

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Efeitos do Silenciamento de duas Triptofanil-
tRNA Sintetases de *Trypanosoma brucei*
mediante RNA de Interferência**

LILIANA TORCOROMA GARCÍA SÁNCHEZ

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração: Genética e Evolução.

SÃO CARLOS – SP

LILIANA TORCOROMA GARCÍA SÁNCHEZ

**Efeitos do Silenciamento de duas Triptofanil-
tRNA Sintetases de *Trypanosoma brucei*
mediante RNA de Interferência**

Orientador: **Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann**

SÃO CARLOS – SP
2007

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S211es

Sánchez, Liliana Torcoroma García.
Efeitos do silenciamento de duas Triptofanil-tRNA
sintetases de *Trypanosoma brucei* mediante RNA de
interferência / Liliana Torcoroma García Sánchez. -- São
Carlos : UFSCar, 2007.
144 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2007.

1. Genética. 2. Evolução. 3. Tripanosomíase africana. 4.
Kinetoplastídeos. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

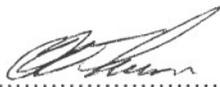
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

"Efeitos do Silenciamento de duas Triptofanil-tRNA Sintetases de
Trypanosoma brucei mediante RNA de Interferência".

Tese de Doutorado de Liliana Torcoroma García Sánchez

Banca Examinadora

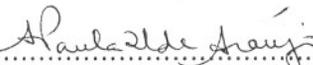
Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann


.....

Profa. Dra. Heloísa Sobreiro S. de Araújo


.....

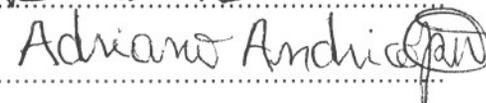
Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo


.....

Profa. Dra. Leila Maria Beltramini


.....

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo


.....

SÃO CARLOS - SP
2007

*Caminante son tus huellas el camino y nada mas, caminante
no hay camino, se hace camino al andar, al andar se hace
camino y al volver la vista atrás se ve la senda que nunca se
ha de volver a pisar.*

Antonio Machado

Ao Sergio

Ao Oscar

AGRADECIMENTOS

Eu tive a sorte de trabalhar com um excelente grupo de professores, funcionários e alunos do Grupo de Cristalografia no Instituto de Física de São Carlos da USP desde 2004.

Gostaria de agradecer, de forma especial, ao Professor Dr. Otávio Henrique Thiemann, por ter me dado a oportunidade de trabalhar com ele e por sua competente orientação nestes últimos três anos.

À Profa. Dra. Heloisa S.S. de Araújo, minha grande professora e amiga.

À Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo, pelas valiosas sugestões técnicas e por sua amizade.

Ao meu irmão Jesús pelo carinho.

Às minhas amigas especiais, Regiane, Caroline e Priscila.

Aos professores e pessoal administrativo do Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À minha família.

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
aaRS	Aminoacil-tRNA sintetase
aa-tRNA	aminoacil-tRNA
BLAST	Programa computacional que busca homologias locais entre DNAs ou proteínas (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BSA	Soro Albumina Bovina
cDNA	DNA complementar
D.O	Densidade ótica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	desoxi-Nucleotídeo Trifosfatado
dsRNA	RNA de dupla fita (<i>double-stranded RNA</i>)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EF-Tu	Fatores de Elongação Tu
FBS	Soro Fetal Bovino
G418	Gentamicina
IPTG	Isopropil- β -Tiogalactosídeo
kDa	kilo-Dalton
LB	Meio de cultura para bactérias Luria Bertani
MetRS	Metionil-tRNA Sintetase
mRNA	RNA mensageiro
mt	mitocondrial
ORF	Seqüência Aberta de Leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTC	Centro Peptidil-Transferase da Subunidade 50S do Ribossomo
PTGS	Silenciamento Gênico Pós-Transcricional
QPCR	PCR em Tempo Real (quantitativo)
RdRP	RNA-Dependent RNA Polymerase
RISC	RNA-Induced Silencing Complex.
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RT-PCR	Transcrição Reversa - PCR
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio - Gel de Eletroforeses de Poliacrilamida
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SM	Meio de cultura Cunningham's
SMGH	Meio SM adicionado de G418 e Higromicina
SMGHP	Meio SM adicionado de G418, Higromicina e Fleomicina
TbWARS1	Triptofanil-tRNA Sintetase citoplasmática de <i>Trypanosoma brucei</i>
TbWARS2	Triptofanil-tRNA Sintetase mitocondrial de <i>Trypanosoma brucei</i>
TGS	Silenciamento Gênico Transcricional
tRNA	RNA transportador

tRNA ^{Trp}	tRNA para Triptofano
TrpRS	Triptofanil-tRNA Sintetase
TryRS	Tirosil-tRNA Sintetase
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
WARS	Triptofanil-tRNA Sintetase

Aminoácidos

Ala (A)	Alanina
Arg (R)	Arginina
Asn (N)	Asparagina
Asp (D)	Aspartato
Cys (C)	Citosina
fMet	Formil-Metionina
Gln (Q)	Glutamina
Glu (E)	Glutamato
Gly (G)	Glicina
His (H)	Histidina
Ile (I)	Isoleucina
Leu (L)	Leucina
Lys (K)	Lisina
Met (M)	Metionina
Phe (F)	Fenil-alanina
Pro (P)	Prolina
Sec	Seleno-cisteina
Ser (S)	Serina
Thr (T)	Treonina
Trp (W)	Triptofano
Tyr (Y)	Tirosina
Val (V)	Valina

Bases Nitrogenadas

A	Adenosina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

RESUMO

O parasita *Trypanosoma brucei* é o agente causal da Tripanossomíases Africana (doença do sono) em humanos e ‘nagana’ em animais, cujo impacto socioeconômico é devastador nos países sub-Saharianos da África. Atualmente, as terapias existentes contra esta doença são insatisfatórias, devido a sua toxicidade e ao surgimento de linhagens resistentes. Tripanosomatídeos contêm uma simples mitocôndria, o kinetoplasto, cujo código genético desvia do código universal, onde o códon de parada UGA é usado como códon para Trp. Um simples tRNA^{Trp}(CCA) codificado no núcleo, decodifica o códon canônico Trp, usado para a tradução dos genes nucleares e mitocondriais. O evento de editoramento “C” por “U” na posição 34 do tRNA^{Trp}(CCA) muda o anticódon de CCA para UCA, permitindo a decodificação do códon de parada UGA para Trp, nos genes mitocondriais. No genoma de *Leishmania* e *Trypanosoma*, foram identificados dois genes nucleares para Triptofanil-tRNA sintetases (WARs), uma citoplasmática (WAR₁) e outra mitocondrial (WAR₂). Com o propósito de validar a WAR mitocondrial de tripanosomatídeos, como um potencial alvo farmacológico, foi realizado o silenciamento gênico (RNAi) de ambos genes WARs de *T. brucei*. Nas condições testadas, a expressão do dsRNA gerou um potente silenciamento, levando ao desenvolvimento de um fenótipo caracterizado por alterações morfológicas, drástica inibição do crescimento, redução nos níveis de oxigênio consumido (somente na TbWAR₂) e morte celular. A eficiência e especificidade do silenciamento foram estimadas por PCR quantitativo e foram evidenciadas significativas modificações na quantidade de mRNA específico para as TbWARs.

ABSTRACT

The parasitic *Trypanosoma brucei* is the causative agent of African Trypanosomiasis (sleeping sickness) in humans, and nagana in animals and is responsible for heavy socioeconomic losses in most countries of sub-Saharan Africa. Therapy against sleeping sickness is unsatisfactory because the toxicity and arising of the drug resistant parasites. Trypanosomatids contain a single mitochondrion, the kinetoplast, whose genetic code deviates from the universal code where a UGA stop codon is used as a Trp codon. A single nuclear-encoded tRNA^{Trp}(CCA), that can decode the canonical Trp codon, is used by both the nucleus and mitochondria genes. A “C” to “U” editing event at position 34 of tRNA^{Trp}(CCA) changes the anticodon from CCA to UCA allowing the decoding of the UGA stop codon to Trp from the mitochondrial genes. We have identified two different nuclear-encoded tryptophanyl-tRNA-synthetase (WARSs) genes (one cytoplasmic (WARS1) and the other to the kinetoplast (WARS2)) in both *Leishmania* and *Trypanosoma* cells. With the purpose to validate the mitochondrial WARS enzymes of trypanosomatids, as potential drug targets, we performed gene silencing (RNAi) experiments with both WARSs forms from *T. brucei*. In the conditions tested, the expression of dsRNA from a dual promoter system generated potent RNA silencing, leading to clear phenotypes characterized by morphologic alterations, severe growth inhibition, reduction in the levels of oxygen consumed (only TbWARS2) and cellular death. The efficiency and specificity of silencing were estimated by quantitative PCR and significant modifications of the specific amount of TbWARSs mRNA were evidenced.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tripanosomatídeos	2
1.1.1 <i>Tripanosomíase Africana Humana</i>	3
1.1.1.1 Etiopatologia.....	4
1.1.1.2 Epidemiologia e Distribuição Geográfica.....	6
.....	10
1.1.1.3 Controle	10
1.1.1.4 Tratamento.....	10
1.1.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	12
1.1.2.1 Ciclo de vida.....	12
1.1.2.2 Morfologia	15
1.1.2.3 Geração de Energia.....	17
1.1.2.4 A Mitocôndria.....	18
1.1.2.4.1 DNA Kinetoplasto (kDNA)	19
1.1.2.5 Genoma Nuclear	21
1.2 tRNAs	22
1.2.1. <i>Estrutura do tRNA</i>	23
1.2.2 <i>Processamento dos tRNA</i>	24
1.2.3 <i>Editoração do tRNA</i>	26
1.2.3.1 Editoração de tRNAs guiado por gRNAs	27
1.2.4 <i>Importação do tRNA: Citoplasma para a Mitocôndria</i>	28
1.2.4.1 Importação Mitocôndrial de tRNA em Tripanosomatídeos.....	32
1.2.4.2 O tRNA ^{Trp} Mitocôndrial de Tripanosomatídeos	34
1.3 Aminoacil-tRNAs (aa-tRNAs)	36
1.3.1 <i>Tipos de aa-tRNAs</i>	36
1.3.1.1 Substratos da Tradução Ribossomal	36
1.3.1.2 Substratos da Tradução Incorretamente Acilados.....	37
1.3.1.3 Substratos Não-Traducionais Corretamente Carregados	37
1.3.2 <i>Controle de Qualidade dos aa-tRNAs</i>	38
1.3.2.1 Especificidade da Seleção de Substrato pela aa-tRNA Sintetase.....	39
1.3.2.2 Discriminação do EF-Tu.....	39
1.3.2.3 Exclusão desde o Ribossomo.....	41
1.3.3 <i>aa-tRNAs em Trypanosoma brucei: Organização Genômica e Expressão</i>	41
1.4 Aminoacil-tRNA sintetases	44
1.4.1 <i>Aminoacilação</i>	46
1.4.2 <i>Características das aaRS</i>	47
1.4.3 <i>Tipos de aaRSs</i>	49
1.5. As Triptofanil-tRNA Sintetases	51
1.6. RNA de Interferência	56
1.6.1 <i>Funções do RNAi na natureza</i>	60
1.6.2 <i>RNAi em Trypanosoma brucei</i>	62
2. OBJETIVOS	64

3. MATERIAIS E MÉTODOS	66
3.1 Materiais	66
3.1.1 <i>cdNA e Plasmídeos</i>	66
3.1.2 <i>Oligonucleotídeos Iniciadores</i>	68
3.2 Métodos.....	70
3.2.1 <i>Isolamento e Manipulação de Ácidos Nucléicos</i>	70
3.2.1.1 <i>Extração do DNA Genômico</i>	70
3.2.1.2 <i>Extração do RNA Total</i>	70
3.2.1.3 <i>Análise de mRNA específico</i>	70
3.2.2 <i>Caracterização dos genes TbWARS1 e TbWARS2</i>	71
3.2.3 <i>Construção dos plasmídeos</i>	72
3.2.3.1 <i>Construções no Vetor de Clonagem</i>	72
3.2.3.2 <i>Construções de Plasmídeos para RNAi</i>	73
3.2.4 <i>Cultura Celular do Trypanosoma brucei</i>	75
3.2.5 <i>Transformação de Células</i>	78
3.2.5.1 <i>Transformação de Células de Bactérias</i>	78
3.2.5.2 <i>Transfecção de Células de Parasitas</i>	78
3.2.6 <i>Demanda de Oxigênio (D.O.)</i>	80
3.2.7 <i>RT-PCR semi-quantitativo</i>	81
3.2.8 <i>PCR quantitativo (Real Time PCR)</i>	82
3.2.9 <i>Curvas de Crescimento</i>	84
3.2.10 <i>Morfologia Celular</i>	84
3.2.11 <i>Análises Estatísticas</i>	87
3.2.12 <i>Seqüenciamento de DNA</i>	87
3.2.13 <i>Eletroforese em Gel de Agarose</i>	88
4. RESULTADOS.....	89
4.1 Caracterização dos genes TbWARS1 e TbWARS2.....	89
4.2 Cultura Celular do Trypanosoma brucei	90
4.3. RNAi de TbWARS1 e TbWARS2.....	91
4.3.1 <i>Desenho dos Experimentos</i>	91
4.3.2 <i>Mutantes condicionados para RNAi</i>	92
4.3.3 <i>Efeitos Fenotípicos do RNAi</i>	94
4.3.3.1 <i>Efeito sobre o Crescimento Celular</i>	94
4.3.3.2 <i>Efeito do RNAi sobre a Expressão Gênica Específica</i>	95
4.3.3.3 <i>Efeito sobre a Morfologia Celular</i>	97
4.3.3.4 <i>Efeito Mitocondrial do RNAi de TbWARS2</i>	103
5. DISCUSSÃO	109
6. CONCLUSÕES	120
7. BIBLIOGRAFIA	122

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de vida de milhões de pessoas é comprometida pela infecção de parasitas protozoários. Os tripanosomas, transmitidos por dípteros (*Glossinia*) para humanos e animais de pastagem na região da África Meridional (*Trypanosoma brucei*) ou pelos insetos reduvídeos em áreas da América Central e do Sul (*Trypanosoma cruzi*), causam doenças debilitantes e letais. Atualmente, o tratamento destas enfermidades tropicais é insatisfatório, caracterizado pela disposição de poucos medicamentos, os quais são geralmente ineficazes, produzindo sérios efeitos colaterais e requerendo, em muitos casos a aplicação de altas doses, hospitalização ou outros inconvenientes para seu uso. Por esta razão, a pesquisa de novos alvos farmacológicos e o desenvolvimento de inibidores mais específicos e eficazes se faz obrigatório.

Com o propósito de validar a enzima envolvida na via de tradução, Triptofanil-tRNA Sintetase como um alvo para o desenho de inibidores, foi realizado o silenciamento específico da forma citoplasmática e mitocondrial desta enzima, mediante a interferência específica do mRNA (RNAi).

Nas secções seguintes desta introdução, se apresenta uma descrição de alguns aspectos teóricos relevantes para esta pesquisa. Na primeira seção se aborda a família dos tripanosomatídeos e as características únicas da biogênese destes parasitos. A ênfase central é feita sobre o *Trypanosoma brucei* e a doença por ele causada, a Tripanosomíase Africana.

Nas seções 1.2 a 1.5, são descritos os tRNAs, sua estrutura, mecanismos de processamento, controle de qualidade, transporte e aminoacilação. Em seguida são tratados aspectos gerais importantes das aminoacil-tRNAs sintetases (aaRSs) e seus mecanismos de discriminação do substrato. Finalmente, é apresentado um tópico especial sobre as Triptofanil-tRNA Sintetases (TrpRSs/WARSs), tema central desta pesquisa.

Na última seção, 1.6, é feita uma breve exposição sobre o processo de silenciamento gênico em *T. brucei*, através de RNA de Interferência (RNAi). Esta ferramenta de manipulação genética foi utilizada neste trabalho para a validação das enzimas WARSs como alvo farmacológico.

1.1. Tripanosomatídeos

A família *Trypanosomatidae* compreende um grande grupo de parasitas flagelados, responsáveis por uma série de doenças, tais como, a Tripanosomíase Africana em humanos (Doença do Sono) e Nagana em animais (*Trypanosoma brucei spp*) e a Tripanosomíase Americana (Doença de Chagas) em humanos (*Trypanosoma cruzi*). Esta família também inclui a *Leishmania spp*, que é o agente etiológico de diferentes tipos de Leishmanioses em humanos e animais e *Crithidia spp*, um parasita exclusivo de insetos.

Estes eucariontes unicelulares residem extracelularmente no sangue e nos tecidos; ou intracelularmente, nas células do músculo liso. Como parasitas, eles se diferenciam durante seu complexo ciclo celular para se adaptar as numerosas condições nutricionais e desafios imunológicos.

Os tripanosomatídeos possuem propriedades genéticas, bioquímicas e estruturais incomuns. Estas características específicas podem ser exploradas como formas de combater as doenças por eles causadas.

1.1.1 Tripanosomíase Africana Humana

As Tripanosomíases Africanas são um conjunto de doenças letais se não tratadas, transmitida por dípteros do gênero *Glossinia* (Figura 1). Essas moscas, TseTse, na língua setswana (Botswana), foram identificadas pela primeira vez no delta do rio Okavando (Botswana), onde são endêmicas. As Tripanosomíase Africanas são causadas por parasitas da espécie *Trypanosoma brucei* (*T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*). Estes parasitas (*T. b. brucei* e *T. congolense*, *T. simiae* e *T. vivax*), além de comprometer a saúde humana, também afetam a saúde animal sendo responsáveis pela doença de ‘Nagana’ em gado e animais de caça (ver Figura 2).



Figura 1. Mosca Tsetse, vetor transmissor da Tripanosomíase Africana. (Ohio-State University, College of Biological Sciences [Http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/home.html](http://www.biosci.ohio-state.edu/~parasite/home.html))



Figura 2. Patologias causadas pelo *Trypanosoma brucei*. De esquerda para direita: Tripanosomíase Africana Humana e Nagana em gado (<http://www.who.int/en>).

1.1.1.1 Etiopatologia

Os sintomas da Tripanosomíase Africana dependem do hospedeiro e da sub-espécie do tripanosoma. Na fase inicial da infecção por *T. b. gambiense*, a presença do parasito na corrente circulatória provoca uma estimulação maciça da resposta humoral, sendo característica a lise das células do hospedeiro, mediada pelo complemento (ver Figura 3). Esta hemólise provoca subsequente anemia; dano vascular (principalmente nos rins); dores musculares e articulares; linfadenopatia (Sinal de Winterbottom); edema; febre e enfraquecimento. A segunda fase, conhecida como fase neurológica, começa quando o parasita atravessa a barreira hemato-encefálica e infesta o Sistema Nervoso Central (SNC), levando ao aparecimento dos sinais e sintomas característicos da doença: confusão, distúrbios sensoriais e perda de

coordenação. O distúrbio no ciclo do sono, o qual dá o nome à enfermidade, é a característica mais significativa da Tripanosomíase Africana. Sem tratamento esta doença é fatal, e se o paciente não é tratado antes de instalada a segunda fase, os danos neurológicos são irreversíveis, mesmo depois do tratamento. A longa e assintomática primeira fase da doença por *T. b. gambiense*, é um dos fatores que contribuem à dificuldade no diagnóstico e tratamento.

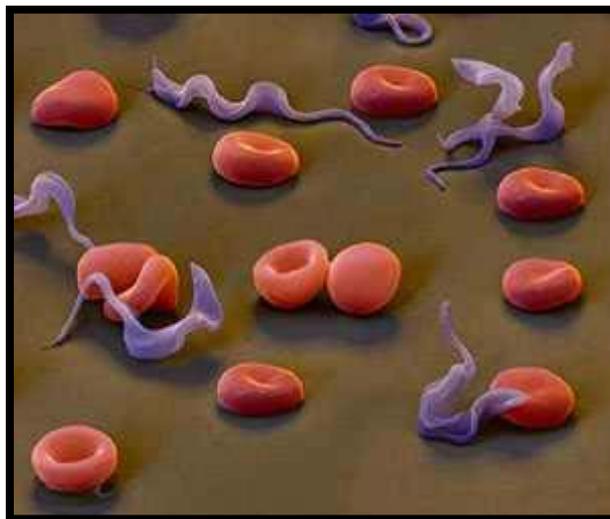


Figura 3. Formas sanguíneas de *T. brucei* num esfregaço de sangue periférica humana (*Ohio State University, College of Biological Sciences*)

No caso da infecção causada pelo *T. b. rhodesiense*, não há os sintomas de comprometimento do SNC ou coma, provavelmente devido a que a morte do paciente acontece antes que estes possam ser desenvolvidos.

1.1.1.2 Epidemiologia e Distribuição Geográfica

A Doença do Sono tem um impacto devastador sobre a saúde humana, por ano são reportados mais de meio milhão de casos e 70,000 mortes. Este parasita também infecta gado e animais de caça, causando a doença de 'Nagana', restringindo o desenvolvimento agrícola e contribuindo ao

empobrecimento das áreas afetadas. Nos últimos trinta anos, falhas nas medidas de controle e no tratamento tem exacerbado o impacto desta patologia, sendo a maior causa de morte em algumas partes de África, superando inclusive a HIV/AIDS em algumas províncias da Angola, Congo e Sudão do Sul (<http://www.who.int/en/>).

A Doença do Sono ameaça mais de 60 milhões de pessoas em 36 países do continente africano. Somente três a quatro milhões destas pessoas encontram-se atualmente sob programas de vigilância epidemiológica, com exames regulares ou acesso a centros de saúde. A falta de recursos das populações em risco leva a que muitas pessoas morram por causa da doença, antes de serem diagnosticadas (<http://www.who.int/en/>).

Em 1999, foram comunicados aproximadamente 45,000 casos, mas a Organização Mundial da Saúde (OMS), calcula que a população afetada por ano seja dez vezes maior, devido ao sub-diagnóstico. Estima-se que o número real esteja entre 300,000 a 500,000 novos casos, e 100,000 incapacitados por ano. O custo da doença é de aproximadamente 1,6 milhões de DALYs (*Disability Adjusted Life Years*). Este índice é uma medida que compreende o conceito dos potenciais anos de vida que uma pessoa perde devido à morte prematura (incluindo os anos perdidos de vida saudável, em virtude de estado de saúde precária ou incapacidade). Um DALY equivale a um ano de vida saudável perdido e ao custo da doença medido pela diferença entre o *status* atual de saúde e a situação ideal, livre da doença ou incapacidade (<http://www.who.int/en/>).

Foram identificados três grandes epidemias de Tripanosomíase Africana no último século: uma entre 1896 e 1906 (principalmente em Uganda e Congo); uma em 1920 em vários países Africanos e uma última que teve início em 1970 e que se prolonga até hoje. A epidemia de 1920 foi contida com sucesso e a enfermidade praticamente desapareceu entre 1960-1965. Depois deste período, falhas no sistema de vigilância epidemiológica levaram ao reaparecimento da doença em forma endêmica nos últimos trinta anos (<http://www.who.int/en/>).

Segundo a OMS (<http://www.who.int/en/>), os países afetados são classificados em quatro categorias de acordo à prevalência da doença, sendo que em cada país a distribuição espacial da doença é muito diversa, encontrando-se focos e micro-focos (ver Figura 4 e 5):

países epidêmicos: Angola, República Democrática do Congo e Sudão;

países altamente endêmicos: Camarões, República de África Central, Chad, Congo, Costa de Marfim, Guine, Moçambique, Uganda e República Unida de Tanzânia;

países pouco endêmicos: Benin, Burkina Faso, Guine Equatorial, Gabon, Kenia, Mali, Togo e Zâmbia;

países de status epidemiológico desconhecido: Botswana, Burundi, Etiópia, Libéria, Namíbia, Nigéria, Ruanda, Senegal e Serra-Leoa.

O *T. b. gambiense* encontra-se principalmente distribuído na África Ocidental (oeste do vale do grande Rift), Congo, Camarões e Angola. A ocorrência da morte acontece geralmente entre seis meses e 6 anos, senão tratada. É transmitido de humano para humano através do vetor *Glossina palpalis*, cujos reservatórios são os rios, lagos e poços. Nesta variedade da

doença, os animais domésticos têm pouca importância epidemiológica. O *T. b. rhodesiense* é o agente etiológico da Tripanosomíase Africana Oriental região dos grandes lagos: Tanzânia, Moçambique, Quênia e Uganda. Esta variedade da Tripanosomíase Africana, afeta de forma significativa os animais domésticos como: antílopes, gazelas e gado. O vetor de transmissão é a mosca hematófaga *Glossina morsitans* (ver Figura 4 e 5).

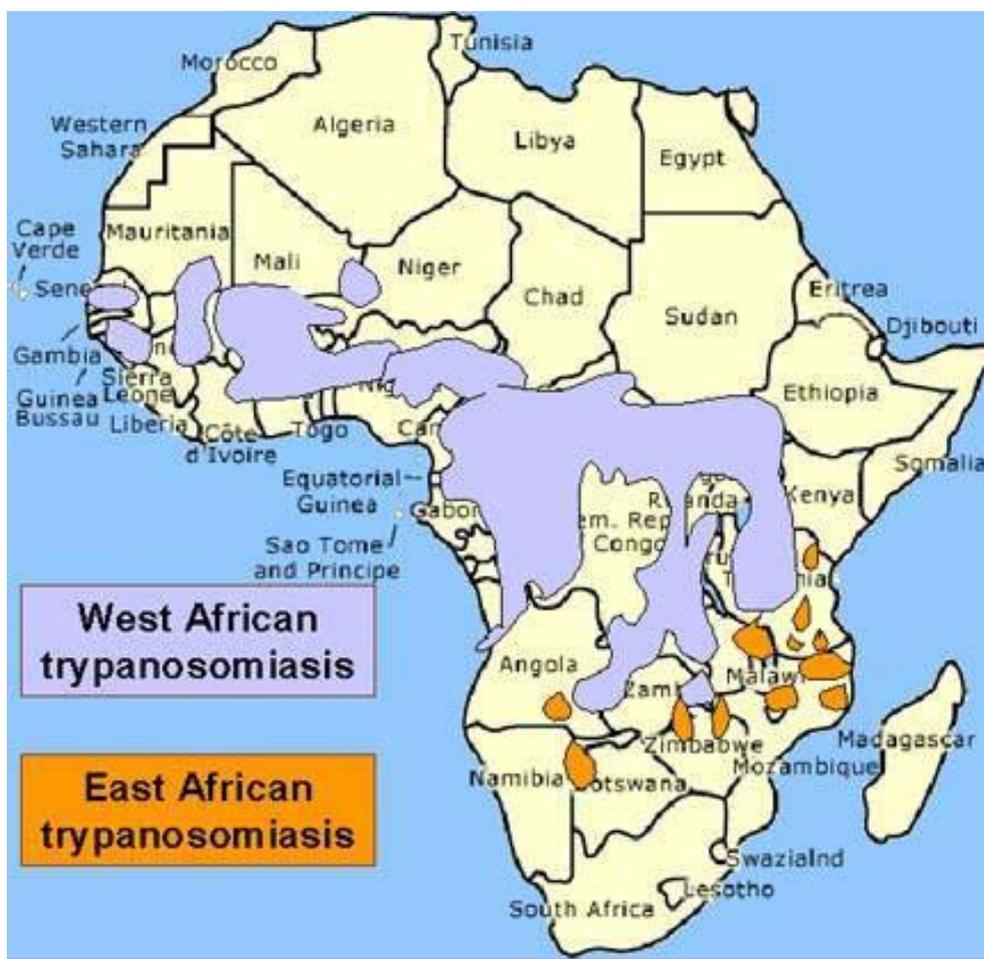


Figura 4. Distribuição espacial da Tripanosomíase Africana Humana. Regiões da África Sub-Sahariana afetadas pela Tripanosomíase Africana do Oeste (em cinza), causada pela sub-espécie *T. b. gambiense* e pela Tripanosomíase Africana do Este (laranja), causada pela sub-espécie *T. b. rhodesiense* (<http://www.who.int/en/>).

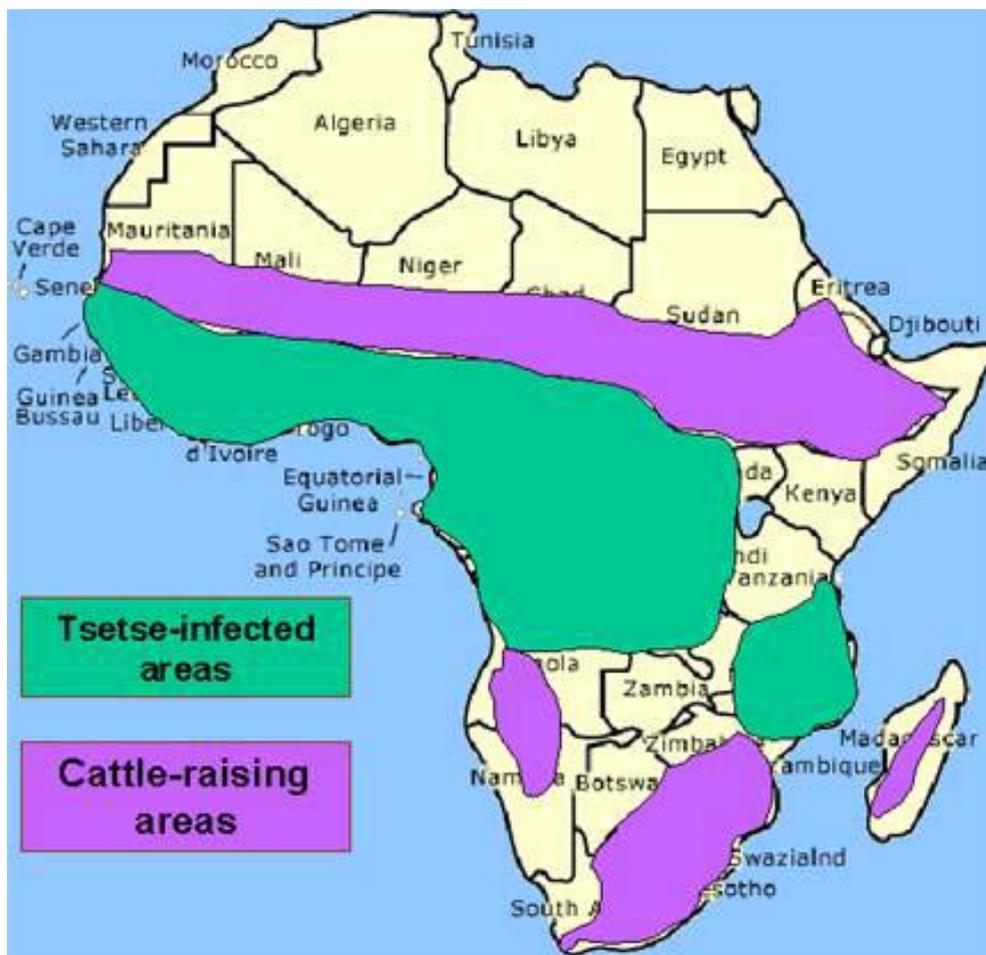


Figura 5. Comparação da distribuição geográfica das áreas infestadas pela mosca Tsetse (verde) e as áreas de criação de gado (roxo) no continente africano, mostrando os efeitos devastadores da doença de 'Nagana' sobre a criação de gado (<http://www.who.int/en/>).

1.1.1.3 Controle

O controle da doença se dá principalmente por vigilância epidemiológica das populações de alto risco, acoplado ao tratamento das pessoas infectadas, além da redução no número de moscas Tsetse.

1.1.1.4 Tratamento

Se a infecção é diagnosticada na fase inicial, as chances de cura são altas. O tipo de tratamento depende da fase da doença: Inicial ou Neurológica (<http://www.who.int/en/>) (ver Figura 6).

Tratamento na Fase Inicial:

- Suramina: Descoberta em 1921, e usada no tratamento da fase inicial da infecção por *T.b. rhodesiense*. Apresenta freqüentes efeitos indesejáveis.
- Pentamidine: Descoberta em 1941, e usada para o tratamento da fase inicial da infecção por *T.b. gambiense*. Apesar de uns poucos efeitos indesejáveis é bem tolerada pelos pacientes.

Tratamento na Fase Tardia (ou neurológica):

- Melarsoprol: Descoberta em 1949. Atualmente, é o único fármaco disponível para o tratamento do estágio avançado da Doença do Sono, independente da sub-espécie causal. É o último derivado arsenical existente. Seu uso implica severos efeitos indesejáveis, incluindo: encefalopatia, freqüentemente fatal (3-10% dos casos), deixando, nos casos de sobrevivência, graves seqüelas neurológicas. Adicionalmente, existe uma considerável resistência ao medicamento, chegando até 30% em algumas partes da África Central.
- Eflornitina: Descoberta em 1990. Constitui a única alternativa existente para o tratamento com o melarsoprol. Eficiente somente contra o *T.b. gambiense*. Sua aplicação requer um regime estrito e de difícil aplicação. Sua produção cessou em 1999.

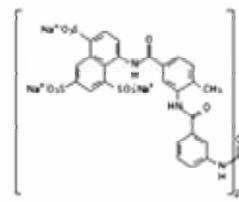
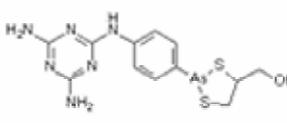
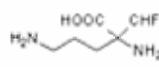
Suramin	<p>Administração Parenteral (i.v.) Inativa em todos os estágios tardios Tratamento prolongado (mais de 3 semanas). Alta toxicidade (anafilaxia fatal em ~ 1 de cada 20.000; reações cutâneas e dano renal reversível). Alto custo (Bayer).</p>	
Pentamidine	<p>Administração Parenteral (i.m.) Inativa em todos os estágios tardios Inativa em alguns casos de <i>T.b.rhodesiense</i>. Alta toxicidade (hipotensão, mialgia, esterilidade, diabetes). Alto Custo (\$ 60-150).</p>	
Melarsoprol	<p>Administração Parenteral (i.v.) Prolongada hospitalização Toxicidade Severa (5% mortalidade; 10% encefalopatia; prurido e falha cardíaca) Alta taxa de reincidência Alto custo (Aventis)</p>	
Eflornithine (D,L- α -DFMO)	<p>Administração Parenteral (i.v.) Tratamento Prolongado (mais de 3 semanas) Toxicidade reversível (convulsões; supressão da medula óssea; sintomas gastrointestinais, surdez) Inativa os estágios tardios por <i>T.b.rhodesiense</i> Alto custo (Aventis)</p>	

Figura 6. Fármacos utilizados para o tratamento da Tripanosomíase Africana Humana.

1.1.2 *Trypanosoma brucei*

1.1.2.1 Ciclo de vida

Os parasitos protozoários são organismos extremamente bem adaptados a seu ambiente, tendo co-evoluído com seu hospedeiro mamífero devido a sua necessidade constante de evitar a sua resposta imune. Possuem um ciclo de vida complexo e são freqüentemente transmitidos entre hospedeiros mamíferos através de vetores artrópodes, nos quais também freqüentemente tem de enfrentar condições hostis. A variedade destas condições enfrentadas por estes parasitos significa que um simples organismo deve exibir uma alta adaptabilidade e uma diferenciação rigorosamente programada, requerendo uma modulação coordenada de muitos processos biológicos básicos.

O *T. brucei* é transmitido entre os hospedeiros mamíferos pela Tsetse, *Glossina* spp, na qual se estabelece inicialmente no intestino e logo migra para as glândulas salivares permitindo a transmissão para um novo hospedeiro mamífero durante sua alimentação (Figura 1). No novo hospedeiro, o parasito sobrevive livre na corrente sangüínea, sendo capaz de evadir a resposta humoral através de sua variação antigênica (McCulloch, 2004), implicando a expressão seqüencial de Glicoproteínas Variáveis de Superfície (VSGs, *Variable Surface Glycoproteins*) antigenicamente distintas, as quais estão ancoradas à membrana de superfície pelo glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Nas formas sangüíneas (*Slender*), o kinetoplasto é localizado na extremidade posterior da célula. Estas proliferam, sendo substituídas por formas *Stumpy*, não proliferativas, na medida em que o número de parasitas aumenta (Matthews *et al.*, 2004). Isto tem duplo propósito: primeiro, o acúmulo de formas não proliferativas limita o incremento no número de parasitas e, talvez, contribua para prolongar a sobrevivência do hospedeiro (e conseqüentemente a probabilidade de transmissão da doença); segundo, a interrupção da divisão celular das formas *Stumpy* na fase G₁, assegura que as mudanças morfológicas, que acontecem depois da transmissão para Tsetse, possam ser coordenadas com a reentrada no ciclo celular.

Após a sua entrada no vetor hematófago, no intestino da mosca são geradas as formas procíclicas proliferativas que mudam a sua maneira de geração de energia, antes baseada exclusivamente na glicólise, para um sistema baseado na respiração mitocondrial. Para este propósito, é requerida uma elaboração estrutural e uma ativação metabólica da organela. As formas

procíclicas, substituem sua coberta de VSG por uma superfície menos densa composta por prociclinas, as quais são ancoradas também ao GPI (Roditi e Liniger, 2002). O kinetoplasto é também re-posicionado para uma localização sub-terminal.

Depois da proliferação no intestino, o parasito migra para as glândulas salivares. A forma epimastigota gerada ali, se prende à parede da glândula através da elaboração da membrana flagelar. Depois de subseqüentes multiplicações, o parasito pára novamente sua divisão celular, readquirindo sua coberta de VSG, para assim poder ser liberado dentro do lúmen da glândula salivar, onde ele se fixa como forma epimastigota. Esta forma é proliferativa e sua fixação à glândula é feita através do seu flagelo. Eventualmente, a partir dos epimastigotes são geradas as formas metacíclicas, não proliferativas, preparando-se, de esta forma, para recomeçar o ciclo de infecção num novo hospedeiro mamífero (Figura 7).

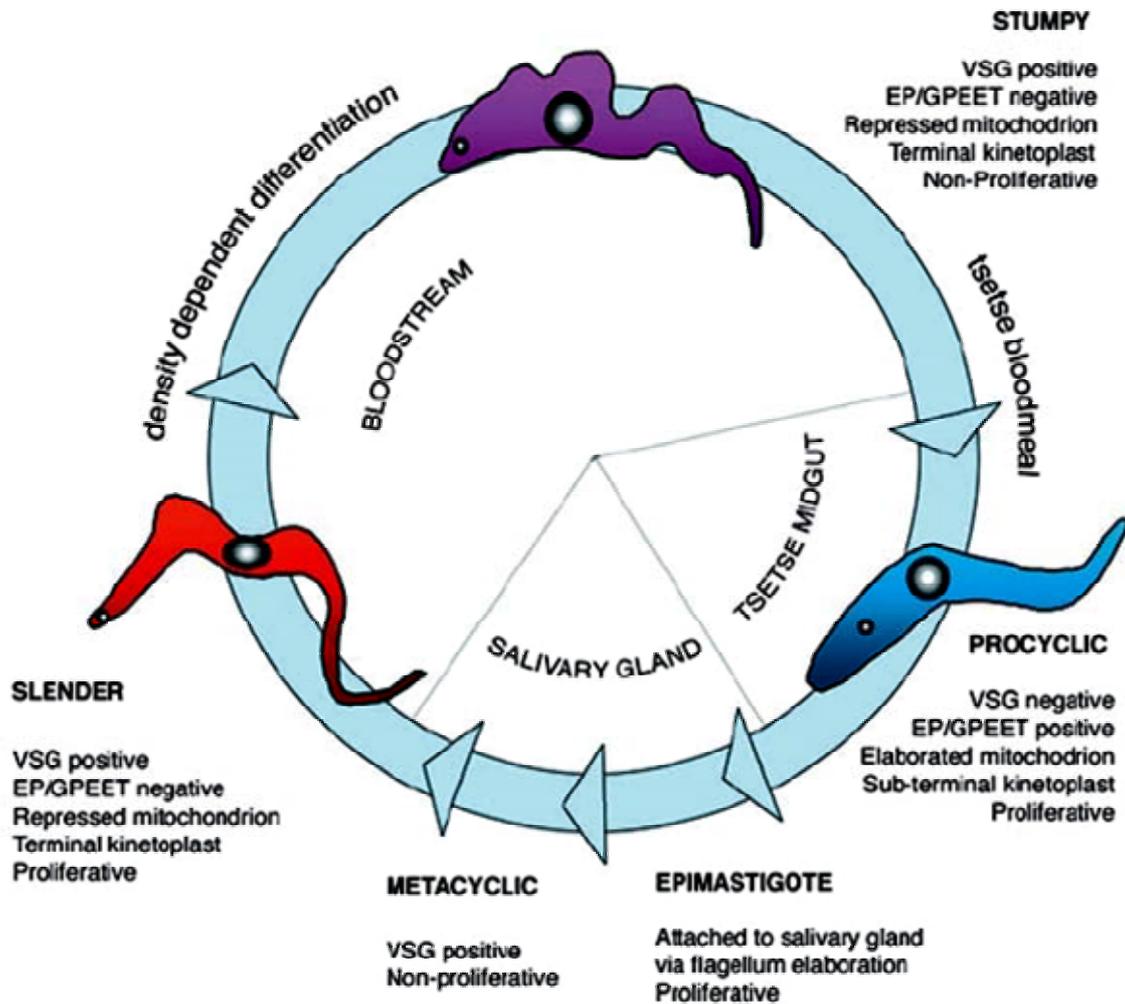


Figura 7 . Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* (Matthews, 2005).

1.1.2.2 Morfologia

A célula do *Trypanosoma* é alongada e possui um citoesqueleto de microtúbulos altamente polarizado, definindo a forma celular que permanece intacta através do ciclo celular (Sherwin e Gull, 1989). As organelas de cópia simples no parasito (*e.g.* cavidade flagelar, flagelo, kinetoplasto, mitocôndria e núcleo) estão posicionadas em forma precisa dentro do citoesqueleto e encontram-se concentrados entre a extremidade posterior e o centro da célula (Figura 8).

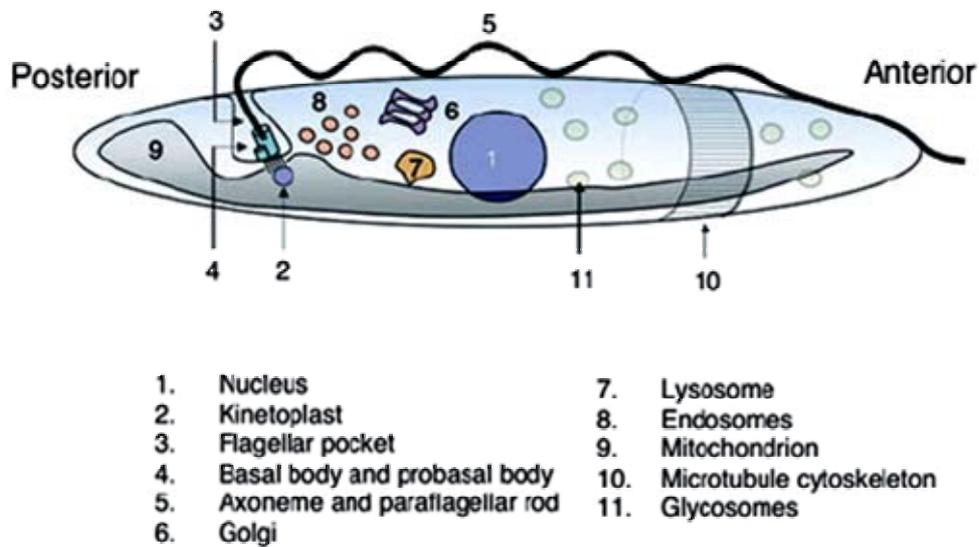


Figura 8. Arquitetura celular do tripanosoma. Representação simplificada da localização das principais estruturas da célula do tripanosoma (Matthews, 2005).

A mobilidade do tripanosoma é dependente do seu flagelo simples, o qual possui uma estrutura axonemal convencional associado com uma vareta paraflagelar (Vaughan e Gull, 2003), uma estrutura semi-rígida encontrada nos kinetoplastídeos e euglenoides, que contribui para a mobilidade do parasito (Bastin *et al.*, 1998). O flagelo dos tripanosomas se origina no corpo basal que, por sua vez, encontra-se ligado através da membrana mitocondrial ao genoma mitocondrial, o qual compreende uma massa de DNA concatenado, chamada de kinetoplasto. Em *T. brucei* foi visualizado um complexo tripartida, consistindo de um grupo de ligamentos conectando o corpo basal à membrana externa da mitocôndria e a um segundo grupo de filamentos no interior da mitocôndria, que liga o kDNA à região correspondente na membrana interna (Gull, 2003). Esta série de filamentos fornece laços de guia através dos quais a segregação do genoma mitocondrial é ligada à replicação e segregação do corpo basal e do

flagelo. De esta forma, os fármacos que desmancham o citoesqueleto, inibem a segregação do corpo basal e do kinetoplasto (Gull, 2003).

1.1.2.3 Geração de Energia

Em todos os tripanosomatídeos, muitas das enzimas glicolíticas encontram-se compartimentalizadas em organelas específicas, os glicossomos (Opperdoes e Borst, 1977). Estas organelas também contem o sistema de enzimas típicas dos peroxissomas, e sua biogênese é similar e homóloga a estas organelas (Clayton *et al.*, 1995).

Nas formas sangüíneas de *T. brucei*, a produção de ATP é inteiramente dependente da glicólise, com a glicose como a fonte de energia preferencial, e a frutose, manose e o glicerol como substratos alternativos. Neste parasito, as enzimas glicolíticas são particularmente abundantes, representando mais de 90% do conteúdo protéico do glicossomo (Misset *et al.*, 1986). Nas formas sangüíneas, a mitocôndria possui um papel menor no metabolismo energético, e o ciclo de Krebs esta ausente, assim como, muitos dos complexos da cadeia respiratória (Bienen *et al.*, 1981). Porém, é errôneo considerar que a mitocôndria nas formas sangüíneas não é funcional. Fundamentalmente, ela possui uma oxidase de alternativa (exclusiva dos tripanosomas) codificada no núcleo, a qual mantém o balanço do potencial redox glicossomal e glicolítico através do desvio do glicerol 3-fosfato para diidroxiacetona-fosfato (Clarkson *et al.*, 1989). A mitocôndria também possui uma ATPase que gera o gradiente de prótons transmembrana usando ATP. Como mínimo as formas sangüíneas devem ter o aparato requerido para a importação de proteínas e metabólitos

chave desde citosol para a mitocôndria, sendo a perda de proteínas mitocondriais letal para esta forma do parasito (Schnauffer *et al.*, 2001).

Nas formas procíclicas, a mitocôndria é metabolicamente mais ativa e contém mais enzimas (Brown *et al.*, 1973), sendo essencial para a geração de ATP, o funcionamento do ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons.

1.1.2.4 A Mitocôndria

Em contraste com a maioria dos eucariontes, que possuem centos de mitocôndrias individuais, os tripanosomatídeos estão constituídos por uma única mitocôndria que abarca todo o comprimento celular, o kinetoplasto (Simpson, 1972). A estrutura mais incomum do kinetoplasto é seu DNA, denominado de DNA kinetoplasto ou kDNA. Na célula o kDNA aparece como uma estrutura tipo disco facilmente observável (Figura 8).

A mais saliente diferença morfológica entre os diversos estágios do ciclo de vida do tripanosoma é a localização do kinetoplasto relativa à extremidade posterior da célula (Figura 9). Nas formas sangüíneas, o kinetoplasto situa-se próximo à extremidade posterior da célula, e cada kinetoplasto filho permanece em esta região através do ciclo celular até a citocinese. Por outro lado, nas formas procíclicas (encontradas no intestino do vetor), o kinetoplasto se localiza entre o núcleo e a parte a parte posterior da célula. Nos epimastigotes (formas encontradas na glândula salivar da mosca), o kinetoplasto é anterior ao núcleo central (Figura 9). As razões para que estas mudanças morfológicas aconteçam durante o ciclo celular dos tripanosomatídeos são desconhecidas, mas é provável que um incremento no comprimento do flagelo ao longo da célula

ajude à mobilidade das formas sanguíneas, enquanto que no epimastigota, o flagelo anterior maior ajudaria a incorporação de substrato (Matthews, 2005).

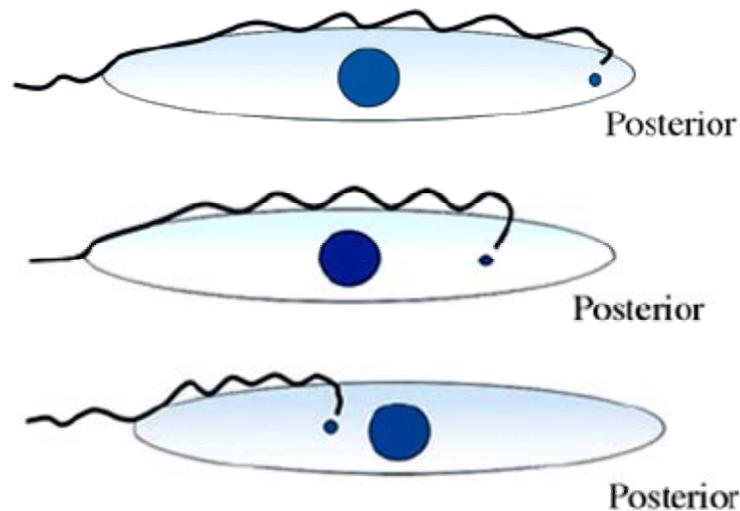


Figura 9. Mudanças na posição do kinetoplasto durante o ciclo de vida do tripanosoma. De cima para baixo: Forma Sanguínea, Forma Procíclica e Epimastigota. O esquema mostra a posição do kinetoplasto com relação ao núcleo e à parte posterior da célula (Matthews, 2005).

1.1.2.4.1 DNA Kinetoplasto (*kDNA*)

Tipicamente, o número de proteínas codificadas no genoma mitocondrial é reduzido e, no caso dos tripanosomas, este número não supera as 18 proteínas em total. Este limitado grupo de proteínas é essencial para a viabilidade celular destes parasitos. Nos tripanosomas, a síntese protéica requer processos únicos ou que apresentam diferenças significativas com outros organismos. Muitos genes representam ORFs (*Open Reading Frame*) incompletas e sua transcrição inicial tem de ser remodelada através da editoração do RNA, para sua conversão em transcritos traduzíveis. A tradução mitocondrial também apresenta características exclusivas. Os ribossomos são constituídos por rRNAs extremamente curtos (os menores conhecidos) e trabalham somente com tRNAs importados do citoplasma. Adicionalmente, a organização topológica do

genoma da mitocôndria requer uma elaborada maquinaria de replicação envolvendo topoisomerases.

O kineoplasto possui muitas características incomuns a outros sistemas biológicos. Ele é composto por dois tipos de DNA circular denominados de maxicírculos e minicírculos. Os maxicírculos (~50 cópias/kinetoplasto, ~10% da massa do kinetoplasto), contêm dois genes codificantes para RNA ribossomal (rRNA) e 18 genes codificantes para proteínas de mitocôndria (Simpson, 1987). Aproximadamente 12 dos genes codificantes para proteínas (dependendo da espécie) são ditos “criptogenes”, cujos transcritos são editados em variadas extensões, por inserção e deleção de uridinas (Sollner-Webb, 1996; Alfonzo et al., 1997). Por outro lado, os minicírculos (~10,000 cópias/kinetoplasto, ~90% da massa do kinetoplasto) codificam para os RNAs guia (guide RNA - gRNA), envolvidos na mediação do processo de edição (Blum e Simpson, 1990). Estes RNAs atuam como moldes através dos quais os transcritos do maxicírculo são pós-transcricionalmente editados. Uma extensa editoração de RNA é uma característica única dos parasitos kinetoplastídeos, os quais requerem para isto, de um complexo multiprotéico chamado de editosoma (Madison-Anteucci *et al.*, 2002). Nos tripanosomas, a editoração de RNA é requerida tanto para as formas procíclicas como para as formas sangüíneas (Schnauffer *et al.*, 2001). Este processo é regulado pelo estágio de desenvolvimento, por exemplo, o mRNA da subunidade II da citocromo oxidase é editada para uma correta fase de leitura nas formas procíclicas (Feagin e Stuart, 1988). Nenhum tRNA é codificado no genoma mitocondrial, nem dos maxicírculos nem dos minicírculos (Simpson et al., 1989).

O genoma mitocondrial tem uma discreta e periódica Fase S e Fase G2 que é coordenada com a replicação do genoma nuclear e a segregação. Existem várias características incomuns no ciclo celular do tripanosoma. O primeiro é a estrita regulação da posição da organela durante a divisão celular (Figura 9). O segundo, é que a citocinese não depende da culminação da mitose nuclear: a interrupção da mitose, por fármacos ou por qualquer outro tipo de perturbação, gera células que tem kinetoplasto, mas carecem de núcleo (chamados de *zooids*) (Ploubidou *et al.*, 1999).

1.1.2.5 Genoma Nuclear

Como no genoma mitocondrial, o genoma nuclear dos tripanosomas é de alta complexidade: o *T. brucei* contém onze cromossomos ‘megabase’ e mais de 100 cromossomos ‘minibase’ de ~50 kb. Estes minicromossomos carregam um amplo repertório de genes VSG (Wickstead *et al.*, 2004). A organização gênica dos cromossomos megabase é caracterizada por genes policistrônicos com seqüências promotoras *upstream* distantes, ainda não identificadas. Estes arranjos de genes não estão organizados em operons, senão que genes que são diferencialmente expressos através do ciclo de vida, podem estar adjacentes. A expressão gênica estágio-regulada é quase exclusivamente controlada ao nível pós-transcricional, através da estabilidade do mRNA e de sua tradução (Clayton, 2002), assim como pelo processamento diferencial do RNA (já que nos tripanosomatídeos todos os genes sofrem *trans-splicing*; somente tem sido identificado um gene com um íntron em *cis* (Mair *et al.*, 2000)).

1.2 tRNAs

As moléculas de RNA transportador (tRNA) são ubíquas em todos os sistemas vivos, mas as populações de tRNAs variam nas diferentes espécies (Muto *et al.*, 1990). A principal função do tRNA é carregar o aminoácido ativado ao ribossomo para participar da síntese de polipeptídeos. Durante este processo, a específica aminoacil-tRNA sintetase (aaRS), catalisa a transferência do aminoácido cognato á extremidade universal 3'-CCA_{OH} na posição 2' ou 3' de uma espécie específica de tRNA (Figura 10). Esta especificidade esta baseada na identidade dos elementos sobre o tRNA reconhecidos pela aaRS.

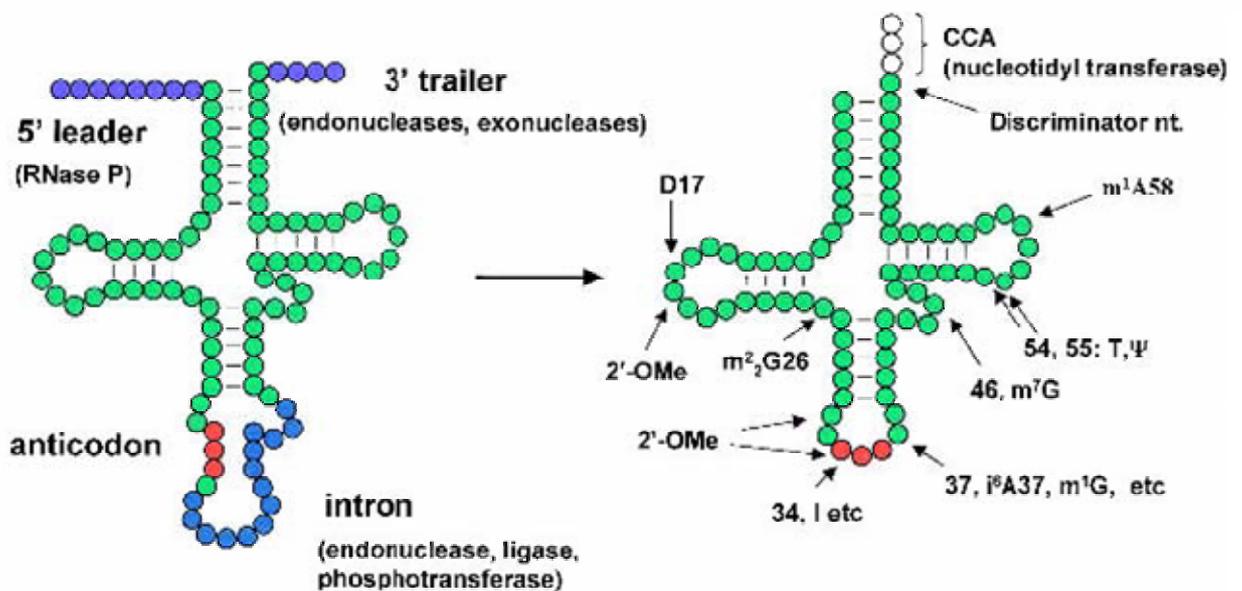


Figura 10. Representação esquemática de um tRNA precursor (esquerda) e sua forma madura (direita), o aminoacil-tRNA. Os círculos coloridos representam os nucleotídeos: partes do tRNA maduro (verde); seqüências 5'e 3'(púrpura); íntron (azul); anticódon (vermelho). As posições de várias modificações no tRNA são indicadas na molécula de tRNA canônico mostrada à direita (Hopper e Phizicky, 2003).

1.2.1. Estrutura do tRNA

Todos os tRNAs existentes na natureza possuem um comprimento que varia entre 72 a 95 resíduos e tipicamente adquirem uma estrutura secundária em forma de trevo (Figura 10). Os tRNAs possuem um número de nucleotídeos que são conservados em relativamente as mesmas posições em todas as moléculas de tRNAs. Duas regiões críticas destas moléculas são o anticódon, o qual interage com o códon do mRNA, e o braço acceptor, onde o aminoácido é ligado. Em muitos tRNAs, os resíduos do anticódon agem como os principais elementos de identidade (Hou *et al.*, 1989). O reconhecimento entre o códon e o anticódon estabiliza a ligação do tRNA aminoacilado ao ribossomo e acelera a reação de aminoacilação, indicando uma importante contribuição do ajuste induzido para a seleção do substrato. Os resíduos do anticódon são os nucleotídeos 34 ao 36, os quais reconhecem os 61 códons codificando os 20 tipos de aminoácidos que formam proteínas. Os outros três códons de parada, no código universal, tem sido descritos por codificar para aminoácidos canônicos ou novos. A primeira exceção identificada foi que o códon de parada UGA codificava para Trp em algumas espécies de *Mycoplasma* (Jukes, 1985). O códon UGA também tem sido identificado por codificar o aminoácido de número 21, a selenocisteína (Chambers *et al.*, 1986). Em arqueas, foi identificado o aminoácido de número 22, a pirrolisina, codificado por um outro códon de parada, o UAG (Srinivasan *et al.*, 2002). Todos estes casos são caracterizados porque os tRNAs carregam um anticódon aberrante, o qual reconhece o códon de parada no mRNA.

No tRNA o nucleotídeo 73 não pareado que se encontra somente a três posições do sítio de ligação do aminoácido é definido como a base discriminadora. Este nucleotídeo é crucial na identidade do tRNA.

1.2.2 Processamento dos tRNA

O papel fundamental do tRNA requer que tRNAs maduros sejam reconhecidos pelas aaRSs (para a adição do aminoácido cognato na sua extremidade 3'); pelo EF-1 α (para a formação do complexo ternário aa-tRNA - GTP - EF-Tu) e pelos elementos do ribossomo para permitir a ligação, a síntese peptídica e a translocação. Mas, para o cumprimento deste papel todos os tRNAs transcritos sofrem um extensivo processamento.

O processamento do tRNA requer cinco passos:

1) remoção da extremidade 5' pela RNase P, a qual geralmente, requer um complexo ribonucleoproteína;

2) remoção da extremidade 3' pela ação combinada de endo- e exonucleases;

3) adição da seqüência CCA. Em eucariotes, muitas eubactérias e algumas arqueas, muitos dos genes de tRNAs carecem da cauda 3'-CCA_{OH} (Bult *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997). Nestes organismos, a geração da seqüência da extremidade 3' CCA do tRNA é catalisada pela enzima adicionadora de CCA (ATP/CTP:tRNA nucleotidiltransferase) que acrescenta três nucleotídeos consecutivos na ordem C, C, e A (Yue *et al.*, 1996). Esta enzima constitui uma das poucas polimerases conhecidas que sintetiza uma seqüência determinada sem a utilização de molde;

(4) *splicing* de íntrons em alguns tRNAs de muitos (senão todos) os eucariontes e algumas arqueas por uma endonuclease, que remove os íntrons, e uma ligase que junta os éxons; e

5) numerosas modificações do tRNA em múltiplos resíduos (ver Figura 10, direita). A principal característica dos tRNAs é sua diversidade e prevalência de bases modificadas pós-traducionalmente. Todos estes nucleotídeos modificados são derivados dos nucleosídeos normais que formam o RNA. Estas modificações são agora vistas como componentes do processamento que interagem com a tradução e a influenciam em múltiplos níveis, afetando o transporte nuclear e a estabilidade do tRNA.

A especificidade do substrato pode prover uma explicação para o ordenamento de alguns dos passos da biogênese do tRNA. As enzimas que modificam C para m₅C, e U para ψ, na alça do anticódon do tRNA, requerem pré-tRNA contendo íntron, e estes passos devem acontecer previamente ao *splicing*. Contrariamente, outras modificações usam tRNAs com *splicing* como substratos, e as modificações resultantes ocorrem somente depois do *splicing* (Grosjean *et al.*, 1997). Por outro lado, como as atividades biosintéticas do tRNA parecem ser espacialmente organizadas com várias localizações diferentes citosólicas e sub-celulares, é provável que estas restrições celulares sejam uma contribuição principal na ordem preferencial do processamento do tRNA (Hopper e Phizicki, 2003).

1.2.3 Editoração do tRNA

Evidências obtidas na década passada com os kinetoplastídeos, indicaram que a seqüência de nucleotídeos de regiões codificantes dos mRNAs podia ser modificada pós-transcricionalmente pela *edição do mRNA*. Desta forma a editoração permite que a seqüência de aminoácidos presente numa proteína não seja sempre um reflexo direto da informação codificada no genoma.

Este processo não é exclusivo do mRNA, experimentos recentes tem descoberto muitos exemplos de mecanismos equivalentes nos tRNAs, muitos dos quais são surpreendentes. Um dos mecanismos mais incomuns do processamento do tRNA parece ser a reconstrução da extremidade 5' do tRNA mitocondrial na *Acanthamoeba castellanii* (Lonergan e Gray, 1993). Por outro lado, tRNAs mitocondriais podem ser editados na extremidade 3' de duas formas independentes de molde.

Vários tipos de animais, tais como lesmas terrestres, galinhas e lulas, parecem ter evoluído um mecanismo que formalmente corresponde à poliadenilação, para o preenchimento da extremidade do braço aminoacil-acceptor até a posição discriminadora (Figura 10, direita), presumivelmente depois do processamento do precursor de tRNA (Tomita *et al.*, 1996).

Diversas classes de editoramento tem sido descritas também em tRNAs mitocondriais. Recentemente, análises dos tRNAs mitocondriais da centopéia *Lithobius forficatus* mostraram que todos, com exceção de um dos seus 22 genes de tRNAs, requeriam de um aparente editoramento dependente de molde para o preenchimento no braço aminoacil-acceptor e a base A do braço

discriminador. Presumivelmente, esta reação requer uma RNA polimerase dependente de RNA (Lavroy *et al.*, 2000).

O mais prevalente destes eventos, envolve a alteração de C por U, correspondente à provável deaminação de citidina. Este tipo de editoração tem sido observado em um tRNA^{His} de marsupial (Janke e Paabo, 1993) e em plantas (Marechal-Drouard *et al.*, 1993), e parece, em vários casos, ser requerido para o processamento do correspondente tRNA (Marechal-Drouard *et al.*, 1996). O editoramento C por U também acontece em tripanosomatídeos (*Leishmania* e *T. brucei*), onde este fenômeno ocorre somente quando o tRNA é importado para a mitocôndria (Alfonzo *et al.*, 1999). Editoramento de inserção clássico de C e U, tem sido também observado num número de tRNAs mitocondriais de *Physarum polycephalum* e *Didymium nigripes* (Antes *et al.*, 1998).

1.2.3.1 Editoração de tRNAs guiado por gRNAs

Este fenômeno é caracterizado pela inserção e deleção de uridinas em sítios determinados do RNA. Em contraste a outros processos de editoramento, que acontecem pela modificação de bases (deaminação, etc.), este mecanismo envolve a hidrólise e religação de pontes fosfato nos RNAs. Os sítios de editoramento são especificados em *trans* por moléculas de RNA guia (gRNAs), as quais fornecem a informação para a reação de processamento através do pareamento de bases com o RNA a editar. De esta forma, os gRNAs constituem uma espécie de molde para a editoração (Blum *et al.*, 1990).

A editoração de RNA guiada por pequenos RNAs moldes ou RNAs guia (gRNAs), foi inicialmente descrita em pré-mRNAs mitocondriais de kinetoplastídeos (Blum *et al.*, 1990). Estes gRNAs são codificados nos mini-

círculos do genoma mitocondrial destes protozoários e participam da editoração de muitos dos genes codificados nos maxicírculos. Esta editoração é essencial para a expressão de muitos genes mitocondriais.

Um novo elo do processamento do tRNA é a modificação de tRNA mediada por gRNA. Um gene de tRNA^{Trp} de euriarquea possui dentro do seu íntron um motivo RNA guia, *C/D box*, especificando sua própria 2'-*O*-metilação em duas posições (d'Orval *et al.*, 2001). Em eucariontes e algumas arqueas, este motivo especifica a ligação da fibrilarina, e junto com seqüências adjacentes de RNA que pareiam com o RNA alvo, dirige a 2'-*O*-metilação em sítios dentro da região pareada (Smith e Steitz, 1997).

1.2.4 Importação do tRNA: Citoplasma para a Mitocôndria

Análises de seqüência de um grande número de genomas mitocondriais, têm mostrado que em muitos organismos, um número variável de genes de tRNA estão ausentes. Esta predição não é totalmente aplicável devido a que, a editoração do tRNA e as variações nos mecanismos de reconhecimento de códons, providenciam caminhos alternativos para compensar uma putativa perda de genes de tRNA. A perda de genes é compensada pela importação do correspondente tRNA citosólico (Schneider e Marechal-Drouard, 2000). A importação de tRNA mitocondrial é predita por ocorrer em muitos protozoários e plantas, assim como em alguns fungos e uns poucos invertebrados, e foi experimentalmente confirmada em *Saccharomyces cerevisiae* (Tarassov e Martin, 1996) e em várias espécies de protozoários (Hancock e Hajduk, 1990;

Simpson *et al.*, 1989) e plantas (Dietrich *et al.*, 1992). Em muitos casos somente um sub-conjunto de tRNAs são importados e alguns genes de tRNA mitocondriais tem sido mantidos (Schneider, 2001).

A importação de tRNA para a mitocôndria é um evento comum entre organismos eucariontes e ocorreu cedo na evolução. O número de espécies de tRNAs importados é extremamente variável e acima de tudo, não guarda correlação com a posição filogenética do organismo. De forma interessante, espécies estreitamente relacionadas podem se diferenciar completamente na importação de tRNA. Este fato sugere que, devido a que a perda de genes é provavelmente irreversível, a importação de tRNA tem uma origem polifilética. (Schneider e Marechal-Drouard, 2000). Por exemplo, *S. cerevisiae* importa unicamente dois tRNAs (tRNA^{Lys} e tRNA^{Gln}), ainda que seu genoma mitocondrial codifica todos os tRNAs necessários para a tradução da organela (Tarassov e Martin, 1996); enquanto que, uma variedade de parasitas protozoários importa todos os seus tRNAs mitocondriais. Desta forma, para alguns organismos, a importação de tRNAs desde o citosol é essencial. Em termos quantitativos, os tRNAs importados representam somente uma pequena fração (~5%) do total celular.

Todos os tRNAs que são importados para a mitocôndria são do tipo citosólicos e eucarióticos, significando que um mesmo gene codifica para um tRNA envolvido na tradução citosólica, assim como na mitocondrial. Porém, alguns tRNAs podem adquirir modificações adicionais nos seus nucleotídeos depois de sua importação (Schneider *et al.*, 1994). Genomas mitocondriais usam um código genético diferente ao universal (como por exemplo, tRNAs que

inserir aminoácidos em resposta a códons de parada). O correspondente tRNA importado deve ser inibido de participar na síntese protéica citoplasmática. De fato, a editoração de tRNA e eventos de modificação de tRNA acontecem no interior da mitocôndria, ativando alguns dos tRNAs importados (Schneider e Marechal-Drouard, 2000).

O *S. cerevisiae* contém dois diferentes tRNA^{Lys} codificados no núcleo, dos quais, somente um é importado ao interior da mitocôndria (Tarassov e Martin, 1996). *S. cerevisiae* importa, para o interior da mitocôndria, 3-5% do total de um simples tRNA citosólico, o tRNA^{CUU}^{Lys}. Este tRNA é primeiro aminoacilado pela Lisil-tRNA Sintetase citosólica. A adição do aminoácido no citoplasma altera a conformação do tRNA, permitindo os subseqüentes passos de importação mitocondrial (Entelis *et al.*, 1998). O tRNA carregado é co-importado através de uma proteína poro de importação usando o precursor mitocondrial da Lisil-tRNA Sintetase como carregador (mesmo que esta proteína não aminoacila o tRNA que transporta). Análises identificaram que os principais determinantes da importação no tRNA^{Lys} de leveduras, são o primeiro par de bases do braço acceptor e o anticódon (Figura 11). Adicionalmente, a competência da importação está correlacionada com a ligação a um fator solúvel de importação. Embora o precursor mitocondrial da Lisil-tRNA Sintetase é um fator crucial para a importação em leveduras, existem evidências de que aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs) não cumprem o mesmo papel em outros sistemas. Em *T. brucei*, um mutante não carregado de tRNA^{Tyr} conseguiu ser efetivamente importado (Schneider *et al.*, 1994), argumentando

contra um possível papel crucial das aaRSs na importação de tRNA, mas não as excluindo totalmente.

A Figura 11, mostra diferentes elementos estruturais determinantes da importação mitocondrial de tRNAs codificados no núcleo provenientes de distintas espécies de organismos (Schneider e Marechal-Drouard, 2000).

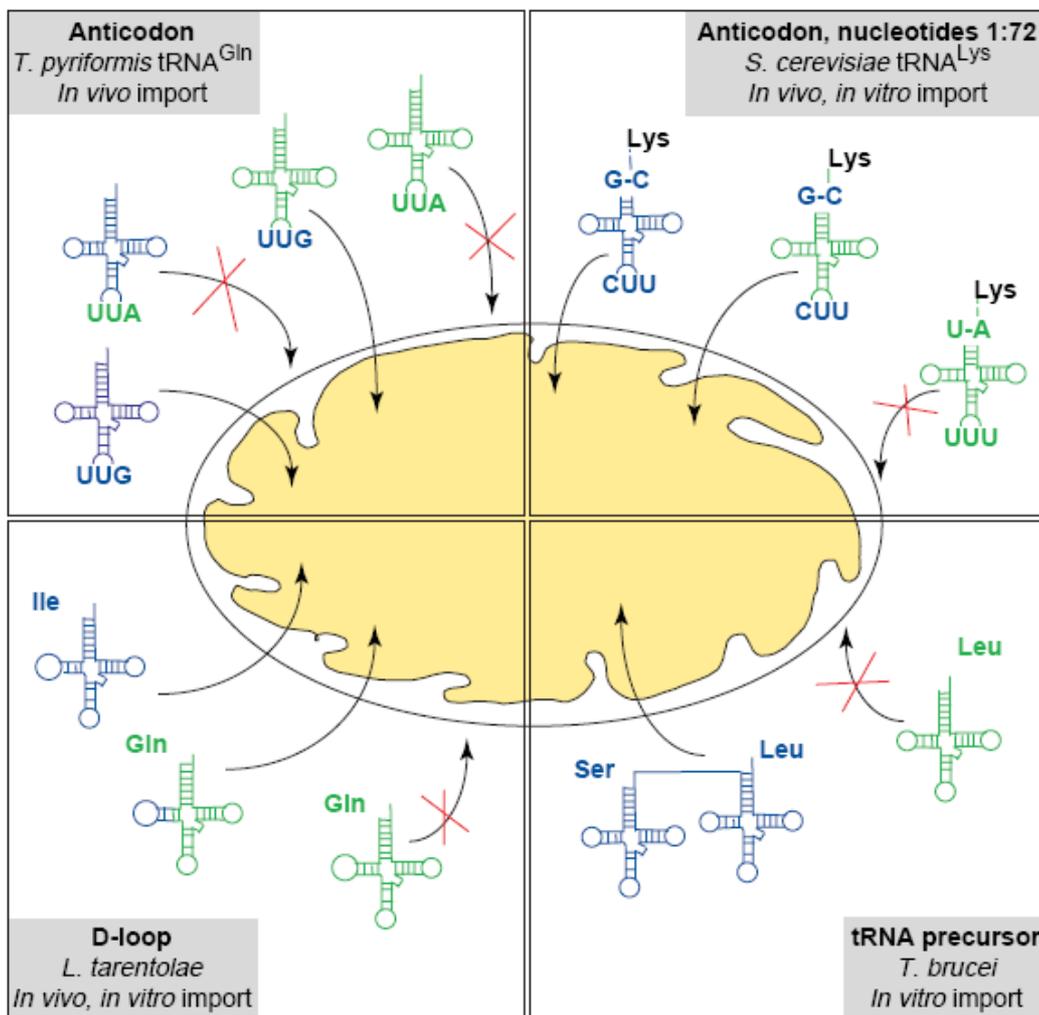


Figura 11. Determinantes da importação mitocondrial de tRNAs codificados no núcleo. Representação esquemática de determinantes chave de tRNAs codificados no núcleo de *Tetrahymena pyriformis*, *S. cerevisiae*, *L. tarentolae* e *T. brucei*. tRNAs específicos do citosol ou importados são mostrados em verde ou azul, respectivamente. Variantes de tRNA com domínios ou nucleotídeos de sua diferencialmente localizada contraparte são apresentados em cores misturadas. Para *T. brucei*, o precursor dimérico de tRNA é mostrado em azul, e o tRNA^{Leu} maduro sugerido para permanecer no citosol é mostrado em verde. Os anticódons e pares de nucleotídeos que contribuem como sinal de importação são indicados. Em *S. cerevisiae*, o tRNA^{Lys} aminoacilado é mostrado devido a que o resíduo de lisina foi evidenciado como requerido para a importação (Schneider e Marechal-Drouard, 2000).

1.2.4.1 Importação Mitocondrial de tRNA em Tripanosomatídeos

O número e identidade dos tRNAs importados são altamente variáveis, embora até o momento, os únicos organismos identificados como importadores obrigatórios de todos os seus tRNAs mitocondriais são os protozoários da ordem kinetoplastídea, o *Trypanosoma* e a *Leishmania* (Hancock e Hajduk, 1990; Simpson *et al.*, 1989).

A importação mitocondrial de tRNA em *T. brucei*, diferentemente de outros organismos como *S. cerevisiae* ou plantas, não é específica. Todos os tRNAs são parcialmente importados dentro da mitocôndria, com exceção do tRNA iniciador, tRNA^{Met-i}, que é o único tRNA específico do citosol. Este último tRNA tem uma alta homologia com o tRNA tipo elongador, tRNA^{Met-e}, o qual é eficientemente importado para a mitocôndria. Ambos tRNAs são aminoacilados pela mesma aminoacil-tRNA sintetase (Tan *et al.*, 2002).

Alguns estudos concluíram que somente pré-tRNAs com extensões 5' são importados, enquanto outros, pelo contrário mostraram que esta extensão não é importante, suportando o modelo de que unicamente tRNAs maduros são importados (Yermovsky-Kammerer e Hajduk 1999; Tan *et al.*, 2002). Se de fato, pré-tRNAs são importados *in vivo*, estes devem ter um mecanismo de escape, ao processamento e aos mecanismos de controle de qualidade do núcleo, para que possam ser exportados ao citosol com extensões 5'e 3' intactas. Recentemente, Sherrer *et al.*, (2003) evidenciaram que seqüências 5' *upstream* das regiões codificantes de tRNA, influenciam a localização de tRNAs em *T. brucei*. Através de análises de seqüência, foi identificado um dinucleotídeo altamente conservado dentro de uma seqüência motivo também conservada, a

YGG(C/A)RRC. Esta seqüência é similar com o motivo previamente descrito em tRNAs e em moléculas competentemente importadas em *Leishmania* (Bhattacharyya *et al.*, 2002). A remoção deste motivo do precursor do tRNA^{Leu} diminui significativamente sua importação *in vitro* e *in vivo*, indicando que esta seqüência flanqueadora 5' esta envolvida na manutenção da abundância e distribuição celular do tRNA^{Leu} (Sherrer *et al.*, 2003).

In vitro, sistemas de importação de tRNA em *T. brucei* (Yermovsky-Kammerer e Hajduk, 1999) e em duas espécies de *Leishmania* (Rubio *et al.*, 2000; Adhya *et al.*, 1997), evidenciaram dependência de ATP externo e provavelmente interno, assim como de componentes do gradiente eletroquímico de prótons (Rubio *et al.*, 2000; Yermovsky-Kammerer e Hajduk, 1999). Nenhum dos ensaios em *Leishmania* ou *T. brucei* requer a adição de fatores citosólicos, o que indica um mecanismo de importação diferente ao descrito para leveduras (Schneider e Marechal-Drouard, 2000).

Por outro lado, a identidade dos determinantes da importação de tRNAs nos tripanosomatídeos (*T. brucei*, *Leishmania*) permanece controversa. A alça do braço D parece contribuir como um sinal, como demonstrado num estudo *in vitro* de importação do tRNA^{Tyr} de *L. tropica* (Mahapatra *et al.*, 1998). Adicionalmente, em experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados em *L. tarentolae*, foi substituída a alça do braço D do tRNA^{Gln} (um tRNA exclusivo do citosol), pela correspondente alça do tRNA^{Ile} importado. Esta substituição levou a uma localização mitocondrial parcial do resultante tRNA (Rubio *et al.*, 2000). Porém, o experimento reverso, onde o tRNA^{Ile} (importado) carregava a alça do braço D do citosólico tRNA^{Gln}, não desencadeio o resultado esperado (Lima e

Simpson, 1996). Por outro lado, ainda não está claro que elemento de sequência dentro da alça do braço D está presente no tRNA importado, mas não nos tRNAs exclusivamente citosólicos (Suyama *et al.*, 1998). São necessários estudos posteriores esclarecendo por completo quais os determinantes da importação mitocondrial, assim como os fatores proteínicos que interagem com ditos elementos, tanto em tRNAs de plantas como de tripanosomatídeos.

1.2.4.2 O tRNA^{Trp} Mitocondrial de Tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos possuem uma organização do genoma mitocondrial característica. O código genético do kinetoplasto (mitocôndria) difere do código universal em que o códon de parada UGA é usado como códon para o Triptofano (Trp). Adicionalmente, o genoma mitocondrial destes organismos carece dos genes que codificam para os tRNAs da organela (Simpson *et al.*, 1989), sendo que todos os tRNAs utilizados pela célula (tradução citoplasmática e mitocondrial) são codificados no núcleo. Os tRNAs mitocondriais precisam ser importados desde o núcleo, através de um mecanismo ainda não completamente elucidado. Vale a pena salientar que, um simples tRNA^{Trp} (CCA), nuclearmente codificado e que decodifica o códon canônico de Trp (UGG), é usado para a tradução tanto dos genes nucleares quanto dos genes mitocondriais. Um processo de editoração do tRNA^{Trp} na posição 34 (C por U) permite que o códon de parada UGA seja decodificado como Trp, na mitocôndria, mudando seu anticódon de CCA para UCA (Alfonzo *et al.*, 1999) (Figura 12 e 13). Este mecanismo de editoramento, que é restrito ao kinetoplasto, permite a leitura dos dois tipos de códons Trp presentes no genoma mitocondrial, o UGG (canônico) e o UGA (Alfonzo *et al.*, 1999). Esta

descoberta abre uma nova perspectiva de investigação da seletividade das aaRSs pelos tRNAs.

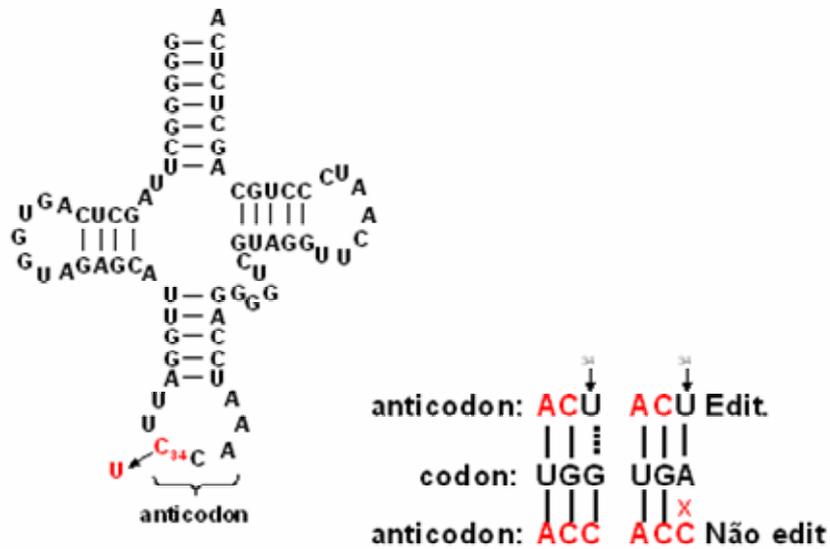


Figura 12. Editoramento do tRNA^{Trp}(CCA) para tRNA^{Trp}(UCA).

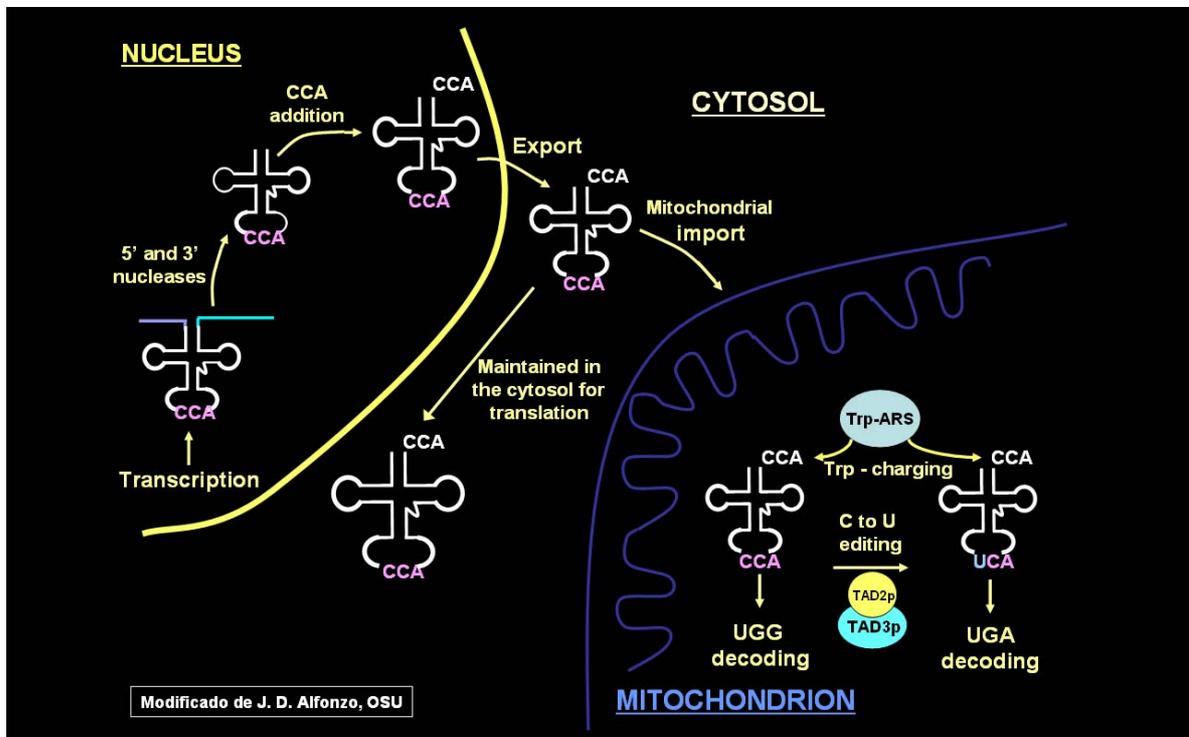


Figura 13. Descrição do mecanismo de importação do tRNA^{Trp}(CCA) de origem nuclear desde o citoplasma para a mitocôndria (adaptado de Alfonzo *et al.*, 1999).

1.3 Aminoacil-tRNAs (aa-tRNAs)

Os aminoacil-tRNAs (aa-tRNAs) são moléculas simples cujo propósito principal é servir como substratos no processo de tradução. Na síntese protéica, estas moléculas são tRNAs maduros que possuem um aminoácido esterificado na extremidade 3' do ácido nucléico. Os 20 diferentes tipos de aa-tRNAs são sintetizados por 20 diferentes aminoacil-tRNA sintetases (aaRSs), das quais há duas classes nos organismos eucariontes, uma para cada aminoácido (aa) do código genético usado na tradução citoplasmática ou organelar (Ibba e Söll, 2000). Os tRNAs situam-se no centro da expressão gênica, eles interpretam o código genético, fornecendo uma interfase entre as trincas do mRNA e o correspondente aminoácido nas proteínas. A síntese dos aminoacil-tRNAs afeta diretamente a fidelidade da tradução, a expansão do código genético, e até mesmo, providencia uma ligação tangível com o metabolismo primário. Desta forma, a síntese dos aminoacil-tRNAs é o mais importante fator no estabelecimento dos limites, dentro dos quais, o código genético é interpretado.

1.3.1 Tipos de aa-tRNAs

Os aa-tRNAs tipicamente encontrados nas células podem ser divididos em três tipos principais, como mostrado na Tabela 1.

1.3.1.1 Substratos da Tradução Ribossomal

É o maior grupo, constituído por moléculas de tRNA corretamente pareadas com seu aminoácido cognato. Entre elas se encontram:

a) os tRNAs alongadores canônicos. Sintetizados usualmente em forma direta pela correspondente aaRS (O'Donoghue e Luthey-Schulten, 2003) e subsequentemente (após conferir sua exatidão), entregues aos ribossomos, pelos fatores de alongação Tu (EF-Tu) (LaRiviere *et al.*, 2001). Da mesma forma, os aa-tRNAs iniciadores em arquea e eucariontes são produzidos diretamente pela Metionil-tRNA sintetase (MetRS), e então, ligados a fatores de iniciação que fazem sua entrega aos ribossomos. Em bactérias e organelas, os Met-tRNA^{fMet} sintetizados pelas MetRS, devem ser previamente formilados por uma específica formilase antes de sua utilização no início da síntese protéica;

b) os alongadores não-canônicos, tais como o selenocisteinil-tRNA^{Sec}, que decodifica o códon de parada UGA como selenocisteína (Sec).

1.3.1.2 Substratos da Tradução Incorretamente Acilados

É o segundo major tipo de aa-tRNAs encontrado nas células, e está constituído por tRNAs, cujo aminoácido esterificado na extremidade 3' no se correlaciona com a seqüência anticódon, como definido no código genético. Este grupo compreende: aqueles deliberadamente sintetizados pela célula como precursores para as modificações pré-traducionais e aqueles resultantes dos erros cometidos pelas aaRSs. O processo de correção feito pelas aaRSs e pelos EF-Tu, garante que a fidelidade da síntese protéica celular não seja comprometida pela geração destes substratos.

1.3.1.3 Substratos Não-Traducionais Corretamente Carregados

Compreende aa-tRNAs tais como o precursor de porfirinas Glu-tRNA^{Glu} (Schauer *et al.*, 2002); os precursores da parede peptidoglicana, Gly-tRNA^{Gly}

(Bumsted *et al.*, 1968) e Ser-tRNA^{Ser} (Petit *et al.*, 1968); e o Lys-tRNA^{Lys}, precursor de Lisil-fosfatidilglicerol (Lennarz *et al.*, 1966).

Tabela 1. Aminoacil-tRNAs encontrados em células bacterianas (Ibba e Söll, 2004)

Aminoacil-tRNA	Padrões de Interação	Função	Número de conjuntos de aa-tRNAs ou espécies tRNA
<u>Substratos da Tradução</u>			
aa-tRNAs Elongadores Canônicos	EF-Tu/EF-1 α	Síntese Protéica	20
aa-tRNAs Iniciadores	Fatores de Iniciação	Síntese Protéica	fMet-tRNA ^{fMet}
aa-tRNAs Elongadores Não-Canônicos	Outros Fatores de Elongação (i.e. SelB)	Síntese Protéica	Sec-tRNA ^{Sec}
<u>Substratos da Tradução Incorretamente Acilados</u>			
aa-tRNAs Deliberadamente Não-Cognatos	Via das Modificações Pré-Traducionais	Píntese Protéica	4 (Asp-tRNA ^{Asn} , Glu-tRNA ^{Gln} , Met-tRNA ^{fMet} , Ser-tRNA ^{Sec})
aa-tRNAs Erradamente Não-Cognatos	Aminoacil-tRNA Sintetases D-aminoácido Deacilases	Aminoácidos Livres	Vários D-Tyr-tRNA ^{Tyr} e outros
<u>Substratos Não-Traducionais</u>			
aa-tRNAs Elongadores Canônicos	Biosíntese de Porifirinas Síntese de Lisilfosfatidilglicerol	Macromoléculas Não-Protéicas	Gly-tRNA ^{Gly} , Ser-tRNA ^{Ser} Lys-tRNA ^{Lys}

1.3.2 Controle de Qualidade dos aa-tRNAs

Uma variedade de estratégias de controle de qualidade é empregada pela célula, para assegurar que somente um de cada 10⁴ códons seja erradamente traduzido, mesmo que altas taxas de erros em determinados códons possam ser toleradas (Min *et al.*, 2003). Adicionalmente ao pareamento códon-anticódon (Ogle *et al.*, 2003), existem três mecanismos de controle de qualidade da tradução: especificidade da seleção de substrato pela aa-tRNA sintetase; discriminação de EF-Tu e exclusão desde o ribossomo.

1.3.2.1 Especificidade da Seleção de Substrato pela aa-tRNA Sintetase

As aaRSs possuem diversas estratégias de reconhecimento molecular, que permitem a síntese dos aa-tRNAs corretos, a partir do pareamento de

particulares aminoácidos e tRNAs existentes na célula (Ibba e Soll, 2000). Este procedimento inclui uma variedade de diversos mecanismos de edição, designados para garantir que aminoácidos incorretamente ativados ou aa-tRNAs erradamente carregados, sejam hidrolisados (Nureki *et al.*, 1998). Particularmente, algumas aaRSs contêm regiões protéicas (domínios de edição) com capacidade para efetuar dita reação de hidrólise (Lin *et al.*, 1996). Recentemente, tem-se demonstrado que a especificidade pelo aminoácido é incrementada pela existência de diversos alelos sintetase. Estes grupos de sintetases, com sutis diferenças em especificidade por moléculas fora do grupo de aminoácidos canônicos, servem para excluir análogos de aminoácidos da tradução (Jester *et al.*, 2003) e para prover resistência contra inibidores análogos de aminoácidos (Brown *et al.*, 2003).

1.3.2.2 Discriminação do EF-Tu

A rotina de detecção de erros na tradução indica que, apesar dos esforços das sintetases, alguns tRNAs incorretamente carregados são capazes de ultrapassar a primeira barreira do controle de qualidade. Desta forma, o seguinte passo na síntese de proteínas, a associação de aa-tRNAs com fatores de tradução, é usado como um ponto adicional de controle. Embora a discriminação de EF-Tu não é absoluta (Min *et al.*, 2003), esta pode distinguir entre o tRNA precursor não-cognato e outras espécies de tRNA incorretamente carregadas (LaRiviere *et al.*, 2001).

Os aa-tRNAs são entregues ao ribossomo (Sítio A) onde é realizado o reconhecimento e seleção do tRNA. Estes aa-tRNAs são entregues formando um complexo ternário com o fator de elocação Tu-GTPase (EF-Tu) ligado ao GTP.

EF-Tu incrementa a taxa e fidelidade da seleção do tRNA. Quando o complexo ternário (EF – Tu – GTP - aa-tRNA) entra no ribossomo, se liga inicialmente à subunidade 50S através de interações proteína-proteína. Depois, o códon e o anticódon se pareiam dentro do sítio A da subunidade 30S. A interação do cognato aa-tRNA com o ribossomo incrementa a taxa de hidrólise do GTP pela EF-Tu até 5×10^4 (Rodnina e Wintermeyer, 2001). Quando a hidrólise acontece, EF-Tu-GDP adotam uma conformação com uma baixa afinidade pelo aa-tRNA (Rodnina *et al.*, 2000), permitindo à extremidade 3' do tRNA acomodar-se dentro do centro peptidil-transferase (PTC) da subunidade 50S. Neste lugar, uma ligação peptídica é formada entre os aminoácidos dos tRNAs adjacentes ao sítio P e A.

Em suma, o aa-tRNA é entregue ao sítio A do ribossomo pelo EF-Tu (através de sua passagem por estados intermediários de reconhecimento do códon e de ativação da GTPase), antes que o aa-tRNA atinja o estado da acomodação completa. A fidelidade da tradução é alcançada usando mecanismos cinéticos e estéricos na seleção inicial, e verificação depois da hidrólise do GTP. Nestes dois passos, a fidelidade é grandemente incrementada pelas diferenças na movimentação do tRNA cognato e semi-cognato. Este processo é promovido pela interação códon-anticódon sobre a subunidade 30S, favorecendo a formação de contatos estabilizantes com a subunidade 50S (Blanchard *et al.*, 2004).

1.3.2.3 Exclusão desde o Ribossomo

Por último, tem sido sugerido que o ribossomo, por si só, deva também prover algum grau de seletividade pelos aa-tRNAs cognatos (Wolfson *et al.*,

2001). É sabido que a seleção do tRNA pelo ribossomo é significativamente mais exata do que o esperado pela termodinâmica do pareamento códon-anticódon em solução. A fidelidade da discriminação é de um erro a cada 1000-10000 aminoácidos corretamente incorporados nas proteínas (Parker, 1989). A ligação ao sitio A é um processo não-equilibrado que é conduzido pela hidrólise irreversível do GTP e a formação da ligação peptídica, de forma tal que, a estabilidade dos complexos formados, não é efetiva para a discriminação. Por outro lado, a grande diferença de ajuste e da taxa de ativação da GTPase, a qual é 65 vezes maior com substratos corretos que com os incorretos, é suficiente para explicar o elevado nível de discriminação por parte do ribossomo (Rodnina *et al.*, 2005).

1.3.3 *aa-tRNAs em Trypanosoma brucei: Organização Genômica e Expressão*

Baseados no projeto genoma de *T. brucei* foram identificados aproximadamente todos os genes de tRNA de tripanosomatídeos preditos. A Tabela 2 mostra o resultado do estudo feito por Tan *et al.* (2002), onde foram identificados 50 genes de tRNAs de tripanosomas, representando 40 diferentes espécies de isoacceptores (Tan *et al.*, 2002).

Tabela 2. Padrão potencial de reconhecimento de códons de tRNAs isoceptores preditos desde o genoma de *T.brucei* (Tan *et al.*, 2002).

aa	No.genes ^a (anticódon predito)	Anticódon ^b	Códon ^c	aa	No.genes ^a (anticódon predito)	Anticódon ^b	Códon ^c	
Ala	1 (AGC)	IGC	GCU	Lys	1(UAG)	UAG	CUA	
		IGC	GCC			1(CAG)	CAG uag	CUG
	1 (UGC)	UGC igr	GCA		?	UUA		
	1 (CGC)	CGC ugc	GCG		1(CAA)	CAA	UUG	
				3(CUU)				
Arg	3(ACG)	ICG	CGU	2(UUU)	3(CUU)	UUU	AAA	
		ICG	CGC			CUU	AAG	
	1(UCG)	UCG igr	CGA	Uuu				
	1(CCU)	CCU ugc	CGG	Met (i e e) ^e	1+2 (CAU)	CAU	AUG	
1(UCU)	UCU ucu	AGA AGG						
Asn	2(GUU)	Guu	AAU	Phe	1(GAA)	Gaa	UUU	
		GUU	AAC			GAA	UUC	
Asp	1(GUC)	Guc	GAU	Pro	1(AGG)	IGG	CUU	
		GUC	GAC			IGG	CCC	
Cys	1(GCA)	gca	UGU	1(UGG)	1(UGG)	UGG igg	CCA	
		GCA	UGC			ugg	CCG	
Gln	1(UUG)	UUG	CAA	Ser	1(AGA)	IGA	UCU	
		uug	CAG			IGA	UCC	
Glu	1(UUC)	UUC	GAA			1(UGA)	UGA iga	UCA
		2(CUC)	CUC uuc			GAG	1(CG A)	CGA uga
					gcu	AGU		
				1(GCU)	GCU	AGC		
Gly	2(GCC)	Gcc	GGU	Thr	1(AGU)	IGU	ACU	
		GCC	GGC			IGU	ACC	
	1(UCC)	UCC	GGA	1(UGU)	UGU igu	ACA		
	1(CCC)	CCC	GGG	1(CGU)	CGU	ACG		
					Ugu			
His	1(GUG)	Gug	CAU	Trp		?	UGG	
		GUG	CAC					
Ile	1(UAU)	? ^d	AUU	Tyr	1(GUA)	Gua	UAU	
		?	AUC			GUA	UAC	
		UAU	AUA					
Leu	1(AAG)	IAG	CUU	Val	2(ACC)	IAC	GUU	
		IAG	CUC			IAC	GUC	
						UAC iac	GUA	
				1(UAC)	1(CAC)	CAC uac	GUG	

^a Número de genes não redundante de isoceptores indicados por genoma haplóide de *T. brucei*.

^b Anticódon predito para decodificar os códons listados na última coluna. Posição *Wobble* A presumida como pós-transcricionalmente convertida a I; casos onde mais de um anticódon decodifica um simples códon, o segundo é indicado em minúsculas.

^c Códon lido pelo anticódon da coluna anterior.

^d Aparentes isoceptores perdidos.

^e Ambos iniciador (i) e elongador (e) tRNA^{Met} foram encontrados.

A maioria dos genes de tRNAs em *T. brucei* são policistrônicos e possuem pequenas seqüências intergênicas. Estes genes podem estar orientados em ambas as direções (Inokuchi e Yamao, 1995).

As quantidades de diferentes tRNAs isoceptores são geralmente muito diversas. Em muitos organismos as quantidades de tRNAs são tipicamente adaptadas às necessidades da célula (Dong *et al.*, 1996; Kanaya *et al.*, 1999), o que é refletido pela correlação positiva entre a abundância dos tRNAs individuais e a freqüência dos correspondentes códons que são usados em proteínas abundantes, como as ribossomais. Esta característica também se aplica ao *T. brucei*, no qual a abundância relativa dos tRNAs variam num fator de 116 e é correlacionada com o uso de códons. Em alguns procariontes e em muitos eucariontes, um importante componente regulador da concentração de tRNA intracelular é a dosagem gênica (Kanaya *et al.*, 1999). Em *T. brucei*, somente 8, dos 40 genes isoceptores, são encontrados em mais de uma cópia no genoma haplóide e não há aparente correlação entre o número de cópias e a abundância de tRNAs. Desta forma, a regulação da abundância de tRNAs em *T. brucei* não pode ser explicada pela dosagem gênica (Tan *et al.*, 2002).

1.4 Aminoacil-tRNA sintetases

A tradução da informação genética em proteínas é essencial para o apropriado funcionamento bioquímico da célula. A fidelidade da tradução do mRNA num polipeptídeo depende da exatidão de dois processos, o reconhecimento dos códons do mRNA pelos anticódons do tRNA (Yarus e Smith, 1995) e a síntese de tRNAs aminoacilados (Ibba *et al.*, 1997). Os tRNAs

aminoacilados são sintetizados quando um aminoácido é esterificado na extremidade 3' de um tRNA (Ibba e Soll, 2000). A aminoacilação de tRNAs acontece através de um mecanismo de dois passos. O primeiro passo envolve a formação de um complexo estável aaRS-aminoaciladenilato, seguidamente, a adenosina da extremidade 3' do tRNA ligado à enzima reage com o aminoaciladenilato, conduzindo a esterificação do tRNA e à liberação do AMP. A ligação do tRNA acontece na presença de uma poliamina ou um cátion divalente, geralmente o magnésio (Figura 14).

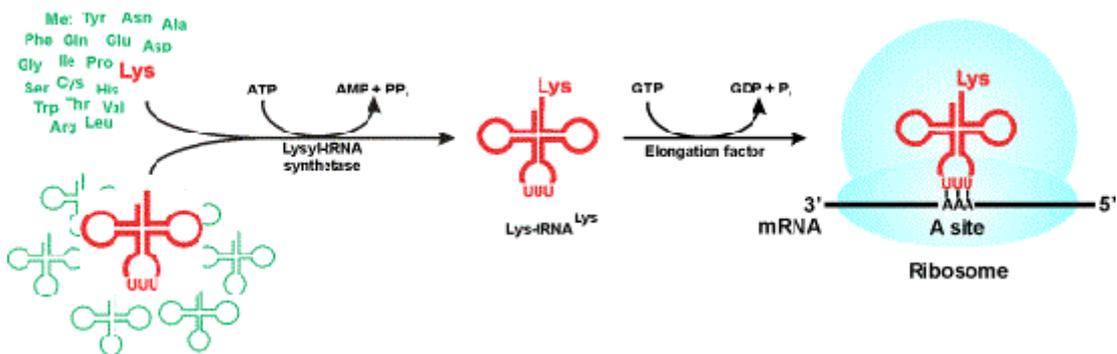


Figura 14. Reação de aminoacilação (Ibba e Söll, 2000).

Esta reação é catalisada pelas Aminoacil-tRNA Sintetases (aaRSs, EC 6.1.1). As aaRSs são uma família de enzimas onde, geralmente, cada membro é capaz de ligar um aminoácido particular ao correspondente tRNA. Estas enzimas são responsáveis pela seleção específica dos aminoácidos na aminoacilação do tRNA e cumprem um papel principal na alta fidelidade da leitura do código genético (Schimmel, 1987). A exatidão da síntese de aa-tRNAs é dependente da especificidade das aaRSs, ou seja, da sua habilidade para discriminar entre vários substratos (Fersht *et al.*, 1986). Esta especificidade é devida à intrincada série de contatos dos seus aminoácidos com as bases dos tRNAs correspondentes assegurando que somente o tRNA compatível seja

selecionado de um amplo conjunto celular de candidatos semelhantes. Neste processo contribuem diversos fatores (Secção 1.3.2) que aumentam a estabilização do estado de transição do apropriado complexo tRNA-aaRS, assim como pela presença de antideterminantes em certos tRNAs que inibem a interação com aaRSs não específicos (Giege *et al.*, 1998). A especificidade da seleção do tRNA, também depende das extensões N- e C-terminal, principalmente encontradas nas sintetases de eucariontes (Ibba e Soll, 2000). Enquanto a especificidade das aaRSs pelos seus respectivos aminoácidos, esta é determinada pela discriminação da cadeia lateral dos mesmos, além de uma propriedade de revisão intrínseca que elimina os aminoácidos não cognatos (Jakubowski e Goldman, 1992).

1.4.1 Aminoacilação

Certas aaRSs previnem potenciais erros na síntese protéica através da desacilação de tRNAs mal-carregados. Por exemplo, isoleucil-tRNA sintetase e valil-tRNA sintetase podem desacilar Val-tRNA^{Ile} e Thr-tRNA^{Val}, respectivamente. Os sítios de edição, destas duas classes de aaRSs, têm um grau inerente de plasticidade para o reconhecimento do substrato. A habilidade para se adaptar a diferenças sutis em tRNAs mal-carregados pode ser importante para a alta precisão da aminoacilação (Nordin e Schimmel, 2002).

Em muitos tRNAs, as bases que fazem os contatos específicos com as aaRSs cognatas estão localizadas principalmente em duas regiões: o laço anticódon e o braço acceptor. Alguns desses contatos estão relacionados com a identificação do tRNA, mas outros não. Em *E.coli*, somente 17 das 20 sintetases

usam alguma ou todas as bases do anticódon para o reconhecimento específico (Saks *et al.*, 1994). A ligação do correto aminoácido ao cognato tRNA também implica que pelo menos uma aaRS esta presente para cada aminoácido. Porém, existem algumas notáveis exceções, como em alguns organismos ou organelas que carecem de atividade GlnRS. Nestes casos o Gln-tRNA^{Gln} é formado pela trasamidação de um glutamato mal-carregado para tRNA^{Glu} (Schon *et al.*, 1988). Outras exceções são os *Methanococcus* (Hamann *et al.*, 1999), os quais não codificam para uma CysRS. Estes organismos utilizam ProRS para a formação de Cys-tRNA (Lipman *et al.*, 2000), constituindo em realidade uma enzima dual proilil-cisteinil-tRNA sintetase.

Todas as moléculas de tRNA formam uma estrutura similar em L, o que permite que elas possam interagir, ao mesmo tempo, com as enzimas que processam o tRNA e com as proteínas do aparato de síntese protéica. Embora, eles precisam ser diferenciados pelas aaRS para serem corretamente aminoacilados (Schimmel, 1989). Os elementos de identidade são geralmente localizados no final do braço acceptor, no anticódon (Giege *et al.*, 1998) e em alguns poucos pares de bases nos braços T e D (McClain e Nicholas, 1987). Em muitos casos os elementos de identidade de um tRNA tem sido conservados através da evolução (Fechter *et al.*, 2001).

1.4.2 Características das aaRS

Tipicamente, em procariontes existem 20 enzimas aaRSs, uma para cada aminoácido (Carter, 1993; Martinis e Schimmel, 1996; Ryan *et al.*, 2001). Em eucariontes, a síntese de proteínas acontece não só no citoplasma, mas também

em organelas tais como as mitocôndrias e cloroplastos (Marechal-Drouard *et al.*, 1993). Exceto em algumas algas, todas as aaRSs são codificadas por genes nucleares e importadas pós-traducionalmente aos seus respectivos compartimentos. Isto é, em eucariontes comumente existem dois genes codificando para diferentes proteínas com a mesma atividade de aminoacilação, com uma proteína localizada no citoplasma e outra na mitocôndria ou nos cloroplastos. Cada enzima aminoacila o tRNA isoaceitante dentro do seu respectivo compartimento celular.

Uma aaRS pode reconhecer seu tRNA cognato por um número limitado de resíduos de nucleotídeos (determinantes de identidade) distribuídos dentro da estrutura do tRNA. Estudos funcionais (Francklyn *et al.*, 1992) e estruturais (Rould *et al.*, 1989), têm demonstrado que os elementos estruturais críticos da identidade do tRNA, muitas vezes se encontram dentro do braço acceptor, incluindo a base discriminatória (N73), e na alça anticódon ou, menos freqüentemente, na alça variável (Schimmel, 1989; Giege *et al.*, 1998). De fato, alguns oligonucleotídeos helicais de RNA que possuem o braço acceptor, mas que carecem da trinca anticódon, são aminoacilados pelas aaRSs (Schimmel *et al.*, 1993).

Embora o código genético é essencialmente o mesmo para todos os organismos, uma dada sintetase de uma espécie, freqüentemente não acila seu cognato tRNA de outra espécie, especialmente se esta é filogeneticamente distante (Shiba *et al.*, 1994). Sendo que o braço T ψ C do tRNA é uma adição mais recente à molécula, este poderia ser usado pela aaRS e o mRNA, para distinguir uma espécie de tRNA da outra (Alexander e Schimmel, 2001).

1.4.3 Tipos de aaRSs

Estudos estruturais e funcionais das aaRSs tem demonstrado que estas enzimas estão compostas de distintos domínios com papéis claramente definidos no reconhecimento do substrato e na sua catálise (Cusack, 1995). A estrutura das aaRSs consiste de dois domínios que interagem com os dois domínios na estrutura secundária do tRNA: a alça do braço acceptor T ψ C e a alça do braço do anticódon (Schimmel *et al.*, 1993).

Devido a que estas enzimas catalisam a mesma reação química (Arnez e Moras, 1997), tem se suposto que todas elas tenham ancestralidade comum com diferenças somente no domínio catalítico. De acordo com a arquitetura dos motivos estruturais no seu domínio catalítico, estas enzimas podem ser agrupadas em duas classes diferentes (Eriani *et al.*, 1990), mas, a origem comum destas enzimas continua a ser um enigma (Ibba *et al.*, 1997) e cada grupo tem evoluído desde um progenitor diferente (Carter, 1993; Eriani, *et al.*, 1995; Nagel e Doolittle, 1995).

As duas classes de enzimas contrastam na orientação do tRNA ancorado ao sítio ativo. As enzimas da classe I ligam o aminoácido ativado ao grupo 2'hidroxil da ribose do acceptor final e as da classe II o fazem a extremidade 3'hidroxil (com exceção da fenil-alanil tRNA sintetase, a qual acila a 2'OH) (Fraser e Rich, 1975). Esta diferença é devida a que cada classe de enzimas utiliza lados opostos para sua interação com o tRNA (Figura 15). As aaRSs de classe I ancoram o tRNA pelo sulco menor, com o laço variável voltado para o solvente e as aaRSs classe II o fazem pelo sulco maior do tRNA com o laço variável voltado para a enzima (Ruff *et al.*, 1991). Estudos estruturais mostram

que as enzimas da classe I contêm um enovelamento tipo Rossmann de ligação de nucleotídeos, composto por folhas- β e hélices- α alternantes no seu sítio ativo. Esta estrutura possui motivos altamente conservados tais como o pentapeptídeo KMSKS e as 11 seqüências aminoácidos-específicas que terminam em HIGH (Ludmerer e Schimmel, 1987). Em contraste, as enzimas da classe II têm sete folhas- β com três hélices- α construindo uma estrutura tipo barril (Leberman *et al.*, 1991; Ruff *et al.*, 1991). Estas enzimas da classe II são dímeros obrigatórios. Todas as aaRSs se encaixam dentro de um destes dois grupos.

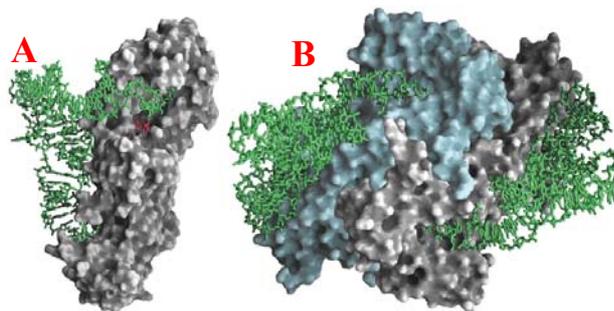


Figura 15. Aminoacil-tRNA sintetases. Ambas as enzimas de classe I (A) e II (B) estão mostradas ligadas ao seu tRNA (em verde). O ATP ligado está indicado em vermelho. A: Gln-tRNA sintetase de *E. coli*, uma típica aaRS monomérica de classe I. B: Asp-tRNA sintetase de levedura, uma típica aaRS dimérica de classe II (Lehninger *Principles of Biochemistry 3rd Ed.*)

As aaRSs das classes I e II podem ser divididas subseqüentemente em três subclasses (a, b, c). Estas subclasses mostram uma tendência para reconhecer aminoácidos que são quimicamente relacionados:

- Classe Ia: reconhece aminoácidos que tem cadeias laterais alifáticas não polares (Ile, Leu, Val) e cadeias polares contendo enxofre (Met e Cys) e Arg.

- Classe Ib: reconhecem aminoácidos com cadeias laterais carregadas (Glu e Lys) e derivados (Gln).
- Classe Ic: reconhecem aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (Tyr e Trp).
- Classe IIa: reconhecem aminoácidos com cadeias laterais alifáticas (Ala e Pro), polares (His, Ser e Thr) e Gly.
- Classe IIb: reconhecem aminoácidos com cadeias laterais carregadas (Asp e Lys) e seus derivados (Asn).
- Classe IIc: reconhecem aminoácidos com cadeias laterais aromáticas (Phe).

É amplamente sabido, que as seqüências das aaRSs podem variar de forma extrema, mesmo entre proteínas da mesma classe. Um exemplo disto, é a pouca similaridade entre as seqüências de IleRS, LeuRS, ValRS e MetRS, todas pertencentes à classe I das aaRSs (Carter, 1993). Independente da classe de aaRS, as modernas sintetases têm adquirido domínios apêndice para assegurar o reconhecimento do anticódon. Tal organização multi-domínios pode ter fornecido uma forma eficiente de especificidade por tRNAs através da evolução, enquanto a função catalítica destas enzimas foi rigorosamente mantida (Ruan *et al.*, 2001).

1.5. As Triptofanil-tRNA Sintetases

A triptofanil-tRNA sintetase (TrpRS ou WARS, EC 6.1.1.2.), que reconhece especificamente o Trp e seu tRNA cognato, representa talvez a adição mais recente ao código genético. Esta é uma aaRSs da classe I, que junto com a

tirosil-tRNA sintetase, constituem a subclasse Ic. A estrutura primária de enzimas que são específicas para um tipo de aminoácido é usualmente conservada (Nagel e Doolittle, 1995). Porém, a TrpRS humana contém domínios N- e C-terminais que não são encontrados no seu correspondente homólogo em leveduras. Estes domínios lhe conferem atividade proteína-kinase (autofosforilação) e são únicos entre a família das aaRSs (Elizarov *et al.*, 1997). Esta característica especial das TrpRSs humanas tem permitido pensar nas TrpRSs de microrganismos patogênicos, como possíveis alvos para a quimioterapia.

A TrpRS é composta por duas subunidades idênticas. A unidade monomérica da TrpRSs do *B. stearothermophilus* tem 328 aminoácidos e 37 kDa, constituindo a menor subunidade catalítica de todas as aaRSs conhecidas. Devido a isto, tem sido considerada como uma candidata ideal para estudos de estrutura-função, constituindo a máxima aproximação existente ao aparato catalítico mínimo para a ativação de aminoácidos (Ilyin *et al.*, 2000). A enzima ativa é dimérica, embora o monômero possua um aparato catalítico intacto para a aminoacilação. A segunda subunidade no dímero é requerida para o reconhecimento do anticódon CCA do tRNA^{Trp} (Figura 16). O monômero da TrpRS possui dois domínios separados (Figura 17 Direita): o enovelamento Rossmann, onde podem ser distinguidas três regiões funcionais: o sítio de ligação a ribose, a triptofano e a pirofosfato (PPi) (Figura 17 Esquerda); e uma folha β altamente enrolada que traz três 'seqüências assinatura' características para ambas as aaRSs (TrpRS e TyrRS) da classe Ic: TIGN, KMSKS e GXDQ, que

juntas configuram o aparato catalítico (Carter, 2004). A Figura 16 mostra a estrutura da TrpRS de *Bacillus subtilis* e a sua putativa ligação com tRNA^{Trp}.



Figura 16. Putativa ligação do tRNA^{Trp} com a TrpRS de *B. subtilis*. Os dois tRNA^{Trp} aparecem coloridos de vermelho e amarelo. As subunidades da TrpRS de *B. subtilis* aparecem coloridas de azul e verde. O motivo em branco é o AMP e o púrpura é o Trp. A ligação do tRNA ocorre através da interface dimérica. Cada molécula de tRNA interage através de um dímero, o braço acceptor do tRNA com formato de L liga o domínio 108-122 numa subunidade e o *loop* anticódon liga o domínio 234-238 na outra subunidade (Jia *et al.*, 2002).

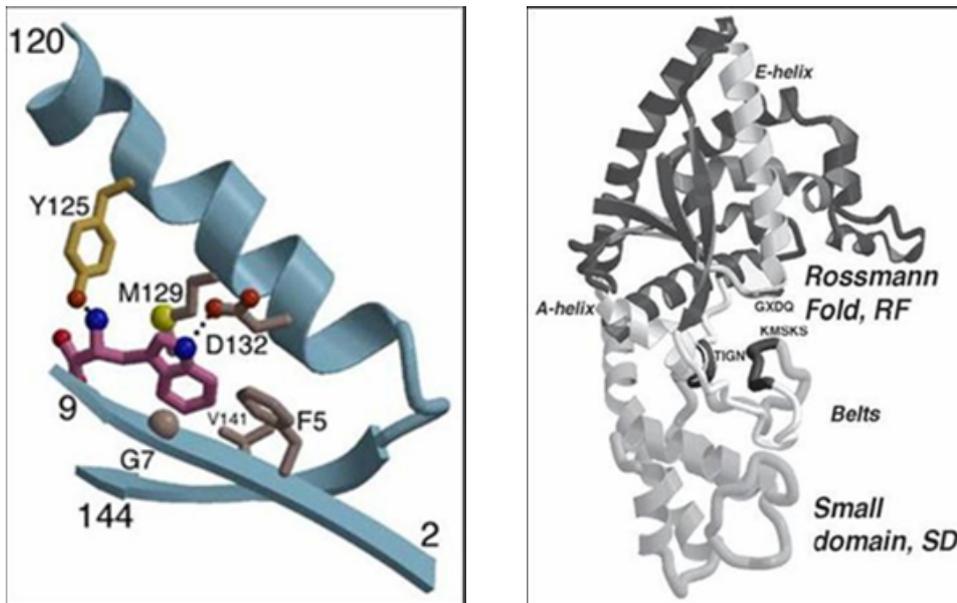


Figura 17. Esquerda-Esquema Ribbon mostrando o sítio de ligação do triptofano da TrpRS de *B. stearothermophilus*. Em destaque se apresentam as relações estruturais envolvidas na determinação da especificidade (Carter, 2004). Direita- Esquema Ribbon de dois domínios do monômero da TrpRS, localizando as assinaturas catalíticas, TIGN no N-terminal da hélice A, GXDQ no N-terminus da hélice E, e KMSKS no C-terminal do enovelamento de Rossmann. Estes sítios compreendem os subsítios de ligação a adenosina e a pirofosfato (Ilyin et al., 2000).

As aaRSs são freqüentemente guiadas por múltiplos elementos de identidade no seu tRNA cognato. No caso da TrpRS cada tipo de enzima dos vários domínios biológicos, exibe uma determinada preferência em relação á N73. As simples substituição no tRNA^{Trp} de *B. subtilis* da base discriminatória G73 pela A73 conservada em eucariotes, confere a este a capacidade de ser carregado com Trp pela TrpRS eucariótica (Xue *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 2002), mas perde muita da sua reatividade com a TrpRS bacteriana. No tRNA^{Trp} de eucariotes (humanos e bovinos) e de arqueobactérias, a base A73 também é o principal elemento de identidade (Xu *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002). Segundo análises cinéticas, N73 no tRNA^{Trp} contribui principalmente na estabilização do estado de transição durante a síntese do triptofanil-tRNA (Ibba *et al.*, 1999;

Guo *et al.*, 2002). Estes resultados indicam que a N73 é o principal elemento de identidade nos três domínios biológicos.

Por outro lado, uma simples mudança da seqüência formadora de uma micro-hélice no braço acceptor (C1-G72 para G1-C72), inibe a aminoacilação pela TrpRS (Schimmel *et al.*, 1993). Adicionalmente, os nucleotídeos do anticódon são importantes elementos de identidade em muitos tRNAs. No *B. subtilis*, os três nucleotídeos do anticódon são cruciais para o reconhecimento do tRNA^{Trp} pela aaRS cognata (Xue *et al.*, 1993).

Dezessete aminoácidos são idênticos nas TrpRSs de todas as espécies bacterianas conhecidas (Carter, 2004) (Figura 18). Somente nove destes resíduos invariáveis parecem ser conservados em todas as TrpRSs eucarióticas e doze são conservados em todas as TrpRSs de arqueas. A assinatura KMSKS não tem sido observada nas TrpRSs de eucariontes e arqueas, predominando neste caso, a KMSAS. A ausência de esta segunda lisina no sitio ativo das enzimas eucarióticas, sugere diferenças significativas no mecanismo catalítico, o que permitiu que Ribas de Pouplana *et al.*, (1996) propuseram que estas duas enzimas eram uma só e que divergiram na separação das linhagens de eucariontes e procariontes, evoluindo em forma independente em cada linhagem, para formar duas enzimas diferentes com a mesma especificidade de aminoácido e de tRNA. As TrpRSs mitocondriais de eucariontes, pertencem à linhagem bacteriana, pelo qual são altamente interessantes para o desenho de fármacos, através da exploração de suas diferenças com suas homólogas citoplasmáticas.

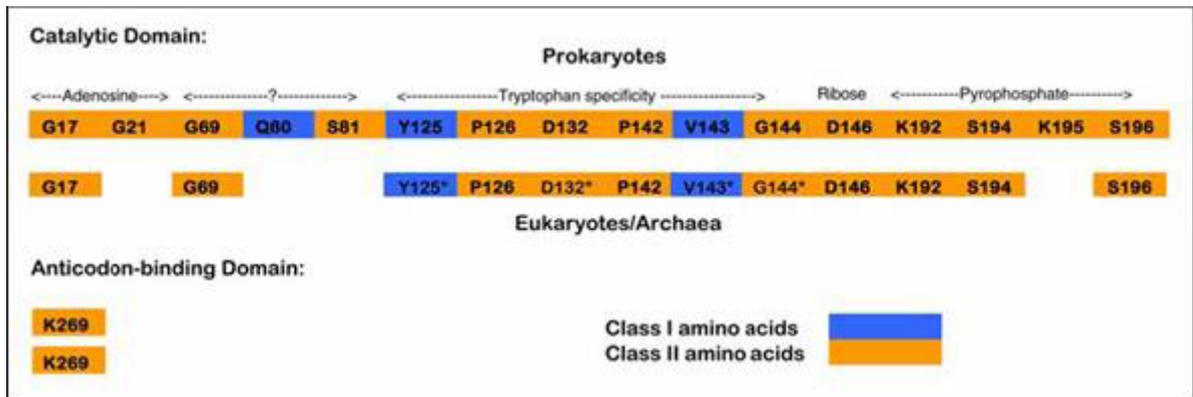


Figura 18. Aminoácidos invariantes na seqüência das TrpRSs (Carter, 2004).

As TrpRSs de procariontes e eucariontes possuem diferenças significativas entre elas, até mesmo nas seqüências motivo altamente conservadas no sitio ativo, pelo qual, formam grupos completamente distintos. A identidade de seqüências entre estes dois grupos de enzimas é muito fraca, exceto dentro das regiões envolvidas na ativação de aminoácidos. Esta característica é de grande interesse para a área médica, já que, os sítios ativos das enzimas eucarióticas e procarióticas são diferentes o suficiente para que, as TrpRSs bacterianas, sejam um alvo atrativo no desenho de fármacos (Kanamaru *et al.*, 2001). Além disso, as TrpRSs de eucariontes superiores possuem um domínio amino-terminal adicional, o qual em humanos cumpre, aparentemente, uma função endócrina (Fersht *et al.*, 1986).

1.6. RNA de Interferência

O RNA de interferência (RNAi) é um processo celular no qual a presença de um RNA de dupla fita (dsRNA) dispara a degradação por homologia de RNAs de cadeia simples (mRNAs) da mesma seqüência, ocasionando o silenciamento gênico. O RNAi pertence à família de processos de Silenciamento Gênico Pós-

Transcricional (PTGS). Estes mecanismos PTGSs foram primeiramente descritos em plantas e fungos, onde a expressão de transgenes ou infecções por vírus ativavam uma via que silenciava genes exógenos e genes endógenos da mesma seqüência, através da formação de pequenos RNAs complementares ao alvo de silenciamento (Baulcombe, 1999). Anteriormente, Guo e Kemphues (1995), tinham descrito o mecanismo de RNA de interferência em *Caenorhabditis elegans* e Fire *et al.*, (1998) determinaram que o dsRNA fora o fator que desencadeante do fenômeno de silenciamento. Desde então, o RNAi tem sido reportado em tripanosomas (Ngo *et al.*, 1998), *Drosophila* (Kennerdell e Carthew, 1998), planaria (Sánchez Alvarado e Newmark, 1999), hidra (Lohmann *et al.*, 1999) e mamíferos (Wianny e Zernicka-Goetz, 2000), entre muitos outros organismos. O RNAi, e processos relacionados, provavelmente evoluíram como mecanismos de defesa contra a expressão de RNAs aberrantes provenientes de transgenes e vírus.

O modelo do mecanismo molecular do RNAi tem sido desenvolvido a partir de estudos realizados em *C. elegans*, *Drosophila* e plantas. Depois que Baulcombe demonstrou que a via do RNAi era ativada pela presença de dsRNAs, estudos feitos por Zamore *et al.*, (2000) mostraram que pequenas moléculas de dsRNA (chamadas de *small interference RNAs* –siRNAs) eram formadas a partir do dsRNA iniciador do silenciamento. Posteriormente, estes siRNAs foram encontrados associados com o complexo aceptor de RNAi, o RISC (*RNA-induced silencing complex*), ratificando seu papel como participantes diretos nesta via de silenciamento (Hammond *et al.*, 2000). Componentes isolados do complexo RISC têm sido identificados como pertencentes à família

de proteínas Argonauta, envolvidas em mecanismos de PTGS (Tabara *et al.*, 1999).

Bernstein *et al.*, (2001), mostraram que uma classe de enzimas da família RNase III ribonucleases, reconhece especificamente dsRNAs e os corta produzindo siRNAs de uma maneira ATP – dependente. Estas enzimas, denominadas de DICERs são evolutivamente conservadas em todos os organismos que possuem RNAi. Elas possuem dois domínios RNase III, um motivo de ligação ao dsRNA, um domínio helicase e uma região homologa com a família de proteínas Argonauta. As DICERs funcionam como um dímero antiparalelo que forma dois tipos de siRNAs (de ~21 e ~25 pb (Hannon, 2002)). Hamilton *et al.*, (2002), propuseram que estas duas espécies de siRNA estão envolvidas em diferentes aspectos do silenciamento, sendo os siRNA curtos (~21 pb), os condutores da degradação do mRNA, enquanto que os longos (~25 pb), estão envolvidos no silenciamento sistêmico e a metilação de DNA. Este último processo faz parte da família processos de Silenciamento Gênico Transcricional (TGS), que a diferença dos PTGS, é herdado.

Em resumo, no interior da célula, as moléculas de dsRNA são detectadas por um mecanismo de vigilância ainda não caracterizado. Os dsRNAs são, então, clivados pelas enzimas DICERs, e fragmentos de siRNA de ~22 pb, são formados. Estes fragmentos servem como moléculas molde que dirigem a clivagem de RNAs de fita simples que sejam complementares (Elbashir *et al.*, 2001). Depois desta clivagem inicial, o RNA de fita simples é completamente degradado. Geralmente, este RNA de fita simples é o mRNA, e sua degradação

leva ao silenciamento da expressão gênica do produto por ele codificado (Figura 19).

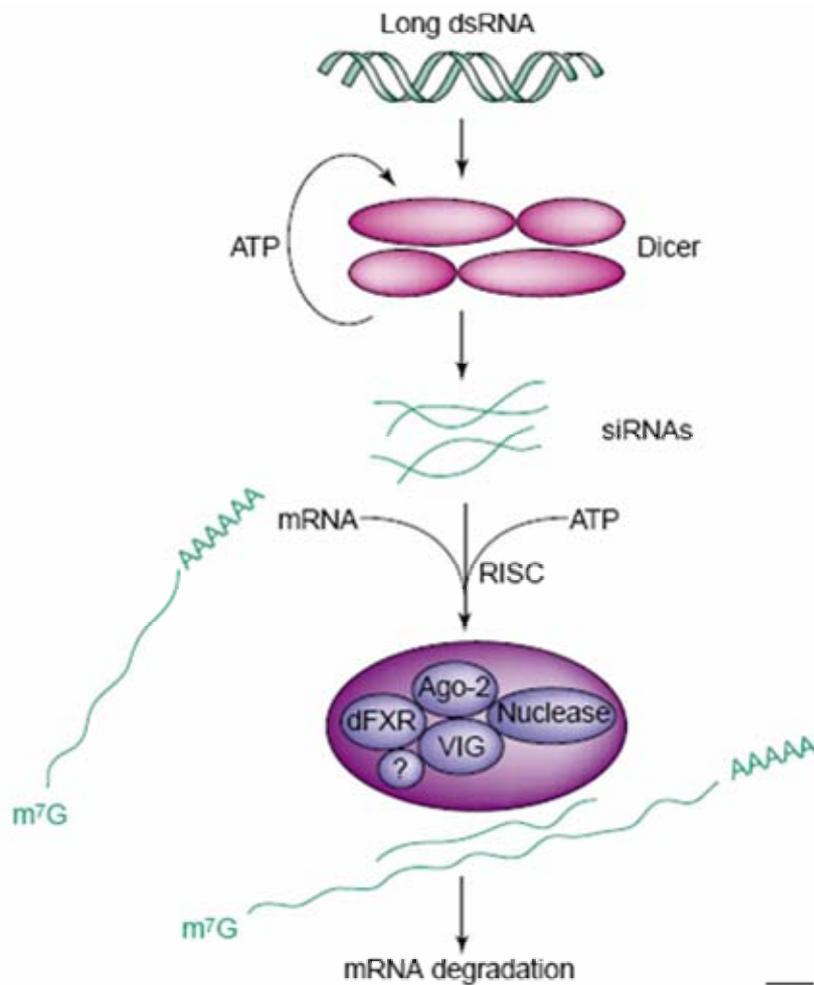


Figura 19. Modelo atual para a degradação de mRNA via RNA de interferência. Dímeros antiparalelos de enzimas DICERS clivam dsRNAs para formar siRNAs, de uma forma ATP-dependente. siRNAs são incorporados no complexo RISC, que os guia para a degradação específica do mRNA alvo (Denli e Hannon, 2003).

Em *C. elegans*, foi observada uma das características mais extraordinárias do RNAi. Pequenas quantidades de dsRNA por célula causam silenciamentos com até 100% de penetrabilidade (Fire *et al.*, 1998), indicando que alguns aspectos do silenciamento, são amplificados. Em plantas e em *C. elegans*, foi identificado o envolvimento de uma RNA polimerase dependente de

RNA (RdRPs), neste processo de amplificação. Esta enzima atua tanto na conversão de RNAs aberrantes em dsRNA detonadores do silenciamento, como na amplificação do silenciamento iniciado por quantidades muito pequenas de dsRNA (Cogoni e Macino, 1999).

1.6.1 Funções do RNAi na natureza

A existência de um potente mecanismo de silenciamento gênico, disparado por dsRNAs, leva ao questionamento do papel biológico deste tipo de resposta. Em muitos organismos, a principal fonte de dsRNAs são os RNAs virais. Os RNAs virais formam dsRNAs intermediários, durante a replicação, que podem disparar a resposta de RNAi. Extensos estudos têm confirmado o papel do RNAi na defesa antiviral (uma excelente revisão pode ser encontrada em Voinnet (2001)).

Um outro papel natural atribuído ao RNAi, é o de mecanismo conservado de resposta contra ácidos nucléicos invasores, comportando-se como um tipo de sistema imune de ácidos nucléicos. Napoli *et al.*, (1990), forneceram uma das primeiras evidências sobre este fenômeno. Com a finalidade de incrementar a cor de flores petúncias, introduziram genes para a expressão da pigmentação. Mas surpreendentemente, a inserção de transgenes *downstream* de um forte promotor causou a formação de manchas sem pigmentação nas plantas transformadas. Neste caso, não somente o transgene, como também o locus endógeno foi silenciado. Ao analisar o loci transgene, foi descoberta uma alta percentagem de inversões repetitivas na sua seqüência, as quais podem formar alças de RNA durante a sua transcrição. Estas observações levaram à hipótese

de que estes RNAs aberrantes, formados principalmente durante a transcrição em altas taxas, talvez propiciem não somente a terminação prematura da transcrição, senão como também, devem ser reconhecidos por proteínas especializadas que disparam a via de RNAi.

Além dos ácidos nucléicos exógenos, existem abundantes elementos parasitas endógenos, que devem ser rigorosamente controlados para manter a estabilidade do genoma. Em alguns casos, o controle de estes elementos genéticos móveis tem sido associado ao RNAi, particularmente em *C. elegans* (Tabara *et al.*, 1999).

Por outro lado foi observada a indução de mudanças na cromatina induzidas por dsRNA. Estas mudanças consistiam na metilação de seqüências homologas a vírus em plantas infectadas (Wessenegger *et al.*, 1994). Este silenciamento é do tipo TGS. Em *Saccharomyces pombe* a maquinaria de RNAi foi implicada na formação de heterocromatina (com elementos repetitivos) nas regiões centroméricas e na manutenção da estabilidade do genoma (Volpe *et al.*, 2002).

A Figura 20 esquematiza os múltiplos papéis cumpridos pelo mecanismo de RNA de interferência na natureza. São mostradas as diferentes fontes de dsRNA que podem levar a diversos tipos de silenciamento.

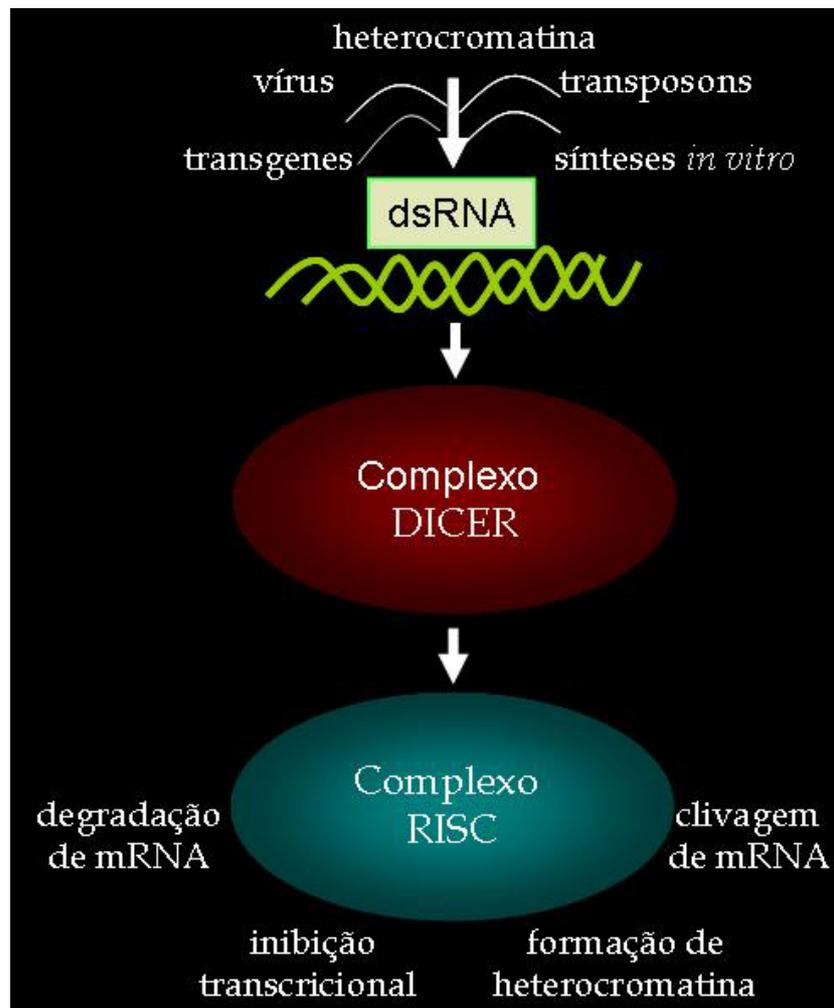


Figura 20. dsRNAs de diferentes origens produzem diversos tipos de silenciamento através da maquinaria de RNA de interferência na natureza (modificado de Denli e Hannon, 2003).

1.6.2 RNAi em *Trypanosoma brucei*

O RNAi em *T. brucei* foi descoberto por acaso por Ngo e colaboradores em 1998, quando um plasmídeo, carregando uma repetição invertida de uma seqüência da extremidade 5' de um gene da α -tubulina (*TUB*), foi transfectado em células procíclicas de *T. brucei*. As células transfectantes desenvolveram uma dramática alteração morfológica, chamada de fenótipo FAT. Eles demonstraram que a transcrição da inversão repetida de (*TUB*) era requerida para a indução do fenótipo FAT, sugerindo que a formação de um alça na

estrutura do mRNA (dsRNA), é o iniciador do mecanismo de interferência da expressão do gene da *TUB*.

Atualmente, o mecanismo de RNAi constitui uma poderosa ferramenta no estudo da biologia molecular de parasitos tripanosomatídeos, permitindo a interferência específica de genes endógenos. Devido à natureza deste tipo de silenciamento (pós-transcricional e dominante), este mecanismo de interferência constitui uma técnica particularmente útil para o silenciamento da expressão gênica em organismos diplóides, onde o *knockout* tradicional de genes alvo seria altamente dispendioso (duplo *knockout*) e, no caso de genes essenciais, impossível. Por outro lado, os estudos realizados através deste mecanismo em *T. brucei*, permitem extrapolar os resultados obtidos para outras espécies de tripanosomatídeos, nas quais a maquinaria de silenciamento por RNA de interferência, não é competente.

2. OBJETIVOS

Nesta pesquisa, dois genes que codificam para as Triptofanil-tRNA sintetases (WARs) de *Trypanosoma brucei*, foram caracterizados e estudados, com o intuito de validar estas enzimas de tripanosomatídeos como potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos. Foram realizados experimentos de silenciamento gênico pós-transcricional, através da expressão de RNA de interferência (RNAi). Estes ensaios foram aplicados para as duas formas de WARS presentes em *Trypanosoma brucei*, citosólica (TbWARS1) e mitocondrial (TbWARS2). A geração de células mutantes condicionadas de RNAi, induzíveis com tetraciclina (TbWARS1 e TbWARS2), junto com o cuidadoso seguimento das propriedades dos fenótipos celulares, gerados em *T. brucei*, forneceram evidências sobre as funções destas aaRSs na biologia celular do parasito, assim como, permitiram a validação destas enzimas como alvos. Estes resultados poderão ser empregados para a descoberta de inibidores para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra a Doença do Sono e outras doenças causadas por tripanosomatídeos, como a Leishmaniose e a Doença de Chagas.

Os objetivos específicos desta pesquisa são descritos a seguir.

Caracterizar os genes correspondentes as enzimas Triptofanil-tRNA Sintetases, citoplasmática (TbWARS1) e mitocondrial (TbWARS2), de *Trypanosoma brucei*.

Estabelecer a cultura, em meio definido, de células de *T. brucei* no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Grupo de Cristalografia do IFSC.

Desenhar experimentos específicos de RNA de interferência para cada um dos genes TbWARSs de *T. brucei*.

Obter linhagens celulares estáveis de *T. brucei* transfectadas com o vetor de RNAi, o pZJM.

Analisar o efeito fenotípico do silenciamento gênico das enzimas TbWARS₁ e TbWARS₂, sobre a viabilidade das células de *T. brucei*, através de curvas de crescimento, microscopia (de luz e de fluorescência) e determinação do consumo de oxigênio.

Determinar a especificidade e eficiência do silenciamento dos genes TbWARSs, usando técnicas de avaliação da expressão gênica semi-quantitativas (RT-PCR) e quantitativas (PCR em Tempo Real).

Validar as enzimas WARSs de Tripanosomatídeos como alvos para o desenho de inibidores.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 cDNA e Plasmídeos

Os DNAs moldes para os ensaios com as WARs de *Trypanosoma brucei* (TbWARs1 (*Gene Bank Accession Number* AC093543.8) e TbWARs2 (*Gene Bank Accession Number* AC091701.3)) foram amplificados a partir do DNA genômico.

Para os ensaios de RNAi foi utilizado o vetor pZJM, que contém um duplo promotor T7, flanqueando um fragmento do gene da α -Tubulina (o qual é substituído pelo gene de interesse). Este plasmídeo permite a expressão de um RNA de dupla fita (dsRNA), da região entre os promotores induzidos por tetraciclina. A presença dos dois promotores permite que a transcrição aconteça nas duas direções, sendo que, tanto a fita senso quanto a anti-senso servem como molde para a T7 RNA polimerase (Figura 21). O gene repórter de resistência à Flomicina presente neste vetor, permite a seleção das células transfectantes. Adicionalmente, a presença de uma sequência espaçadora de rDNA, permite a inserção deste vetor em forma estável em regiões não transcritas do genoma do parasita (Wang *et al.*, 2000).

Como vetor de clonagem em bactéria, foi utilizado o vetor de clonagem pCR 2.1 TOPO da Invitrogen, um sistema altamente eficiente para inserção direta do produto de PCR em um vetor plasmidial “ativado” (com uma 3’ timina ancorada), através de uma reação catalisada pela enzima topoisomerase I, sem requerer ligases ou procedimentos pós-PCR. Este vetor tem na sua seqüência sítios para diversas enzimas de restrição o que facilita a passagem para vetores de expressão (Manual de instruções TOPO TA Cloning – Invitrogen).

3.1.2 Oligonucleotídeos Iniciadores

A Tabela 3 apresenta os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a caracterização gênica dos genes TbWARs, assim como para sua amplificação e clonagem para os ensaios de RNAi e PCR quantitativo.

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para ensaios de caracterização gênica, RNAi, amplificação por PCR e PCR quantitativo.

Nome Oligonucleotídeo	Seqüência 5'- 3'	Descrição	Tm
<i>SL1-RNA</i>	AACTAACGCTATATAAGTATCA GTTTCTGTACTTTATG	<i>Primer</i> senso extremidade 5'da fita molde do gene ' <i>Spliced Leader</i> '	62,0
<i>TbWARS1Rev-150</i>	ACGGAGGAAATGATGCGGTT	<i>Primer</i> anti-senso da região 130 a 150 do putativo gene <i>TbWARS1</i>	57,8
<i>TbWARS1Rev-110</i>	ATCCGTTCCAGCAATGCCTC	<i>Primer</i> anti-senso da região 90 a 110 do putativo gene <i>TbWARS1</i>	58,4
<i>TbWARS1For1050</i>	ACAATAACGGCCATCACGAA	<i>Primer</i> senso da região 1050 a 1070 do putativo gene <i>TbWARS1</i>	55,1
<i>TbWARS1For980</i>	CGCGCGAGTGAAGAAGGAGT	<i>Primer</i> senso da região 980 a 1000 do putativo gene <i>TbWARS1</i> .	59,0
<i>TbWARS2Rev-100</i>	CATTATCACCCTGCTATTA	<i>Primer</i> anti-senso da região 80 a 100 do putativo gene <i>TbWARS2</i>	52,4
<i>TbWARS2Rev-170</i>	GTCACAACATCGTCGTCTTT	<i>Primer</i> anti-senso da região 150 a 170 do putativo gene <i>TbWARS2</i>	54,9
<i>TbWARS2For1301</i>	TGAAGAGCTTAGCCGCAGAT	<i>Primer</i> senso da região 1301 a 1321 do putativo gene <i>TbWARS2</i>	54,1
<i>TbWARS2For1241</i>	ACGAGATGGTTGGGGAGGTA	<i>Primer</i> senso da região 1241 a 1261 do putativo gene <i>TbWARS2</i>	55,4
<i>TbWARS1RevHindIII</i>	TCAAGCTTTCCTGCTGCTG CCTTCTCGCTG GAC	<i>Primer</i> anti-senso extremidade 3' do gene <i>TbWARS1</i> , com adição no 5'de um sítio de restrição para <i>HindIII</i>	69,9
<i>TbWARS2RevHindIII</i>	CTAAGCTTCTATGCCATAATGT TGCGCACCTCCG TAAA	<i>Primer</i> anti-senso extremidade 3' do gene <i>TbWARS2</i> , com adição no 5'de um sítio de restrição para <i>HindIII</i>	64,5
<i>TbWARS2ForXhoI</i>	TACTCGAGATGCGCCGGGCTT CACATGTTTGCACG TC	<i>Primer</i> senso extremidade 5' do gene <i>TbWARS2</i> , com adição no 5'de um sítio de restrição para <i>XhoI</i>	69,6
<i>TbWARS1ForXhoI</i>	CGCCTCGAGATGACTGAAGCC GTTGTAACACCGTG GTCT	<i>Primer</i> senso da extremidade 5' do gene <i>TbWARS1</i> , com adição no 5'de um sítio de restrição para <i>XhoI</i>	69,3

3.2 Métodos

3.2.1 Isolamento e Manipulação de Ácidos Nucléicos

3.2.1.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico, desde formas procíclicas (PCF) de *T. brucei* 2913, foi isolado pelo método de extração com tampão salino, como descrito por Belloffato e Cross (1989), mas sem o uso do homogenizador.

3.2.1.2 Extração do RNA Total

O RNA Total foi extraído a partir de 5 a 50×10^7 células (culturas não induzidas ou induzidas), usando o método do Trizol (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por espectrofotometria de UV a 260 nm, e a qualidade do RNA foi conferida por análise de gel como descrito por Sagerström e Sive (1996). A integridade do RNA foi confirmada pela visualização das bandas de rRNA 18 S e 28 S rRNA usando a coloração de brometo de etídeo.

3.2.1.3 Análise de mRNA específico

Amostras de RNA Total foram utilizadas como molde para amplificação do mRNA, utilizando *primers* específicos. Posteriormente, ensaios de RT-PCR foram realizados para a obtenção do cDNA, utilizado o kit One Step RT-PCR da Qiagen, de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de mRNA foi estimada *a priori* através de densitometria em gel de agarose 2%. A quantificação do mRNA foi realizada por PCR em Tempo Real (QPCR), usando

o kit Absolute QPCR SYBR Green Mix (Abgene Advanced Biotechnologies Limited) como descrito anteriormente (Yin *et al.*, 2001). A quantificação do transcrito foi realizada no equipamento Rotor Gene Real Time PCR (Corbett Research – Uniscience), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos.

3.2.2 Caracterização dos genes *TbWARS1* e *TbWARS2*

A caracterização gênica dos dois genes de *TbWARSs* foi realizada por 5' e 3' RACE-PCR. Para esse ensaio, foram utilizados como oligonucleotídeos senso: oligo (dT) e o *primer Splice Leader* (Campbell, *et al.*, 1984), junto com oligonucleotídeos anti-senso (internos) derivados da seqüência gênica dos genes depositada no NCBI. O RNA total do *T. brucei* foi isolado e usado como molde para as reações de RT-PCR. Uma reação de PCR foi acoplada e o cDNA obtido na reação anterior foi utilizado como molde. A síntese do cDNA a partir do mRNA de cada um dos genes foi otimizada utilizando temperaturas entre 45-55°C durante tempos que variaram entre 30 min e uma hora. Já a reação de PCR, acoplada ao RT, foi otimizada variando o número de ciclos (entre 25-40) e a temperatura de anelamento (entre 50 – 60 °C por 30 seg). O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose 2% e revelado com brometo de etídeo (BrEt). A banda resultante foi purificada através do kit Wizard SV Gel e PCR Clean-up System (Promega) e utilizada para clonagem direta no vetor pCR 2.1 TOPO, para seu seqüenciamento. Para a caracterização do gene *TbWARS1* foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos internos específicos: *TbWARS1Rev-*

150, TbWARS1Rev-110, TbWARS1For1050, TbWARS1For980; e para a caracterização do TbWARS2 os *primers* internos específicos: TbWARS2Rev-100, TbWARS2Rev-170, TbWARS2For1301, TbWARS2For1241.

As ORF's completas dos genes das WARsS, citoplasmática e mitocondrial, de *T.brucei* (TbWARS1 e TbWARS2, respectivamente) foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico. Para a amplificação de TbWARS1 foram utilizados como par de *primers*: TbWARS1ForXhoI (senso) e TbWARS1RevHindIII (anti-senso); e para TbWARS2, o par de *primers*: TbWARS2ForXhoI (senso) e TbWARS2RevHindIII (anti-senso). A reação de PCR foi realizada por 20 - 25 ciclos com TM entre 55 - 60°C. Os produtos da PCR foram chamados de TbWARS1 e TbWARS2 de acordo com o par de *primers* utilizados. O resultado da PCR foi verificado em gel de agarose 1% - BrEt. As bandas resultantes foram purificadas e clonadas no vetor pCR 2.1 TOPO, com fins de seqüenciamento.

3.2.3 Construção dos plasmídeos

3.2.3.1 Construções no Vetor de Clonagem

Com o objetivo de conferir a seqüência dos insertos a serem utilizados para as diversas clonagens, foi realizado um passo prévio de clonagem no vetor pCR 2.1 TOPO. Produtos das PCR individuais, purificados e frescos foram utilizados como insertos nas reações de clonagem no sistema. O vetor e o inserto foram colocados na reação em uma proporção molar de 1:4, respectivamente, junto com as sais (NaCl 200mM e MgCl₂ 10mM) e a topoisomerase I do kit TOPO Cloning Reaction (Invitrogen). A reação foi incubada por 5 minutos a

temperatura ambiente. Depois deste tempo, este material foi utilizado para a transformação de células quimicamente competentes de *E.coli* DH5 α . Cerca de 10-50 μ L das células transformadas foram plaqueadas em placas seletivas de LB Agar com 50 μ g/mL de Kanamicina e 40 μ L de X-Gal 40 mg/mL. As colônias recombinantes foram duplamente selecionadas através de crescimento seletivo e por *screening White/Blue* sem IPTG. As colônias brancas foram selecionadas e analisadas por lise alcalina e submetidas a ensaio de restrição. A correta seqüência dos insertos foi conferida pelo Seqüenciamento de DNA. Os plasmídeos dos clones, cuja seqüência foi corretamente verificada foram extraídos por lise alcalina e digeridos com as enzimas de restrição específicas (cujos sítios de restrição foram incluídos nos *primers*) para servirem como insertos nos posteriores ensaios de subclonagem no vetor de RNAi, pZJM.

3.2.3.2 Construções de Plasmídeos para RNAi

Para os ensaios de RNAi foram utilizados como insertos os DNAs correspondentes às ORF's completas (~1.2 Kb).dos dois genes WARs de *T.brucei* (TbWARs1 e TbWARs2). Cada um dos genes foi amplificado por PCR, a partir do DNA genômico, usando um par de *primers* gene específicos, desenhados com os sítios para as enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*, para *primer* senso e anti-senso, respectivamente. Para TbWARs1:

(5'-CGCCTCGAGATGACTGAAGCCGTTGTAACACCGTG GTCT-3') senso

e (5'-TCAAGCTTTCCTGGGTTGCCGCTTCTTCGCTG GAC-3') anti-senso;

e para TbWARs2:

(5'-TACTCGAGATGCGCCGGGCTTCACATGTTTGCACG TC-3') senso e (5'-CTAAGCTTCTATGCCATAATGTTGCGCACCTCCG TAAA-3') anti-senso.

O produto de PCR foi clonado no vetor pCR 2.1 TOPO e a seqüência dos insertos foi conferida para a posterior subclonagem no plasmídeo de RNAi pZJM (Wang *et al.*, 2000). Para a reação de clonagem foi utilizado o vetor pZJM digerido com as enzimas *XhoI* e *HindIII*. A ocorrência da dupla digestão foi conferida pela liberação de um produto de 600pb, correspondente ao gene da α -Tubulina. O vetor linearizado pela reação de restrição com *XhoI* e *HindIII*, e o inserto, submetido ao mesmo tratamento, foram utilizados para a reação de ligação em uma relação molar de 1:4. A reação catalisada pela DNA ligase foi incubada a 4°C durante 8 horas. A diferença de outros vetores de RNAi, a clonagem neste vetor consiste em um único passo de ligação, já que a presença do duplo promotor T7 (flanqueando o inserto), permite a síntese do dsRNA. Todos os passos da clonagem (amplificação, digestão, quantificação, ligação, etc.), foram acompanhados no gel de agarose 1% e revelados com Brometo de Etídeo 10mg/mL. A quantificação do DNA no gel de agarose foi feita por densitometria com auxílio do programa Kodac Digital Science 1D. Cerca de 5 μ L da reação de ligação foram utilizados para transformar células altamente competentes da linhagem de propagação *E.coli* DH5 α . As colônias recombinantes foram selecionadas em meio LB-Kanamicina 30 μ g/mL, e logo submetidas a lise alcalina para extração do plasmídeo e análise de restrição com *XhoI* e *HindIII*. As seqüências dos insertos e a correta direção de leitura foram conferidos pelo Seqüenciamento de DNA. As duas construções obtidas com o vetor pZJM (*pZJM-TbWARS1* e *pZJM-TbWARS2*) foram isoladas e utilizadas

para a transfecção de células de *T.brucei* 2913 para os posteriores ensaios de RNAi.

3.2.4 Cultura Celular do *Trypanosoma brucei*

Para os experimentos de RNA de interferência foram utilizadas células procíclicas de *Trypanosoma brucei* 2913, gentilmente doadas pelo Prof. Dr. David Campbell do *Microbiology Immunology Molecular Genetics, University of California*, Los Angeles. Esta linhagem 2913 carrega inserida no genoma os genes para expressão constitutiva da T7 RNA polimerase (Wirtz *al.*, 1998) e do repressor de tetraciclina (Wirtz *al.*, 1999), indispensáveis para a expressão induzida do dsRNA a partir do vetor pZJM.

As células 2913 de *T. brucei* foram crescidas no meio de Cunningham (Cunningham, 1977) suplementado com Soro Fetal Bovino completo (SFB) 10% fetal, 15 µg/ml de G418 e 50 µg/ml de higromicina B, para manutenção respectiva da estabilidade intracelular da T7 RNA polimerase e do repressor de tetraciclina na construção de DNA (Figura 22). As culturas foram mantidas a temperatura constante de 26°C.

A Tabela 4 apresenta os reagentes do complexo meio de Cunningham.

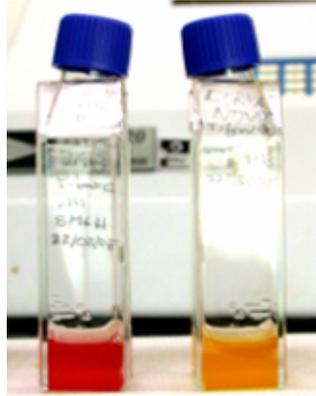


Figura 22. Meio de cultura para *Trypanosoma brucei*. Garrafas com meio de cultura Cunningham's adicionado com Soro Fetal Bovino 10% e com os antibióticos: G418 15 µg/mL, Higromicina 50 µg/mL e Fleomicina 2.5 µg/mL. À direita, meio não crescido apresentado a típica coloração vermelha. À esquerda, meio crescido por 48 horas evidenciando a típica mudança de cor de vermelho para amarelo. Indicador do meio vermelho de fenol.

Tabela 4. Composição do meio para cultura *in vitro* de PCF de *T.brucei*

Meio Cunningham's (SM)
Reagente
<i>Sais Inorgânicas</i>
KCl
MgCl ₂ .6H ₂ O
MgSO ₄ .7H ₂ O
NaH ₂ PO ₄ .1H ₂ O
Água miliQ q.s.p. 70 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O
<i>Açúcares e Ácidos orgânicos</i>
D – Glicose
D-Fructose
Sucrose
Ácido L-Málico
Ácido α-Cetoglutárico
Ácido Fumárico
Ácido Succínico
cis-Aconitato
Piruvato de Sódio 100 mM
<i>Aminoácidos</i>
β-Alanina
DL-Alanina
L-Arginina
L-Asparagina.1H ₂ O
Ácido L-Aspartico
L-Cisteina-HCL.1H ₂ O
L-Cistina
Ácido L-Glutâmico
L-Glutamato
Glicina
L-Histidina
DL-Isoleucina
L-Leucina
L-Lisina
DL-Metionina
L-Fenilalanina
L-Prolina
DL-Serina
L-Taurina
DL-Treonina
L-Triptofano
L-Tirosina
DL-Valina
<i>Aditivos</i>
BME Vitaminas (100X)
Penicilina-Estreptomicina (100X)
Vermelho de Fenol (0,5%)
Soro Fetal Bovino (SFB) 10%
G418 (50 mg/mL) 15µ/mL
Higromicina (50 mg/mL) 50µ/mL

3.2.5 Transformação de Células

3.2.5.1 Transformação de Células de Bactérias

Para estes ensaios foram utilizadas células quimicamente competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α (Gibco) que permite a propagação do plasmídeo. Estas células foram preparadas a partir de monoculturas na fase logarítmica de crescimento (D.O.₆₀₀ entre 0,4-0,6). Foi empregada uma solução de CaCl₂ 50 mM estéril para o preparo da membrana das células para a transformação através da técnica de choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2.5.2 Transfecção de Células de Parasitas

Para este procedimento foram utilizadas células de *Trypanosoma brucei* da linhagem 2913, forma procíclicas (PCF) albergando integrados no genoma os genes para a T7 RNA polimerase e o repressor de tetraciclina. A transfecção de células de *T. brucei* com as construções de DNA foi realizada por eletroporação como descrito anteriormente (Wang *et al.*, 2000). Para os ensaios de transfecção foram utilizadas células 'saudáveis', crescidas no meio apropriado e mantidas em fase *log* de crescimento. Um volume de meio, correspondente a aproximadamente 1 x 10E8 células, foi centrifugado 10 min a 2000 rpm e o precipitado foi coletado e lavado em 2 mL de Meio de Eletroporação - ME (75% Cytomix : 25% Sucrose-Tampão Fosfato) (Van den Hoff *et al.*, 1992) (Tabela 5). Após uma nova centrifugação o precipitado foi ressuscitado em 0,45mL do mesmo tampão contendo 20 μ g do DNA (vetor pZJM linearizado com *NotI*). A Eletroporação foi feita em uma cuveta de 0,4 cm (BioRad Electroporation cuvette), usando o eletroporador Gene Pulser (BioRad) com os seguintes

parâmetros: dois pulsos de 1,5 kV de voltagem, 25 microF de capacitância e 400 ohms de resistência com 10 seg de intervalo entre os pulsos. O volume final da cuveta não deve ultrapassar 0,55 mL.

Tabela 5. Soluções do Meio de Eletroporação (ME) para transfecção (Van den Hoff *et al.*, 1992).

Cytomix		
Estoque	500 mL	Concentração Final
KCl	4,47 g	120 mM
CaCl ₂ 150 mM	0,5 mL	0.15 mM
K ₂ HPO ₄ (anidro)	0,87 g	10 mM
HEPES (livre de ácido)	2,97 g	25 mM
EDTA 0,5 mM, pH 8	2 mL	2 mM
MgCl ₂ 1M	2,5 mL	5 mM
Água miliQ	q.s.p. 500 mL	
O pH final deve ser ajustado para 7,6 com KOH. Esterilizar por filtração.		
Sucrose-Tampão Fosfato		
Estoque	500 mL	Concentração Final
Sucrose	47,41 g	277 mM
K _x PO ₄ 0,5M pH 7,4*	7 mL	7 mM
MgCl ₂ 1M	0,5 mL	1 mM
Água miliQ	q.s.p. 500 mL	
* Feito por titulação de KH ₂ PO ₄ 0,5 M com K ₂ HPO ₄ 0,5M. O pH final deve ser ajustado para 7,4 com K ₂ HPO ₄ 0,5M. Esterilizar por filtração.		

As células foram transferidas para 5 mL de meio Cunningham's, suplementado com antibióticos e SFB, imediatamente após a eletroporação e incubadas a 26°C. A cultura transfectada foi mantida sem o agente de seleção específico para pZJM (Fleomicina) durante as seguintes 24 h, com o objetivo de permitir a estabilização das células. Após a adição de 2,5 µg/mL de Fleomicina no meio, culturas foram diluídas em forma seqüencial para a obtenção de uma população clonal. As culturas foram estabilizadas durante 5-15 dias antes do início dos ensaios de RNAi. Quando as culturas alcançaram uma taxa de crescimento comparável com a do controle não transfectado, se deu início a indução das culturas com Tetraciclina (1,5 µg/mL). Como controle, células não transfectadas 2913 foram crescidas na presença de Fleomicina. Para a indução

da síntese do dsRNA, as células foram incubadas em meio adicionado com tetraciclina (1,5 µg/ml) por 24h. Durante a indução do RNAi, as células foram lavadas e diluídas a fase *log* diariamente e incubadas novamente em meio fresco com tetraciclina. Como controles foram usadas: 1) culturas transfectadas em ausência de tetraciclina (não-induzida - NI) e 2) culturas tipo selvagem 2913 não transfectadas na presença e ausência de tetraciclina. Os experimentos de indução do RNAi foram realizados com culturas estáveis em fase *log* de crescimento e seu fenótipo celular foi analisado até que a morte celular foi evidenciada e confirmada pelo não crescimento das culturas induzidas em meio fresco sem tetraciclina. Os resultados de RNAi foram analisados por triplicata em experimentos independentes.

3.2.6 Demanda de Oxigênio (D.O.)

O monitoramento do consumo de oxigênio por parte das células de *T. brucei* foi realizado no Laboratório de Saneamento-EESC da USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Luis Antônio Daniel, utilizado um oxímetro digital Digimed DM4. Este medidor de oxigênio consiste em uma célula eletrolítica, com um Cátodo de platino e um Ânodo tubular de prata separado por um molde epóxico. Ambos encontram-se imersos em eletrólitos e o conjunto está isolado por uma membrana gás permeável de teflon (PTFE).

Para a determinação do oxigênio dissolvido aplica-se um potencial de polarização diferencial entre o ânodo e o cátodo. O oxigênio da amostra difunde através da membrana, reduzindo no cátodo e criando uma oxidação no ânodo. A corrente resultante é proporcional ao oxigênio presente. A Demanda Bioquímica

de Oxigênio (DBO) é usada para determinar a carga microbiana aeróbia de uma solução ou a capacidade de consumo de oxigênio dos mesmos. Isto significa que a DBO é a quantidade de oxigênio necessário para a oxidação biológica mitocondrial.

Antes das medições, o oxímetro foi calibrado com simulação de 100% de umidade, nas condições de teste (893m de altitude e temperatura de 23°C). A concentração de oxigênio é expressa em partes por milhão (ppm) ou mg/L. A taxa (ppm) foi calculada assumindo que o conteúdo de oxigênio da água saturada com ar é de 0,276 mM a 28 °C (de acordo com as instruções do fabricante). Medidas de D.O. foram feitas de culturas de *T.brucei* crescidas no meio Cunningham's, nas condições anteriormente descritas, até fase *log* de crescimento. A concentração de células de todas as amostras foi ajustada para 1×10^6 cel/mL. Imediatamente antes do ensaio, 30 mL de cada cultura foram transferidas para um tubo de vidro (10cm de comprimento e 3cm de largura), especialmente desenhado para medidas de D.O., com encaixe perfeito do eletrodo para impedir a entrada de gases atmosféricos. As medidas foram coletadas durante 600 seg, tempo no qual a variação da concentração de oxigênio dissolvido cessou nas culturas analisadas. Esta medida foi acompanhada durante 30 minutos em células controle de *T.brucei* 2913.

3.2.7 RT-PCR semi-quantitativo

O cDNA dos genes específicos (TbWARS1 e TbWARS1) foi gerado a partir do RNA total extraído das diversas linhagens celulares. Para este ensaio foram usados pares de *primers* específicos: SL1-RNA - TbWARS1Rev-110 e SL1-RNA -

TbWARS2Rev-100, descritos anteriormente, para a amplificação de fragmentos 5'UTR dos genes TbWARS1 e TbWARS1, respectivamente. Os ensaios acoplados de transcrição reversa e PCR foram realizados com o Kit One Step RT-PCR da Qiagen. Para cada 50 µL de reação foram usados 100 ng de RNA total e os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Os ciclos de temperatura para o RT-PCR foram os seguintes:

- Transcrição reversa a 50 °C por 30 min, desativação da transcriptase reversa e ativação da *Taq* DNA polimerase a 95 °C por 15 min, 35 ciclos de PCR a 95°C por 30 seg, 48 °C por 30 seg e 68 °C por 1 min, e um passo final de polimerização de 68 °C por 10 min.

Os produtos do RT-PCR foram semi-quantificados por análise densitometria em gel de agarose 2%.

3.2.8 PCR quantitativo (Real Time PCR)

A quantidade de transcrito dos genes de interesse foi determinada usando o método de PCR em Tempo Real. Os fragmentos de cDNAs dos genes TbWARS1 e TbWARS1, foram gerados como descritos anteriormente (método semi-quantitativo RT-PCR) mas simplesmente com transcrição reversa sem acoplamento do PCR. A quantificação foi feita no aparelho de PCR em tempo real Rotor Gene Real Time PCR (Corbett Research – Uniscience). O princípio básico deste método é a determinação do Ct (*Threshold Cycle*), que é o número de ciclos no qual o produto do PCR atinge um limiar de fluorescência detectável ou ciclo de aparecimento de fluorescência ótima para medição. O Ct é inversamente proporcional à quantidade de DNA. O fluoróforo utilizado foi o

SYBR Green (Corbett Research – Uniscience), um corante que liga diretamente DNA de dupla fita - dsDNA (genômico, plasmidial e cDNA). A detecção direta do produto de PCR é monitorado pela medida do incremento da fluorescência causado pela ligação do *SYBR Green* ao dsDNA. Com a finalidade de superar os possíveis erros que possam ter sido gerados durante a amplificação, a GAPDH glicosomal (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - um gene constitutivo que participa da glicólise glicosomal) foi utilizada como gene constitutivo. GAPDH glicosomal de *T. brucei* foi amplificada usando como par de oligonucleotídeos:

5`-CCTCGGGAATGAGATTGATGTCGTTGCTGT-3`, como *primer* senso;

5`-CACATACTCCACACCAAGCTTTCCC-3`, como anti-senso.

Esta normalização é feita com o objetivo de corrigir as flutuações de fluorescência causadas pelos erros de concentração no volume de amostra. A normalização é determinada pela divisão da emissão de intensidade do corante da amostra pela emissão da referencia passiva, para obter uma razão definida como Rn (reporte normalizado) para uma determinada reação, assim:

$$DR_n = (R_{n+}) - (R_{n-}),$$

onde,

DR_n= Magnitude do sinal gerado no PCR.

R_{n+} = Intensidade da emissão do *SYBR Green* (PCR com molde)

R_{n-}= Intensidade da emissão passiva do *SYBR Green* (PCR sem molde)

O valor Ct é o ciclo no qual acontece o primeiro incremento estatisticamente significativo na DR_n ou seja, o sinal (Intensidade de

Fluorescência Normalizado) aumenta associado com um crescimento exponencial do produto de PCR.

Para este ensaio foi utilizado kit Absolute QPCR SYBR Green Mix da Abgene Advanced Biotechnologies Limited. Como moldes foram utilizados os cDNAs gerados por RT simples (sem acoplamento do PCR) de amostras de RNA Total isolado de culturas de *T.brucei-TbWARS1* e 2, induzidas e não induzidas com tetraciclina. A reação foi montada por duplicata e seguindo as instruções do fabricante. A quantidade relativa de transcritos gênicos, normalizada com respeito à GAPDH de cada amostra, foi calculada usando ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (*User Bulletin 2*, Applied Biosystems). Os DRn normalizados obtidos para cada linhagem celular transfectante foi dividida pelos DRn normalizados da célula tipo selvagem, para obter uma mudança nos níveis de transcrito relativa à célula controle (selvagem).

3.2.9 Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento foram obtidas durante um período de 11 dias, com amostragem em diversos pontos após a indução do RNAi. As células foram fixadas em formaldeído 4% (v/v): PBS (NaCl 150 mM, Tampão Fosfato de Sódio 5 mM, pH 7,3). A contagem das células foi realizada através de um hemocitómetro.

3.2.10 Morfologia Celular

Para a análise da morfologia celular, as culturas não induzidas e as induzidas por tetraciclina foram examinadas a diferentes intervalos de tempo depois da indução do RNAi, por microscopia ótica de células vivas e por

fluorescência de células vitais e fixadas. Foram implementadas diversas técnicas de coloração:

a) DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol): para a observação do DNA nuclear e do DNA kinetoplasto. Este corante forma um complexo fluorescente com o DNA de dupla fita, mostrando uma fluorescência específica para as bases pareadas AT, AU e IC. Quando DAPI liga ao DNA, sua fluorescência é fortemente aumentada. Para esta coloração, as células crescendo no meio específico foram centrifugadas e lavadas uma vez em PBS contendo Triton X 0.1% (para incrementar a permeabilidade da membrana) e incubada 10 min no gelo. O precipitado lavado foi ressuspensionado então em Paraformaldeído 4% tamponado com PBS contendo 75 ng/ml DAPI (Sigma) para uma concentração de 5000 cel/ μ l. Após um minuto, 10 μ l desta suspensão foram colocados entre uma lamina e uma lamínula. A morfologia dos núcleos celulares foi observada usando um microscópio de fluorescência (Nikon) em uma longitude de onda de excitação de 350 nm. Foram considerados núcleos de fenótipo normal aqueles com fluorescência forte e homogênea. Núcleos apoptóticos podem ser identificados pela cromatina condensada na periferia da membrana nuclear ou a morfologia totalmente fragmentada dos corpos nucleares. A integridade do DNA do kinetoplasto também foi conferida através desta coloração. A porcentagem dos diferentes fenótipos foi constatada para cada 150 células observadas.

b) Mitotracker: A mitocôndria de tripanosomas vivos foi visualizada através de um corante vital sensível ao potencial redox, o MitoTracker Red CMXRos (λ Em 579nm e λ Ex 599nm da Molecular Probe), um derivado de X-rosamina (Figura

23). Células em fase *log* de crescimento foram incubadas com 100 nM de Mitotracker Red CMXRos a 28°C por 5 min em SMGHP, e logo lavadas com meio fresco e incubadas novamente, sem corante, por 20 min.

Embora corantes fluorescentes tradicionais para mitocôndria, tais como tetrametilrosamina e rodamina 123, sejam rapidamente absorvidos pela mitocôndria funcional, eles são facilmente lavados da célula, uma vez acontece a perda do potencial de membrana na mitocôndria. Esta característica limita o uso de estes corantes em experimentos que requerem que as células sejam tratadas com aldeídos fixadores ou outros agentes que afetem o estado energético da mitocôndria. O fluoróforo MitoTracker Red CMXRos, da Molecular Probe (Em 579nm Ex 599nm), é um corante seletivo de mitocôndria que é concentrado por mitocôndrias ativas e bem retidas durante o processo de fixação da célula.

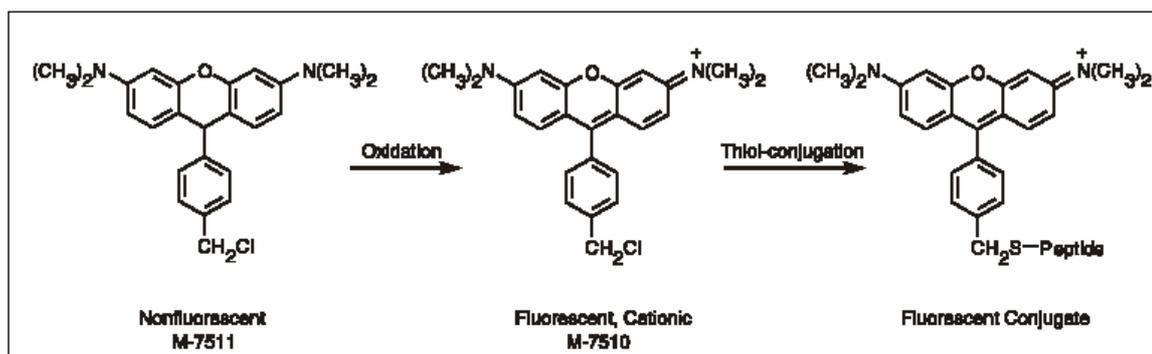


Figura 23. Reação intracelular do MitoTracker. Quando o Mitotracker penetra no interior de células que estão respirando ativamente, acontece a sua oxidação e seqüestro no interior da mitocôndria, donde reage com os grupos tiol das proteínas e peptídeos para formar um conjugado aldeído fixado.

c) DAPI-RED: Esta metodologia foi desenvolvida para esta pesquisa.

Para tal fim, células lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% (v/v) :

PBS foram coradas com DAPI 60 μ M DAPI e Mitotracker Red CMXRos 5 μ M. A

percentagem de anomalias morfológicas (número de núcleos, kinetoplastos e formas) foi determinado em 150 células.

3.2.11 Análises Estatísticas

A significância dos dados obtidos a partir dos ensaios de PCR em Tempo Real foi determinada pelo método de controles aplicando o teste-t pareado sobre dados lineares $2^{-\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) usando o software (Statistica, Statsoft, Tulsa, OK). O t de *Student* é utilizado para testar a significância de uma única media comparada com uma dada media hipotética (controle), ou seja, a media das diferenças entre pares. Considerando como hipótese nula que no há diferença como resultado do tratamento, então, os dois membros de um par devem dar o mesmo valor da variável medida com $P = 1$. Valores de P próximos a zero serão considerados significativos, onde, valores próximos a um, serão considerados diferenças não significativas entre os pares. Este teste de significância também foi usado para dar precisão às análises dos dados obtidos a partir das medidas de Demanda de Oxigênio e Curvas de Crescimento.

3.2.12 Seqüenciamento de DNA

Os ensaios de seqüenciamento de DNA foram realizados pelo método de nucleotídeos de terminação, utilizando um seqüenciador automáticos ABI Prism 377 DNA Sequencer da Perkin Elmer. As concentrações dos *primers* foram ajustadas para 5 pmoles/ μ L e do DNA para 120 ng/ μ L.

3.2.13 Eletroforese em Gel de Agarose

Os procedimentos que envolvem DNA foram acompanhados por eletroforese de gel de agarose 1% e reveladas com brometo de etídeo 10 mg/ml (Sambrook *et al.*, 1989), com o auxílio de transiluminador UV a 302 nm.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos genes *TbWARS1* e *TbWARS2*

Os genes das enzimas, citoplasmática (*TbWARS1*) e mitocondrial (*TbWARS2*), de Triptofanil-tRNA Sintetases de *T. brucei*, foram caracterizados por 5' e 3' RACE-PCR, utilizando para a obtenção do 5'UTR e 3'UTR, *primers* senso desenhados com base na seqüência do *Spliced-Leader* e do poliA, respectivamente. Como *primers* anti-senso foram utilizados oligonucleotídeos desenhados a partir de seqüências internas conhecidas destes dois genes. A Figura 24A mostra um gel de agarose 2% com o produto do ensaio de 5'RACE-PCR para os dois genes, amplificados com o par de *primers* SL-RNA e *TbWARS2*+100, para o gene da *TbWARS2*; e o par SL-RNA e *TbWARS1*+110 para o gene *TbWARS1*.

Estes experimentos permitiram obter as seqüências 5' e 3' UTR, assim como, as ORFs completas destes genes. Através da clonagem e seqüenciamento dos fragmentos amplificados, e com o auxílio de alinhamentos, foi obtida a seqüência aberta de leitura destes dois genes. Sendo a ORF completa de *TbWARS1* correspondente a 1170 pb e a de *TbWARS2* de 1422 pb (Figura 24B).

Este dado permitiu o desenho de novos *primers* para a amplificação das ORFs para os ensaios de RNA de interferência (RNAi).

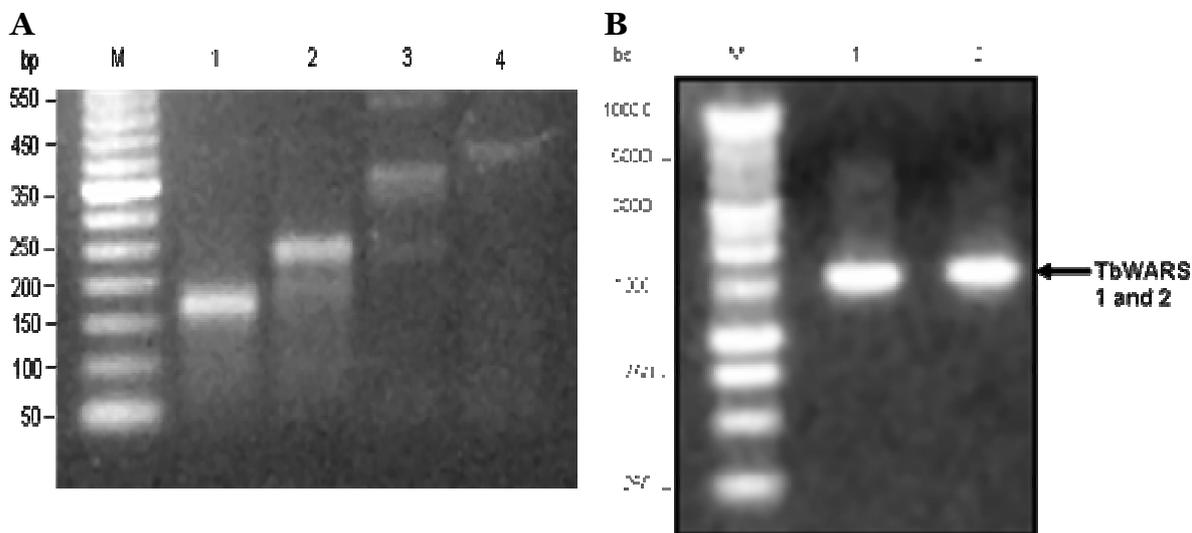


Figura 24. Caracterização dos genes TbWARSs por RACE-PCR. A-Gel de agarose 2%. Produto de RT-PCR de fragmentos dos genes TbWARS1 e 2. M) Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder da Invitrogen. 1) Fragmento da TbWARS2 amplificado com os primers SL-RNA e TbW2+100. 2) Fragmento da TbWARS2 amplificado com os primers SL-RNA e TbW2+170. 3) Fragmento da TbWARS1 amplificado com os primers SL-RNA e TbW1+110. 4) Fragmento da TbWARS1 amplificado com os primers SL-RNA e TbW1+150. B- Gel de agarose 1% do produto de amplificação por PCR das ORFs completas de: 1) TbWARS1 e 2) TbWARS2 de ~1,2 kb. M- Marcador de peso molecular High Mass DNA Ladder da Invitrogen.

4.2 Cultura Celular do *Trypanosoma brucei*

A cultura acelular de PCF de *T. brucei* 2913 foi estabelecida por primeira vez no nosso laboratório. As células controle 2913 selvagens foram colocadas para crescer no meio SM suplementado. Devido à falta de incubação em CO₂, estas células apresentaram um crescimento inicial diminuído e insuficiente para os experimentos de transfecção e indução do RNAi. A adição de *cis*-aconitato ao meio, melhorou a taxa de crescimento e concentrações de 1-3x10⁷ foram atingidas, com duplicação do número de parasitas a cada 8h. Valores ótimos para os passos subseqüentes de transfecção e indução do dsRNA. Os parasitas foram mantidos vitais durante dois meses de cultura contínua, com diluição 1:10

e troca de meio a cada dois dias. Depois deste período, foi necessário o início da cultura com células mantidas em nitrogênio líquido. A morfologia celular das culturas selvagens permaneceu normal, com poucas anomalias e com presença de células em evidente replicação (Figura 25A). A morte celular espontânea aconteceu aos 60 dias de cultura contínua, sendo observadas no meio, múltiplas anomalias celulares (Figura 25B).

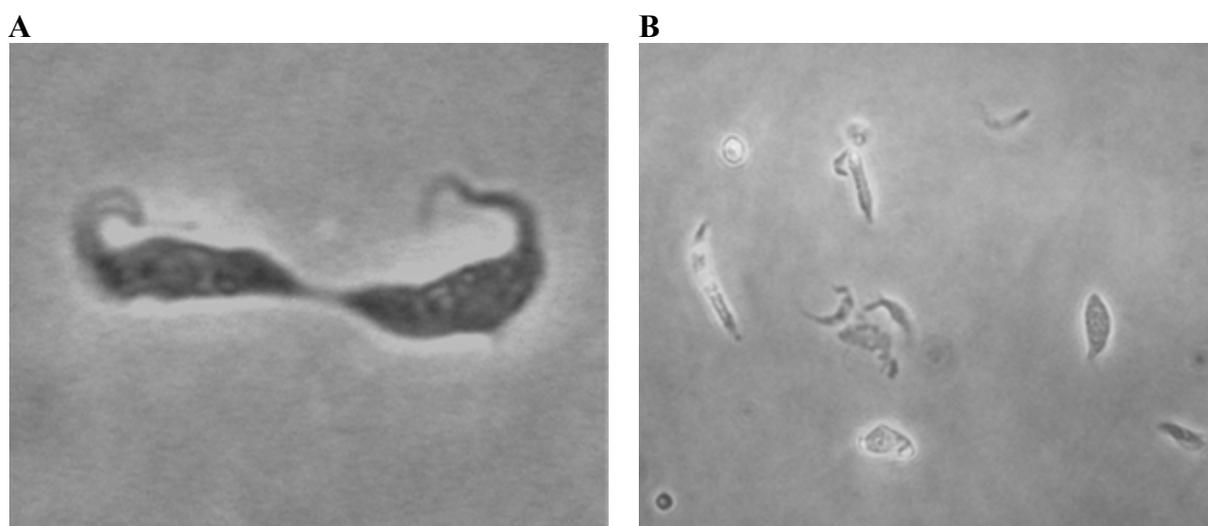


Figura 25. Cultura de *T.brucei* PCF2913 crescendo em meio Cunningham's (SMGH) - SFB10%. Imagens de contraste de fase. A- Morfologia de células crescidas em meio fresco. Célula em citocinese. B-Morfologia de células em cultura velha após de 90 horas de incubação sem mudança de meio. A maior parte das células apresentam alterações morfológicas. Na foto observam-se células gigantes e células ovais.

4.3.RNAi de *TbWARS1* e *TbWARS2*

4.3.1 Desenho dos Experimentos

Para garantir a especificidade dos ensaios de RNAi, análises de seqüências criteriosos devem ser feitos para a escolha adequada dos fragmentos a serem clonados. Através da utilização do software *Blast* (*Blast 2 Sequences Results Version Blastn 2.2.10*), foi realizada uma busca de fragmentos homólogos de 17 pb ou mais, entre cada uma das *TbWARSs* com outros genes

de *T. brucei*. As seqüências de DNA dos genes TbWARS1 e TbWARS2 não apresentaram similaridade de seqüência significativa com outros genes de *T. brucei*, que pudessem interferir com a especificidade do ensaio de RNAi. Mesmo entre as duas sintetases a identidade de seqüência foi de 57%, mas sem a presença comum de fragmentos significantes (>17 pb). Por esta razão as ORFs completas de cada um dos genes WARSs foram utilizadas, sem risco de comprometer a especificidade do silenciamento.

Por outro lado, as seqüências dos genes destas sintetases, foram analisadas com o software NEBcutter 2.0, para a determinação de possíveis sítios de restrição para as enzimas *Xho* I, *Hind* III e *Not* I. Em nenhum dos casos foram encontrados sítios para estas enzimas, dentro das seqüências dos genes, o que permitiu a progressão da clonagem das ORF's completas dentro do vetor de RNAi pZJM. As enzimas *Xho* I e *Hind* III, são as únicas com sítios na região de clonagem do vetor, e a *Not* I permite a linearização do plasmídeo na região de rDNA para a transfecção estável.

4.3.2 Mutantes condicionados para RNAi

Para avaliar o efeito do silenciamento e validar os genes WARSs como alvos farmacológicos, ensaios de *knockdown* foram realizados utilizando a tecnologia do RNA de interferência (RNAi) em células de *T. brucei*. Com este propósito, duas construções foram realizadas usando o pZJM (Wang *et al.*, 2000) como plasmídeo de RNAi e como insertos, clonados entre promotores T7 flanqueadores, foram inseridas as ORFs completas de cada um dos genes de TbWARS. As construções resultantes foram denominadas de pZJM-TbWARS1 e

pZJM-TbWARS2, para os genes citoplasmático e mitocondrial, respectivamente. Estes plasmídeos, que geram um dsRNA intramolecular, foram usadas separadamente para transformar células PCF de *T. brucei* da linhagem 2913 (Wirtz *et al.*, 1999), gerando dois mutantes condicionados, cuja expressão de dsRNA foi induzível pela adição de tetraciclina, a TbWARS1 e a TbWARS2. Como controle, foram utilizadas células 2913 sem a construção no pZJM.

As células transfectantes TbWARS1, apresentaram-se instáveis e a morte celular espontânea aconteceu, 12-14 dias após cultura contínua. Análises morfológicas de microscopia sugerem que a morte celular provavelmente foi decorrente de uma resposta apoptótica, mas esta avaliação precisa ser confirmada, através de análises específicas. Contrariamente, os mutantes TbWARS2, mostraram-se estáveis e com morfologia normal, mesmo depois de dois meses de cultura contínua. Resultados estes, similares aos obtidos com as células selvagens 2913.

Posteriormente, a indução da resposta de RNAi foi realizada sobre culturas 'saudáveis', capazes de atingir valores de $1-3 \times 10^7$ células/mL e de duplicar seu número, em períodos de 8-12 horas. No caso das células TbWARS1, os experimentos de indução da dsRNA começaram no dia quinto após a transfecção. Para esta linhagem celular, somente um de cada três ensaios de transfecção resultou em células apropriadas para a progressão do RNAi. Nas células TbWARS2, os experimentos de indução da dupla fita foram começados aos 7 dias após a transfecção, quando as células apresentaram as condições ótimas de experimentação. Estas linhagens transfectantes evidenciaram perda

de viabilidade após serem estocadas em nitrogênio líquido, por isso, cada um dos três experimentos independentes de RNAi foram feitos sobre células recém transfectadas.

4.3.3. Efeitos Fenotípicos do RNAi

4.3.3.1 Efeito sobre o Crescimento Celular

Para monitorar o efeito sobre o crescimento celular do silenciamento individual de cada uma das TbWARSs, foram realizadas curvas de crescimento de células transfectadas com ou sem indução com tetraciclina. Como referência foram realizadas curvas de crescimento das células 2913 não transfectadas e das células não induzidas das duas linhagens transfectantes.

O crescimento das células transfectantes foi inibido depois da indução do RNAi com tetraciclina. A expressão do RNAi contra o gene da enzima citoplasmática, TbWARS1, resultou numa rápida e severa redução do crescimento das culturas transfectantes. Comparado com o crescimento da cultura controle não transfectada, estas células apresentaram uma diminuição de 84%, 4h depois da indução, com rápido declínio e morte em 24h (Figura 26).

Por outro lado, umas poucas horas (6h) depois da indução do *knockdown* de TbWARS2, as culturas mostraram uma inibição do crescimento de 79% (relativa ao controle), sendo evidente a morte celular depois de 72h (Figura 26). Ambas as linhagens transfectantes mostraram cessação total do crescimento, sendo este efeito mais rapidamente manifestado em culturas induzidas de TbWARS1 (24h), que nas correspondentes de TbWARS2 (72h) (Figura 26).

Estas culturas não apresentaram recuperação, mesmo depois de serem lavadas e refrescadas em meio novo sem tetraciclina, confirmando a morte celular.

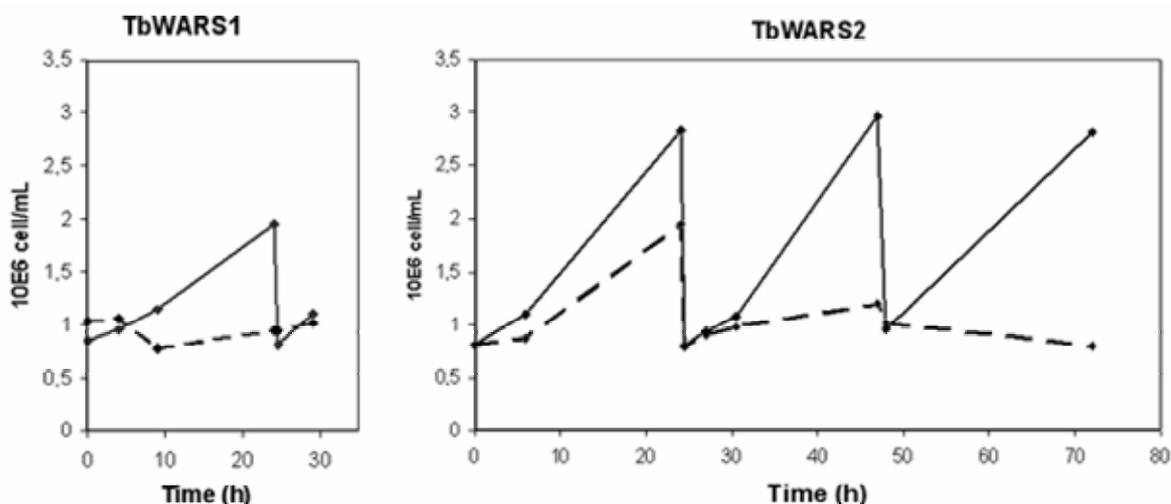


Figura 26. Curvas de crescimento de células de *T. brucei* 2913 induzidas com tetraciclina (linha tracejada) e não induzidas (linha cheia). A cada 24 horas as culturas foram diluídas para fase logarítmica de crescimento (aprox. 1×10^6) e induzidas novamente com tetraciclina.

4.3.3.2 Efeito do RNAi sobre a Expressão Gênica Específica

Para determinar a especificidade do ensaio de RNAi e a percentagem de sua específica inibição, foi realizado RT-PCR Semi-quantitativo e PCR em Tempo Real (QPCR) a partir de células de *T. brucei* 2913, induzidas ou não com tetraciclina.

A expressão do dsRNA de TbWARS1 levou a uma depleção total do mRNA específico, a níveis não detectáveis no gel de agarose do RT-PCR Semi-quantitativo (Figura 27). A análise quantitativa de mRNA (QPCR) revelou que os níveis do transcrito estavam reduzidos mais de 16 vezes nas células induzidas, um dia depois da indução.

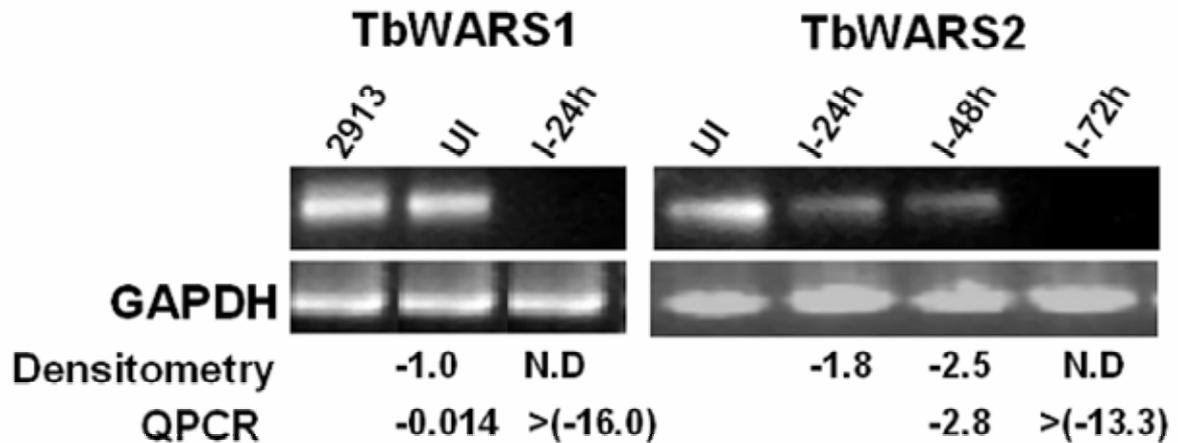


Figura 27. RT-PCR e QPCR de mRNA de culturas de TbWARS1 e 2. 2913: Células controle não transfectadas. UI: Células de TbWARS1 ou 2 não induzidas. I-24h, I-48h e I-72h: células de TbWARS1 ou 2 depois de 24, 48 e 72 horas, respectivamente. O gene da GAPDH foi usado como controle e seu transcrito é mostrado para comparação. A quantificação foi feita por Análises Densitométrico de Banda dos ensaios RT-PCR Semi-quantitativo e por QPCR.

A expressão do dsRNA de TbWARS2, a partir do sistema de duplo promotor T7, também causou uma eficiente degradação do RNA cognato, levando a um decréscimo de ~3 vezes (Figura 27) às 48h e completo silenciamento às 72h de indução (quantidades de mRNA não foram detectáveis no ensaio de RT-PCR Semi-quantitativo e QPCR, com níveis <13 vezes (Figura 27)). Estes resultados confirmaram a eficiência do silenciamento das TbWARSs, pela expressão de dsRNA intramolecular sobre seus alvos específicos, evidenciado por RT-PCR e QPCR, depois de 24h e 72h para TbWARS1 e 2, respectivamente. Os níveis do transcrito destas sintetases não foram alterados significativamente nas linhagens não induzidas e nem nas células controle não transfectadas. Os níveis do transcrito controle (GAPDH glicosomal) permaneceram inalterados em todas as culturas analisadas (induzidas, não induzidas e controle). Adicionalmente, os níveis de mRNA de TbWARSs não-alvo, não foram afetados (Figura 27).

Nas culturas não-induzidas de TbWARS₁, a expressão do mRNA específico foi ligeiramente reduzida (0,014 vezes) quando comparada com os níveis das células 2913 não transfectadas (Figura 27).

Estes resultados demonstram que os ensaios de RNAi para TbWARSs: (i) podem inibir efetivamente a replicação de culturas de formas procíclicas de *T. brucei*; (ii) o efeito de *knockdown* nos níveis de mRNA é seqüência específica, e (iii) o resultado de RNAi é efetivo e leva a morte celular, poucos dias após a indução de células em cultura.

4.3.3.3 Efeito sobre a Morfologia Celular

Com o propósito de descrever o fenótipo e avaliar as alterações morfológicas decorrentes da interrupção dos genes das Triptofanil-tRNA Sintetases (WARSs), foram realizadas e implementadas diversas técnicas de coloração celular. Para a análise da integridade do DNA nuclear e mitocondrial (kinetoplasto), assim como para determinar o número de estruturas presentes nas células, o corante específico para DNA, DAPI, foi utilizado. Por outro lado, a vitalidade celular foi determinada através do uso do corante seletivo para mitocôndria, Mitotracker. Adicionalmente, foi implementada uma coloração, misturando os corantes DAPI e Mitotracker, sobre células fixadas, com a finalidade de observar, ao mesmo tempo, número de núcleos, número de kinetoplastos e morfologia celular, permitindo sua associação. Através desta coloração, chamada de DAPI-RED, foi também possível visualizar o número de flagelos, mas de uma forma menos específica.

Como controles, foram utilizadas células não transfectadas e transfectadas, mas, não-induzidas. A morfologia das células de culturas não

induzidas apareceu normal nas análises de microscopia de luz (contraste de fase – PC) e de fluorescência, DAPI, DAPI-RED e Mitotracker (Figuras 28-A1 e 29-B1).

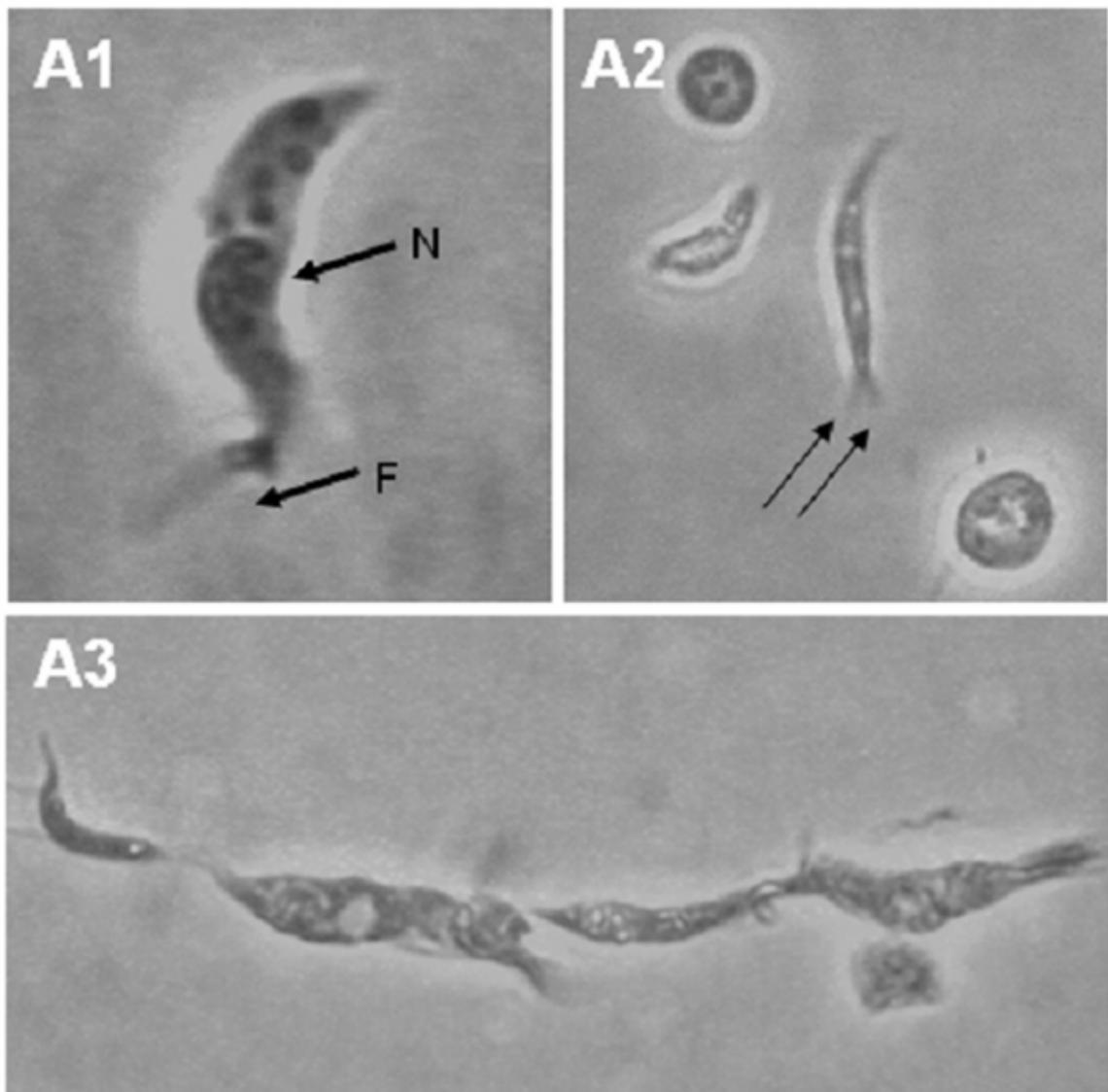


Figura 28. Imagens de contraste de fase. A1- Células de TbWARS1 não induzidas. As setas indicam N: núcleo; F: flagelo. A2- Células de TbWARS1 após 24 h de incubação com tetraciclina. As setas indicam uma célula com vários flagelos. A3- Células de TbWAR2 após 48h de indução de RNAi.

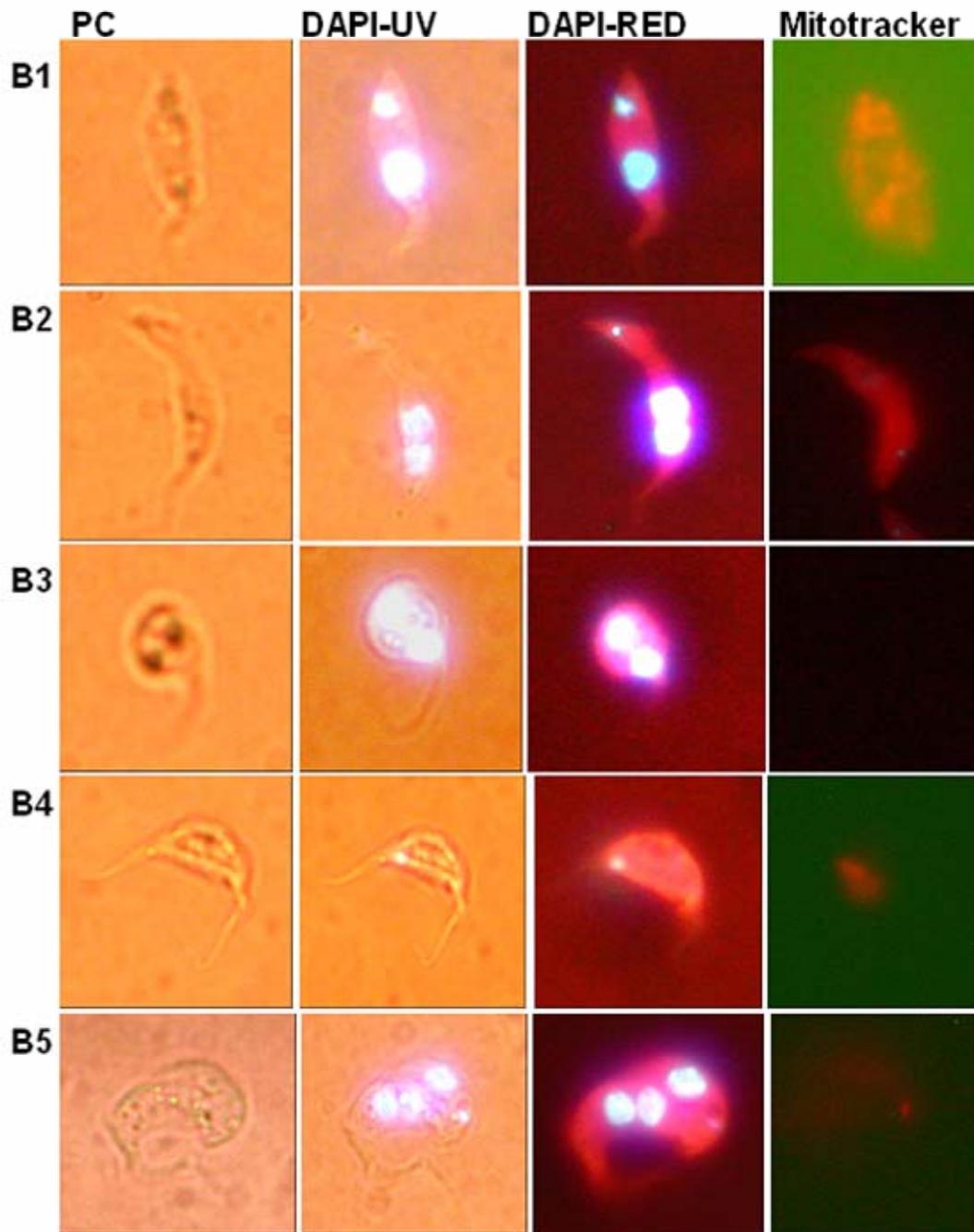


Figura 29. B-Morfologia celular, DNA kinetoplasto e DNA nuclear de células de mutantes condicionadas de TbWARS1 e 2, após diferentes períodos de incubação com tetraciclina PC: Imagens de Contraste de Fase. DAPI-UV: Imagens de Fluorescência de células coradas com DAPI visualizada com luz visível e UV. DAPI-RED: Imagens de Fluorescência de células coradas com Mitotracker Red CMXRos e DAPI e visualizadas no canal de DAPI (UV). Mitotracker: Imagens de Fluorescência de células coradas com o corante sensível a potencial, Mitotracker Red CMXRos, em células vivas. B1- Células de morfologia normal de culturas de TbWARS2 não induzidas. B2- Células anormais de TbWARS2 24 h após indução, com o núcleo dividido antes do kinetoplasto. B3- Célula esférica de TbWARS1 24 h após a indução. B4- *Zooid* característico de culturas de TbWARS2 48h após a indução. B5- Célula multinucleada de culturas de TbWARS1 24 h após a indução.

A distribuição celular foi determinada a diferentes intervalos de tempo a partir do início da indução do dsRNA, sobre 150 células observadas em campos contínuos. A distribuição celular induzida pelo *knockdown* das TbWARSs, assim como o das células controle, é apresentada na Tabela 6. As células foram classificadas em duas categorias de acordo com o número de kinetoplastos (K) e núcleos (N), observados por célula:

células normais: constituído por células com um núcleo e um kinetoplasto (1K1N) ou com dois kinetoplastos e um ou dois núcleos (células em divisão celular) (2K1N/2K2N); e

células anormais: compreende células com um número anormal de kinetoplastos ou núcleos.

Tabela 6- Morfologia de células de *T. brucei* após a indução do RNAi.

Células	Normal				Anormal					
	1K1N (%)	2K1N (%)	2K2N (%)	1K0N (%)	2K0N (%)	0K2N (%)	1K2N (%)	0K0N (%)	1K3N (%)	Esferas (%)
T.b2913 controle	83	11	3	3						
TbWARS1										
Não-induzida	79	11	3	3		2	2			
Induzida 24 h	9	2	3	3		3	3	3	41	33
TbWARS2										
Não-induzida	78	12	2	4		2	2			
Induzida 24 h	51	13	5	9	5	6	2	8	1	
Induzida 48 h	48	8	6	16	4	2	6	8	2	
Induzida 72 h	21	4	19	43	4	4	2	1	2	

K: kinetoplasto

N: núcleo

T.b. 29-13: Células controle selvagens de *T. brucei* 2913.

TbWARS1: Células de *T. brucei* 2913 transfectadas com pZJM-TbWARS1.

TbWARS2: Células de *T. brucei* 2913 transfectadas com pZJM-TbWARS2

Células arredondadas classificadas como 'esferas' foram encontradas com exclusividade nas culturas induzidas de TbWARS1 (Figura 29-B3). Nas culturas controle selvagem, a população foi constituída principalmente (90-94%) de

células com um kinetoplasto e um núcleo (1K1N), e em forma minoritária, por células em divisão (2K1N - 2K2N) (Figura 25A), como apresentado na Tabela 6.

Na linhagem de TbWARS1 com indução do RNAi, a citocinese foi aparentemente bloqueada e a morfologia celular foi afetada (Tabela 6). Depois de 24h de incubação com tetraciclina, a maioria das células (41%) tornaram-se gigantes com múltiplos núcleos, kinetoplastos e flagelos (Figura 28-A2 e Figura 29-B5). Uma porção significativa da população (33%) apresentou forma arredondada (Figura 28-A2 e Figura 29-B3). A Figura 30 apresenta uma imagem geral da cultura de TbWARS1 após 24h de indução, onde abundantes detritos e anomalias celulares podem ser observados.

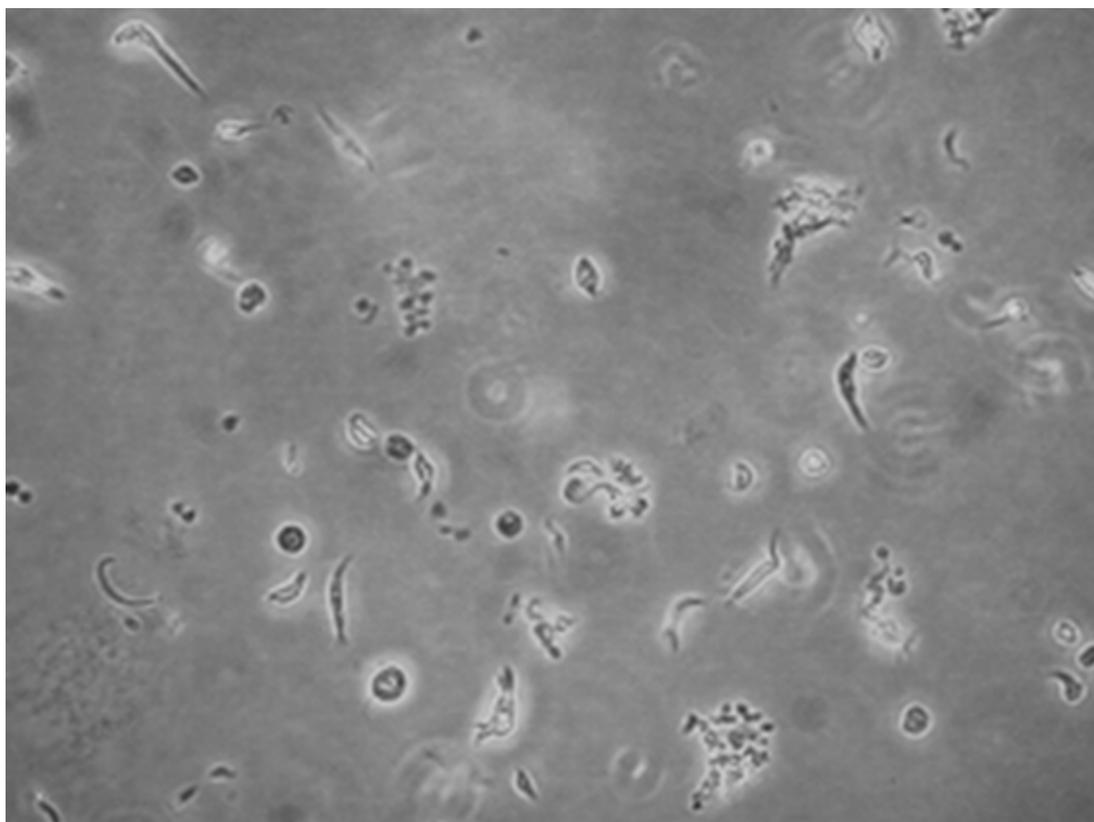


Figura 30. Morfologia de células *T. brucei* TbWARS1 induzidas. Imagens de contraste de fase após 24h de indução com tetraciclina (1,5 µg/mL). Abundantes detritos celulares, indicadores de morte, são evidentes. As células apresentam variados fenótipos, sendo predominante a presença de células arredondadas 'esferas' e de células gigantes multinucleadas.

Por outro lado, o *knockdown* de TbWARS2 resultou numa série de anomalias morfológicas. Após 24 h pós-RNAi, uma porção de células (36%) apresentou anomalias na sua morfologia (Figura 31) quando comparada com células não tratadas, cuja percentagem de anomalias foi inferior a 10% (Tabela 6). Às 48h de indução foi observado um padrão heterogêneo de morfologia celular, porém, em todas as culturas induzidas a diferentes intervalos de tempo, a anomalia mais comum foi a presença de formas *zooid* (Figura 29-B4), caracterizadas pela presença de um ou dois flagelos, um kinetoplasto e a ausência de núcleo.

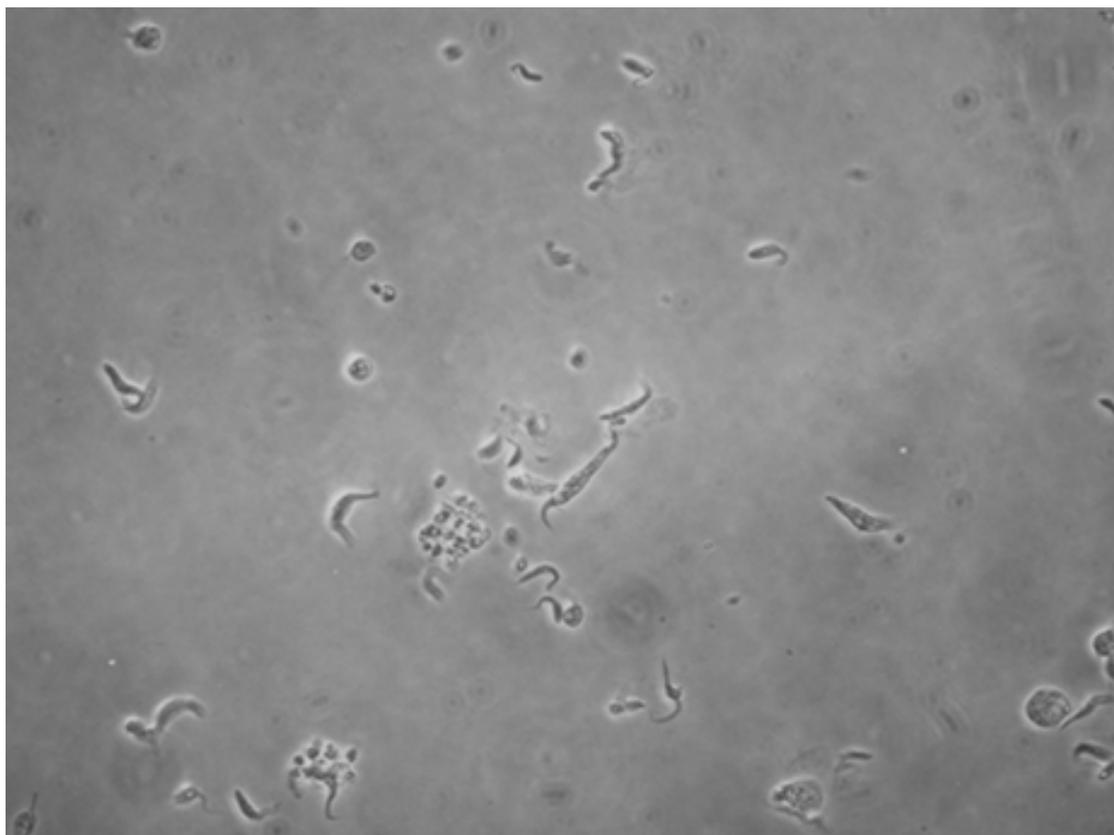


Figura 31. Morfologia de células *T. brucei* TbWARS2 induzidas com tetraciclina. Imagens de contraste de fase às 48 horas de indução. Evidenciam-se abundantes detritos no meio e células agregadas de morfologia alterada.

Na Figura 29, são mostrados alguns dos tipos representativos de células encontrados nas células *knockdown* de TbWARS1 e 2: a) células com bloqueio na replicação do kinetoplasto (Figura 29-B2), nas quais a replicação do núcleo ocorre, mas sem a duplicação do kinetoplasto; b) células com dois núcleos e sem kinetoplastos nem flagelos, cuja forma é quase redonda (Figura 29-B3); c) *zooids* (Figura 29-B4) com dois flagelos; d) células multinucleadas com um kinetoplasto e três núcleos (Figura 29-B5). Nesta imagem, o núcleo, o kinetoplasto, o flagelo e a morfologia celular foram observados através de imagens DAPI-UV (coloridas com DAPI e visualizadas com luz visível e UV) e imagens de DAPI-RED (coloridas com Mitotracker e DAPI e visualizadas com UV) e a atividade mitocondrial foi revelada com Mitotracker em células vivas.

4.3.3.4 Efeito Mitocondrial do RNAi de TbWARS2

A coloração Mitotracker foi utilizada com a finalidade de determinar as alterações sofridas pela mitocôndria em decorrência da indução do RNAi de TbWARS2 (gene da sintetase mitocondrial). A fluorescência do corante vital Mitotracker somente é disparada depois de sua entrada no interior de células respirando ativamente, onde é oxidado à correspondente espécie fluorescente específica de mitocôndria. Interessantemente, diferentes potenciais eletroquímicos, através da membrana mitocondrial, produzem um característico padrão de coloração, para formas procíclicas induzidas e não induzidas (Figura 32). Um típico padrão reticular é visível no interior de células não-induzidas (excluindo a região do núcleo), as quais se mostram significativamente alteradas depois do tratamento com tetraciclina (Figura 32, C a F). Células induzidas apresentaram um decréscimo na capacidade de retenção do corante por parte

da mitocôndria, principalmente, depois de 72h (Figura 32, E-F), indicando uma dramática perturbação da função metabólica.

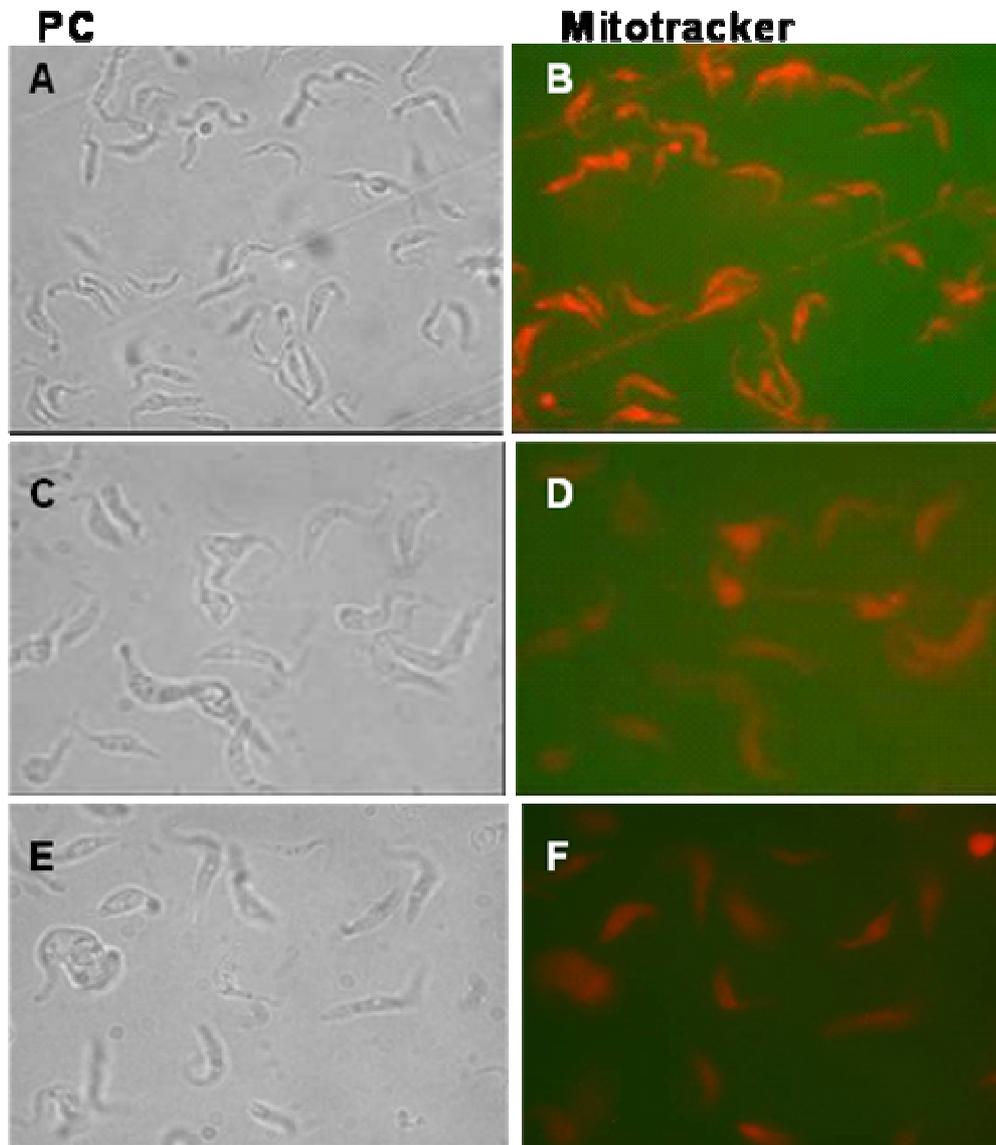


Figura 32. Avaliação da Função Respiratória de células de TbWARS2. Acumulação de corante sensível ao potencial redox (Mitotracker) em formas procíclicas de *T.brucei* TbWARS2. PC: Imagens de contraste de fase. Mitotracker: Imagens de fluorescência de células coradas com Mitotracker Red CMXRos. A-B: Células de TbWARS2. C-D: Células de TbWARS2 48 h depois da indução com tetraciclina. E-F: Células de TbWARS2 72 h depois da indução. TbWARS2-RNAi induz visíveis alterações no potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial produzindo uma diminuição progressiva no padrão de coloração das células induzidas.

Com o intuito de aprofundar nestas observações, foi medida a capacidade de consumo de oxigênio por parte das células, e assim poder ter uma avaliação

quantitativa da função mitocondrial. A medida do oxigênio demandado (Demanda de Oxigênio, D.O.) por parte de um número conhecido de células, é um fiel indicador da vitalidade celular e da função mitocondrial. Os resultados obtidos nas células tratadas com tetraciclina, em diferentes intervalos de tempo (0, 24, 48 e 72 horas), foram comparados com os resultados de D.O. de células não transfectadas 2913 (controle). A Tabela 7 apresenta os dados coletados para cada tipo de amostra (controle e induzida, a diferentes intervalos de tempo), em cada um dos experimentos (1, 2 e 3). A D.O. é calculada pela diferença no consumo de oxigênio num intervalo determinado de tempo (600 segundos), no qual se apresenta variação significativa (ou alguma variação, neste caso) da taxa de oxigênio medido. As culturas controle foram submetidas ao teste durante 30 minutos, e somente nos primeiros 10 minutos foi constatada atividade respiratória. Depois deste tempo, a variação das medições foi nula. Uma explicação possível para este resultado poderia ser que as condições do teste (falta de troca de gases atmosféricos leva ao consumo do oxigênio presente no tubo) alteram a vitalidade das células procíclicas de *T. brucei*, as quais são completamente dependentes da respiração aeróbia (função mitocondrial) para sua produção de energia. As amostras provenientes de culturas tratadas com tetraciclina durante três dias, não apresentaram variação nos níveis de oxigênio consumido, durante 600 segundos.

Tabela 7. Ensaio de Demanda de Oxigênio. Dados comparativos do consumo de oxigênio demandado por células de *T. brucei* tipo selvagem (2913) e células transfectantes TbWARS2 não induzidas (NI) e induzidas (24h e 48h de indução com

tetraciclina). 1,2 e 3: são os resultados obtidos de experimentos independentes feitos por triplicata para cada tipo de amostra.

Dados ensaios de DO em ppm												
Tempo (seg)	2913 Controle			TbWARS2 NI			TbWARS2 I - 24 horas			TbWARS2 I - 48 horas		
	Ensaio	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2
0	7,2	7,4	7,2	7,1	7,4	7,5	6,3	7,1	7,6	6,7	7,3	7,7
15	5,6	5,7	5,6	5,6	5,8	5,9	5,5	6,3	6,8	6	6,7	7
30	5,1	5,1	5,1	5	5,2	5,3	4,8	5,5	6,0	5,9	6,6	6,891
45	4,8	4,8	4,7	4,8	5,0	5,1	4,7	5,4	5,9	5,8	6,5	6,785
60	4,7	4,7	4,6	4,7	4,9	4,9	4,6	5,3	5,9	5,7	6,4	6,6
75	4,6	4,6	4,6	4,6	4,8	4,9	4,6	5,3	5,8	5,7	6,4	6,6
90	4,4	4,4	4,4	4,5	4,6	4,8	4,5	5,2	5,6	5,7	6,4	6,6
120	4,4	4,4	4,4	4,4	4,5	4,7	4,4	5,1	5,5	5,6	6,2	6,5
180	4,2	4,2	4,2	4,3	4,4	4,6	4,3	5,0	5,5	5,6	6,2	6,5
240	4,1	4,1	4,1	4,2	4,3	4,5	4,3	5,0	5,5	5,5	6,1	6,4
300	4,1	4,1	4,1	4,2	4,3	4,4	4,3	5,0	5,6	5,5	6,1	6,4
360	4,1	4,0	4,0	4,2	4,3	4,4	4,4	5,1	5,5	5,5	6,1	6,4
420	4	4,0	4,0	4,1	4,2	4,4	4,3	5,0	5,5	5,5	6,1	6,4
480	4	4,0	4,0	4,1	4,2	4,3	4,3	5,0	5,5	5,5	6,1	6,4
540	4	4,2	4,0	4,1	4,2	4,3	4,3	5,0	5,5	5,5	6,1	6,4
600	4	4,2	4,0	4,1	4,2	4,3	4,3	5,0	5,5	5,5	6,1	6,4

A Tabela 8 apresenta os resultados da análise estatística (media e desvio padrão (DS)) calculados a partir dos dados coletados de D.O. As medidas obtidas, a partir de experimentos independentes feitos por triplicata, apresentaram estabilidade, caracterizada por um baixo desvio padrão.

Tabela 8. Análises Estatísticas dos dados obtidos, a partir do ensaio de Demanda de Oxigênio. Dados comparativos do consumo de oxigênio demandado por células de *T.brucei* tipo selvagem (2913) e células transfectantes TbWARS2 não induzidas (NI) e induzidas (24h e 48h de indução com tetraciclina). DS: Desvio Padrão.

Parâmetro	Tempo (seg)	2913 Controle	TbWARS2 NI	TbWARS2 I - 24 h	TbWARS2 I - 48 h
Media	600	3,24	3,23	2,12	1,21
DS		0,064	0,064	0,017	0,019
%	600	100	99,68	65,34	37,41
DS		1,980	1,986	0,516	0,589

A Figura 33 apresenta um gráfico de barras com a representação dos dados da Tabela 8. A taxa de respiração foi significativamente afetada (uma diminuição de 64,31%) às 48h pós-indução, resultados compatíveis com a

alteração na fluorescência da mitocôndria, descrita anteriormente e com a redução de quase três vezes na expressão do mRNA de TbWARS2 (Figura 27). Depois de 72h, a demanda de oxigênio (D.O.) por parte das células tratadas não foi detectada.

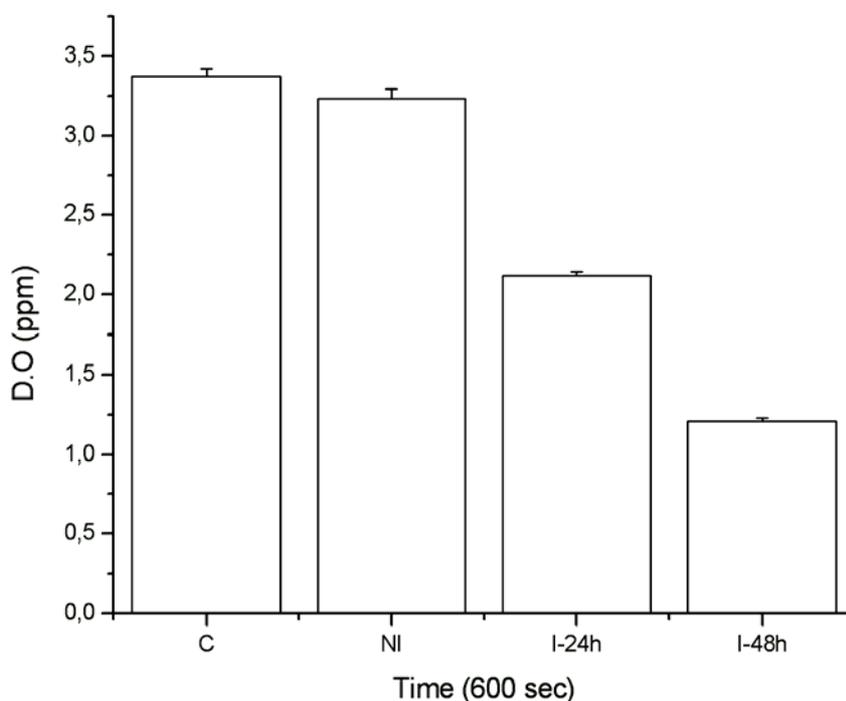


Figura 33. Avaliação da Função Respiratória pela Demanda de Oxigênio (DO) de Células de TbWARS2. C: Células controle de *T. brucei* 29-13. UI: Células de TbWARS2 Não induzidas. I-24h e I-48h: TbWARS2 24h e 48h após a indução, respectivamente. As 72h a D.O foi não detectável neste ensaio.

A análise quantitativa do mRNA das culturas de TbWARS2 induzidas, sugerem que o decréscimo na demanda de oxigênio (Figura 33) e a redução do potencial mitocondrial (Figura 32), ocorreram como consequência da redução do transcrito do gene TbWARS2 (Figura 27). De acordo com estes resultados, pode se concluir que, talvez, pequenas mudanças na expressão desta sintetase mitocondrial, decorrente da indução da interferência (RNAi) específica, podem

disparar extensas e rápidas alterações na função mitocondrial e no potencial redox. Adicionalmente, no terceiro dia pós-indução, a completa eliminação do mRNA de TbWARS2 nas células *knockdown*, foi compatível com a perda total de sua atividade respiratória (Figura 33) e do seu potencial de membrana mitocondrial (Figura 32).

De acordo com o anterior, podemos sugerir que, a não síntese da enzima TbWARS2, pode resultar na perda de outras proteínas da síntese mitocondrial, levando a perda do potencial redox mitocondrial, e conseqüentemente, da capacidade respiratória a essencialmente a mesma taxa.

5. DISCUSSÃO

As Aminoacil-tRNA Sintetases são enzimas essenciais que estabelecem a ligação entre aminoácidos e tRNA, acoplando, de esta forma, o código genético

ao aminoácido específico. A inibição das aaRSs em organismos patogênicos, resulta em depleção das espécies de tRNAs carregados (aminoacilados) o que leva ao eventual colapso da síntese de proteínas e crescimento celular (Kim *et al.*, 2003). Devido ao seu papel central na tradução, o desenvolvimento de inibidores que discriminem entre enzimas de bactérias, parasitas ou fungos dos seus homólogos humanos, poderia fornecer um meio de desenvolvimento de agentes contra estes microrganismos. Por tudo isso, estas enzimas tem sido reconhecidas como promissórios alvos de uma nova geração de antibióticos com alta seletividade (Schimmel *et al.*, 1998).

Por outro lado, doenças tropicais, tais como as causadas por parasitas tripanosomatídeos (Doença do Sono, Chagas e Leishmaniose), têm emergido nos últimos anos com altas taxas de morbi-mortalidade e impactos socioeconômicos devastadores. Estas enfermidades, típicas dos países mais pobres do mundo, não oferecem incentivos para o desenvolvimento de novos antibióticos por parte da indústria farmacêutica. Evidência disto é a crise contínua, na qual se encontra imerso o tratamento farmacológico destas doenças. Desde 1975 até 1999, somente 13 novos fármacos foram desenvolvidos contra todas as doenças tropicais existentes (<http://www.who.int/en/>). Atualmente, todas as grandes companhias farmacêuticas descontinuaram a pesquisa no campo destas doenças infecciosas. As prováveis causas disto são: o baixo retorno econômico e o alto investimento necessário para colocar uma nova droga no mercado. A situação atual fica ainda mais preocupante pela emergência de linhagens patogênicas multi-resistentes aos fármacos existentes. Isto se junta, com a pobre taxa de sucesso, característica dos medicamentos

contra as doenças tropicais (devido à complexidade biológica dos seus agentes etiológicos) e, como consequência, nos anos recentes estas doenças infecciosas tem ressurgido, inclusive as já controladas no passado, tais como a Tripanosomíase Africana, hoje principal causa de morte de algumas regiões da África Sub-Sahariana (<http://www.who.int/en/>).

O fato de que as sub-espécies patogênicas de *T. brucei* se tornem imunes aos principais fármacos anti-infecciosos, além da alta toxicidade dos mesmos, significa que a luta contra a infecção por estes agentes é ainda mais difícil. A melhor estratégia para superar estes obstáculos é o descobrimento de novos alvos, por parte das instituições sem animo de lucro. Neste campo, as aminoacil-tRNA Sintetases constituem uma promissora plataforma para o desenvolvimento de novos compostos que não tenham resistência cruzada para outros antimicrobianos clássicos.

A relação filogenética, características estruturais e mecanismos de reação de estas enzimas constituem a base teórica para desenhar vários compostos que poderão inibir especificamente as aaRS alvo. Segundo Kim *et al.*, (2003), estas enzimas apresentam vantagens sobre outras proteínas, como alvos para antibióticos, por varias razões mencionadas a seguir.

a) Durante um longo período de evolução, elas acumularam uma ampla variedade de diversidades estruturais que podem ser exploradas para desenhar inibidores espécie-seletivos.

b) Quase todos os organismos contêm um grupo de diferentes aaRSs que estão a cargo de 20 aminoácidos naturais. Cada aaRS pode ser utilizada como alvo individual para ensaios com inibidores.

A exclusiva inativação de um RNA particular é vital no processo de validação gênica de um determinado alvo, e uma característica crucial para o sucesso do RNAi, como ferramenta em biologia molecular, é sua especificidade. Nesta pesquisa uma abordagem genética baseada no RNA de interferência foi utilizada, em combinação com um número de técnicas bioquímicas, para avaliar as funções canônicas e não-canônicas das WARs em *T. brucei*. O RNAi induzível permite a obtenção de dados acerca do requerimento de um gene particular para o crescimento celular e, pode ser utilizado para visualizar o fenótipo que origina a morte celular.

A metodologia de RNA de interferência oferece amplas vantagens para o silenciamento gênico de genes em tripanosomatídeos, quando comparada com o *knockout*. Devido a que estes parasitas são diplóides, um *knockout* completo requer uma dupla deleção gênica usando dois diferentes marcadores de seleção (Ray e Hines, 1995). Esta característica dificulta as condições de cultura (já complexas) e a estabilização pós-transfecção destes parasitos. Adicionalmente, se o *knockout* homocigótico de um gene é altamente deletério, clones com este genótipo podem não ser obtidos, já que células hemizigotas, precisam sofrer uma segunda transfecção e resistir a um segundo marcador de seleção. Já o RNA de interferência age pós-transcricionalmente e interfere de forma dominante na expressão gênica, sendo particularmente útil em organismos diplóides, como o *T. brucei* que pode possuir múltiplas cópias de alguns genes. Neste contexto, experimentos de RNAi induzível, diferentemente do *knockout*, oferecem informação sobre o que acontece às células no início da depleção dos níveis de uma proteína essencial.

Atualmente, existem quatro métodos de expressão de dsRNA em *T. brucei*: a) RNA senso e anti-senso podem ser sintetizados *in vitro*, anelados e eletroporados no interior do *T. brucei* (Ngo *et al.*, 1998). A durabilidade do efeito do silenciamento gerado por este método é limitada (>20 h) e pode não ser suficiente para causar a depleção das correspondentes proteínas e gerar o fenótipo de muitos genes. Adicionalmente, devido ao tempo e o custo requerido para a síntese do dsRNA, este método se constitui na abordagem menos desejável entre os disponíveis;

b) clonagem de um gene alvo ou fragmento dentro de um vetor de expressão em *T. brucei*, como uma repetição invertida (Wang *et al.*, 2000). Para estabilizar o plasmídeo um fragmento de DNA espaçador é inserido entre o DNA repetido. Quando transcrito, o RNA forma uma estrutura em alça que ativa a via de RNAi. A maior desvantagem deste método, é que múltiplos passos de clonagem são requeridos para a construção do plasmídeo.

c) o terceiro método envolve o uso de plasmídeos carregando um duplo promotor sobre lados opostos do gene alvo (Wang *et al.*, 2000). RNAs senso e anti-senso, gerados desde a seqüência localizada entre os dois promotores, anelam para formar o dsRNA. A principal vantagem deste sistema é que a construção do vetor é feita num simples passo de clonagem. Dois promotores tem sido utilizados para este propósito, promotores rRNA e T7. O promotor T7 é muito mais forte que o rRNA, mas sua utilização só pode ser feita sobre células transgênicas expressando T7 RNA polimerase de forma constitutiva (Wirtz *et al.*, 1998). A principal desvantagem desta metodologia é que nenhum destes promotores é mantido episomalmente, como resultado, o silenciamento por

RNAi não é mantido por longos períodos de tempo, dificultando a geração de fenótipos a partir de genes que codificam proteínas de vida média longa. Este problema tem sido superado pela geração de vetores, duplo promotor, que se integram ao DNA genômico de forma estável (Wang *et al.*, 2000). Atualmente, existem vetores com duplo promotor T7 induzíveis por tetraciclina, que se integram à região espaçadora rDNA do genoma, permitindo a interferência de genes cujos produtos são altamente estáveis. Um destes sistemas, muito usado atualmente, é o pZJM, criado por Wang *et al.*, (2000);

d) por último, Bastin *et al.*, (2000) criaram um método de geração de RNAi pela inserção de um promotor na orientação oposta de um determinado gene. Não fica claro se esta abordagem funciona somente para genes de cópia simples. Esta técnica pode ser útil para criar fenótipos por perda de função randômica para *screens* genéticos.

Neste trabalho, como vetor de RNA de interferência foi escolhido o pZJM. Este vetor permite a transfecção permanente de células procíclicas de *T. brucei*. Este tipo de transformação celular, evita os problemas de variabilidade inter-experimental e o alto consumo de DNA e outros materiais, decorrente da transfecção transiente. Em tripanosomas, devido a que somente uma pequena fração das células transientes (geralmente, 2% ou menos) expressam o produto de interesse, é muito difícil obter suficiente produto de RNA para a sua quantificação (Wirtz *et al.*, 1994). Na transfecção permanente, para promover a integração do DNA no genoma, o vetor é linearizado por digestão com enzimas de restrição dentro de seqüências idênticas ao proposto sítio de integração (Eid e Sollner-Webb, 1991), permitindo a recombinação homóloga. Para obter o

máximo nível de expressão, o plasmídeo deve ser inserido numa região silenciosa do genoma, tal como o DNA ribossomal espaçador (rDNA). No caso do pZJM, um fragmento de ~600pb de rDNA com o sitio de restrição para NotI, propicia esta integração.

Um incremento adicional da expressão gênica numa ordem de magnitude é obtido pela inserção de seqüências promotoras para a T7 RNA polimerase de bacteriófagos. O pZJM é um sistema plasmidial caracterizado pela formação de duplas fitas de RNA, através da inserção do gene a silenciar, entre dois duplos promotores T7. Este sistema oferece vantagens óbvias de alta penetrabilidade do fenótipo de silenciamento, mas, por outro lado pequenos ‘vazamentos’ do sistema podem ser altamente deletérios, principalmente quando se trata de genes centrais para o funcionamento celular.

Um benefício adicional do pZJM, para a indução do RNAi, é o fato de ser um sistema induzível, que possibilita o estudo completo de fenótipos decorrentes da interferência de genes essenciais, cujo silenciamento é letal. Este sistema plasmidial, induzível por tetraciclina, precisa ser transfectado em células de *T. brucei* transgênicas, que expressam o repressor *tet* de forma constitutiva. Os níveis de expressão podem ser regulados em quatro ordens de magnitude pela variação nas quantidades de tetraciclina no meio. Para os nossos estudos, várias concentrações foram testadas, sendo atingidas as melhores condições de experimentação com 1,5 µg/mL de tetraciclina.

Para a validação das WARs de tripanosomatídeos como alvo, foi escolhido o *T. brucei* devido à competitividade do seu sistema de interferência. Este trabalho foi desenvolvido sobre formas procíclicas do parasito, devido à

maior praticidade nas técnicas de cultura, quando comparado com às formas sangüíneas. Mas, porque validar uma enzima mitocondrial como alvo farmacológico, se as formas sanguíneas de *T. brucei* dependem exclusivamente da glicólise para a produção de energia? Por muito tempo, a mitocôndria das formas sanguíneas foi considerada sem função, mas, recentes experimentos de RNAi, permitiram esclarecer este erro. Em formas sangüíneas de *T. brucei*, o silenciamento de uma proteína que participa na tradução mitocondrial, levou ao desenvolvimento de um fenótipo letal, confirmando a essencialidade da mitocôndria e dos genes da síntese protéica da organela, na vitalidade deste estágio de desenvolvimento (Schnauffer *et al.*, 2001). Desta forma, os efeitos do silenciamento gênico feitos sobre enzimas da tradução mitocondrial em formas procíclicas, podem também ser extrapolados para as formas sangüíneas do parasito.

Os experimentos de RNAi com pZJM requerem a utilização de formas procíclicas de *T. brucei* 2913, as quais carregam no seu genoma os genes do repressor de tetraciclina e da T7 RNA polimerase (expressos em forma constitutiva). Com este propósito, foi estabelecida no nosso laboratório a cultura acelular do *T. brucei* 2913. Este tipo de cultura apresenta um alto grau de dificuldade devido à quantidade de reagentes utilizados para preparar o meio e a os cuidados constantes por ela requeridos. Hoje em dia, o meio disponível para a cultura deste tripanosoma, o Cunningham's (Cunningham, 1977), é extremamente complexo e caro, o que constitui uma grande dificuldade prática, no estudo deste parasita. Outros meios existentes, não permitem a realização de

experimentos de transfecção e de RNAi, com a mesma taxa de sucesso. Trabalhos neste sentido constituem uma área aberta de pesquisa.

Para o desenho dos experimentos de RNAi, as seqüências de ácidos nucléicos dos dois genes, citoplasmático e mitocondrial, foram identificadas individualmente, e os resultados apontaram que nenhum deles apresentava significativa identidade com outros genes do *T. brucei*. A identidade entre as seqüências de DNA das duas TbWARSs foi de 57%, mas não foram encontrados fragmentos com o tamanho e a similaridade suficientes para causar interferência cruzada do RNAi sobre o outro RNA. De fato, as seqüências de aminoácidos também não apresentaram homologia relevante. Devido à não-significativa identidade com outros genes e a que longos dsRNAs elevam a especificidade e a eficiência do *knockdown* por RNAi em *T. brucei* (LaCount *et al.*, 2000), foram escolhidas as seqüências das ORFs completas destes genes para a construção dos plasmídeos de RNAi. A transfecção destes vetores não altera o crescimento celular ou a morfologia das formas procíclicas de *T. brucei* antes da indução com tetraciclina. Os resultados indicam que, depois do início dos ensaios específicos de RNAi, os níveis de mRNAs codificando para as TbWARSs individuais, foram reduzidos significativamente nas formas procíclicas.

Nos ensaios de RNAi, a TbWARS1 parece cumprir um papel mais crítico na vitalidade do *T. brucei*, já que, suas células transfectantes apresentaram-se mais instáveis e morreram depois de duas semanas de cultura contínua. Este fenômeno pode ser explicado por um pequeno ‘vazamento’ do sistema de duplo promotor T7, que causa alterações no crescimento celular, efeitos que quando

acumulados, levam à eventual morte celular das linhagens não induzidas, devido à função essencial da TbWARS1 na replicação do *T. brucei*. Em contraste, as células não induzidas de TbWARS2 permaneceram completamente saudáveis depois de dois meses de cultura contínua.

Estes *knockdowns* da expressão gênica foram altamente específicos. Somente, a espécie simples designada para a interferência, foi diminuída, enquanto que, os níveis de mRNA da outra TbWARSs permaneceram inalterados em cada caso. A rápida taxa, na qual o fenótipo mutante foi desenvolvido, após a expressão da dupla fita de RNA contra os genes sintetases, indica que talvez, estas proteínas possuem uma vida média curta ou que são requeridas em altas quantidades para o correto funcionamento da tradução celular. Nas células TbWARS1 – RNAi, a morte celular aconteceu em apenas um dia e o aparecimento das anomalias morfológicas começou 9h após a incubação com tetraciclina. As principais anomalias na morfologia celular foram células gigantes multinucleadas e células esféricas, sugerindo inibição da citocinese com progressão do ciclo celular.

Na linhagem TbWARS2, após a indução da síntese do dsRNA pela adição de tetraciclina, foi evidenciado um significativo decréscimo na taxa de crescimento às 48h do início do tratamento, com completa cessação do crescimento e morte ao terceiro dia. Adicionalmente, uma variedade de fenótipos mutantes apareceu 24h após a indução. Estas alterações morfológicas incluíram células mini-tripanosomas que careciam de núcleo (*zooids*), células com alteração no número de núcleos e flagelos, entre outras anomalias.

A depleção do gene mitocondrial, TbWARS2 resultou no acúmulo de *zooids*, sugerindo um bloqueio da mitose sem a inibição da segregação do kinetoplasto, o qual lidera a citocinese e a progressão da divisão celular, gerando células filhas anucleadas com kinetoplasto (Ploubidou *et al.*, 1999). O ciclo do kinetoplasto pode, por si só, conduzir as formas procíclicas à divisão celular, um fenômeno não observado em outros eucariontes. Sugerindo que existe um vazamento no mecanismo de regulação do ciclo celular em tripanosomas (Tu e Wang, 2004).

A eficiência e especificidade do silenciamento foi estimada por RT-PCR Semi-quantitativo, onde ficou evidente uma expressiva redução dos níveis específicos do mRNA de TbWARS2. Resultados compatíveis com o observado através da coloração das células com o corante sensível ao potencial de membrana, Mitotracker. Células induzidas mostraram significativa diminuição na sua capacidade de seqüestro do corante, indicando perda do potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial do parasito. Estes efeitos pleiotrópicos são consistentes com um papel essencial destas enzimas no processo de tradução organelar. Na ausência da triptofanil-tRNA sintetase mitocondrial, muitas proteínas sintetizadas na mitocôndria, seriam inapropriadamente traduzidas, o que poderia explicar a variedade de efeitos encontrados nas células *knockdown*. Estes resultados indicam que um potencial efeito no metabolismo respiratório, pode ser o detonante do processo de morte celular.

Nossos resultados mostram claramente, o papel central que as enzimas WARS1 e 2 cumprem na viabilidade celular, validando estas proteínas como alvo para o desenvolvimento de inibidores.

6. CONCLUSÕES

Foi estabelecida a cultura em meio definido do *T. brucei* 2913 no nosso laboratório.

As ORFs completas dos genes que codificam para as enzimas Triptofanil-tRNA Sintetases, citoplasmática (TbWARS1) e mitocondrial (TbWARS2), de *T. brucei*, correspondem a 1170 e 1422 pb, respectivamente.

Através da análise por PCR quantitativo foi determinada a alta especificidade do silenciamento gênico das TbWARSs, mediante RNA de interferência, acontecendo redução unicamente da espécie de mRNA alvo.

Os fenótipos dos mutantes condicionados de RNAi foram desenvolvidos rapidamente, após a expressão da dupla fita de RNA contra os genes sintetases, indicando que talvez, estas proteínas possuem uma vida média curta ou que são requeridas em altas quantidades para o correto funcionamento da tradução celular.

Nas células TbWARS1, a morte celular aconteceu 24h após a indução do dsRNA. As principais anomalias na morfologia celular foram células gigantes multinucleadas e células esféricas, sugerindo inibição da citocinese com progressão do ciclo celular.

Nas células TbWARS2, a completa cessação do crescimento e morte aconteceu às 72h após a indução. A depleção do específico mRNA de TbWARS2, resultou no acúmulo de células filhas anucleadas com kinetoplasto, sugerindo

um bloqueio da mitose sem a inibição da segregação do kinetoplasto (que lidera a citocinese e a progressão da divisão celular). As TbWARS2 induzidas mostraram perda do potencial eletroquímico através da membrana mitocondrial. Estes efeitos deletérios são consistentes com um papel essencial destas enzimas no processo de tradução organelar. Estes resultados indicam que um potencial efeito no metabolismo respiratório, pode ser o detonante do processo de morte celular.

Os efeitos do silenciamento gênico evidenciam o papel central que as enzimas triptofanil-tRNA sintetases, citoplasmática e mitocondrial, desempenham na viabilidade celular, validando estas proteínas como alvo para o desenvolvimento de novos inibidores.

7. BIBLIOGRAFIA

Adhya *et al.*, Role of a RNA-binding protein in import of tRNA into *Leishmania* mitochondria. **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 21396-21402, 1997.

Alexander, R.W. and Schimmel, P. Domain-domain communication in aminoacyl-tRNA synthetases. **Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.** v. 69, p. 317-349, 2001.

Alfonzo, J.D., Blanc, V., Estevez, A.M., Rubio, M.A. and Simpson, L. C to U editing of the anticodon of imported mitochondrial tRNA^{Trp} allows decoding of the UGA stop codon in *Leishmania tarentolae*. **EMBO J.** v. 18, p. 7056-7062, 1999.

Alfonzo, J.D., Thiemann, O. and Simpson, L. The mechanism of U insertion/deletion RNA editing in kinetoplastid mitochondria. **Nucleic Acids Res.** v. 25, p. 3751-3759, 1997.

Antes, T., Costandy, H., Mahendran, R., Spottswood, M., and Miller, D. Insertional editing of mitochondrial tRNAs of *Physarum polycephalum* and *Didymium nigripes*. **Mol. Cell. Biol.** v. 18, p. 7521-7527, 1998.

Arnez, J.D. and Moras, D. Structural and functional considerations of aminoacylation reaction. **Trends Biochem. Sci.** v. 22, p. 211-216, 1997.

Bastin, P., Sherwin, T. and Gull, K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. **Nature.** v. 391, p. 548, 1998.

Baulcombe, D. Viruses and gene silencing in plants. **Arch. Virol. Suppl.** v. 15, p. 189-201, 1999.

Bayfield, M.A., Dahlberg, A.E., Schulmeister, D., Sorner, S and Barta, A. A conformational change in the ribosomal peptidyl transferase center upon active/inactive transition. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 98, p. 10096-10101, 2001.

Bellofatto, V. and Cross, G.A.M. Expression of a bacterial gene in a trypanosomatid protozoan. **Science.** v. 224, p. 1167-1169, 1989.

Bernstein, E. *et al.*, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature.** v. 409, p. 363-366, 2001.

Bhattacharyya, S.N., Chatterjee, S., and Adhya, S. Mitochondrial RNA import in *Leishmania tropica*: Aptamers homologous to multiple tRNA domains that interact cooperatively or antagonistically at the inner membrane. **Mol. Cell. Biol.** v. 22, p. 4372-4382, 2002.

- Bienen, E.J. *et al.*, *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during *in vitro* transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. **Exp. Parasitol.** v. 51, p. 408-417, 1981.
- Blanchard, S.C., Gonzalez, R.L., Kim, H.D., Chu, S., Puglisi, J.D. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. **Nature Struct. Mol. Biol.** v. 11, p. 1008-1014, 2004.
- Blum, B. and Simpson, L. Guide RNAs in kinetoplastid mitochondria have a nonencoded 3'oligo-(U) tail involved in recognition of the pre-edited region. **Cell.** v. 62, p. 391-397, 1990.
- Brown, R.C. *et al.*, Changes in oxidative metabolism and ultrastructure accompanying differentiation of the mitochondrion in *Trypanosoma brucei*. **Int. J. Parasitol.** v. 3, p. 691-704, 1973.
- Brown, J.R., Gentry, D., Becker, J.A., Ingraham, K. Holmes, D.J. and Stanhope, M.J. Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens. **EMBO Rep.** v. 4, p. 1-7, 2003.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L. *et al.*, Complement genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. **Science**, vol. 273, No. 5278, pp. 1058-1073, 1996.
- Bumsted, R.M., Dahl, J.L., Söll, D. and Strominger, J.L. 1968. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. **J. Biol. Chem.** v. 243, p. 779-782, 1968.
- Campbell, D. A., Thornton, D. A., and Boothroyd, J. C. **Nature.** v. 311, p. 350–355, 1984.
- Carter, C. Cognition, mechanism, and evolutionary relationship in aminoacyl-tRNA synthetases. **Ann. Rev. Biochem.** v. 62, p. 715-748, 1993.
- Carter, C.W. **The Aminoacyl-tRNA Synthetases**, edited by Michael Ibba, Christopher Francklyn and Stephen Cusack. 2004 Landes Bioscience/Eurekah.com. Capitulo 12 Tryptophanyl-tRNA synthetases.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W., and Harrison, P.R. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by termination codon, TGA. **EMBO J.**, vol. 5, No. 6, pp. 1221-1227, 1986.
- Clarkson, A.B.Jr. *et al.*, Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 17770-17776, 1989.

- Clayton, C. *et al.*, Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. ***Microbiol. Rev.*** v. 59, p. 325-344, 1995.
- Cogoni, C. and Macino, G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. ***Nature.*** v. 399, p. 166-169, 1999.
- Cunningham, I. New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. ***J. Protozool.*** v. 24, p. 325-329, 1977.
- Cusack, S. Eleven down and nine to go. ***Nat. Struct. Biol.*** v. 2, p. 824-831, 1995.
- Denli, A.M. and Hannon, G.J. RNAi: an ever-growing puzzle. ***Trends Bioch. Sci.*** v. 28, p. 196-201, 2003.
- Dietrich, A., J. H. Weil, and L. Maréchal-Drouard. Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. ***Annu. Rev. Cell Biol.*** v. 8, p.115–131, 1992.
- Dong, H., L. Nilsson, and C. G. Kurland. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. ***J. Mol. Biol.*** v. 260, p. 649–663, 1996.
- d’Orval, B.C., Bortolin, M.L., Gaspin, C., and Bachellerie, J.P. Box C/D RNA guides for the ribose methylation of archaeal tRNAs. The tRNA^{Trp} intron guides the formation of two ribose-methylated nucleosides in the mature tRNA^{Trp}. ***Nucleic Acids Res.*** v. 29, p. 4518–4529, 2001.
- Eid, J.E. and Sollner-Webb, B. Homologous recombination in tandem calmodulin genes in *Trypanosoma brucei* yields multiple products: compensatium for deleterious deletions by gene amplification. ***Genes. Dev.*** v. 5, p. 2024-2032, 1991.
- Elizarov, S., Zabazarnykh, M., Musolyamov, G., Kovaleva, G., Egorov, T. and Kisselev, L. Protein kinase activity tightly associated with bovine triptophanyl-tRNA synthetase. ***Mol. Biol.*** v. 31, p. 210-218, 1997.
- Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P., and Tarassov, I.A. Structural requirements of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** v. 95, p. 2838–2843, 1998.
- Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Ador, L., Rees, B., Thierry, J.C., Gangloff, J. and Moras, D. The class II aminoacyl-tRNA Synthetases and their active site: evolutionary conservation of an ATP binding site. ***J. Mol. Evol.*** v. 40, p. 499-508, 1995.

Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. Partition of tRNA Synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. **Nature**. v. 347, p. 203-206, 1990.

Feagin, J. E. and Stuart, K. Developmental aspects of uridine addition within mitochondrial transcripts of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Cell. Biol.** v. 8, p. 1259-1265, 1988.

Fechter, P., Rudinger-Thirion, J., Tukalo, M., and Giege, R. Major tyrosine identity determinants in *Methanococcus jannaschii* and *Saccharomyces cerevisiae* tRNA(Tyr) are conserved but expressed differently. **Eur. J. Biochem.**, vol. 268, No. 3, pp. 761-737, 2001.

Ferrante, A and Allison, A.C. Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes. **Parasite Immunol.** v. 5, p. 491-498, 1983.

Fersht, A.R. Dissection of the structure and activity of the tyrosyl-tRNA synthetase by site-directed mutagenesis. **Biochem.** v. 26, p. 8031-8037, 1987.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, MK., Kostas, SA., Driver, SE., Mello, CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** v.391, p. 806-811, 1998.

Francklyn, C., Shi, J.P., and Schimmel, P. Overlapping nucleotide determinants for specific aminoacylation of RNA microhelices. **Science**, vol. 255, No. 5048, pp. 1121-1125, 1992.

Fraser, T.H.; Rich, A. Aminoacids are not all initially attached to the same position on transfer RNA molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 72, p. 3044-3048, 1975.

Ghedini, E. *et al.*, Inducible expression of suicide genes in *Leishmania donovani* amastigotes. **J. Biol.Chem.** v. 273, p. 22997-23003, 1998.

Giege, R., Sissler, M., and Florentz, C. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. **Nucleic Acids Res.** vol. 26, No. 22, pp. 5017-5035, 1998.

Görlich, D. and Kutay, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v.15, p. 607-660, 1999.

Grosjean, H., Szweykowska-Kulinska, Z., Motorin, Y., Fasiolo, F., and Simos, G. Intron-dependent enzymatic formation of modified nucleosides in eukaryotic tRNAs: A review. **Biochimie.** v. 79, p. 293-302, 1997.

Gull, K. Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 6, p. 365-370, 2003.

Guo, S. and Kempthues, K.J. *par-1*, a gene required for establish polarity in *C. elegans* embryos, encodes putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. ***Cell***. v. 81, p. 611-620, 1995.

Guo, Q., Gong, Q., Tong, K.L., Vestergaard, B., Costa, A., Desgres, J., Wong, M., Grosjean, H., Zhu, G., Wong, J.T., and Xue, H. Recognition by tryptophanyl-tRNA synthetases of discriminator base on tRNA^{Trp} from three biological domains. ***J. Biol. Chem.*** vol. 277, No. 16, pp. 14343-14349, 2002.

Hamann, C.S., Sowers, K.R., Lipman, R.S., and Hou, Y.M. An archaeal aminoacyl-tRNA synthetase missing from genomics analysis. ***J. Bacteriol.*** vol. 181, No. 18, pp. 5880-5884, 1999.

Hamilton, A. *et al.* Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. ***EMBO J.*** v. 21, p. 4671-4679, 2002.

Hammond, S.M. *et al.*, An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. ***Nature***. v. 404, p. 293-296, 2000.

Hancock, K., and S. L. Hajduk. The mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* are nuclear encoded. ***J. Biol. Chem.*** v. 265, p. 19208-19215, 1990.

Hannon, G.J. RNA interference. ***Nature***. v. 418, p. 244-251, 2002.

Hopper, A.K. and Phizicky, E.M. tRNA transfers to the limelight. ***Genes and Development***. v.17, p. 162-180, 2003.

Hou, Y.M., Frankclyn, C., and Schimmel, P. Molecular dissection of a transfer RNA and the basis for its identity. ***Trends Biochem. Sci.*** vol. 14, No. 6, pp. 233-237, 1989.

Ibba, M. Curnow, A.W.; Soll, D. Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. ***Trends Biochem. Sci.*** v. 22, p. 39-42, 1997.

Ibba, M. Soll, D. Aminoacyl-tRNA synthesis. ***Annu. Rev. Biochem.*** v. 69, p. 617-650, 2000.

Ibba, M. and Soll, D. Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. ***Genes and Development***. v.18, p. 731-738, 2004.

Ibba, M., Sever, S., Praetorius-Ibba, M., and Soll, D. Transfer RNA identity contribute to transition state stabilization during aminoacyl-tRNA synthesis. ***Nucleic Acids Res.*** vol.27, No. 18, pp. 3631-3637, 1999.

Inokuchi, H., and F. Yamao. 1995. ***Structure and expression of prokaryotic tRNA genes***, p. 17-30. In D. Söll and U. L. RajBhandary (ed.), tRNA: structure, biosynthesis, and function. ASM Press, Washington, D.C.

- Ilyin, V. A., Temple, B., Hu, M., Li, G., Yin, Y., Vachette, P. and Carter, Jr, C. W. 2.9 Å crystal structure of ligand-free tryptophanyl-tRNA synthetase : domain movements fragment the adenine nucleotide binding site. **Protein Sci.** v. 9, p. 218-231, 2000.
- Janke, A. and Paabo, S. Editing of a tRNA anticodon in marsupial mitochondria changes its codon recognition. **Nucleic Acids Res.** v. 21, p. 1523–1525, 1993
- Jester, B., Lavengood, J., Roy, H., Ibba, M. and Devine, K. Nonorthologous replacement of lysyl-tRNA synthetase prevents addition of lysine analogous to the genetic code. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 100, p. 14351-14356, 2003.
- Jia, J., Xu, F., Chen, X., Chen, L., Jin, Y. and Wang, D.T.P. **Biochem. J.** Two essential regions for tRNA recognition in *Bacillus subtilis* tryptophanyl-tRNA synthetase. v. 365, 749-756, 2002.
- Jukes, T.H. A change in the genetic code in *Mycoplasma capricolum*. **J. Mol. Evol.** vol. 22, No. 4, p. 361-362, 1985.
- Kanamaru, T., Nakano, Y., Toyoda, Y. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antibacterial activities of TQAK-083, an agent for treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 45, p. 2455-2459, 2001.
- Kanaya, S., Yamada, Y., Kudo, and T. Ikemura. Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. **Gene.** v. 238, p. 143–155, 1999.
- Kennerdell, J.R. and Carthew, R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. **Cell.** v. 95, p. 1017-1026, 1998.
- Kim, S., Lee, S.W., Choi, E.C. and Choi S.Y. Aminoacyl-tRNA synthetases and their inhibitors as a novel family of antibiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 61, p. 278-288, 2003.
- LaCount, D.J. Bruse, S. Hill, K.L. Donelson, J.E. Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 111, p.67-76, 2000.
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D. and Uhlenbeck, O.C. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. **Science.** v. 294, p. 165-168, 2001.
- Lavrov, D.V., Brown, W.M., and Boore, J.L. A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius forficatus*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 97, p. 13738–13742, 2000.

Leberman, R., Hartlein, M. and Cusack, S. *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase: the structure of a class 2 aminoacyl-tRNA synthetase. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1089, p. 287-298, 1991.

Lennarz, W.J., Nesbitt III, J.A. and Reiss, J. The participation of sRNA in the enzymatic synthesis of O-L-lysylphosphatidylglycerol in *Staphylococcus aureus*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 55, p. 934-941, 1966.

Lima, B.D., and Simpson, L. Sequence-dependent in vivo importation of tRNA into the mitochondrion of *Leishmania tarentolae*. **RNA.** v. 2, p. 429-440, 1996.

Lin, L., Hale, S.P. and Schimmel, P. Aminoacylation error correction. **Nature.** v. 384, p. 33-34, 1996.

Lipman, R.S., Sowers, K.R., and Hou, Y.M. Synthesis of cysteinyl-tRNA(Cys) by genome that lacks the normal cysteine-tRNA synthetase. **Biochemistry.** vol. 39, No. 26, pp. 7792-7798, 2000.

Livak, K.J and Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** v. 25, No.4, p. 402-8, 2001.

Lohmann, L.U., Endl, I., Bosch, T.C. Silencing of developmental genes in hydra. **Dev. Biol.** v. 214, p. 211-214, 1999.

Lonergan, K.M. and Gray, M.W. Editing of transfer RNAs in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. **Science.** v. 259, p. 812-816, 1993.

Ludmerer, S.W.; Schimmel, P. Gene for yeast glutamine tRNA synthetase encodes a large amino-terminal extension and provides a strong confirmation of the signature sequence for a group of the aminoacyl-tRNA synthetases. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 10801-10806, 1987.

Lund, E. and Dahlberg, J.E. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. **Science.** v. 282, p. 2082-2085, 1998.

Madison-Antenucci, S., Grams, J. and Hajduk, S. L. Editing machines: the complexities of trypanosome RNA editing. **Cell.** v. 108, p. 435-438, 2002.

Mahapatra, S., Ghosh, S., Bera, S.K., Ghosh, T., Das, A. and Adhya, S. The D arm of tyrosine tRNA is necessary and sufficient for import into *Leishmania* mitochondria *in vitro*. **Nucleic Acids Res.** v. 26, p. 2037-2041, 1998.

Mair, G., Shi, H. F., Li, H. J., Djikeng, A., Aviles, H. O., Bishop, J. R., Falcone, F. H., Gavrilescu, C., Montgomery, J. L., Santori, M. I. *et al.* A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA.** v. 6, 163-169, 2000.

- Maréchal-Drouard, L., Weil, J.H. and Dietrich, A. Transfer RNAs and transfer genes in plants. ***Annu. Rev. Cell. Biol.*** v. 8, p. 115-131, 1993.
- Martinis, S.A. and Schimmel, P. (1996) In ***Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*** (Neidhardt, F.C.ed). 2nd edition. p. 887-901. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Matthews, K.R., Ellis, J.R. and Paterou, A. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. ***Trends Parasitol.*** v. 20, p. 40-47, 2004.
- Matthews, K.R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. ***J. Cell. Sci.*** v. 118, p. 283-290, 2005.
- McClain, W.H. and Nicholas, H.B., Jr. Discrimination between transfer RNA molecules. ***J. Mol. Biol.*** vol. 194, pp. 635 - 642. 1987.
- McCulloch, R. Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. ***Trends Parasitol.*** v. 20, p. 117-121, 2004.
- Min, B., Kitabake, M., Polycarpo, C., Pelaschier, J., Raczniak, G., Ruan, B., Kobayashi, H., Namgoong, S. and Söll, D. Protein synthesis in *Escherichia coli* with mischarged tRNA. ***J. Bacteriol.*** v. 185, p. 3524-3526, 2003.
- Misset, M. *et al.*, Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. ***Eur. J. Biochem.*** v. 157, p. 441-453, 1986.
- Nagel, G.; Doolittle, R. Phylogenetic analysis of the aminoacyl-tRNA Synthetases. ***J. Mol. Evol.*** v. 40, p. 487-498, 1995.
- Napoli, C. *et al.*, Introduction of a chimeric chalone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. ***Plants Cell.*** v. 2, p. 279-289, 1990.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K and Ullu, E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypsnosoma brucei*. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*** v. 95, p. 14687-14692, 1998.
- Nordin, B.E., and Schimmel, P. Plasticity of Recognition of the 3'-End of Mischarged tRNA by Class I Aminoacyl-tRNA Synthetases. ***J. Biol. Chem.***, v. 277, No. 23, 20510-20517, 2002
- Nureki, O., Vassylyev, D.G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T. Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T.L., Schimmel, P., and Yokoyama, S. Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. ***Science.*** v. 280, p. 578-582, 1998.

O'Donoghue, P. and Luthey-Schulten, Z. On the evolution of structure in aminoacyl-tRNA synthetases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 67 p. 550-573, 2003.

Ogle, J.M., Carter, A.P and Ramakrishnan, V. Insights into the decoding mechanisms from recent ribosome structures. **Trends Biochem. Sci.** v. 28, p. 259-266, 2003.

Opperdoes, F.R. and Borst, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. **FEBS Lett.** v. 80, p. 360-364, 1977.

Parker, J. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. **Microbiol Rev.** v. 53 p. 273-298, 1989

Petit, J.F., Strominger, J.L. and Söll, D. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation of serine and glycine into interpeptide bridges in *Staphylococcus epidermidis*. **J. Biol. Chem.** v. 243, p. 757-767, 1968.

Ploubidou, A., Robinson, D. R., Docherty, R. C., Ogbadoyi, E. O., and Gull, K. **J. Cell Sci.** v.112, p. 4641-4650, 1999.

Ramakrishnan, V. Ribosome structure and the mechanism of translation. **Cell.** v. 108, p. 557-572, 2002.

Roditi, L. and Liniger, M. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. **Trends Microbiol.** v. 10, p. 128-134, 2002.

Rodnina, M.V. *et al.*, GTPases mechanisms and functions of translation factors on the ribosome. **Biol. Chem.** v. 381, p. 377-387, 2000.

Rodnina M.V. and Wintermeyer, W. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. **Ann. Rev. Biochem.** v.70, p. 415-435, 2001.

Rodnina, M.V., Gromadski, K.B., Kothe, U. and Wieden, H-J. Recognition and selection of tRNA in translation. **FEBS Letters.** v. 579, p. 938-942, 2005.

Rould, M.A., Perona, J.J. Soll, D., and Steitz, T.A. Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8Å resolution. **Science.** v. 246, No. 4934, p. 1135-1142, 1989.

Ruan, D. *et al.*, Genomic and evolution of aminoacyl-tRNA synthesis. **Acta Bioch. Polonica.** v. 48, p. 1-21, 2001.

Rubio, M. A., X. Liu, H. Yuzawa, J. D. Alfonzo, and L. Simpson. Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae* RNA. **RNA**. v. 6, p. 988–1003, 2000.

Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J.C. and Moras, D. Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA (Asp). **Science**. v. 52, p. 1682-1689, 1991.

Ryan, B., Ahel, I., Ambrogelly, A., Becker, H., Bunjun, S., Feng, L., Tumbula-Hansen, D., Ibba, M., Korencic, D., Kobayashi, H., Jacquin-Becker, C., Mejlhede, N., Min, B., Raczniak, G., Rinehart, J., Stathopolous, C., Li, T. and Söll, D. Genomics and evolution of aminoacyl-tRNA synthetases. **Acta Biochim. Pol.** v. 48, p. 313-321, 2001.

Sagerström, C. G. and Sive, H. L. (1996) in **A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis** (Krieg, P. A., ed) pp. 83–103, Wiley-Liss,

Saks, M.E., Sampson, J.R., and Abelson, J.N. The transfer RNA identity problem: a search for rules. **Science**. v. 14, No. 5144, p. 191-7, 1994.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989). In **Molecular Cloning: A laboratory manual**. Second Edition. Plainview. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sánchez Alvarado, A. and Newmark, P.A. Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 96, p. 5049-5054, 1999.

Schauer, S., Chaturvedi, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., *et al.* *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. Trapping the thioester intermediate. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 48657-48663, 2002.

Sherwin, T. and Gull, K. The cell division cycle of *Trypanosoma brucei brucei*: timing of event markers and cytoskeletal modulations. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** v. 323, p. 573-588, 1989.

Schimmel, P. Aminoacyl-TRNA synthetases: general scheme of structure, function, relationships in the polypeptide and recognition of transfer RNAs. **Annu. Rev. Biochem.** v. 56, p. 125-158, 1987.

Schimmel, P. Parameters of the molecular recognition of transfer RNAs. **Biochemistry**. vol. 28, No. 7, pp. 2747-2759, 1989.

Schimmel, P., Giege, R., Moras, D., and Yokohama, S. An operational RNA code for aminoacids and possible relationship to genetic code. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** vol. 90, No. 19, pp. 8763-8768, 1993.

Schimmel, P.; Tao, J.; Hill, J. Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. **FASEB**. v. 12, p. 1599-1609, 1998.

Schnauffer, A. *et al.*, An RNA ligase is essential for RNA editing and survival of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **Science**. v. 291, p. 2159-2162, 2001.

Schneider, A. *et al.*, Nuclear-encoded mitochondrial tRNAs of *Trypanosoma brucei* have a modified cytidine in the anticodon loop. **Nucleic Acids Res**. v. 22, p. 3699-3705, 1994.

Schneider, A. and Marechal-Drouard, L. Mitochondrial tRNA import: Are there distinct mechanisms? **Trends Cell Biol**. v.10, p. 509-513, 2000.

Schon, A., Hottiger, H., and Soll, D. Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. **Nature**. vol. 331, No. 6152, pp. 187-190, 1988.

Sherrer, R.L., Yermovsky-Kammerer, A.E. and Hajduk, S.L. Sequence motif within *Trypanosoma* precursor tRNAs influence abundance and mitochondrial localization. **Mol. Cell. Biol**. v. 23, p. 9061-9072, 2003.

Shiba, K., Suzuki, N., Shigesada, K., Namba, Y., Schimmel, P., and Noda, T. Human Cytoplasmic Isoleucyl-tRNA Synthetase: Selective Divergence of the Anticodon-Binding Domain and Acquisition of a New Structural Unit. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** vol. 91, 7435-7439, 1994.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. **Annu. Rev. Microbiol**. v. 41, p. 363-382, 1987.

Simpson, A.M, Suyama, Y., Dewes, H., Campbell, D. and Simpson, L. Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function. **Nucleic Acids Res**. v. 17, p. 5427-5445, 1989.

Smith, C.M. and Steitz, J.A. Sno storm in the nucleolus: New roles for myriad small RNPs. **Cell**. v. 89, p.799-809, 1997.

Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., DEloughery, C., Lee, H., Dubois, J. *et al.*, Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. **J. Bacteriol**. vol.179, No. 22, pp. 7135-7155, 1997.

Sollner-Webb, B. *Trypanosome* RNA editing: resolved. **Science**. v. 273, p. 1182-1183, 1996.

Srinivasan, G. James, C.M., and Krzycki, J.A. Pyrrolysone encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. **Science**. vol. 296, No. 5572, pp. 1459-1462, 2002.

Suyama *et al.*, Regulated tRNA import in *Leishmania* mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1396, p. 138-142, 1998.

Tabara *et al.*, The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**. v. 99, 123-132, 1999.

Tan, T.H., Pach, R., Crausaz, A., Ivens, A., and Schneider, A. tRNAs in *Trypanosoma brucei*: Genomic organization, expression, and mitochondrial import. **Mol. Cell. Biol.**v. 22, p. 3707–3717, 2002.

Tarassov, I., and Martin, R. Mechanisms of tRNA import into yeast mitochondria: an overview. **Biochimie**. v. 78 p. 502–510, 1996.

Tomita, K. and Weiner, A.M. Collaboration between CCA and A-adding enzymes to build and repair the 3'-terminal CCA of tRNA in *Aquifex aeolicus*. **Science**. v. 294, p. 1334– 1336, 2001.

Tu, X. and Wang, C.C. The involvement of two *cdc-2*-related kinases (CRKs) in *Trypanosoma brucei* cell cycle regulation and the distinctive stage-specific phenotypes caused by CRK3 depletion. **J. Biol. Chem.** v. 279, p. 20519-20528, 2004.

Van den Hoff, M. J., Moorman, A. F., and Lamers, W. H. **Nucleic Acids Res.** v. 20, p. 2902, 1992.

Vaughan, S. and Gull, K. The trypanosome flagellum. **J. Cell. Sci.** v. 116, p. 757-759, 2003.

Voinnet, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends Genet.** v. 17, p. 449-459, 2001.

Volpe, T.A. *et al.*, Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. **Science**. v. 297, p. 1833-1837, 2002.

Wang, Z., Morris, J.C., Drew, M.E., Englund, P.T. Interference of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using integratable vector with opposing T7 promoters. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 40174-9, 2000.

Webster, T. A., Lathrop, R. H. and Smith, T. F. Prediction of a common structural domain in aminoacyl-tRNA synthetases through use of a new pattern-directed inference system. **Biochemistry**. v. 26, p. 6950-6957, 1987.

Wessenegger *et al.*, RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. **Cell**. v. 76, p. 567-576, 1994.

Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biol.* v. 2, p. 70-75, 2000.

Wirtz, E., Hartmann, C. and Clayton, C.E. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. *Nucl. Acid. Res.* v. 22, p. 3887-3894, 1994.

Wirtz E., Hoek, M., Cross G.A. Regulated processive transcription of chromatin by T7 RNA polymerase in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* v. 26, p. 4626-4634, 1998.

Wirtz, E., Leal S, Ochatt. C, Cross GA. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knockouts and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* v. 99, p. 89-101, 1999.

Wolfson, A.D., LaRiviere, F.J., Pleiss, J.A. Dale, T., Asahara, H. and Uhlenbeck, O.C. tRNA conformity. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* v. 66, p. 185-193, 2001.

Xue, H., Shen, W., Giege, R., and Wong, J.T. Identity elements of tRNA(Trp): Identification and evolutionary conservation. *J. Biol. Chem.* vol. 268, No. 13, pp. 9316-9322, 1993.

Yermovsky-Kammerer, A.E. and Hajduk, S.L. *In vitro* import of a nuclearly encoded tRNA into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* v. 19, p. 6253-6259, 1999.

Yin, J. L., Shackel, N. A., Zekry, A., McGuinness, P. H., Richards, C., van der Putten, K., McCaughan, G. W., Eris, J. M., Bidhop, G. A. Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunology and Cell Biology.* v.79, p. 213-221, 2001.

World Health Organization Fact sheet N°259 March 2001

Yue, D., Maizels, N., and Weiner, A.M. CCA-adding enzymes and poly(A) polymerases are all members of the same nucleotidyltransferase superfamily: characterization of the CCA-adding enzyme from the archaeal hyperthermophile *Sulfolobus shibatae*. *RNA.* vol. 2, No. 9, pp. 895-908, 1996.

Zamore *et al.*, RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotides intervals. *Cell.* v. 101, p. 25-33, 2000.

-