSON JE, HALL N, FRASER CM, MELVILLE SE, EL-SAYED NM. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**. 2005 Jul 15;309(5733):416-22.

BLOUNT KF, BREAKER RR. *Riboswitches* as antibacterial drug targets. **Nat Biotechnol**. 2006 Dec;24(12):1558-64.

BRANTL S. Bacterial gene regulation: from transcription attenuation to *riboswitches* and ribozymes. **Trends Microbiol**. 2004 Nov;12(11):473-5.

BRENER, Z; ANDRADE, ZA; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Ed. Guanabara Koogan. 2ª edição. 2000.

BRUN, R.; BLUM, J.; CHAPPUIS, F.; BURRI, C. Human African trypanosomiasis. **Lancet**. 2010 Jan 9;375(9709):148-59. Epub 2009 Oct 14.

CHAMBERLIN M, MCGRATH J, WASKELL L. CHAMBERLIN M, MCGRATH J, WASKELL L. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. **Nature**. 1970 Oct 17;228(5268):227-31

CLAYTON C, SHAPIRA M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**. 2007 Dec;156(2):93-101. Epub 2007 Jul 19.

DAROCHA WD, OTSU K, TEIXEIRA SM, DONELSON JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. 2004 Feb;133(2):175-86.

DAROCHA WD, OTSU K, TEIXEIRA SM, DONELSON JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. 2004 Feb;133(2):175-86.

DAROCHA WD, SILVA RA, BARTHOLOMEU DC, PIRES SF, FREITAS JM, MACEDO AM, VAZQUEZ MP, LEVIN MJ, TEIXEIRA SM. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res**. 2004 Jan;92(2):113-20. Epub 2003 Nov 21.

DAROCHA WD, SILVA RA, BARTHOLOMEU DC, PIRES SF, FREITAS JM, MACEDO AM, VAZQUEZ MP, LEVIN MJ, TEIXEIRA SM. Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitol Res**. 2004 Jan;92(2):113-20. Epub 2003 Nov 21.

DAS A, BANDAY M, BELLOFATTO V. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. **Eukaryot Cell**. 2008 Mar;7(3):429-34. Epub 2007 Oct 19.

DE SOUZA W, ATTIAS M, RODRIGUES JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int J Biochem Cell Biol**. 2009 Oct;41(10):2069-80. Epub 2009 Apr 18.

DEANS, T.L.; CANTOR, C.R.; COLLINS, J.J. A tunable genetic switch based on RNAi and repressor proteins for regulating gene expression in mammalian cells. **Cell**. 2007 Jul 27;130(2):363-72.

DELESPAUX V, VITOLEY HS, MARCOTTY T, SPEYBROECK N, BERKVENS D, ROY K, GEERTS S, VAN DEN BOSSCHE P. Chemosensitization of *Trypanosoma congolense* strains resistant to

isometamidium chloride by tetracyclines and enrofloxacin. **PLoS Negl Trop Dis.** 2010 Sep 28;4(9):e828.

EL-SAYED NM, MYLER PJ, BARTHOLOMEU DC, NILSSON D, AGGARWAL G, TRAN AN, GHEDIN E, WORTHEY EA, DELCHER AL, BLANDIN G, WESTENBERGER SJ, CALER E, CERQUEIRA GC, BRANCHE C, HAAS B, ANUPAMA A, ARNER E, ASLUND L, ATTIPOE P, BONTEMPI E, BRINGAUD F, BURTON P, CADAG E, CAMPBELL DA, CARRINGTON M, CRABTREE J, DARBAN H, DA SILVEIRA JF, DE JONG P, EDWARDS K, ENGLUND PT, FAZELINA G, FELDBLYUM T, FERELLA M, FRASCH AC, GULL K, HORN D, HOU L, HUANG Y, KINDLUND E, KLINGBEIL M, KLUGE S, KOO H, LACERDA D, LEVIN MJ, LORENZI H, LOUIE T, MACHADO CR, MCCULLOCH R, MCKENNA A, MIZUNO Y, MOTTRAM JC, NELSON S, OCHAYA S, OSOEGAWA K, PAI G, PARSONS M, PENTONY M, PETTERSSON U, POP M, RAMIREZ JL, RINTA J, ROBERTSON L, SALZBERG SL, SANCHEZ DO, SEYLER A, SHARMA R, SHETTY J, SIMPSON AJ, SISK E, TAMMI MT, TARLETON R, TEIXEIRA S, VAN AKEN S, VOGT C, WARD PN, WICKSTEAD B, WORTMAN J, WHITE O, FRASER CM, STUART KD, ANDERSSON B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science.** 2005 Jul 15;309(5733):409-15.

FIGUEIREDO L, SCHERF A. Plasmodium telomeres and telomerase: the usual actors in an unusual scenario. **Chromosome Res.** 2005;13(5):517-24.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E., MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** 1998 Feb 19;391(6669):806-11.

GHEDIN E, CHAREST H, ZHANG WW, DEBRABANT A, DWYER D, MATLASHEWSKI G. Inducible expression of suicide genes in *Leishmania donovani* amastigotes. **J Biol Chem.** 1998 Sep 4;273(36):22997-3003.

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 Apr 1;29(7):1556-64.

GLOVER L, HORN D. Repression of polymerase I-mediated gene expression at *Trypanosoma brucei* telomeres. **EMBO Rep.** 2006 Jan;7(1):93-9.

GRIFFIN MO, FRICOVSKY E, CEBALLOS G, VILLARREAL F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2010 Sep;299(3):C539-48. Epub 2010 Jun 30.

HERM-GÖTZ A, AGOP-NERSESIAN C, MÜNTER S, GRIMLEY JS, WANDLESS TJ, FRISCHKNECHT F, MEISSNER M. Rapid control of protein level in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*. **Nat Methods.** 2007 Dec;4(12):1003-5. Epub 2007 Nov 11. Erratum in: **Nat Methods.** 2008 Jan;5(1):113.

INOUE, N.; OTSU, K.; FERRARO, D.M., DONELSON, J.E. Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. **Mol Biochem Parasitol**. 2002 Apr 9;120(2):309-13.

JULLIEN N, GODDARD I, SELMI-RUBY S, FINA JL, CREMER H, HERMAN JP. Conditional transgenesis using Dimerizable Cre (DiCre). **PLoS One**. 2007 Dec 26;2(12):e1355.

KELLY JM, WARD HM, MILES MA, KENDALL G. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res**. 20(15):3963-9

KENDALL G, WILDERSPIN AF, ASHALL F, MILES MA, KELLY JM. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. **EMBO J**. 9(9):2751-8.

KENNEDY, P.G. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. **J Clin Invest**. 2004 Feb;113(4):496-504.

LACOUNT DJ, BRUSE S, HILL KL, DONELSON JE. Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Nov;111(1):67-76.

LEBOWITZ JH, SMITH HQ, RUSCHE L, BEVERLEY SM. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes Dev**. 1993 Jun;7(6):996-1007.

LESCURE FX, LE LOUP G, FREILIJ H, DEVELOUX M, PARIS L, BRUTUS L, PIALOUX G. Chagas disease: changes in knowledge and management. **Lancet Infect Dis**. 2010 Aug;10(8):556-70.

LYE LF, OWENS K, SHI H, MURTA SM, VIEIRA AC, TURCO SJ, TSCHUDI C, ULLU E, BEVERLEY SM. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathog**. 2010 Oct 28;6(10):e1001161.

MADEIRA DA SILVA L, OWENS KL, MURTA SM, BEVERLEY SM. Regulated expression of the *Leishmania* major surface virulence factor lipophosphoglycan using conditionally destabilized fusion proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 May 5;106(18):7583-8. Epub 2009 Apr 21.

MANDAL M, BREAKER RR. Gene regulation by *riboswitches*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2004 Jun;5(6):451-63.

MARTÍNEZ-CALVILLO S, VIZUET-DE-RUEDA JC, FLORENCIO-MARTÍNEZ LE, MANNING-CELA RG, FIGUEROA-ANGULO EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol**. 2010;2010:525241. Epub 2010 Feb 11.

MATTHEWS, K.R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **J Cell Sci.** 2005 Jan 15;118(Pt 2):283-90. Erratum in: **J Cell Sci.** 2005 May 1;118(Pt 9):2078. **Mol Biochem Parasitol.** 2000 Nov;111(1):67-76.

MYLER PJ, AUDLEMAN L, DEVOS T, HIXSON G, KISER P, LEMLEY C, MAGNESS C, RICKEL E, SISK E, SUNKIN S, SWARTZELL S, WESTLAKE T, BASTIEN P, FU G, IVENS A, STUART K. Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999 Mar 16;96(6):2902-6.

NAHVI A, SUDARSAN N, EBERT MS, ZOU X, BROWN KL, BREAKER RR. Genetic control by a metabolite binding mRNA. **Chem Biol.** 2002 Sep;9(9):1043.

NAVARRO, M.; PEÑATE, X.; LANDEIRA, D. Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. **Trends Microbiol.** 2007 Jun;15(6):263-70. Epub 2007 May 4.

NGO, H.; TSCHUDI, C.; GULL, K.; ULLU, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998 Dec 8;95(25):14687-92.

PADILLA-MEJÍA NE, FLORENCIO-MARTÍNEZ LE, FIGUEROA-ANGULO EE, MANNING-CELA RG, HERNÁNDEZ-RIVAS R, MYLER PJ, MARTÍNEZ-CALVILLO S. Gene organization and sequence analyses of transfer RNA genes in Trypanosomatid parasites. **BMC Genomics.** 2009 May 18;10:232.

PIRES SF, DAROCHA WD, FREITAS JM, OLIVEIRA LA, KITTEN GT, MACHADO CR, PENA SD, CHIARI E, MACEDO AM, TEIXEIRA SM. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. **Int J Parasitol.** 2008 Mar;38(3-4):289-97. Epub 2007 Sep 26.

PRUCCA CG, SLAVIN I, QUIROGA R, ELÍAS EV, RIVERO FD, SAURA A, CARRANZA PG, LUJÁN HD. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. **Nature.** 2008 Dec 11;456(7223):750-4.

RASSI JR A, RASSI A, MARIN-NETO JA. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2009 Jul;104 Suppl 1:152-8.

REGIS-DA-SILVA CG, FREITAS JM, PASSOS-SILVA DG, FURTADO C, AUGUSTO-PINTO L, PEREIRA MT, DAROCHA WD, FRANCO GR, MACEDO AM, HOFFMANN JS, CAZAUX C, PENA SD, TEIXEIRA SM, MACHADO CR. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Mol Biochem Parasitol.** 2006 Oct;149(2):191-200. Epub 2006 Jun 21.

RESPUELA P, FERELLA M, RADA-IGLESIAS A, ASLUND L. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**. 2008 Jun 6;283(23):15884-92. Epub 2008 Apr 9.

REY, L. Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROBINSON KA, BEVERLEY SM. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**. 2003 May;128(2):217-28.

RODGERS, J. Human African trypanosomiasis, chemotherapy and CNS disease. **J Neuroimmunol**. 2009 Jun 25;211(1-2):16-22. Epub 2009 Mar 9.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SEMENKOV YUP, MAKAROV EM, MAKHNO VI, KIRILLOV SV. Kinetic aspects of tetracycline action on the acceptor (A) site of *Escherichia coli* ribosomes. **FEBS Lett**. 1982 Jul 19;144(1):125-9.

SERGANOV, A.; PATEL, D.J. Ribozymes, *riboswitches* and beyond: regulation of gene expression without proteins. **Nat Rev Genet**. 2007 Oct;8(10):776-90. Epub 2007 Sep 11.

SIEGEL TN, HEKSTRA DR, KEMP LE, FIGUEIREDO LM, LOWELL JE, FENYO D, WANG X, DEWELL S, CROSS GA. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. **Genes Dev**. 2009 May 1;23(9):1063-76. Epub 2009 Apr 15.

SIMARRO, P.P.; JANNIN, J.; CATTAND, P. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? **PLoS Med**. 2008 Feb;5(2):e55.

STEITZ, T.A. The structural changes of T7 RNA polymerase from transcription initiation to elongation. **Curr Opin Struct Biol**. 2009 Dec;19(6):683-90. Epub 2009 Oct 5.

STUART K, PANIGRAHI AK. RNA editing: complexity and complications. **Mol Microbiol**. 2002 Aug;45(3):591-6.

SUESS B, FINK B, BERENS C, STENTZ R, HILLEN W. A theophylline responsive *riboswitch* based on helix slipping controls gene expression in vivo. **Nucleic Acids Res**. 2004 Mar 5;32(4):1610-4. Print 2004.

SUESS B, HANSON S, BERENS C, FINK B, SCHROEDER R, HILLEN W. Conditional gene expression by controlling translation with tetracycline-binding aptamers. **Nucleic Acids Res**. 2003 Apr 1;31(7):1853-8.

TARLETON RL, REITHINGER R, URBINA JA, KITRON U, GÜRTLER RE. The challenges of Chagas Disease-- grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med.** 2007 Dec;4(12):e332.

TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Biotechnol.** 2006 Jul 6;6:32

TEIXEIRA AR, NITZ N, GUIMARO MC, GOMES C, SANTOS-BUCH CA. Chagas disease. **Postgrad Med J.** 2006 Dec;82(974):788-98.

TEIXEIRA SM, DAROCHA WD. Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. **Genet Mol Res.** 2003 Mar 31;2(1):148-58.

TEIXEIRA SM, OTSU K, HILL KL, KIRCHHOFF LV, DONELSON JE. Expression of a marker for intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes in extracellular spheromastigotes. **Mol Biochem Parasitol.** 1999 Jan 25;98(2):265-70.

THOMAS S, GREEN A, STURM NR, CAMPBELL DA, MYLER PJ. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. **BMC Genomics.** 2009 Apr 8;10:152.

TOPP S, GALLIVAN JP. Emerging applications of *riboswitches* in chemical biology. **ACS Chem Biol.** 2010 Jan 15;5(1):139-48.

ULLU E, TSCHUDI C, CHAKRABORTY T. RNA interference in protozoan parasites. **Cell Microbiol.** 2004 Jun;6(6):509-19.

URBINA JA. New advances in the management of a long-neglected disease. **Clin Infect Dis.** 2009 Dec 1;49(11):1685-7.

WACHTER A. *Riboswitch*-mediated control of gene expression in eukaryotes. **RNA Biol.** 2010 Jan-Feb;7(1):67-76. Epub 2010 Jan 1.

WEATHERLY DB, BOEHLKE C, TARLETON RL. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC Genomics.** 2009 Jun 1;10:255.

WEIGAND JE, SUESS B. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. **Nucleic Acids Res.** 2007;35(12):4179-85. Epub 2007 Jun 12.

WELBURN, S.C.; FÈVRE, E.M.; COLEMAN, P.G.; ODIIT, M.; MAUDLIN, I. Sleeping sickness: a tale of two diseases. **Trends Parasitol.** 2001 Jan;17(1):19-24.

WILKINSON, S.R.; KELLY, J.M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev Mol Med.** 2009 Oct 29;11:e31.

WIN, M.N.; SMOLKE, C.D. A modular and extensible RNA-based gene-regulatory platform for engineering cellular function. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007 Sep 4;104(36):14283-8. Epub 2007 Aug 20. Erratum in: **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2009 Sep 8;106(36):15514

WINKLER WC, BREAKER RR. Regulation of bacterial gene expression by *riboswitches*. **Annu Rev Microbiol.** 2005;59:487-517.

WIRTZ E, HARTMANN C, CLAYTON C. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. **Nucleic Acids Res.** 1994 Sep 25;22(19):3887-94.

WIRTZ E, HOEK M, CROSS GA. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Res.** 1998 Oct 15;26(20):4626-34.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G.A. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol.** 1999 Mar 15;99(1):89-101

YAN S, MARTINEZ-CALVILLO S, SCHNAUFER A, SUNKIN S, MYLER PJ, STUART K. A low-background inducible promoter system in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol.** 2002 Feb;119(2):217-23.

YAO C, LUO J, HSIAO CH, DONELSON JE, WILSON ME. *Leishmania chagasi*: a tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. **Exp Parasitol.** 2007 Jul;116(3):205-13. Epub 2007 Jan 19.

ZINGALES B, PEREIRA ME, OLIVEIRA RP, ALMEIDA KA, UMEZAWA ES, SOUTO RP, VARGAS N, CANO MI, DA SILVEIRA JF, NEHME NS, MOREL CM, BRENER Z, MACEDO A. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. **Acta Trop.** 1997 Nov;68(2):159-73.