

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Tamara De' Carli da Costa Lima

**Abordagens moleculares voltadas a caracterização
funcional dos homólogos da proteína de ligação a cauda
poli-A (PABP) em espécies de *Leishmania* sp.**

**Recife
2012**

Tamara De' Carli da Costa Lima

**Abordagens moleculares voltadas a caracterização
funcional dos homólogos da proteína de ligação a cauda
poli-A (PABP) em espécies de *Leishmania* sp**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Genética da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis:

Recife

2012

Catálogo na Fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Tamara De' Carli da Costa

Abordagens moleculares voltadas a caracterização funcional dos homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) em espécies de Leishmania sp./ Tamara De' Carli da Costa Lima– Recife: O Autor, 2012.

182 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Christian Robson de Souza Reis

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

Genética 2. Leishmania 3. Proteínas I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orientador) II. Reis, Christian Robson de Souza (coorientador) III. Título

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2012- 239

Tamara De' Carli da Costa Lima

Abordagens moleculares voltadas a caracterização funcional dos
homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) em
espécies de *Leishmania* sp

Aprovado em 21/09/2012

Banca Examinadora:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Tatiany Patricia Romão Pompílio de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Recife

2012

Dedico a meu noivo
e minha família

Agradecimentos

Ao Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pelo conhecimento e incentivo prestados durante a execução deste trabalho.

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco pela Pesquisa pela bolsa concedida

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela grande colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco

A minha família e aos meus amigos pelo apoio constante.

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, com o suporte financeiro da CAPES, FACEPE, CNPq e CPqAM/FIOCRUZ.

Resumo

Em eucariotos, a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) se liga especificamente a sequência de poli-adenosinas na extremidade 3' dos mRNAs, atuando em múltiplas funções associadas ao metabolismo destes, incluindo biogênese, processamento, transporte núcleo-citoplasmático e degradação. A PABP também participa na síntese proteica, via interações diretas com fatores de tradução, como o fator de iniciação eIF4G, parceiro da proteína de ligação ao *cap* eIF4E. O objetivo desta Tese foi dar continuidade a caracterização de três homólogos da PABP identificados em *Leishmania* sp. (PABPs1, 2 e 3), protozoários patogênicos de características biológicas diferenciadas. Em estudos prévios estas proteínas se mostraram abundantes e de expressão simultânea e a PABP1 se mostrou representada por isoformas associadas a sua fosforilação. Neste trabalho, foi observado que as três proteínas possuem localização citoplasmática, porém sob condições de inibição da transcrição, mas não de tradução ou processamento de mRNAs, as PABPs 2 e 3 migram para o núcleo. Esse comportamento está de acordo com ensaios de interação proteína-proteína, onde foi observada uma associação direta entre as PABPs 2 e 3, independente de RNA. A expressão de isoformas fosforiladas da PABP1 foi então analisada e observou-se que esta era afetada pela inibição dos processos de síntese de mRNAs. Investigando sua participação no processo de tradução, foram confirmadas interações específicas entre a PABP1 e um homólogo de eIF4G *in vivo* e interações inéditas entre esta e homólogos de eIF4E. As três proteínas se mostraram capazes de se associar com os polissomas de células em fase de crescimento exponencial, mas não de fase estacionária. Ao longo do trabalho foram mapeados motivos envolvidos com as interações observadas identificando características novas não descritas. Por fim, ensaios de co-imunoprecipitação seguido de análise proteica por espectrometria de massa e de RNAs por RT-PCR confirmaram a presença de parceiros proteicos diferenciados para cada homólogo e mRNAs alvo para as PABPs 2 e 3 cuja tradução está associada a fase S do ciclo celular. Nossos resultados mostram que estas proteínas apresentam funções divergentes e reforça um papel mais geral da PABP1 na tradução.

Palavras-chave: Iniciação da tradução; Proteína de ligação a cauda poli-A; Tripanossomatídeos

Abstract

In eukaryotes, the poly-A binding protein (PABP) binds specifically to a poly-adenosines sequence present in the 3' end of the mRNAs where performs multiple functions associated with their metabolism, including biogenesis, processing, nucleocytoplasmic transport, and degradation. The PABP also participates in protein synthesis, via direct interactions with translation factors such as the initiation factor eIF4G, partner of the cap binding protein eIF4E. The aim of this Thesis was to continue the characterization of the three PABP homologues identified in *Leishmania* sp. (PABPs 1, 2 and 3), a pathogenic protozoan with differentiated biological characteristics. Previous studies have shown that these proteins are abundant and simultaneously expressed and that PABP1 is characterized by multiples isoforms associated to phosphorylation. In this study, it was observed that all three proteins have cytoplasmic localization, but under transcription inhibition conditions but not translation or mRNAs processing, the PABPs 2 and 3 migrate to the nucleus. This behavior is in agreement with a protein-protein interaction observed between PABPs 2 and 3, and this interaction is independent of RNA. The expression of the phosphorylated isoforms of PABP1 was also analyzed and it was found that some of those isoforms were affected by the inhibition of the processing of mRNAs synthesis. When investigated their participation in the translation process were observed specific interactions between PABP1 and a homolog of eIF4G *in vivo* and a novel interaction between PABP 1 and the homologues of eIF4E. Throughout this study the motifs involved in the interactions mentioned above were mapped and new motifs not yet described were observed. All three proteins have been shown to be associated with polysomes in cells in exponential phase, but not in stationary phase. Finally, co-immunoprecipitation assays followed by protein analysis by mass spectrometry and of RNAs by RT-PCR confirmed the presence of different protein partners and mRNAs targets to the PABPs 2 and 3 whose translation is associated with the S phase of cell cycle. Our results show that these proteins have different functions and reinforces a more general role of PABP1 in translation.

Keywords: Translation initiation; poly-A binding protein; trypanosomatids

Lista de Figuras

Figura 1. Vetores invertebrados da leishmaniose.	6
Figura 2. Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i> .	7
Figura 3. Resumo do ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	10
Figura 4. Representação esquemática da forma típica dos tripanossomatídeos	11
Figura 5. Representação mostrando a alta sintonia entre os cromossomos de <i>L. major</i> e <i>T. brucei</i> .	13
Figura 6. Diagrama mostrando os tamanhos dos genomas e a distribuição dos grupamentos de genes ortólogos entre três espécies de tripanossomatídeos	14
Figura 7. Diagrama mostrando genes espécies específicos encontrados nas três espécies de <i>Leishmania</i> .	17
Figura 8. Transcrição poliscistrônica nos tripanossomatídeos.	19
Figura 9. Representação esquemática do <i>trans-splicing</i> .	22
Figura 10. Esquema geral de uma típica PABP.	29
Figura 11. Estruturas dos domínios presentes na PABP citoplasmática.	30
Figura 12. Esquema de um mRNA de PABP.	34
Figura 13. Modelo do mecanismo de controle do comprimento da cauda poli-A.	37
Figura 14. Esquema da iniciação da tradução cap dependente.	47
Figura 15. Comparação entre as sequências das PABPs dos tripanossomatídeos (<i>L. major</i> e <i>T. brucei</i>) com as PABPs de humano, levedura e planta.	80
Figura 16. Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3.	83
Figura 17. Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 frente a inibição da transcrição por incubação com Actinomicina-D.	85
Figura 18. Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 frente aos inibidores de processamento de RNA e tradução.	86
Figura 19. Análise da expressão da PABP1 sob inibição de diferentes	88

processos celulares associados ao metabolismo de mRNAs e proteínas.

Figura 20. Análise da interação entre os três homólogos de PABP <i>in vivo</i> .	90
Figura 21. Análise da interação entre os homólogos de PABPs 2 e 3 na presença ou ausência de RNAs.	91
Figura 22. Análise de interação entre os homólogos da PABP.	93
Figura 23. Mapeamento das regiões de interações entre as PABP2/PABP2 e entre as PABP2/PABP3.	94
Figura 24. Análise da interação entre as proteínas EIF4G3 e EIF4E4 <i>in vivo</i> .	96
Figura 25. Análise da interação <i>in vivo</i> entre os homólogos de PABP e o homólogo do fator eIF4G de iniciação da tradução, o EIF4G3.	97
Figura 26. Mapeamento da região de interação da PABP1 com o fator EIF4G3.	98
Figura 27. Análises das interações entre os homólogos de PABP e dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E, os EIF4E3 e 4.	99
Figura 28. Mapeamento da região de interação da PABP1 com os fatores EIF4E3 e 4.	100
Figura 29. Perfil polissomal dos EIF4E3 e 4 e EIF4G4.	102
Figura 30. Perfil polissomal das PABPs 1, 2 e 3.	103
Figura 31. Análise da superexpressão das proteínas heterólogas PABP1, 2 e 3 fusionadas a HA.	104
Figura 32. Associação com os polissomos em fases exponencial (A) e estacionária (B) dos três homólogos de PABP.	106
Figura 33. Análise do padrão de co-precipitação de mRNAs específicos junto às PABPs 1, 2 e 3.	119

Lista de Tabelas

Tabela 1. Dados de homologia de sequência, comparando as proteínas completas e seus domínios individuais, entre a PABP1 de humano e os homólogos de <i>Leishmania</i> , levedura e planta.	79
Tabela 2. Análise de parceiros funcionais das PABPs 1, 2 e 3 na fase exponencial de <i>L. infantum</i>	110
Tabela 3. Identificação de mRNAs alvos da PABP1.	116
Tabela 4. Identificação de mRNAs alvos das PABPs 2 e 3.	117

Lista de Abreviaturas

Item	Definição
ACE	Elementos de controle de adenilação (<i>Adenylation control elements</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
CEP	Elementos citoplasmáticos de poliadenilação (<i>Citoplasmic elements of polyadenilation</i>)
CPFS	Fator específico de clivagem e poliadenilação (<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i>)
CstF	Fatores estimulatório de clivagem (<i>Cleavage stimulation factor</i>)
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Desoxiribonucleic acid</i>)
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
eIF	Fator de iniciação da tradução eucariótico (<i>Eukaryotic initiation factor</i>)
eRF	Fator de terminação da tradução eucariótico (<i>Eukaryotic termination factor</i>)
FAZ	Zona de junção do flagelo (<i>Flagellum Attachment Zone</i>)
GST	Glutathione S Transferase
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
LB	Luria bertani
LIT	Liver infusion tryptose
PABP	Proteína de ligação a cauda poli-A (<i>Poly(a)-binding protein</i>)
Paip	Proteína de interação com a PABP (<i>PABP-interacting protein</i>)
PARN	poli-A nuclease (<i>Poly-A nuclease</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RNA pol	RNA polimerase
RRMs	Motivos de reconhecimento de RNA (<i>RNA recognition motif</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SDS-	Gel de poliácridamida em condições desnaturantes (<i>Sodium Dodecyl</i>

PAGE	<i>Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis</i>)
PAM2	Motivo 2 de interação a PABP (<i>PABP-interacting motif 2</i>)
PAP	poli-A polimerase (<i>Poly-A polymerase</i>)
PAS	Sinal de Poliadenilação (<i>Polyadenylation Signal</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SL	Sequência <i>spliced leader</i> ou mini-éxon
snRNA	pequeno RNA nuclear (<i>small nuclear RNA</i>)
snoRNA	Pequenos RNAs nucleolares (<i>Small nucleolar RNAs</i>)
TBS	Solução salina tamponada com tris (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TE	Tampão Tris-EDTA
tRNAi	tRNA iniciador
UTR	Região não traduzível (<i>Untranslated Region</i>)
VSG	Antígeno variante de superfície (<i>Variant Surface Glycoprotein</i>)

Sumário

Resumo	v
Abstract	vi
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabela	ix
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1 Tripanossomatídeos	4
2.1.1 Gênero <i>Leishmania</i> e as leishmanioses	5
2.1.2 Ciclo biológico	8
2.2 Organização celular e genômica dos tripanossomatídeos	10
2.2.1 Organização celular dos tripanossomatídeos	10
2.2.2 Organização genômica dos tripanossomatídeos	11
2.2.3 Genoma de <i>L. major</i> e comparação com outras espécies de <i>Leishmania</i>	15
2.3 Organização gênica, transcrição e formação dos mRNAs nos tripanossomatídeos	17
2.3.1 RNA polimerase e promotores	19
2.3.2 Processamento em <i>trans</i> (<i>trans-splicing</i>) dos mRNAs	20
2.3.3 Poli-A e poliadenilação dos mRNAs	22
2.4 Controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos	24
2.4.1 Degradação de mRNAs e sua regulação	25
2.5 Proteína de ligação a cauda poli-A (PABP)	27
2.5.1 Estrutura das PABPs citoplasmáticas	28

2.5.2	Estrutura das PABPs nucleares	32
2.5.3	Modificações pós-traducionais da PABP	33
2.5.4	Regulação da tradução dos mRNAs da PABP	36
2.5.5	Principais funções associadas a PABP na síntese e processamento de mRNAs	36
2.5.5.1	Função na poliadenilação do RNA	38
2.5.5.2	Função na exportação do RNA	38
2.5.6	Papel da PABP no controle da estabilidade dos mRNAs	39
2.5.7	Papel da PABP na síntese proteica	41
2.5.7.1	Iniciação da tradução nos eucariotos e complexo eIF4	41
2.5.7.2	Modo de ação da PABP na iniciação da tradução	44
2.5.7.3	Regulação da tradução via interação PABP- PAIP-1 e PABP	47
2.6	PABPs e iniciação da síntese protéica em tripanonossomatídeos	49
2.6.1	Estudos preliminares sobre PABPs em tripanossomatídeos	49
2.6.2	Evidências sobre múltiplos complexos do tipo eIF4F na iniciação da tradução em tripanosomatídeos	51
2.6.3	Identificação de múltiplos homólogos de PABPs nos tripanosomatídeos	54
3.	Objetivos	56
3.1	Objetivo Geral	56
3.2	Objetivos Específicos	56
4.	Materiais e Métodos	57
4.1	Cultivo de parasitas e curvas de crescimento frente a inibidores	57
4.2	Imunofluorescência	58

4.3 Western-blot	59
4.4 Produção de lisados celulares	60
4.5 Imunoprecipitação	61
4.6 Amplificação e clonagem de deleções dos homólogos PABP1-3 em <i>L.major</i>	62
4.7 Expressão de proteínas recombinantes	63
4.8 Purificação de proteínas recombinantes	64
4.9 Transcrição e tradução <i>in vitro</i>	66
4.10 Ensaio de interação proteína- proteína (<i>pull-down</i>)	68
4.11 Fracionamento celular por centrifugação/ultracentrifugação em <i>L. major</i>	68
4.12 Métodos de amplificação e clonagem das PABPs de <i>L. infantum</i> superexpressa em <i>L. infantum</i>	70
4.13 Transfecção das PABPs 1, 2 e 3 fusionadas a HA em <i>L. infantum</i>	71
4.14 Ensaios de sedimentação em gradiente de sacarose	71
4.15 Imunoprecipitação utilizando anticorpo monoclonal contra HA para espectrometria	73
4.16 Imunoprecipitação seguida de RT- PCR	73
5. Resultados	76
5.1 Análise comparativa das sequências das três PABPs de <i>Leishmania</i> sp.	76
5.2 Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 de <i>Leishmania major</i>	82
5.3 Análise da expressão de isoformas da PABP1 na presença de inibidores diferentes processos associados ao metabolismo de mRNAs e proteínas	86

5.4 Análise da interação entre os homólogos de PABPs através de imunoprecipitação	88
5.5 Análise das interações entre homólogos de PABP <i>in vitro</i> e mapeamento de sítios de ligação	91
5.6 Análise das interações entre as PABPs 1, 2 e 3 e a proteína EIF4G3, homólogo do fator de iniciação da tradução eIF4G de <i>L. major</i>	94
5.7 Análise das interações entre as PABPs 1, 2 e 3 e dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E, EIF4E3 e 4, de <i>L. major</i>	98
5.8 Análise da associação de PABPs nativas com populações de mRNPs celulares em <i>L. major</i>	100
5.9 Análise da associação com polissomas de PABPs fusionadas a HA	103
5.10 Identificação de parceiros funcionais através de espectrometria de massa das PABPs	106
5.11 Identificação de RNAs alvos das PABPs	115
6. Discussão	120
7. Conclusão	128
8. Referências bibliográfica	129
9. Anexo	156
9.1 Trabalho publicado associado a Tese	156
9.2 Trabalho publicado associado a Tese	168
9.3 Manuscrito em elaboração	181

1. Introdução

A família Tripanosomatidae é formada por um grupo de eucariotos, protozoários flagelados da ordem *Kinetoplastidea*, que tem como principais gêneros o *Trypanosoma* e a *Leishmania*. Esses gêneros são de grande importância médica e veterinária por provocarem várias enfermidades de impacto mundial tais como a doença de Chagas e as diversas formas de Leishmaniose.

Os tripanosomatídeos apresentam características bioquímicas, celulares e moleculares específicas que os diferenciam dos demais eucariotos. Algumas das características são a grande conservação e sintonia entre seus genes nas diferentes espécies, o editoramento de RNAs mitocondriais e a transcrição policistronica, onde os genes são transcritos como um único e longo mRNA precursor e seu processamento é realizado pelo mecanismo de *trans splicing* onde o pré-mRNA é dividido em múltiplos mRNAs maduros representando seqüências codificadoras individuais. A transcrição policistrônica e o escasso número de promotores nestes parasitas impede uma regulação individual da síntese de mRNAs, como ocorre em outros eucariotos. Desta forma, acredita-se que boa parte dos mecanismos de regulação da sua expressão gênica ocorram em nível pós-transcricional, como durante a tradução dos mRNAs em proteínas.

Dentre as proteínas envolvidas na regulação gênica de procariotos e eucariotos a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) é uma proteína extremamente conservada e essencial para a viabilidade uma vez que participa de vários processos associados ao metabolismo dos mRNAs. Como seu nome diz, esta proteína se liga a cauda poli-A presente na extremidade 3' da grande

maioria dos mRNAs eucarióticos e media boa parte das funções associadas a esta estrutura. Entre essas podemos citar: processamento dos mRNAs precursores no núcleo; transporte núcleo-citoplasmático; controle da meia-vida e degradação dos mRNAs no citoplasma; recrutamento dos mRNAs pela maquinaria de síntese protéica e sua tradução propriamente dita.

A PABP é bem estudada em diversos organismos como mamíferos, plantas e leveduras, mas pouco ainda se sabe sobre essas proteínas em tripanossomatídeos. Diferentemente de outros organismos em *Leishmania major* foram identificados três homólogos da PABP (denominados PABP1, 2 e 3), dos quais dois são conservados nos diferentes tripanossomatídeos e um terceiro que só se apresenta nas espécies de *Leishmania*. Alguns destes homólogos de PABP já foram individualmente estudados na própria *L. major*, em *T. cruzi* e em *T. brucei*, porém nunca de forma comparativa ou visando analisar seu papel na síntese protéica.

Diante do exposto essa proteína deve apresentar-se como uma proteína importante nos processo de regulação da expressão. Desta forma, esta Tese teve como objetivo principal determinar qual(is) dos homólogos de PABP de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos participa(m) diretamente na iniciação da tradução e que particularidades na sua atividade podem ser observadas em relação ao que já se sabe em outros eucariotos. Bem como identificar novas funções associadas a estes homólogos. Também se pretende definir em que outros processos associados com o metabolismo dos mRNAs estas proteínas atuam e como os diferentes homólogos se distinguem funcionalmente.

Este trabalho mostrou que todos os homólogos de PABP possuem localização citoplasmática, porém sob condição de inibição da transcrição as

PABP2 e 3 migram para o núcleo. Ensaio de interação *in vivo* mostraram que as PABP2 e 3 são capazes de interagir entre si e que a interação é independente de RNA. Quanto a ligação aos fatores de iniciação da tradução EIF4G3, EIF4E3 e EIF4E4 foi observado que dentre os homólogos de PABP apenas PABP1 parece se ligar. No mais a análise do perfil polissomal mostrou que todas as PABPs devem estar envolvidas na tradução, porém de RNAs alvos distintos.

Mediante ao exposto nossos resultados mostram que estes homólogos devem apresentar funções divergentes dentro da célula, alguns deles únicos nos tripanossomatídeos, e reforça um papel mais ativo da PABP1 na tradução uma vez de sua ligação ao homólogo do eIF4G.

2. Revisão da Literatura

2.1 Tripanosomatídeos

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados que compreendem parasitas de vários grupos de vertebrados, invertebrados e até mesmo plantas (Simpson *et al.*, 2006). Pertencem a ordem Kinetoplastida a qual é representada por 9 gêneros distintos (*Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Wallaceina*, *Leptomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Phytomonas*), classificados de acordo com suas características morfológicas bem como sua interação com os hospedeiros. Este grupo de protozoários se distinguem por possuírem uma região rica em DNA presente em sua mitocôndria única denominada cinetoplasto. Entre outras peculiaridades ao nível de sua biologia destacam-se: o complexo de edição dos mRNAs mitocondriais; o processamento em *trans* de todos os transcritos de mRNAs citoplasmáticos (*trans-splicing*); a disposição e transcrição de genes em grandes unidades policistrônicas; modificações de nucleotídeos; compartimentalização da glicólise; e a capacidade de evasão do sistema imune através de variações na antigenicidade de sua superfície (Hannaert *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2003; Simpson *et al.*, 2004; Lukes *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Besteiro *et al.*, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005).

Dentre os gêneros de tripanossomatídeos destacam-se os *Leishmania* e *Trypanosoma* por apresentarem importância médica e veterinária de impacto mundial causando doenças tais como as várias formas de Leishmaniose (*Leishmania sp.*), a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e a Doença do Sono

(*Trypanosoma brucei*). Estes protozoários possuem uma organização genômica, estruturas celulares, e processos biológicos semelhantes, porém apresentam diferenças morfológicas significantes em seu ciclo de vida, visto que habitam nichos biológicos diferentes e são transmitidos por diferentes insetos vetores (Stuart *et al.*, 2008).

2.1.1 Gênero *Leishmania* e as leishmanioses

O gênero *Leishmania* é representado por mais de 20 espécies responsáveis pelo grupo de doenças denominadas de leishmanioses. A transmissão é feita por cerca de 30 espécies de flebotomíneos, insetos dípteros pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya*, sendo os parasitas capazes de se multiplicar em vários hospedeiros mamíferos (Figura 1). As espécies de *Leishmania* apresentam então um ciclo de vida digenético com duas formas vegetativas diferentes: a forma extracelular móvel, promastigota, que é encontrada no vetor invertebrado e a forma obrigatoriamente intracelular, amastigota, capaz de se multiplicar em vários hospedeiros vertebrados, infectando células da linhagem fagocítica. A forma promastigota é dividida em várias formas de desenvolvimento conhecidas como promastigotas procíclica, nectomona, leptomona, haptomona, paramastigota e metacíclica. Na sua forma metacíclica o parasita tem sido descrito como pequeno, com um flagelo relativamente grande, aparecendo em maior número em cultura na fase estacionária. Esta forma caracteriza a fase infectante da *Leishmania*, embora as formas promastigota procíclica e amastigota também sejam capazes de infectar o

hospedeiro (Teixeira *et al.*, 2002). A forma procíclica é considerada uma célula ovóide, bastante móvel e que possui atividade replicativa. As formas promastigotas possuem uma variabilidade muito grande nas suas dimensões, variando entre 10-20 μm de diâmetro. Já a forma amastigota intracelular é arredondada, apresenta um flagelo pequeno, o qual não emerge da bolsa flagelar, e possui aproximadamente de 3-7 μm de diâmetro (Awasthi *et al.*, 2004) (Figura 2).



Figura 1. Vetores invertebrados da leishmaniose. Em (A) o inseto do gênero *Phlebotomus* transmissor da doença no Velho Mundo e em (B) o gênero *Lutzomyia*, transmissor da doença no Novo Mundo. Fonte: http://www.who.int/Leishmaniasis/disease_epidemiology/en/index.html

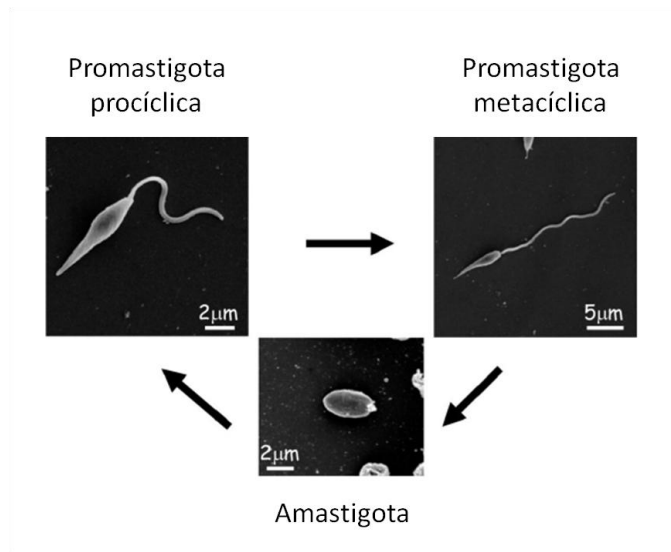


Figura 2. Formas evolutivas do gênero *Leishmania*. Nos painéis superiores se encontra a forma promastigota encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, onde o painel da esquerda é a forma procíclica e o painel da direita a forma metacíclica. No painel inferior se encontra a forma amastigota presente no hospedeiro vertebrado. Fonte: Modificada de Besteiro *et al.*, 2007.

De uma maneira geral as leishmanioses podem ser divididas em dois grandes grupos: tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar tem uma grande variedade de formas as quais podem ser agrupadas em leishmaniose cutânea, caracterizada por lesões na pele de cura espontânea ou que podem se tornar crônicas; leishmaniose mucocutânea, caracterizada por lesões ulcerativas e destruição da mucosa; leishmaniose cutânea difusa, caracterizada por lesões nodulares as quais não são ulcerativas nem se disseminam. Já a forma visceral é crônica e progressiva e afeta vários órgãos que incluem o baço, fígado, medula óssea e linfonodos.

As leishmanioses são encontradas em 88 países, com 12 milhões de pessoas sendo acometidas nas suas diferentes formas. A cada ano surgem 2 milhões de casos novos com 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco.

Esta doença se encontra largamente distribuída nos trópicos e subtropicais se estendendo desde a América Central e do Sul até os países mediterrâneos, África, Ásia central, Índia e China. Segundo dados da OMS, 90% das infecções de leishmaniose tegumentar se desenvolvem no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Brasil e Peru; 90% das infecções de leishmaniose visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil.

2.1.2 Ciclo biológico

As espécies de *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida o qual envolve diferentes formas de desenvolvimento como resultado das diferentes condições ambientais as quais são submetidas dentro de seus dois hospedeiros. Seu ciclo biológico tem início quando os flebotomíneos infectados picam e inoculam as formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro vertebrado. No local da inoculação estas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos tissulares, denominados fagossomos. Para que isso ocorra as formas promastigotas fazem uso de mecanismos que as permitem resistir à ação de elementos presentes no sangue, principalmente o sistema do complemento, e estimulam sua adesão aos macrófagos e sua endocitose por essas células. Moléculas de superfície das promastigotas, como a GP63 (glicoproteína de 63 kDa) e LPG (complexo glicofosfoglicano) são consideradas importantes nestes processos (Lodge and Descoteaux, 2005; Roberts *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006). Após a interiorização, o macrófago promove a fusão dos lisossomos com o fagossomo formando o fagolisossomo (Amer and Swanson,

2002;Cunningham, 2002;Sacks and Kamhawi, 2001). Para sua adaptação às condições do novo ambiente, o parasita sofre a transformação para a forma amastigota. Esta forma também é acidófila, bem adaptada ao baixo pH destes compartimentos. O estágio de vida amastigota dentro do mamífero pode persistir por vários meses ou anos, resultando na doença, entretanto o parasita pode ficar latente por décadas ou até pela vida inteira do hospedeiro mamífero (Aebischer, 1994). As formas amastigotas se multiplicam intensamente por divisão binária até que provocam o rompimento do macrófago, caindo no espaço intercelular, vindo a serem fagocitadas por novos macrófagos e células do Sistema Fagocítico Mononuclear (Figura 3)

Durante o repasto sanguíneo sobre o hospedeiro vertebrado o vetor flebótomo não contaminado ingere as formas amastigotas de *Leishmania*. Dentro do tubo digestivo do inseto, no intestino médio, estas células, protegidas pela matriz peritrófica, irão permanecer por um período de quatro horas até três dias. Em seguida, a matriz peritrófica se degenera e as células de *Leishmania*, já diferenciadas em promastigotas procíclicas, migram para o segmento anterior do tubo digestivo onde sofrem mais divisões e diferenciação, tornando-se promastigotas metacíclicas infectantes. Os parasitos então migram para a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal. O tempo aproximado para completar o desenvolvimento no inseto é de sete a dez dias, dependendo da espécie (Wilson *et al.*, 2010).

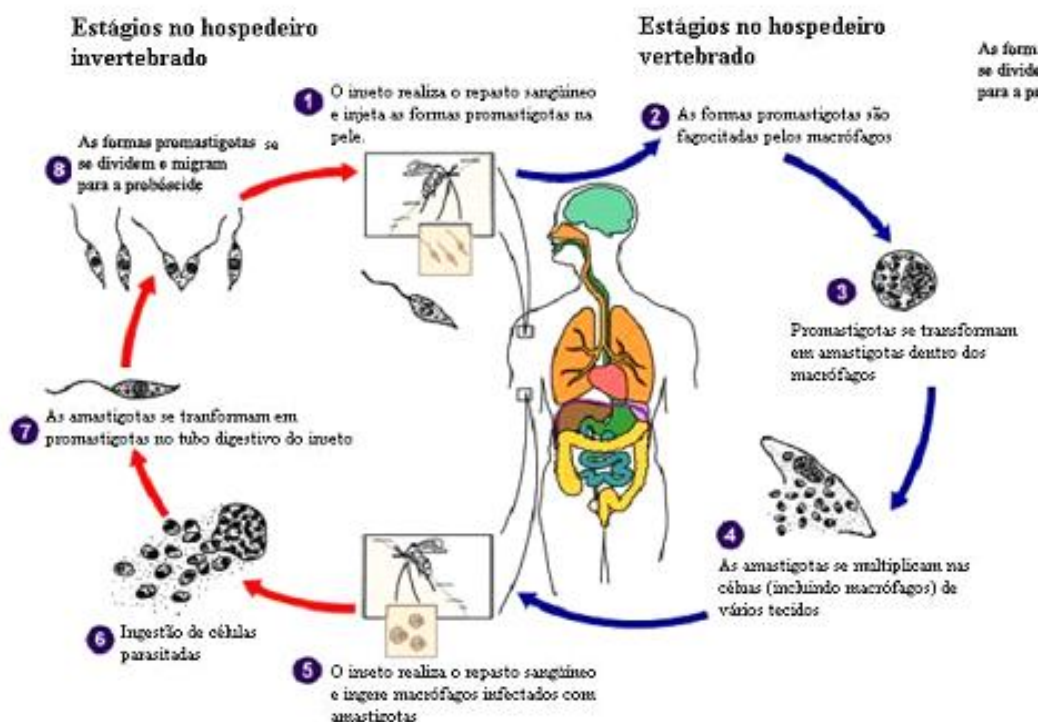


Figura 3. Resumo do ciclo de vida da *Leishmania sp.*, demonstrando a transmissão do parasita do hospedeiro invertebrado para o vertebrado e suas respectivas formas morfológicas. Fonte: Figura adaptada de [http:// www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.htm).

2.2 Organização celular e genômica dos tripanossomatídeos

2.2.1 Organização celular dos tripanossomatídeos.

A forma celular dos tripanossomatídeos é definida por uma gaiola de microtúbulos subpeliculares organizadas em arranjo de hélices ao longo do eixo longitudinal da célula (Gull, 1999; Price *et al.*, 2003). Um único flagelo reside anexado ao corpo celular através da zona de junção do flagelo ou FAZ (do inglês *Flagellum Attachment Zone*) localizado no bolso flagelar (do inglês *Flagellar*

Pocket). Junto à zona de junção do flagelo está localizado o corpo basal (importante para a divisão celular) e próximo a ele reside o cinetoplasto, localizado dentro de uma grande mitocôndria que percorre quase todo corpo celular (McKean, 2003). Os tripanossomatídeos possuem organelas especializadas para metabolização da glicose, os glicossomos (revisado por Michels *et al.*, 2000), e um núcleo localizado no centro da célula (Ogbadoyi *et al.*, 2000) (Figura 4). Também estão presentes no citoplasma o megassomo (compartimento da via endocítica), retículo endoplasmático liso e rugoso, e o complexo de Golgi.

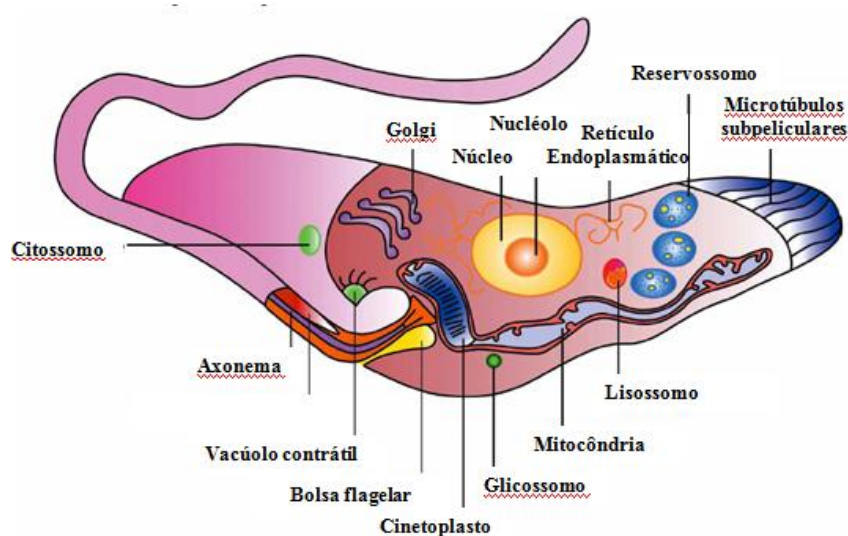


Figura 4. Representação esquemática da forma típica dos tripanossomatídeos, destacando estruturas como núcleo, cinetoplasto, bolsa flagelar, corpo basal e pro-basal, flagelo, complexo de golgi, lisossomos, endossomos, mitocôndria, microtúbulos, glicossomos. Figura modificada de Lopes *et al.*, 2010

2.2.2 Organização genômica dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos divergiram muito cedo da linhagem evolutiva dos eucariotos, o que explica suas várias características únicas, como os já citados edição de mRNAs mitocondriais, a transcrição policistrônica e o *trans-splicing*. Mesmo tendo divergido entre si há cerca de 200-500 milhões de anos, os genomas dos protozoários *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, referidos como TriTryps, apresentam uma notável conservação na organização dos genes (sintenia) (Ghedini *et al.*, 2004), assim como um grande número de genes em comum (El-Sayed *et al.*, 2005; Kissinger, 2006; Ginger, 2005). A publicação dos genomas dos TriTryps foi de extrema importância e relevância por impulsionar pesquisas que permitem a compreensão da biologia destes protozoários, além de facilitar o desenvolvimento de testes de diagnósticos e vacinas (Kissinger, 2006).

Os genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* possuem tamanhos variados de 25, 55, 33 megabases (Mb), respectivamente, sendo que a grande diferença de tamanho encontrada no genoma de *T. cruzi* devida ao grande número de sequências repetitivas (cerca de 50%), tais como retrotransposons, sequências teloméricas e famílias gênicas de proteínas de superfície (El-Sayed *et al.*, 2005). O *T. brucei* possui seus genes distribuídos ao longo dos seus 11 megacromossomos, e o *T. cruzi* e a *L. major* possuem os genes distribuídos em aproximadamente 28 e 36 pares de cromossomo menores, respectivamente. Foi possível observar que a maior parte dos rearranjos nos blocos sintênicos representa inversões e/ou translocações e em *T. brucei* parece ter havido um grande número de fusões cromossômicas o que explicaria seu menor número

cromossômico. Dos 36 pares de cromossomos de *L. major*, 20 parecem ser completamente sintênicos a regiões correspondentes nos megacromossomos de *T. brucei* (Figura 5). Apesar desta alta conservação sintênica entre *L. major* e as espécies de *Trypanossoma*, a organização nas extremidades dos cromossomos (telômeros) é distinta contendo sequências pequenas e regiões subteloméricas conservadas margeando as sequências repetitivas que precedem os telômeros (Ivens *et al.*, 2005).

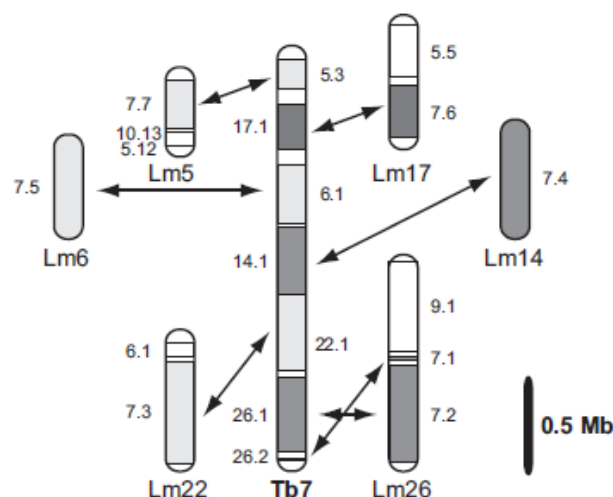


Figura 5. Representação mostrando a alta sintenia entre os cromossomos de *L. major* e *T. brucei*. Como exemplo pode-se ver o cromossomo 7 de *T. brucei*, que contém cerca de 7 blocos sintênicos com cromossomos de *L. major*. Figura modificada de Ginger, 2005.

Análises dos três genomas dos TriTryps revelaram a existência de 6158 grupamentos gênicos ortólogos comuns aos três patógenos. Apesar do alto grau de conservação entre as três espécies, foram encontrados 910 genes específicos de *L. major*, 1392 genes específicos de *T. brucei* e 3736 genes exclusivos de *T. cruzi*. Quando comparadas as três espécies foram encontrados 74 grupos de

genes exclusivos de *L. major* e *T. brucei*, 482 genes exclusivos de *L. major* e *T. cruzi* e 458 genes exclusivos de *T. brucei* e *T. cruzi* (Kissinger, 2006). Especula-se que o alto grau de conservação genômica entre os diferentes tripanosomatídeos seja devido a algum tipo de pressão seletiva que deve restringir o rearranjo dos genes, tais como a incidência relativamente baixa de recombinação sexual, a organização policistrônica ou a replicação, porém a razão de tal fenômeno ainda não está bem clara (El-Sayed *et al.*, 2005; Ghedin *et al.*, 2004). Interessantemente 43% das quebras de sintenia entre *T. brucei* e *L. major* ocorrem muito perto ou dentro das regiões de troca de fita que separa grupos de genes direcionais, outra característica única dos genomas de tripanossomatídeos (Figura 6).

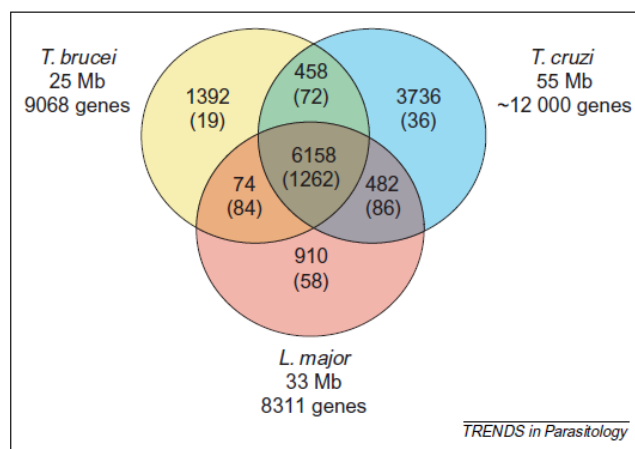


Figura 6. Diagrama mostrando os tamanhos dos genomas e a distribuição dos grupamentos de genes ortólogos entre três espécies de tripanossomatídeos: *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Figura modificada de Kissinger, 2006.

Com relação ao grau de identidade ao nível de sequência de aminoácidos entre as proteínas das três espécies dos TriTryps, foi observada uma média de

57% de identidade entre *T. brucei* e *T. cruzi*, enquanto que em *L. major*, quando comparado com as duas espécies de *Trypanosoma*, se observou cerca de 44% de identidade, refletindo assim suas relações filogenéticas (El-Sayed *et al.*, 2005). Já quando comparados os 1617 domínios protéicos encontrados, revelou-se que poucos deles (cerca de 5%) são exclusivos de uma única espécie. No geral estes dados mostram que apesar da maioria dos genes estar presente em um mesmo contexto genômico, existem diferenças substanciais as quais devem refletir as adaptações espécie-específicas às distintas pressões de seleção e às diferentes estratégias de sobrevivência destes organismos (El-Sayed *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005).

2.2.3 Genoma de *L. major* e comparação com outras espécies de *Leishmania*

Para o sequenciamento da *L. major* foi utilizada a cepa MHOM/IL/81/Friedlin cujo genoma consistiu de $3,28 \times 10^7$ pares de base, organizados em cromossomos que se caracterizam pela presença de regiões repetitivas nos telômeros, contrastando com o *T. brucei* e *T. cruzi*. Apesar de o genoma ser parcialmente aneuplóide e possuir três grandes diferenças alélicas, é encontrado um pequeno número de polimorfismo de sequências (<0,1%), novamente contrastando com o que foi observado para os genomas de *T. brucei* e *T. cruzi* (Ivens *et al.*, 2005). A análise das sequências de *L. major* mostrou que os genes exclusivos de *Leishmania* se encontram distribuídos randomicamente no genoma do parasita, ao invés de concentrados em regiões subteloméricas ou em

pontos adjacentes as regiões de troca de fita e pontos de quebra de sentença, como observado para os outros tripanosomatídeos. Estes genes devem ser responsáveis por diferenças metabólicas entre as espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, porém a maioria (68%) ainda não possui função conhecida (revisado em El-Sayed *et al.*, 2005).

Com o advento do sequenciamento de duas outras espécies de *Leishmania*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, foi possível fazer uma comparação entre os três genomas dentro do mesmo gênero. As espécies de *L. major* e *L. infantum*, encontradas no Velho mundo, possuem 36 cromossomos enquanto a *L. braziliensis*, de origem americana, possui apenas 35 cromossomos, provavelmente devido à fusão entre os cromossomos 20 e 34 (Smith *et al.*, 2007). Estima-se que a divergência entre as espécies de *Leishmania* tenha ocorrido há cerca de 20-100 milhões de anos e, apesar da grande distância evolutiva, o grau de conservação gênica é superior a 99%. A conservação ao nível de sequências codificadoras de proteínas também é alta e, dos aproximadamente 8.300 genes em comum, apenas cerca de 200 são diferencialmente distribuídos nas três espécies, tendo a *L. braziliensis* 47 genes ausentes nas outras espécies, enquanto que *L. infantum* tem 27 genes específicos e *L. major* apenas 5. Destes aproximadamente 200 genes, apenas 34% apresentam funções que podem ser anotadas com base na procura de similaridade de sequências ou domínios protéicos com os de organismos já anotados (Peacock *et al.*, 2007; Rochette *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2007) (Figura 7).

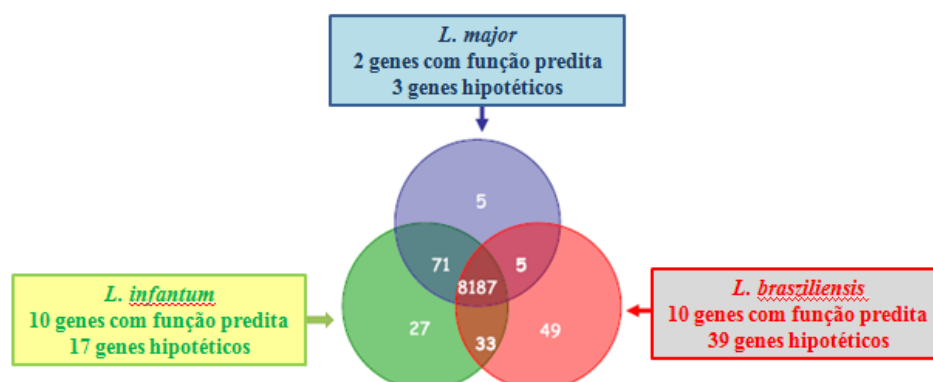


Figura 7. Diagrama mostrando genes espécies específicos encontrados nas três espécies de *Leishmania*: *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*. Pode-se observar que 8187 genes são comuns às três espécies. Figura modificada de Smith *et al.*, 2007.

2.3 Organização gênica, transcrição e formação dos mRNAs nos tripanossomatídeos

Em *Leishmania*, como em outros tripanossomatídeos, foi observado uma combinação não usual de mecanismos de expressão gênica, onde a síntese e maturação dos mRNAs diferem dos processos encontrados na maioria dos eucariotos. A partir de estudos utilizando o cromossomo 1 de *L. major* foi observado pela primeira vez que as sequências codificadoras de proteínas se encontram reunidas em grupos contíguos que seguem a mesma orientação dentro de uma mesma fita de DNA (Myler *et al.*, 1999). Esse arranjo de genes nos tripanossomatídeos se assemelha em alguns pontos aos conhecidos operons bacterianos, devido a terem seus genes transcritos em unidades policistrônicas, onde uma única região promotora é utilizada na transcrição de múltiplos genes.

Assim como em procariotos, os genes dos tripanossomatídeos em sua grande maioria não possuem íntrons, com apenas quatro exceções identificadas (Ivens *et al.*, 2005). A maioria dos genes que codificam proteínas é transcrito como unidades policistrônicas, e os mRNAs maduros são gerados a partir do transcrito policistrônico primário através do mecanismo de *trans-splicing* ou processamento em *trans* (Ullu and Tschudi, 1993; Matthews *et al.*, 1994), o qual será discutido a seguir. Porém, diferentemente do que ocorre nos operons bacterianos e nos nemátodos as unidades policistrônicas dos tripanossomatídeos não codificam genes funcionalmente relacionados (Campbell *et al.*, 2003).

Nos tripanossomatídeos os grupos de genes contíguos são separados por sequências pequenas de 1-13 kb chamadas de regiões de trocas de fita (do inglês *strand switches*) (Ivens *et al.*, 2005; Martinez-Calvillo *et al.*, 2004) as quais devem ser responsáveis por direcionar a transcrição. A maioria dos cromossomos contém pelo menos dois grupos de genes contíguos precedidos de regiões de troca de fita, enquanto um conjunto de genes esta sendo transcrito em direção ao telômeros (sentido divergente) numa das fitas do DNA o outro começa a ser transcrito na direção oposta (sentido convergente) na outra fita de DNA e a finalização da transcrição vai ocorrer ao final dos grupos, onde geralmente se co-localizam os genes para tRNA, rRNA e ou snRNA (Ivens *et al.*, 2005; Palenchar and Bellofatto, 2006) (Figura 8).

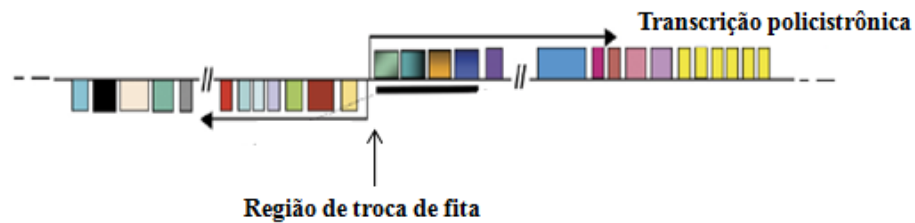


Figura 8. Transcrição poliscistrônica nos tripanossomatídeos. Blocos gênicos não relacionados estão agrupados em fitas distintas do DNA e são bidirecionalmente transcritos pela ação da RNA polimerase II (RNAPII), a partir de regiões de troca de fita. Figura modificada de Haile and Papadopoulos, 2007.

2.3.1 RNA polimerase e promotores

Assim como nos outros eucariotos, nos tripanossomatídeos são encontradas quatro classes diferentes de RNA polimerases: RNA pol I, RNA pol II e RNA pol III, com localização nuclear, além de uma RNA polimerase encontrada na mitocôndria. Cada uma das classes de polimerases possui várias subunidades e são responsáveis pela transcrição de diferentes tipos de RNAs. A RNA pol I está envolvida na transcrição dos rRNAs (18S, 5.8S, 28S) e de genes que codificam proteínas de superfície estágio específico, tais como as prociclinas e VSGs de *T. brucei*; a RNA pol II transcreve genes codificantes de proteínas, pequenos RNA nucleolares (snoRNA) e o RNA da *spliced leader*; enquanto que a RNA pol III é responsável pela transcrição dos tRNAs, do rRNA 5S e alguns pequenos RNAs nucleares (snRNA); já a RNA pol mitocondrial é responsável pela

transcrição dos mRNAs mitocondriais (Campbell *et al.*, 2003; Palenchar and Bellofatto, 2006).

Apesar de homólogos para todas as subunidades da RNA pol II eucariótica estarem presentes, o mesmo não foi observado para vários dos homólogos dos fatores basais de transcrição (Ivens *et al.*, 2005; Martinez-Calvillo *et al.*, 2007; Martinez-Calvillo *et al.*, 2010). Essa ausência leva a várias interpretações: formas divergentes desses fatores devem estar presentes; proteínas específicas nos tripanossomatídeos possuem papel equivalente aos fatores de transcrição eucarióticos e por fim a ausência de regulação transcricional elimina a necessidade desses fatores.

Promotores para as RNA pol I e pol III já estão bem definidos (Laufer and Gunzl, 2001; Laufer *et al.*, 1999). No entanto, com exceção de um promotor conhecido para a RNA pol II, associado à transcrição do mini-éxon (SL RNA) (Gilinger and Bellofatto, 2001), não foi possível identificar sequências promotoras consenso nas regiões flangeadoras dos genes codificadores de proteínas.

2.3.2 Processamento em *trans* (*trans-splicing*) dos mRNAs

O mecanismo de *trans-splicing* foi identificado pela primeira vez em *T. brucei* em mRNAs que codificam para as suas proteínas variáveis de superfície (VSG). Nestes mRNAs foi observada a presença de uma sequência de aproximadamente 39 nucleotídeos em sua extremidade 5', a qual não se encontrava codificada nos respectivos genes (Boothroyd and Cross, 1982; Van der Ploeg *et al.*, 1982). Estudos de expressão mostraram que esta sequência,

denominada de *spliced leader* (SL) (De Lange *et al.*, 1984; Parsons *et al.*, 1984), era proveniente da extremidade 5' de um segundo RNA, que pode variar de 85 a 140 nucleotídeos, o qual ficou conhecido como SL RNA. Uma característica da sequência SL é a presença de uma estrutura cap modificada que diferentemente da estrutura cap universalmente conservada (7-metil guanossina) em eucariotos possui os primeiros quatro nucleotídeos da sequência SL modificados por metilação. Este cap modificado não usual é conhecido como estrutura cap-4, e é a estrutura cap com maior número de modificações conhecidas entre as células eucarióticas (Bangs *et al.*, 1992; Gunzl, 2010).

O mecanismo de *trans-splicing* se dá através de duas reações de transesterificação, onde o sítio GU doador presente no RNA SL precursor fundiona-se a uma região próxima ao sítio AG receptor do mRNA policistrônico, denominado ponto de ramificação, formando uma estrutura em forma de Y, ao contrário do típico laço encontrado nas reações de processamento ou *splicing* convencional (*cis-splicing*). Esse sinal é reconhecido pelo complexo de processamento (spliceossomo) encontrado nestes protozoários, sendo as estruturas intermediárias removidas e a sequência SL fusionada a extremidade 5' de cada mRNA. O sinal aceitor para o processamento no pré-mRNA propriamente é o dinucleotídeo AG quando localizado imediatamente após uma região rica em pirimidinas (Benz *et al.*, 2005) (Figura 9). Cerca de 50 subunidades do complexo de processamento já foram descritas para os tripanossomatídeos (Ambrosio *et al.*, 2004).

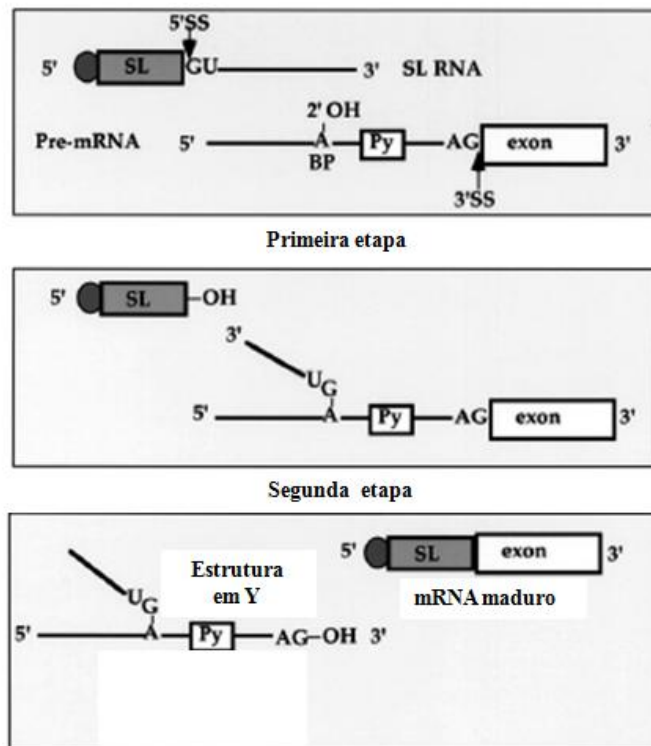


Figura 9. Representação esquemática do *trans-splicing*. A figura mostra o sítio 5' acceptor de *splicing* (GU) no SL-RNA, o sítio 3' acceptor (AG) e o ponto de ramificação (BP), seguido do trato polimirimídico (Py) nos pré-mRNAs. O pré-mRNA recebe então a sequência SL tornando o mRNA maduro. Figura modificada de Liang *et al.*, 2003.

2.3.3 Poli-A e poliadenilação dos mRNAs

A adição de uma cauda poli-A é necessária para se completar o processamento da grande maioria dos mRNAs eucarióticos. Diferentemente do que ocorre em outros eucariotos alguns trabalhos sugerem que o *trans-splicing* e a poliadenilação nos tripanosomatídeos são eventos dependentes que ocorrem concomitantemente e imediatamente após a transcrição, uma vez que a inibição do *trans-splicing* de um mRNA impede o processamento da extremidade 3' do

mRNA anterior (Ullu and Tschudi, 1993;Liang *et al.*, 2003). Para uma melhor compreensão de cada um, entretanto, aqui os dois processos serão discutidos separadamente.

O processamento da extremidade 3' dos mRNAs nos tripanossomatídeos não se encontra bem caracterizado, porém nos eucariotos em geral o mesmo ocorre em duas reações sucessivas: primeiro ocorre a clivagem endonucleolítica em sítios específicos na extremidade 3' não traduzível (UTR – do inglês *untranslated region*), entre esses sítios podemos citar a sequência consenso de eucariotos AAUAAA (PAS – sinal de poliadenilação) (Zhao *et al.*, 1999). Numa segunda etapa a enzima poli-A polimerase (PAP) inicia a formação da cauda poli-A pela adição consecutiva de adeninas na extremidade 3' OH do mRNA, auxiliada pela proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) nuclear que se liga quando esta cauda tem cerca de 10 resíduos de adenosina, e aumenta a afinidade da PAP pelo RNA (Kerwitz *et al.*, 2003). Ambas as reações são realizadas por um grande número de proteínas, as quais são conservadas desde leveduras a eucariotos. Dentre estas podemos citar os fatores de clivagem (Im, Ilm), fatores estimulatório de clivagem (CstF) e o fator específico de clivagem e poliadenilação (CPSF) para a etapa de clivagem e a poli-A polimerase (PAP), a PABP e a FIP1 (proteína de ligação a PAP) para a etapa de poliadenilação (Mandel *et al.*, 2008).

Nos tripanossomatídeos não são encontradas sequências específicas como o sinal de poliadenilação AAUAAA. Ao invés disso, a poliadenilação ocorre a uma distância fixa (100-400nt) após o sinal de processamento (LeBowitz *et al.*, 1993;Matthews *et al.*, 1994). Assim, o mesmo trato polipirimídico usado como sinal nas reações de *trans-splicing*, presente nas regiões intergênicas, parece

funcionar como sinal para a poliadenilação e possui papel fundamental no acoplamento desses processos, uma vez que mutações geradas nestes leva a sítios de poli-A aberrantes (Liang *et al.*, 2003; Hug *et al.*, 1994). Nesse contexto, a distância entre a região rica em pirimidinas e o sítio acceptor de consenso AG para o *trans-splicing* têm influência sobre a adição da cauda poli-A.

2.4 Controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos

Atualmente acredita-se que os tripanossomatídeos tenham perdido a capacidade de regular a expressão dos genes codificantes de proteínas ao nível de transcrição, uma vez que possuem transcrição policistrônica, faltam promotores clássicos para a transcrição de mRNAs pela RNA pol II e o seu genoma codifica poucos fatores de transcrição (Campbell *et al.*, 2003). Foi proposto assim que a RNA pol II transcreva os genes constitutivamente em pré-mRNAs policistrônicos extensos, e só então se dê o controle da expressão gênica. O perfil global de expressão de proteínas durante o desenvolvimento e a mudança entre os hospedeiros demonstra que vários genes são regulados diferentemente: sendo 2 a 9% modulados a nível de RNA (principalmente pela estabilidade dos mRNAs) e 12 a 18% regulados a nível de proteína, seja durante a tradução ou após a mesma (revisto por (Haile and Papadopoulos, 2007). A falta de controle da transcrição revela a importância de processos pós-transcricionais na regulação da expressão gênica. Estes processos agiriam por meio das diferentes etapas da maturação dos mRNAs, como *trans-splicing* e a

poliadenilação, e também a nível de controle de sua estabilidade e/ou tradução em proteínas (Clayton and Shapira, 2007).

2.4.1 Degradação de mRNAs e sua regulação

Nos eucariotos em geral a degradação dos mRNA poliadenilados ocorre através de dois mecanismos distintos. O primeiro se inicia pela deadenilação dos mRNAs, no qual a enzima poli-A nuclease remove a cauda poli-A presente na sua extremidade 3', seguida pela remoção do *cap* na extremidade 5' pelo complexo de proteínas Dcp1 e Dcp2 e pela helicase Dhh1, e por fim a degradação do mRNA no sentido 5'-3' pela enzima Xrn1 (Tucker and Parker, 2000; Mitchell and Tollervey, 2001; Wilusz *et al.*, 2001; Parker and Song, 2004). Diversas deadenilases já foram encontradas em diversos organismos, tais como a poli-A nuclease (PARN) em mamíferos, o complexo Pan2/Pan3 e o complexo Ccr4/Caf1/Not em leveduras. Um segundo mecanismo pode ocorrer em alguns tipos de mRNA que precisam ser rapidamente degradados e requer a ação do exossomo, um complexo de 11 proteínas com diversas funções na degradação dos mRNAs (Buttner *et al.*, 2006). Neste caso os mRNAs alvos contêm elementos ricos em AU (AREs) em sua extremidade 3' UTR. Várias proteínas regulatórias se ligam a estes elementos estabilizando ou desestabilizando o mRNA através da inibição ou não da deadenilação. Em seguida a deadenilação ocorre a degradação propriamente dos mRNAs no sentido 3'-5' (Mukherjee *et al.*, 2002; van and Parker, 2002), resultando em um pequeno RNA capeado que é logo processado (Wang and Kiledjian, 2001).

Nos tripanossomatídeos o modelo para degradação de mRNAs envolve também duas vias distintas (Clayton and Shapira, 2007). O primeiro mecanismo é rápido, independente de eventos de deadenilação e parece ocorrer em mRNAs estágio-específico instáveis, e sua regulação deve envolver mecanismos parasito-específicos. Já o segundo mecanismo é constitutivo, dependente de deadenilação e atua com cinética inferior durante a degradação de mRNAs estáveis e provavelmente de uma subpopulação de mRNAs instáveis (Haile and Papadopoulos, 2007).

Estudos utilizando extratos de tripanossomatídeos demonstraram atividade de deadenilação durante a degradação de RNAs *in vivo*. Foram identificados vários homólogos das enzimas utilizadas na degradação em leveduras e mamíferos. Entre eles foram encontrados três possíveis homólogos da PARN, um homólogo para a Pan2 e Pan3 e alguns componentes do complexo NOT. A Pan2 e Pan3 e o complexo CAF/NOT são necessários para o crescimento normal destes parasitas, sendo o complexo CAF/NOT a principal deadenilase para a maioria dos mRNAs de tripanossomatídeos. Não foi identificado nenhum homólogo para as proteínas Dcp1 e Dcp2, porém a atividade de remoção do *cap* foi evidenciada em *L. seymori* (Milone *et al.*, 2002). Em relação à enzima responsável pela degradação 3'-5' Xrn1 foram encontrados quatro homólogos, dos quais apenas para o primeiro se confirmou um papel na degradação de mRNAs (Li *et al.*, 2006).

2.5 Proteína de Ligação a cauda poli-A (PABP)

Proteínas de ligação a cauda poli-A (PABPs), como seu nome diz, são as principais proteínas responsáveis pelo reconhecimento específico da cauda poli-A presente na extremidade 3' dos mRNAs eucarióticos, mediando sua função em diferentes processos celulares relacionados a seu metabolismo, tais como: processamento de pré-mRNAs (Amrani *et al.*, 1997; Minvielle-Sebastia *et al.*, 1997; Wang and Grumet, 2004) transporte de mRNAs maduros do núcleo para o citoplasma (Wang and Grumet, 2004); regulação de estabilidade dos mRNAs (Caponigro and Parker, 1996; Coller *et al.*, 1998; Wang and Grumet, 2004); iniciação e terminação da tradução (Jacobson and Peltz, 1996; Gallie, 1998; Otero *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2000; Wang and Grumet, 2004; Sachs *et al.*, 1997).

Até o momento dois grupos distintos de PABP foram identificados em vertebrados, a PABP citoplasmática (PABPC ou simplesmente PABP) e a PABP nuclear (PABPN) classificadas baseado na sua localização intracelular e em estudos de filogenia. Estes dois grupos diferem em sua estrutura e funções, sendo a PABPC com função geralmente na tradução e regulação de estabilidade dos mRNA e a PABPN com estrutura divergente do primeiro grupo, com função na poliadenilação e na maturação de pré-mRNAs (Bienroth *et al.*, 1993; Wahle, 1995a; Wahle, 1995b). Vários genes que codificam para as PABPs citoplasmáticas já foram encontrados em diversos organismos. Em metazoários temos a PABPC1 (Blobel, 1973), também chamada de PABP1 em humanos e ratos ou PABPC em *Xenopus* (Mangus *et al.*, 2004; Kuhn and Wahle, 2004), sendo a mais estudada e protótipo do grupo; a PABP embrionária (ePABP) (Voeltz *et al.*, 2001; Seli *et al.*,

2005), encontrada em oócitos e embriões; a ePABP2 descrita em *Xenopus* e ratos (Cosson *et al.*, 2004; Good *et al.*, 2004); a PABP induzível (iPABP ou PABPC4), descrita em células T de humanos (Yang *et al.*, 1995); uma PABP específica de testículo (tPABP; PABPC2/PABPC3) identificada em humanos (Feral *et al.*, 2001) e ratos (Kleene *et al.*, 1994); e a PABP5, estruturalmente distinta das demais, encontrada no cromossomo X de humanos e ratos (Blanco *et al.*, 2001). Alguns estudos mostram que a PABP1 e a PABPC4 são abundantemente expressas, enquanto os outros membros da família parecem ter expressão restrita a tecidos específicos (Brook *et al.*, 2009).

Já o segundo grupo tem como protótipo a PABII, descrita pela primeira vez em mamíferos e hoje denominada PABPN1 (Kuhn and Wahle, 2004; Wahle, 1991). Esta é codificada por um único gene o qual já foi identificado em diversos organismos, dentre eles *Drosophila* e leveduras de fissão (Pab2) e foi demonstrado que possui papel importante na poliadenilação dos mRNAs (Kuhn and Wahle, 2004)

2.5.1 Estrutura das PABPs citoplasmáticas

A estrutura da PABP citoplasmática canônica pode ser dividida em: uma porção N-terminal, constituída de quatro domínios de ligação ao RNA altamente conservados (RRMs de *RNA recognition motifs*); e uma extremidade C-terminal variável contendo um domínio de interação proteína-proteína também conservado (PABC) (Kuhn and Wahle, 2004) (Figura 10). Os RRM's presentes na região N-terminal diferem em suas especificidades de ligação ao RNA e à proteínas, sendo

os dois primeiros RRM's responsáveis pela ligação específica ao poli-A (Kahvejian *et al.*, 2001; Sachs *et al.*, 1987; Kuhn and Pieler, 1996; Deardorff and Sachs, 1997; Mangus *et al.*, 2003) e o RRM2 responsável pela ligação ao fator de iniciação da tradução eIF4G (Imataka *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1999; Kessler and Sachs, 1998). Os outros dois RRM (3 e 4) estão envolvidos na ligação a sequências não poli-A e ricas em AU (Burd *et al.*, 1991; Sladic *et al.*, 2004). Em levedura foi descrito que a primeira metade do RRM4 é suficiente para conferir a viabilidade de células com o gene PABP normal depletado (Sachs *et al.*, 1987). A cristalografia de um fragmento de cerca de 190 aminoácidos da PABP humana, correspondente aos RRM's 1 e 2, ligado a um RNA poliadenilado (A11) mostrou o que o RRM consiste um domínio globular composto de quatro fitas betas antiparalelas e duas duplas hélices. As duas fitas centrais de cada RRM possuem dois motivos altamente conservados, o domínio RNP1 octamérico e o RNP2 hexamérico (Kuhn and Wahle, 2004; Mangus *et al.*, 2003). Foi observado que o RNA poliadenilado adota uma conformação permanente estendida devido ao arranjo antiparalelo do RNA e da proteína e se liga na região 3' do RRM1 e na 5' do RRM2 (Deo *et al.*, 1999) (Figura 11).

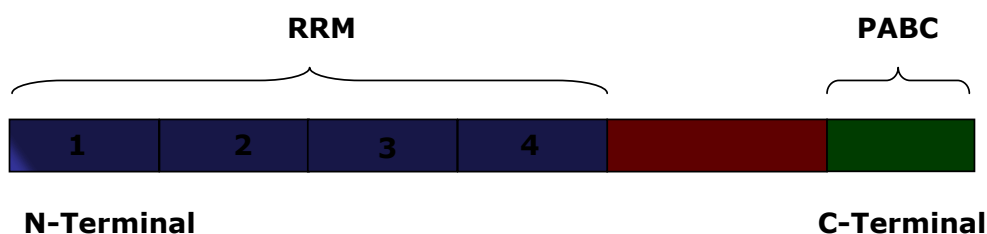


Figura 10. Esquema geral de uma típica PABP. Em destaque a região N-terminal que possui quatro domínios de ligação ao mRNA (RRMs), a extremidade C-terminal que possui o domínio denominado PABC e entre esses domínios um domínio central rico em prolina.

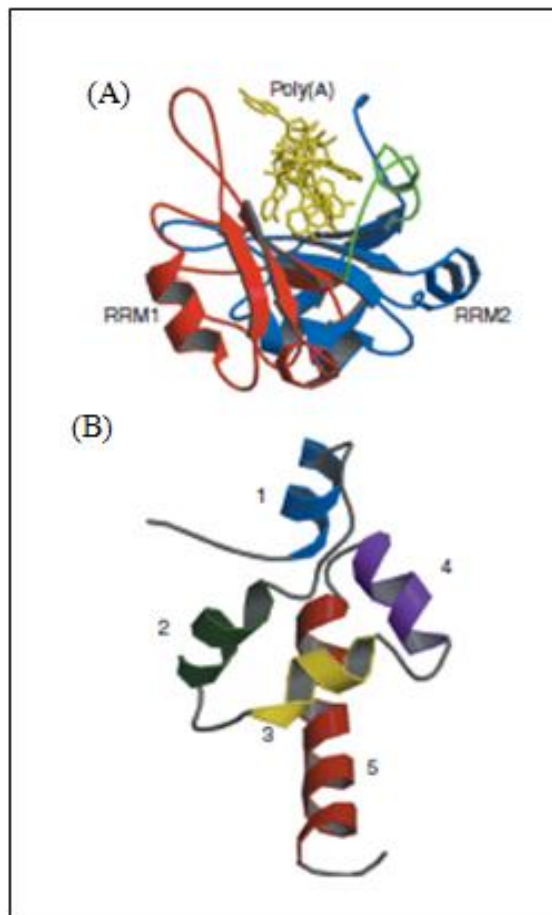


Figura 11. Estruturas dos domínios presentes na PABP citoplasmática. (A) Estrutura tridimensional dos RRM1 e 2 quando associados a cauda poli-A. (B) Estrutura tridimensional mostrando as cinco hélices do domínio carboxi-terminal. Figura modificada de Mangus *et al.*, 2003.

Evidências experimentais sugerem que a extremidade C-terminal da PABP participa na estabilização dos mRNAs (Coller *et al.*, 1998), na iniciação e terminação da tradução (Wang and Grumet, 2004), bem como na exportação dos mRNAs contendo cauda poli-A recém sintetizados (Afonina *et al.*, 1998). Esta extremidade é composta de uma região de conexão pouco conservada, rica em prolina e de uma região carboxi-terminal altamente conservada (PABC ou

recentemente denominada MLLE). A primeira está associada ao processo de multimerização onde moléculas de PABP se associam umas às outras presas à cauda poli-A dos mRNAs (Melo *et al.*, 2003;Kuhn and Pieler, 1996) e a segunda foi descrita como região de interação com proteínas regulatórias e fatores de tradução que contem o domínio PAM2 (de motivo 2 de interação a PABP do inglês PABP-interacting motif 2) (Roy *et al.*, 2002;Kozlov and Gehring, 2010) tais como o fator de terminação da tradução eRF3 e as proteínas regulatórias Paip1 e Paip2 (Kozlov *et al.*, 2001;Melo *et al.*, 2003;Kozlov and Gehring, 2010). Foi demonstrado que o domínio PABC não participa na interação entre moléculas de PABP, porém mostrou-se indispensável para a viabilidade celular em leveduras (Melo *et al.*, 2003;Coller *et al.*, 1998) .Até o momento foram determinadas as estruturas do domínio PABC em humanos, leveduras e *T. cruzi* (Kozlov *et al.*, 2001;Siddiqui *et al.*, 2003;Deo *et al.*, 2001;Kozlov *et al.*, 2002) a partir da ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios-X de um segmento conservado de 75 aminoácidos. A análise mostrou que esta região consiste de quatro ou cinco alfa-hélices e que se liga especificamente através de uma região hidrofóbica a um motivo de aproximadamente 12 aminoácidos, encontrados em todos seus parceiros ligantes. Observou-se nesse domínio, em um grande número de organismos diferentes, um alto grau de conservação de sequência nas hélices 2, 3 e 5, que correspondem aos sítios de ligação dos peptídeos alvos (Kozlov *et al.*, 2001;Kozlov *et al.*, 2004;Lei *et al.*, 2011;Kozlov and Gehring, 2010).

2.5.2 Estrutura das PABPs nucleares

Até o momento pouco se sabe sobre a estrutura das PABPs nucleares mas, diferentemente das PABPs citoplasmáticas, estas possuem um região amino-terminal seguida de um único RRM e uma região carboxi-terminal rica em arginina, sendo as duas últimas necessárias para o reconhecimento do poli-A (Wahle and Ruegsegger, 1999). Em leveduras a PABP nuclear foi descrita como essencial para a viabilidade celular sendo codificada pelo gene Nab2 (Anderson *et al.*, 1993). Diferente das outras PABPs, Nab2 utiliza um domínio Arg-Gly-Gly (RGG) para ligação. Esta proteína também contém um motivo do tipo dedos de zinco (*zinc-finger*), semelhante ao encontrado nas subunidades da RNA polimerase, e um região rica em glutamina que contém uma região com números variáveis do segmento Gln-Gln-Gln-Pro (QQQP)(Mangus *et al.*, 2003).

2.5.3 Modificações pós-traducionais da PABP

Até o momento, várias isoformas de PABP já foram descritas em levedura, ouriço, trigo e plantas (Drawbridge *et al.*, 1990;Le *et al.*, 1997;Le *et al.*, 2000) e foi postulado que estas modificações sejam devidas a fosforilação. Em plantas o estado fosforilativo da PABP não só influencia a ligação cooperativa com a poli-A como também determina a interação específica com aqueles fatores já identificados como capazes de interagir com a PABP (Melo *et al.*, 2003;Le *et al.*, 2000) . No mais foi levantada a possibilidade de que o estado fosforilativo das PABPs media a interação funcional entre o cap e a cauda de poli-A. Em células HeLa, análises bidimensionais utilizando um inibidor da quinase MKK2 (U0126),

fez com que a PABP migrasse como uma proteína mais básica, e apareceu como um único spot no gel, sugerindo que a regulação da fosforilação da mesma seja efetuada através da via p38MAP Kinase/MKK2 (Ma *et al.*, 2009).

Além da fosforilação outros tipos de modificação pós-traducionais podem ocorrer na PABP. Em humanos foram encontradas 14 tipos diferentes de modificações incluindo metilações em resíduos de lisina, glutamato, aspartato e acetilações em lisinas. Foi observado que o estado dessas modificações na PABP é regulado durante o ciclo celular via modulação das acetilações em lisina. Foi também observado que dois resíduos de lisina são diferencialmente metilados ou acetilados modulando algumas interações entre a PABP e outras proteínas, este sendo o primeiro exemplo de regulação envolvendo a modificação do tipo metilação/acetilação em um mesmo aminoácido (Brook *et al.*, 2012). Outro tipo de modificação que interfere com a capacidade de ligação da PABP a outras proteínas é a metilação em resíduos de arginina, que na PABP de humanos ocorre na região de ligação, região esta onde ocorre a interação entre moléculas de PABP (Melo *et al.*, 2003).

2.5.4 Regulação da tradução dos mRNAs da PABP

Devido aos múltiplos papéis da PABP no metabolismo do mRNA, é importante que sua expressão seja muito bem regulada. O mRNA da PABP é expresso em diferentes níveis em vários tecidos e sua tradução pode ser regulada por dois mecanismos distintos conhecidos: autoregulação mediada pela própria

PABP e regulação mediada por um trato polipirimídico em sua extremidade 5' (Melo *et al.*, 2003; Bag and Bhattacharjee, 2010).

Os mRNAs das PABPs possuem em sua região 5' UTR dois potenciais elementos de regulação de ação *cis*. O primeiro é denominado elemento TOP, que constitui o trato polipirimidínico citado acima e o segundo é encontrado logo em seguida e compreende uma região conservada rica em adeninas (aproximadamente 50-70 nt) denominada ARS (Gorgoni and Gray, 2004; Melo *et al.*, 2003; Bag and Bhattacharjee, 2010; Patel *et al.*, 2005) (Figura 12). Vários mRNAs contendo o elemento 5' TOP já foram observados, sendo os mesmos expressos dependendo da condição de crescimento da célula (revisado (Melo *et al.*, 2003; Bag and Bhattacharjee, 2010) Vários estudos mostram que a tradução de mRNAs contendo o elemento TOP é estimulada durante o crescimento uma vez permite que mais ribossomos se liguem na 5' UTR o que deve aumentar a taxa de elongação (Bag and Bhattacharjee, 2010).

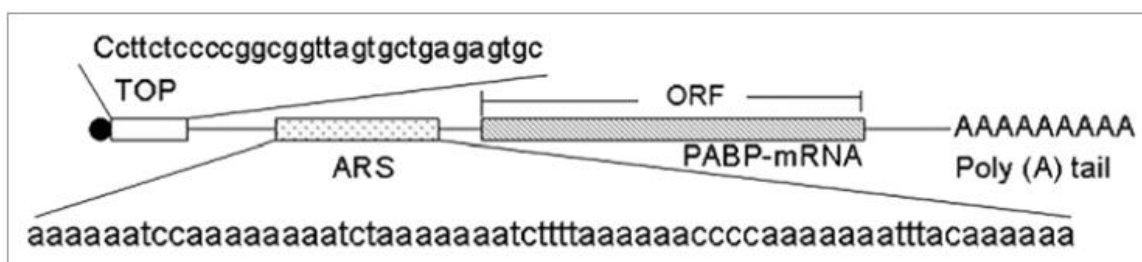


Figura 12. Esquema de um mRNA de PABP. A figura mostra os dois elementos de controle traducional, o TOP e o ARS ambos encontrados na 5' UTR. Figura modificada de Bag and Bhattacharjee, 2010.

Um segundo ponto de controle depende de mecanismos autoregulatórios envolvendo a ARS presente na 5'UTR do mRNA PABP. Em humanos foi determinado que esse sítio possui cerca de 61 nucleotídeos, formado por conjuntos de 5 a 8 adeninas espaçadas com 3 a 6 resíduos de pirimidinas e que se encontra a 73 nucleotídeos do cap (Melo *et al.*, 2003;Hornstein *et al.*, 1999). Acredita-se que a PABP, quando em excesso em relação aos mRNAs poliadenilados, se liga então a esse trato de adeninas em seu mRNA reprimindo sua tradução e a própria síntese uma vez que não permite a passagem da subunidade ribossomal 40S. A repressão pela PABP pode ser aliviada quando ocorre um aumento intracelular de mRNA poliadenilados, ou quando ocorre um aumento de tamanho de caudas poli-A pré-existentes. Experimentos *in vitro* mostraram que ao se adicionar poli-A exógeno o efeito é mimetizado mesmo na ausência de síntese de mRNA, enquanto que a super-expressão *in vivo* é capaz de reprimir os mRNAs da PABP endógenos (Melo *et al.*, 2003;de Melo Neto *et al.*, 1995;de Melo Neto *et al.*, 2000). Assim o elemento TOP é capaz de estimular a tradução dos mRNAs quando a demanda celular é aumentada. Por outro lado o ARS monitora e controla os níveis celulares de PABP e suprime a tradução de mRNAs de PABP através de um mecanismo de “*feedback*”. Foi observado que o efeito estimulatório de TOP sob a tradução dos mRNAs é mantida mesmo quando o elemento ARS está presente. (revisado por (Bag and Bhattacharjee, 2010).

2.5.5 Principais funções associadas a PABP na síntese e processamento de mRNAs

2.5.5.1 Função na poliadenilação do RNA

Como descrito anteriormente a reação de poliadenilação é composta por duas etapas: a etapa de clivagem e a de adição da cauda poli-A. Para que ocorra a clivagem são necessárias varias proteínas em especial a CPFS (fator específico de clivagem e poliadenilacao), que se liga na região contendo o sinal de poliadenilação (AAUAAA) e recruta a PAP (poli-A polimerase) para dar inicio a adição, e em seguida varias moléculas de PABPN vão se ligando a cauda nascente à medida que esta vai crescendo (Kuhn *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 1991; Bienroth *et al.*, 1991; Millevoi and Vagner, 2010). A ligação da PABPN na cauda nascente produz três efeitos que auxiliam no processo. Primeiramente a PABPN não permite que o complexo CPFS se ligue a cauda poli-A restringindo essa proteína a sequência sinal. Segundo, a PABPN mantém a CPSF e a poli-A polimerase em um distanciamento adequado para que possam continuar interagindo, uma vez que a função estimulatória da CPSF na elongação diminui com o aumento da distância entre estas duas proteínas. A PABPN provavelmente facilita essa interação promovendo o dobramento correto do RNA durante a elongação (Keller *et al.*, 2000). Terceiro, a PABPN quando em contato com a poli-A polimerase aumenta a estabilidade do complexo de poliadenilação. A poli-A polimerase é uma enzima de ação não-processiva, isto é, a cada adição de resíduos de adenina ela se separa da molécula de RNA. Quando ligada a ambas

as CPSF e a PABPN, porém, forma um complexo estável que permite que a polimerase adicione a cauda poli-A em um único evento. Ao final da poliadenilação a estrutura do complexo PABPN/poli-A polimerase muda de tal forma que desfaz a interação entre CPFS/poli-A polimerase. Foi proposto que a PABPN só desfaz a ligação CPFS/poli-A polimerase quando a cauda poli-A está toda coberta por moléculas de PABPN, de forma que a PABPN regularia o número de resíduos de adenina adicionados (Kuhn *et al.*, 2009) (Figura 13).

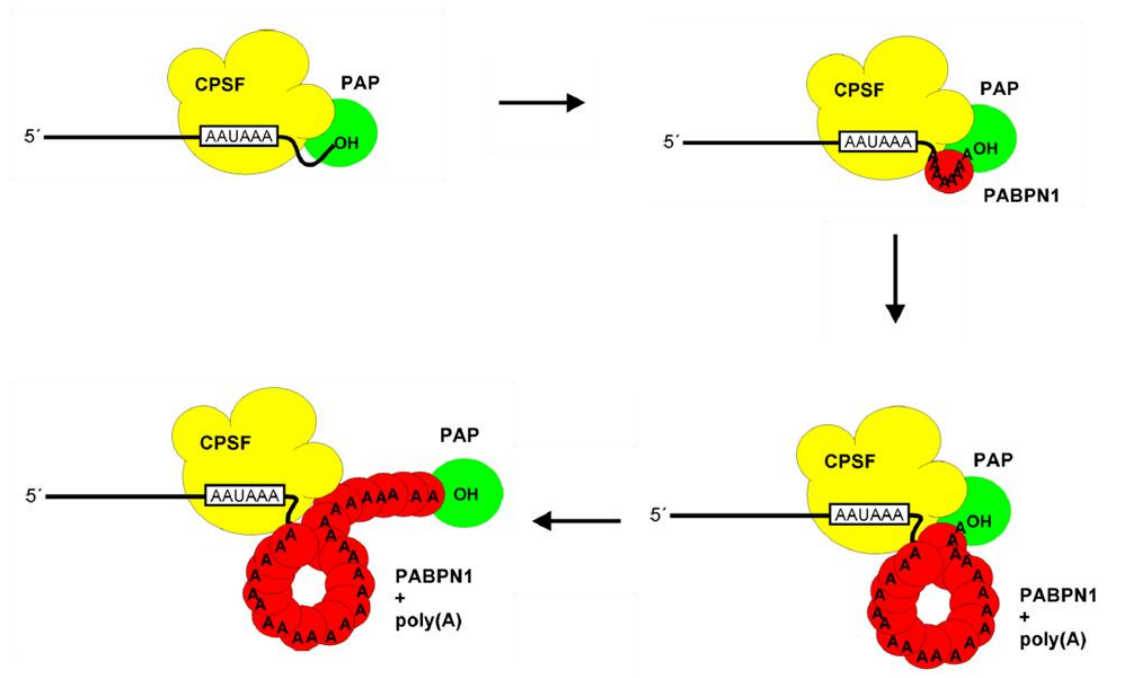


Figura 13. Modelo do mecanismo de controle do comprimento da cauda poli-A. A proteína CPSF se liga ao sinal de poliadenilação e recruta a poli-A polimerase. A primeira molécula de PABPN1 se liga ao complexo quando a cauda possui cerca de 12 nucleotídeos, seguida de moléculas sucessivas de acordo com o crescimento da cauda. O complexo formado faz com que o RNA se dobre de forma a manter o contato entre a CPFS e poli-A polimerase permitindo que a cauda seja sintetizada de forma processiva. Quando a cauda poli-A excede o comprimento de cerca de 250 resíduos de adenina a molécula de PABPN1 não consegue permanecer ligada ao complexo e desta forma o contato entre a CPFS e poli-A polimerase se desfaz finalizando a elongação. Figura modificada de Kuhn *et al.*, 2009 e Eckmann *et al.*, 2011.

Em alguns tipos celulares, e/ou em fases de desenvolvimento específicos de organismos pluricelulares, podem ocorrer eventos específicos de poliadenilação de mRNAs no citoplasma. Estes eventos dependem de sequências específicas nas regiões 3'UTR dos mRNAs alvos, as quais já foram definidos durante a maturação de oócitos (CEPs – elementos citoplasmáticos de poliadenilação; ou ACEs - elementos de controle de adenilação) e durante a embriogênese (CPE embriogênica). Apesar da PABP citoplasmática se ligar a cauda poli-A dos mRNAs não se sabe ao certo como a poliadenilação citoplasmática promove a tradução. Em alguns casos deve ocorrer um incremento na tradução de mRNAs sujeitos inicialmente a um baixo nível de tradução ou alternativamente este processo ativa a tradução de mRNAs silenciosos. Acredita-se que em ambos os casos o efeito na tradução dos mRNAs esteja associado ao *status* da PABP citoplasmática na cauda poli-A. Uma proposta seria de que a ligação da PABP citoplasmática a caudas poli-A pequenas e sua subsequente poliadenilação deva ter papel no recrutamento de moléculas adicionais de PABP com estímulo na tradução dos mRNAs (revisado em Gorgoni and Gray, 2004).

2.5.5.2 Função na exportação do RNA

Na maioria dos eucariotos ocorre a contínua troca de proteínas e aminoácidos entre o núcleo e o citoplasma através do complexo do poro nuclear. Um grande número de proteínas está envolvido neste complexo incluindo as chamadas exportinas Xpo1/Crm1. Pouco se sabe sobre o modo como a PABP participa na exportação de mRNAs do núcleo para o citoplasma, mas em

leveduras foi observado que apesar da localização citoplasmática da pab1p a mesma esta dinamicamente mudando para o núcleo, fato corroborado pela observação de que a pab1p possui um sinal de localização nuclear em seu RRM4 que a dirige para esse compartimento. Esse comportamento parece ser conservado na evolução uma vez que foi demonstrado para humanos e leveduras de fissão. A pab1p é capaz de interagir com nucleoporinas específicas, com as exportinas Xpo1/Crm1, sugerindo assim um envolvimento com a exportação de mRNAs (Brune *et al.*, 2005).

2.5.6 Papel da PABP no controle da estabilidade dos mRNAs

O papel das PABPs na regulação da degradação dos mRNAs não está tão bem esclarecido quanto seu papel na tradução. Nesta última a PABP auxilia na iniciação da síntese de proteínas através de suas diversas interações com a cauda poli-A e o complexo eIF4F de iniciação da tradução. Estas mesmas interações parecem ter o papel de proteger os mRNAs contra a ação de deadenilases, tais como a poli-A ribonuclease (PARN), e de enzimas envolvidas com a remoção do *cap*. Uma vez que o substrato para a deadenilação interage com a PABP, pode-se prever que esta proteína tenha papel na degradação destes mRNAs, embora não se saiba bem como. Foi observado que mutantes de pab1p em leveduras possuem cauda poli-A maiores sugerindo que além de proteger a cauda poli-A da degradação a PABP é necessária para seu encurtamento (Sachs and Davis, 1989). Observou-se também que a taxa de deadenilação é maior nestes mutantes mostrando que a PABP deve ter papel

estimulatório na deadenilação. Ensaios de purificação com a 3' poli-A exonuclease (PAN) mostraram que a pab1p precisa estar ligada a cauda poli-A para que a enzima exerça seu papel (Kuhn and Wahle, 2004;Lowell *et al.*, 1992). Em contraste o principal complexo de deadenilases em leveduras (Ccr4p-Pop2p-Notp) e a mais importante deadenilase de mamífero (PARN) são inibidas na presença de PABP (Mangus *et al.*, 2003;Korner *et al.*, 1998).

Além do papel na deadenilação alguns modelos foram propostos para a inibição da remoção do *cap* pela PABP. Um dos modelos seria através da ligação da PABP com o complexo de ligação ao *cap* via interação com o eIF4G, o que manteria o *cap* indisponível para ligação com as enzimas dcp1 e dcp2. Um segundo modelo propõe que a PABP afete a localização de transcritos dentro da célula uma vez que se liga a estes não permitindo sua inclusão nos corpos de processamento onde ocorre a degradação (Kuhn and Wahle, 2004). Em leveduras foi observado que a PABP tanto inibe quanto estimula a remoção do *cap* dos mRNAs uma vez que após a retirada da cauda poli-A, ela auxilia no rearranjo dos mRNPs facilitando a ligação do complexo ativador deste processo que contém proteínas como a Lsm1p-Lsm7p e Pat1p (Tharun and Parker, 2001;Mangus *et al.*, 2003). Esse rearranjo promove a ligação destes mRNPs com o complexo formado pelas proteínas Dcp1p-Dcp2p, criando um substrato para a degradação exonucleolítica 3'-5'/5'-3' (Mangus *et al.*, 2003;Sheth and Parker, 2003).

2.5.7 Papel da PABP na síntese proteica

A participação da PABP na síntese de proteínas foi testada usando mRNAs repórteres com e sem *cap* ou cauda poli-A, o que revelou que ambos atuam sinergicamente estimulando a tradução de mRNAs. Estes resultados indicaram que a PABP, mediando os efeitos da cauda poli-A, atuaria durante a iniciação da síntese proteica através da interação com os fatores associados ao *cap*. Vários estudos demonstraram que essas interações ocorrem mesmo na ausência de cauda poli-A, porém de forma menos eficiente, possivelmente recrutando os chamados fatores de iniciação eucarióticos (eIFs de *eukaryotic Initiation Factors*) para o complexo de tradução ou através da estabilização deste complexo (Otero *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 2000; Wang and Grumet, 2004; Peng and Schoenberg, 2005)

2.5.7.1 Iniciação da tradução nos eucariotos e complexo eIF4F

Nos eucariotos, a síntese de proteínas, também conhecida por tradução, é mediada pelos ribossomos e por um grande número de macromoléculas auxiliares entre proteínas e outros RNAs e pode ser dividida em quatro etapas: iniciação, alongação, terminação e reciclagem de ribossomos (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Jackson *et al.*, 2010). A iniciação é um importante ponto de regulação da tradução e da expressão gênica como um todo, uma vez que constitui a etapa crítica no qual ocorre a interação entre o ribossomo e o mRNA e o seu posicionamento correto no códon de iniciação da tradução. Para que ocorra

é necessário a atividade de cerca de 25 polipeptídeos: os eIFs, proteínas individuais ou complexos protéicos que auxiliam na atividade do ribossomos e sem os quais o processo de síntese de proteínas não ocorre (Hershey and Merrick, 2000).

Os fatores eIF4 são em sua maioria exclusivos de eucariotos e são responsáveis por diferentes etapas ao longo da iniciação da tradução, compreendendo as subunidades polipeptídicas eIF4A, eIF4E, eIF4G e os fatores eIF4B e eIF4H. O fator eIF4F é um complexo heterotrimérico responsável pelo recrutamento do mRNA para a maquinaria de tradução. Este complexo é composto por três polipeptídeos: (1) eIF4A, uma ATPase RNA-dependente e RNA helicase; (2) eIF4E, a proteína que se liga ao *cap* dos mRNAs e (3) eIF4G, proteína que estrutura o complexo eIF4F e possui sítios de ligação para um número variado de outros polipeptídeos envolvidos na tradução e outros processos (Gingras *et al.*, 1999). Através de sua subunidade eIF4E o eIF4F interage com o *cap* enquanto através do eIF4G interage com um segundo complexo de iniciação da tradução, o eIF3, que por sua vez se associa ao ribossomo. Dessa forma, através de suas subunidades, o eIF4F atua como uma ponte na ligação entre o mRNA e o ribossomo (Wells *et al.*, 1998; Kapp and Lorsch, 2004; Jackson *et al.*, 2010; Goodfellow and Roberts, 2008).

O fator eIF4E é uma proteína de 24 kDa que executa um papel essencial na tradução *cap*-dependente. Este fator se liga especificamente ao *cap* presente na extremidade 5' do mRNA da maioria dos eucariotos, permitindo o recrutamento dos outros fatores de iniciação e por último da subunidade 40S para o mRNA (Sonnenberg *et al.*, 1978). Na iniciação da tradução o eIF4E possui como parceiros

funcionais o fator eIF4G, eIF4A, identificados por cromatografia de afinidade (McKendrick *et al.*, 1999). Estudos mostram que a remoção do eIF4E de extratos celulares reduz drasticamente a tradução dos mRNAs com *cap* o que pode ser restaurado com a adição de eIF4E recombinante expresso em bactérias ou eIF4E nativo purificado. O eIF4E, apesar de ter sido previamente descrita como uma única proteína possui diversos homólogos em vários organismos com diferentes funções (Ptushkina *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2005). Além do papel na tradução, os membros da família eIF4E estão envolvidos no transporte de mRNAs, em mecanismos de repressão da tradução e atuando no controle da tradução de mRNAs específicos através da interação com diferentes parceiros funcionais (Rhoads, 2009).

O fator eIF4A é considerado o protótipo da família DEAD-box de RNA helicases, por apresentar oito motivos, dos quais o mais conservado é o motivo II conhecido como DEAD (L-D-E-A-D-X-X-L : Leu-Asp-glu-Ala-Asp-X-X-Leu) (Linder, 2003). Essas proteínas são conservadas de bactérias a humanos e estão envolvidas numa série de processos celulares incluindo a transcrição, *splicing* dos mRNAs, tradução, biogênese do ribossomo transporte e degradação de mRNAs. Como estão envolvidas em várias funções celulares que requerem a remoção de estruturas secundárias tem sido proposto que as mesmas atuem como RNA helicases. No processo de síntese protéica a retirada dessas estruturas secundárias de dentro da região 5' não traduzida do mRNA, pelo eIF4A, é importante por facilitar a ligação do complexo 43S ao mRNA e o deslocamento da subunidade menor ribossomal até o códon de iniciação da tradução. Em mamíferos foram identificadas três isoformas do eIF4A (Weinstein *et al.*, 1997), tendo as eIF4AI e II um maior grau de homologia (90% de identidade) e

funcionalmente parecidas (Gingras *et al.*, 1999;Nielsen and Trachsel, 1988;Yoder-Hill *et al.*, 1993), enquanto que a identidade entre eIF4A1 e III é menor (cerca de 66%).

O fator eIF4G é uma proteína de alto peso molecular e teve seus genes isolados e clonados de vários organismos, tais como levedura, mosca de frutas, plantas e mamíferos (Keiper *et al.*, 1999;Prevot *et al.*, 2003). É uma proteína grande cuja complexidade é devido à grande quantidade de sítios de ligação para outras proteínas presentes ao longo de sua estrutura. O principal papel do eIF4G é coordenar a formação do complexo eIF4F e mediar sua interação com outros fatores que participam na iniciação da tradução. Nessa tarefa ele interage com o eIF4E, eIF4A, eIF3 e PABP, entre outros.

2.5.7.2 Modo de ação da PABP na iniciação da tradução

Uma interação entre as regiões 5' e 3' do mRNA foi inicialmente descrita em leveduras e posteriormente em humanos e plantas, através da demonstração da associação direta da PABP com o fator eIF4G, o que sugere um modelo de tradução onde os mRNAs seriam traduzidos circularizados (Gallie, 1998;Kahvejian *et al.*, 2001;Gingras *et al.*, 1999;Preiss and Hentze, 2003) (Figura 14). Ensaio de reconstituição de sistemas de tradução *in vitro*, utilizando eIF4E, eIF4G e PABP recombinantes demonstraram essa circularização dos mRNAs em sistemas eucarióticos através de microscopia de varredura (Wells *et al.*, 1998).

Vários estudos têm sido desenvolvidos para determinar por quais mecanismos a circularização mediada por PABP estimula a tradução (Jacobson

and Peltz, 1996;Kahvejian *et al.*, 2001). Uma hipótese seria que a PABP promove o recrutamento do complexo de iniciação 48S e 80S (Tarun, Jr. *et al.*, 1997;Sachs and Davis, 1989;Searfoss *et al.*, 2001). Depleção da PABP em extratos de células ascíticas de ratos resultou em uma redução na formação dos complexos de iniciação 48S e 68S, as quais são recuperadas com a adição de PABP recombinante sugerindo a participação da PABP nestes processos bem como a importância da interação PABP-eIF4G. Foi observado também que a PABP ao se ligar com o eIF4G estimula a interação entre o eIF4E e o cap, talvez através de mudanças conformacionais no eIF4G (Le *et al.*, 1997;Sonenberg and Hinnebusch, 2009;Wei *et al.*, 1998). Todos esses achados definem a PABP como um fator de iniciação da tradução clássico e enfatiza a importância da circularização dos mRNAs para a sua tradução eficiente (Kahvejian *et al.*, 2005;Svitkin *et al.*, 2009;Sonenberg and Hinnebusch, 2009) (Figura 14).

Um segundo modelo propõe que a circularização dos mRNAs estimula a reciclagem dos ribossomos. Isso se deve ao fato de que através da circularização é esperado um aumento na concentração de ribossomos terminais próximos ao 5' cap do mRNA, assim facilitando a reciclagem dos ribossomos (Jacobson and Peltz, 1996;Gallie, 1998a;Kahvejian *et al.*, 2001). Esse fato é corroborado por achados que estabeleceram que existe uma real interação entre a iniciação e a terminação da tradução, uma vez que já foi observado que os fatores de terminação eRF1 e eRF3 se ligam a região C-terminal da PABP (Uchida *et al.*, 2002). Assim a interação entre os fatores de terminação e a PABP deve proporcionar aos ribossomos que estão terminando a tradução que sejam recrutados para um próximo ciclo de síntese protéica.

A interação PABP-eIF4G, já mapeada em diversos organismos, mostra que o sítio de ligação ocorre entre a região N-terminal do eIF4G e o RRM2 da PABP (Imataka *et al.*, 1998; Otero *et al.*, 1999; Kessler and Sachs, 1998; Kuhn and Wahle, 2004). Estudos de interação *in vitro* em leveduras demonstraram que a PABP necessita estar ligada ao poli-A para que seja capaz de se ligar ao eIF4G (Tarun, Jr. and Sachs, 1997), porém isto pode não ser essencial *in vivo* (Gray *et al.*, 2000). Em oócitos de *Xenopus* e células de mamífero (pelo menos *in vitro*) quando se aboliu a interação PABP/eIF4G, através de uma mutação na posição 161 da PABP (Groft and Burley, 2002), tanto as taxas de tradução quanto as de poliadenilação dos mRNA foram reduzidas, mostrando a importância da interação entre as duas proteínas (Wakiyama *et al.*, 2001; Kahvejian *et al.*, 2005). Em contraste, a interação PABP/eIF4G em leveduras não parece ser a única forma de estimular a iniciação da tradução uma vez que quando abolida é bem tolerada (Kessler and Sachs, 1998). Outra interação, conservada em animais e plantas, com o fator de iniciação eIF4B, também foi demonstrada como estimulatória da tradução uma vez que aumenta a afinidade da PABP pela cauda poli-A (Le *et al.*, 1997; Le *et al.*, 2000; Cheng and Gallie, 2010). Em plantas a interação PABP com os fatores de iniciação eIF4B e eIFiso4F (isoforma do eIF4F presente apenas em plantas) aumenta a atividade helicase e ATPase associadas a este último (Bi and Goss, 2000; Cheng and Gallie, 2010).

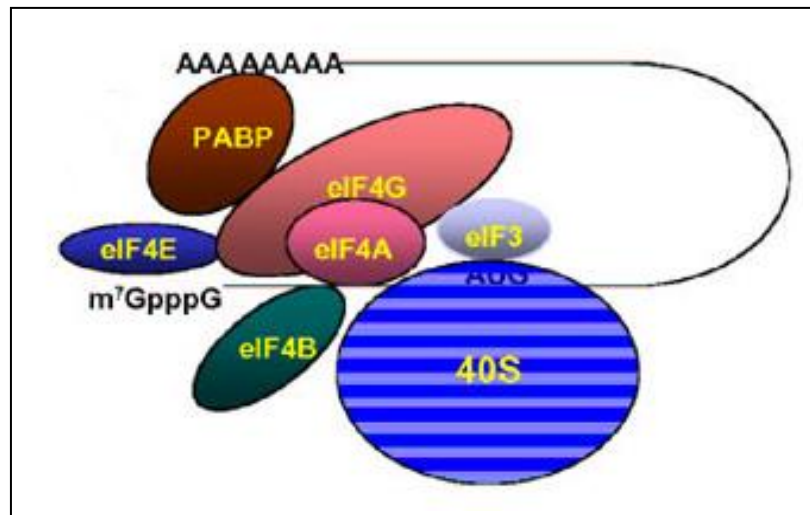


Figura 14. Esquema da iniciação da tradução cap-dependente. O esquema mostra a associação entre a PABP, ligada a cauda poli-A na extremidade 3' do mRNA, e outros fatores de iniciação da tradução associados à extremidade 5' do mRNA.

2.5.7.3 Regulação da tradução via interação PABP- PAIP-1 e PABP PAIP-2

Em mamíferos, a atividade da PABP é modulada por duas proteínas de ligação a PABP, denominadas de PAIP-1 e PAIP-2 (do inglês de *PABP-interacting proteins*) (Craig *et al.*, 1998;Khaleghpour *et al.*, 2001).. Estas proteínas possuem dois domínios de interação a PABP em comum, denominados PAM1 e PAM2 (Khaleghpour *et al.*, 2001;Roy *et al.*, 2002).

A PAIP-1 é uma proteína de 54 kDa caracterizada por uma região de homologia com o domínio central do eIF4G (25% de identidade e 39% similaridade). Essa mesma região possui um sitio de ligação ao eIF4A e com o eIF3 (revisado em (Martineau *et al.*, 2008). A PAIP-1 contém dois sítios de ligação

a PABP, o PAM1, que se liga em cerca de 140 aminoácidos na região C-terminal da PABP enquanto que o PAM2 se liga a região N-terminal da PABP, especificamente nos RRM1 e 2 (Roy *et al.*, 2002). Entre suas funções tem a capacidade de estimular a tradução *in vivo*, interage com o eIF4A e ainda esta envolvida em *turnover* de mRNAs. Utilizando mRNAs *reporter* em células de mamíferos foi observado que a PAIP-1 possui funções estimulatórias da tradução, porém os mecanismos de como isto ocorre não estão bem elucidados. Foi evidenciado que o fator eIF3 interage com a PAIP-1 em seu domínio PAM2 competindo com a PABP pela ligação com a PAIP-1. Porém a PABP permanece ligada a PAIP-1 via PAM1 uma vez que esta interação é mais forte do que a interação PAM2/PABP. Assim forma-se um complexo ternário o qual estabiliza a conformação circular dos mRNAs (Martineau *et al.*, 2008).

Já a PAIP-2 é uma proteína bem menor, de cerca de 14 kDa, que também possui os dois domínios de ligação a PABP. Neste caso, o PAM1 consiste em uma sequência de aminoácidos na região central da PAIP-2 e que interage especificamente com os RRM2 e 3 da PABP (Khaleghpour *et al.*, 2001), enquanto que o PAM2 se localiza na região C-terminal da proteína e interage com a região C-terminal da PABP, porém com menor afinidade do que a interação mediada pelo PAM1 (Khaleghpour *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2002). Recentemente foi encontrado um segundo homólogo de PAIP-2 denominado PAIP-2b, de aproximadamente 12 kDa e com 80% de similaridade e 59% de identidade com a PAIP-2 original. Os sítios de ligação para a PABP nestes dois homólogos são bastante similares, e de fato a PABP se liga a cada uma destas proteínas de maneira parecida (Berlanga *et al.*, 2006). A PAIP-2 teve sua função inicialmente descrita como repressora da tradução e em seguida foi implicada na regulação da

estabilidade de mRNAs através de sua ligação com a regiões 3' UTR (Gouyon *et al.*, 2003; Onesto *et al.*, 2004). A PAIP-2 inibe a tradução através da competição com a PAIP-1 pela ligação a PABP deslocando-a da cauda poli-A, o que acaba desestabilizando a circularização do mRNA. No mais a PAIP-2 tem a capacidade de inibir a formação do complexo ribossomal 80S demonstrando que esta proteína reprime a tradução em sua etapa de iniciação. Foi observado também que tanto a PAIP-2 como o eIF4G interagem com o RRM2 da PABP, demonstrando assim uma superposição desses sítios que sugere uma competição dessas duas proteínas pela ligação com a PABP. Outra interação observada foi com o fator de terminação da tradução eRF3, proteína que facilita a passagem do ribossomo da extremidade 3' para a 5' estimulando a tradução. A PAIP-2 interage com a região C-terminal do eRF3, através de seu domínio PAM2, no mesmo sítio utilizado na interação eRF3/PABP, mostrando que a PAIP-2 deve competir com o eRF3 pela ligação a PABP e desta forma reprimir a re-iniciação da tradução (Berlanga *et al.*, 2006).

2.6 PABPs e iniciação da síntese protéica em tripanonossomatídeos

2.6.1 Estudos preliminares sobre PABPs em tripanossomatídeos

Até o presente momento, homólogos da PABP nos tripanossomatídeos foram identificados e caracterizados em *T. brucei*, *T. cruzi*, e *L. major*. O primeiro homólogo de PABP de tripanossomatídeo descrito na literatura foi uma proteína de *T. cruzi*, de 66 kDa, cujo gene está presente em duas cópias no genoma do

parasita, sendo que seu mRNA é expresso constitutivamente durante todo o ciclo de vida do parasita. Esta proteína possui propriedades similares a de outros eucariotos e possui o domínio de ligação entre peptídeos (PABC) mais relacionado com os das PABPs de vegetais (Batista *et al.*, 1994). Uma segunda PABP caracterizada em *Trypanosoma*, a PABP de *T. brucei*, possui peso molecular de 62,2 kDa e apresenta 86,4% de identidade e 88,7 % de similaridade com a proteína descrita de *T. cruzi* (Pitula *et al.*, 1998). Assim como para outras PABPs, a região 5' UTR do seu mRNA possui segmentos ricos em repetições A e AU, sugerindo que também possua capacidade de autoregulação da sua tradução, como demonstrada para a PABP humana (Pitula *et al.*, 1998). Em *L. major*, foi descrito um homólogo de PABP de 63 kDa que é codificado por um gene de cópia única no genoma do parasita, o que contrasta com as proteínas de *T. cruzi* e *T. brucei* cujos genes estão duplicados. Esta proteína apresenta baixos níveis de homologia com as PABPs descritas em *T. cruzi* e *T. brucei* (30-35% de identidade), semelhantes aos observados em homólogos desta proteína de organismos mais distantes evolutivamente como *Homo sapiens* (36%) e *Saccharomyces cerevisiae* (38%). É uma proteína expressa constitutivamente durante o ciclo de vida da *Leishmania* e que se apresenta representada por pelo menos duas isoformas fosforiladas, sendo sua localização predominantemente citoplasmática mas com uma rara distribuição difusa no núcleo. Em ensaios de complementação, esta PABP não pode reverter a parada no crescimento celular causada por um mutante nulo de *Saccharomyces cerevisiae* (Bates *et al.*, 2000).

Algumas características funcionais foram observadas para diferentes homólogos de PABP em vários tripanossomatídeos. Foi observado que em *Crithidia fasciculata*, uma proteína que se assemelha aquela descrita em *T. cruzi*

e *T. brucei*, participa de um complexo que reconhece sequências presentes nas regiões não-traduzíveis de mRNAs o qual se acumula periodicamente durante o ciclo celular (Mittra and Ray, 2004). Já em *T. cruzi* foi observado uma interação da PABP descrita com proteínas de ligação a RNA denominadas de TcUBPs. Estas proteínas se ligam a mRNAs com motivos ricos em repetições dos nucleotídeos AU (AREs) nas regiões 3' UTRs. Foi observado que a TcPABP1 e a TcUBP1 interagem nos estágios de epimastigotas e tripomastigotas e não dependem de RNA no estágio tripomastigota, mostrando que estas proteínas possuem contato direto, enquanto a ligação TcPABP1 e a TcUBP2 ocorre apenas em epimastigotas (D'Orso and Frasch, 2002). Ensaios *in vitro* demonstraram que a interação da TcUBP1 com a TcPABP1 é capaz de destruir a formação de dímeros de TcUBP1, mais não da TcUBP2, e pode também diminuir a afinidade da TcPABP1 pela cauda poli-A. Foi sugerido ainda que, em epimastigotas, a presença de TcUBP2 juntamente com outros fatores deve ajudar na estabilização da interação TcPABP1/ TcUBP1.

2.6.2 Evidências sobre múltiplos complexos do tipo eIF4F na iniciação da tradução em tripanosomatídeos

Nos tripanossomatídeos *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei* foram identificadas sequências homólogas a alguns dos fatores de iniciação da tradução eucarióticos. Apesar de possuírem diferentes graus de similaridades, estas sequências apresentam semelhanças entre as espécies de tripanosomatídeos, o que indica que elas devem ser conservadas e desempenham papéis importantes nestes

parasitas. Entre os fatores identificados incluem as subunidades do complexo de iniciação da tradução eIF4F as quais estão em etapas diferentes de caracterização. Um dado novo observado foi a ocorrência nesses tripanosomatídeos de múltiplos homólogos para as subunidades eIF4E (6 homólogos - EIF4E1, EIF4E2, EIF4E3, EIF4E4, EIF4E5 e EIF4E6), eIF4G (5 homólogos - EIF4G1, EIF4G2, EIF4G3, EIF4G4 e EIF4G5) além de dois homólogos de eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII), todas conservadas em diferentes espécies destes organismos (Dhalia *et al.*, 2005) e dados não publicados). Esta multiplicidade de homólogos de eIF4E e eIF4G não foi encontrado em outros organismos unicelulares e bem como para outros de homólogos fatores de iniciação da tradução nos tripanosomatídeos. A existência de diversos homólogos aos fatores de iniciação da tradução nestes organismos reflete a complexidade do processo de tradução nos mesmos.

Foram descritas 4 isoformas do fator eIF4E, as quais codificavam proteínas de 214, 281, 349 e 447 aminoácidos respectivamente (Yoffe *et al.*, 2004; Yoffe *et al.*, 2006; Dhalia *et al.*, 2005). Das 4 sequências três tiveram seus níveis intracelulares detectados em extratos da fase promastigota, porém seus níveis variavam significativamente.. Análises de “Western-blot” mostraram que o eIF4E1 encontra-se em maior concentração nas amastigotas axênicas. Quanto a capacidade de se ligar aos diferentes análogos do cap, o LmEIF4E1 e o LmEIF4E4 se ligam ao cap monometilado, os eIF4E1 e o eIF4E4 se ligam ao cap-4 e ao m7 GTP, e o fator eIF4E-2 se liga preferencialmente ao cap-4 metilado (Yoffe *et al.*, 2004). Ensaios de complementação mostraram que nenhuma das isoformas é capaz de reverter o mutante nulo em *Saccharomyces cerevisiae* (Yoffe *et al.*, 2006). Ensaios de purificação os LmEIF4E1 e LmEIF4E4

se ligam ao LmEIF4G3 em extratos de *L. major*. Através de gradiente de sacarose foi demonstrada a interação das isoformas eIF4E2 e eIF4E4 com os polissomos.

Ao fator eIF4A, foram descritas duas sequências homólogas que codificavam proteínas de 403 e 389 aminoácidos com cerca de 70% de similaridade com as proteínas de mamíferos. Os homólogos ao fator eIF4A de *L. major* possuem todos os motivos conservados das RNAs helicases, assim como sequências menores típicas de um fator eIF4A. Em fase promastigota o LmeIF4A1 se mostrou bem abundante e o LmeIF4A2 não foi detectado o que sugere o LmeIF4A1 seria o homólogo funcional nesta fase o LmeIF4A2 seria expresso em outras formas do ciclo evolutivo. Ensaio de interação proteína-proteína demonstraram que apenas o LmeIF4A1 se liga um homólogo do fator eIF4G, o LmeIF4G3 (Dhalia *et al.*, 2005). Em *T. brucei* também foram identificados dois homólogos ao eIF4A: o TbeIF4AI mostrou-se de localização citoplasmática, essencial para a viabilidade e envolvido na tradução e o TbeIF4AIII mostrou-se localização nuclear, não é essencial para viabilidade celular e foi proposto que esteja envolvido nas mesmas funções do eIF4AIII de humanos (Dhalia *et al.*, 2006).

Por último, para o fator eIF4G de *L. major* foram encontrados 5 ORFs que continham o domínio central do eIF4G conservado. Essas proteínas variam em seus tamanhos de 1016, 1425, 635, 765 e 782 aminoácidos e na localização do domínio conservado HEAT-1/MIF4G. Apenas os LmeIF4G3 e 4 foram quantificados na forma promastigota e possuem níveis semelhantes. Ensaio de interação proteína-proteína mostraram que os LmeIF4G1 ao 4 se ligam ao

LmEIF4A1. No mais o *LmEIF4G4* se liga ao fatores *LmEIF4E3* e *LmPABP1* e o *LmEIF4G3* se liga as *LmPABP1*. Em *T. brucei* foi observado que o *TbEIF4G3*, 4 e 5 são essenciais para a viabilidade celular. E apenas o *TbEIF4G3* mostrou mudança na morfologia das células (Moura, D. M. N. - Dissertação de Mestrado, 2009).

2.6.3 Identificação de múltiplos homólogos de PABPs nos tripanosomatídeos

Em trabalho anterior que antecedeu a presente Tese, para confirmar a existência de outro(s) homólogo(s) de PABP em *L. major*, utilizou-se a seqüência descrita de PABP de *T. cruzi* para busca de homólogos no banco de dados do genoma de *L. major* (www.genedb.org). Assim, um outro gene para PABP foi encontrado, distinto daquele já descrito (a *LmPABP1*), porém com uma homologia significativamente maior com a proteína de *T. cruzi*. Este novo homólogo foi denominado de *LmPABP2* e apresenta níveis de homologia com as demais PABPs de vertebrados, levedura e com a própria *LmPABP1* de cerca de 30%. Um terceiro homólogo também foi encontrado, a *LmPABP3*, que possui cerca de 30% de homologia com as demais, porém, este novo homólogo está ausente em *T. cruzi* e *T. brucei*. Seqüências codificadoras para os três homólogos da PABP de *L. major* foram então clonadas em vetores de expressão o que permitiu a expressão das proteínas de fusão. As proteínas foram utilizadas para imunização de coelhos para produção de anticorpos policlonais e os soros produzidos utilizados para quantificação dos níveis intracelulares das proteínas na forma

promastigota de *L. major*. Onde se observou que o homólogo LmPABP2 era o mais abundante, seguido das LmPABP1 e LmPABP3. O soro anti-LmPABP1 reconheceu duas bandas no extrato total de *L. major*, uma das quais possivelmente representa a forma fosforilada da proteína previamente escrita (Bates *et al.*, 2000), enquanto as LmPABP2 e LmPABP3 se apresentam representadas por apenas uma isforma. Os soros purificados foram também utilizados para analisar expressão em diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* e observou-se que estes reconheceram não só as proteínas de *L. major*, como as de outras espécies de *Leishmania* e também a dos seus ortólogos em *T. cruzi* e *T. brucei*. Em seguida foi analisada a expressão das proteínas ao longo de curvas de crescimento. Por fim os respectivos anticorpos purificados foram utilizados para determinar indiretamente a localização subcelular dessas proteínas por meio de frações citoplasmáticas e nucleares que mostrou a presença dos três homólogos na fração citoplasmática, porém com as LmPABP2 e 3 presentes também na fração nuclear (da Costa Lima, T. D. C. – Dissertação de mestrado, 2007).

Este trabalho focou-se na caracterização funcional dos três homólogos das PABPs em *L. major* a partir da investigação da participação dos mesmos na síntese protéica através de ensaios de localização celular, identificação de parceiros funcionais bem como identificação dos domínios envolvidos nestas interações, ensaios de associação com os polirribossomos e busca de RNAs que possam ser o substrato das PABPs.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar funcionalmente os três homólogos de PABP em espécies de *Leishmania*, investigando sua atuação ao nível da síntese de proteínas e outros processos do metabolismo de mRNAs e ainda analisando sua interação com parceiros funcionais conhecidos ou identificados neste trabalho.

3.2 Objetivos específicos

- * Mapear a localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 de *Leishmania* .
- * Analisar o efeito de diferentes inibidores de transcrição, tradução e processamento de mRNAs no padrão de expressão e de localização dos homólogos de PABP.
- * Analisar a interação entre os homólogos de PABP e entre estes e homólogos selecionados dos fatores de iniciação da tradução eIF4G e eIF4E, assim como mapear os domínios de ligação.
- * Verificar a participação dos três homólogos da PABP no processo de síntese.
- * Investigar a associação entre os homólogos de PABP e outros fatores proteicos a partir de extratos celulares.
- * Identificar RNAs alvo que possam ser o substrato biológico das PABPs 1, 2 e 3.

4. Materiais e Métodos

4.1 Cultivo de parasitas e curvas de crescimento frente a inibidores

A manutenção das formas promastigotas de *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin), *L. amazonensis* LTB0016 foi realizada em meio Schneider pH 7.2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Estreptomicina/Penicilina 0,1%) em volumes de aproximadamente 3 ml, e mantidas a 26°C com repiques a intervalos de 3 a 4 dias. E a manutenção das formas promastigota de *L. infantum* realizada em meio SDM-79 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 mL/L Hemina (2,5 mg/mL em 50 mM NaOH) em volumes de 10mL e mantidas a 26°C com repiques a intervalos de 6 dias. Quando das células transfectadas as mesmas foram mantidas em meio SDM-79 suplementado de 0,2µg/µL do antibiótico Neomicina.

Para realização das curvas de inibição foi realizada a expansão das culturas de *L. amazonensis* quando em fase estacionária, as quais foram repassadas em 150 ml do respectivo meio de cultura para uma concentração inicial de 10^6 células/ml. A estas culturas foram adicionados os seguintes inibidores: Cicloheximida (50µg/mL), Actinomicina D (10µg/mL), Puromicina (2mM), Sinefungina (2,6µM), Lactacistina (50µg/mL), Ácido ocadáico (20nM). Em seguida foram retiradas alíquotas para uma concentração final de 10^5 células/µL

nos tempos de 0h, 15min, 30min, 1h, 2h, 6h e em 24h, as quais foram analisadas por *Western-blot*.

4.2 Imunofluorescência

A Imunofluorescência foi realizada utilizando-se aproximadamente 5×10^6 células em cada reação. As células foram centrifugadas a 1600 g por 10 minutos a 25°C, lavadas com 1mL de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,47 mM KH₂PO₄ pH7.3) e fixadas com paraformaldeído a 3% por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente centrifugadas e colocadas em placa já contendo lamínula pré-fixada com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Após 15 minutos, foram feitas três lavagens de 5 minutos com PBS - Glicina 20 mM, seguido de permeabilização das células por incubação na mesma solução suplementada de 0,1% de Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich) por 10 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS -Glicina 20mM e o bloqueio foi efetuado na mesma solução suplementada com albumina bovina (BSA) 1% por 20 minutos. Após o bloqueio seguiu-se a incubação com o primeiro anticorpo purificado na diluição pré-definida por 1h a 37°C, seguido de três lavagens com PBS-Glicina 20mM - BSA 1% e em seguida adicionado RNase A 10 mM por 20 minutos, para degradar todo RNA presente na célula. Foram realizadas três lavagens com PBS - Glicina 20mM - BSA 1% para posterior incubação com o segundo anticorpo Alexa Fluor 488 conjugado diluído 1:500 e com o marcador de DNA TOTO-3 (Molecular Probes) diluído 1:250 em PBS - Glicina 20mM. As células foram então deixadas no escuro por 1h a 37°C. Ainda

no escuro, foram efetuadas três lavagens com PBS e as lamínulas secas foram fixadas em lâminas uma gota de Prolong-gold e guardadas protegidas da luz em a -20°C. As células foram visualizadas em microscópio confocal utilizando o programa de microscopia Leica SP1I-AOBS.

A imunofluorescência foi também realizada na presença de inibidores de transcrição, tradução e processamento de mRNA. Para isso culturas de células na fase exponencial foram previamente incubadas por 10 horas com os inibidores Actinomicina D, Cicloheximida e Sinefungina para as concentrações finais de 10µg/mL, 50µg/mL e 2,6µM respectivamente. Em seguida foram realizadas os procedimentos de imunofluorescência como descrito acima.

4.3 Western-blot

As amostras protéicas em tampão Laemmli 2X (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol e 0.125 M Tris HCl, pH6.8) foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF (Immobilon-P – Milipore) para realização de ensaios de detecção utilizando anticorpos específicos. As membranas foram então bloqueadas em solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl pH7.5), 5 % de leite desnatado e 0,05% de Tween-20 a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora ou durante a noite a 4°C. Em seguida as membranas foram incubadas com os diferentes soros totais ou anticorpos imunopurificados em diluições pré-definidas em solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl pH7.5), 5 % de leite desnatado e 0,05% de Tween-20 a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após três lavagens de 10

minutos com TBS e 0,05% de Tween-20 estas membranas foram incubadas com o segundo anticorpo (anti-IGg de coelho conjugado a peroxidase), numa diluição de 1:10.000 a temperatura ambiente sob agitação por 1 hora. Após novas lavagens com TBS (três), as membranas foram incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente com uma solução contendo 1,2 mM de Luminol, 0,4 mM de Iodofenol (diluído em DMSO) e 0,03% de peróxido de hidrogênio para a reação de quimioluminescência (ECL). As membrana foram secas com papel de filtro e expostas a filme específico para ECL (GE-Healthcare), em intervalos de 5 e 1 minutos.

4.4 Produção de lisados celulares

Para a obtenção dos lisados celulares utilizados nos experimentos de imunoprecipitação, cerca de 2×10^8 células de culturas de diferentes fases de crescimento foram incubadas por cinco minutos com Cicloheximida adicionado ao meio de cultivo (100ug/mL) e imediatamente coletadas por centrifugação a 5000 g por 5 minutos e lavadas com PBS suplementado com Cicloheximida na mesma concentração. As células foram então ressuspensas em 1mL de tampão de lise (20 mM Hepes KOH pH7.4, 5 mM acetato de potássio, 4 mM acetato de magnésio, 2 mM DTT) suplementado com inibidores de protease e fluoreto de sódio a 1 mM (inibidor de fosfatases). A lise foi realizada por ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Após cerca de cinco ciclos a lise foi monitorada por visualização ao microscópio óptico e, quando no caso de não ter sido eficiente, novos ciclos de congelamento/descongelamento

foram realizados. Confirmada a ausência de células intactas, o produto da lise foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos, sendo o sobrenadante o lisado celular que foi utilizado em diferentes abordagens neste projeto. Como etapa prévia os diferentes lotes de lisados, assim como os sedimentos das respectivas centrifugações, foram analisados por *Western-blot* com anticorpos policlonais disponíveis contra os homólogos de PABP de *L. major*, visando confirmar a presença e integridade das proteínas nativas. Os lisados validados por essa análise foram aliquotados e estocados a -80°C. Variações desses lisados podem ser preparadas na ausência de cicloheximida e/ou fluoreto de sódio ou após a adição de outros inibidores de tradução e/ou transcrição.

4.5 Imunoprecipitação

Para a imunoprecipitação padrão, utilizando soro policlonal específico para as proteínas alvo, cerca de 60 mg de proteína A-sefarose (GE Healthcare) foram inicialmente hidratadas em água milli-Q seguido de lavagem com 10 mL de PBS. Cerca de 30 µL desta resina (50% p/v em PBS) foi então incubada com volumes variados de soro (1 a 5 µL de soro policlonal pré-imune, controle negativo, ou 1 a 2 µg do anticorpo imunopurificados contra as proteínas alvo) em 0,5 mL de PBS e mantida sob agitação a 4°C durante a noite. A resina foi então coletada e lavada por três vezes com o tampão de lise. Esta resina foi então incubada com 0,1 mL do lisado celular por 2 horas a 4°C sob agitação, seguido de centrifugação e o sobrenadante guardado para posterior análise. Após mais três lavagens com PBS ou tampão de lise as proteínas ligadas a resina foram eluídas por

ressuspensão em tampão de amostra para SDS-PAGE. Após o fracionamento eletroforético em gel de SDS-PAGE 15% este foi transferido para membrana de PVDF em sistema semi-seco e as proteínas de interesse puderam ser visualizadas através de *Western-blot*. Dependendo do ensaio a resina pós-imunoprecipitação pode ser incubada com 0,1µg/µL de RNase A por 15 minutos a 37°C de forma a investigar se os complexos protéicos observados dependem da presença de RNA íntegro.

4.6 Amplificação e clonagem de deleções dos homólogos PABP1-3 em *L.major*

Para obtenção das deleções referentes aos domínios N e C- terminais dos três homólogos de PABP foram utilizados duas abordagens distintas. Uma a partir da reamplificação dos genes alvos, utilizando como molde os genes de *L. major* previamente amplificados e clonados em vetores plasmidiais, seguido de clonagem dos fragmentos nos plasmídeos pET21a e pGEX 4T3, e outra através de digestão com enzimas de restrição com subsequente subclonagem nos mesmos vetores descritos acima. Para as clonagens referentes aos domínios C-terminal das PABPs 1, 2 e 3 e ao domínio N-terminal da PABP3 foram utilizados como molde os genes clonados, obtendo assim as sequencias codificadoras para essas deleções flanqueadas pelos sítios das enzimas de restrição *NcoI/HindIII*, *NcoI/Not I*, *BamHI/NotI* e *BamHI/XhoI*, respectivamente. Para as reações de PCR foi utilizada a enzima Pfx *platinum* (Invitrogen), com o respectivo tampão de reação e as recomendações do fabricante, oligonucleotídeos, 1 mM de

MgSO₄ e temperatura de anelamento de 55°C. Após a amplificação os fragmentos foram digeridos com as diferentes enzimas de restrição, conforme descritas acima. Para as clonagens relativas às PABP1 e 2 N-terminal, as construções plasmidiais contendo os genes completos foram individualmente digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI/ *Not*I para recuperação dos fragmentos de DNA correspondentes (897 e 1122 respectivamente). Os diferentes fragmentos desejados foram purificados por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com Syber® safe, visualização com aparelho emissor de ultravioleta de ondas longas, excisão das banda de interesse e purificação utilizando-se o sistema *QIAEX II Gel Extraction Kit* (da QIAGEN) conforme recomendação do fabricante.

Em seguidas, os fragmentos amplificados foram então clonados em vetores plasmidiais de expressão (pET21a e pGEX4T3), previamente cortados com as mesmas enzimas e purificados em gel, por incubação durante 20 h a 16°C com a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs®) visando a expressão das respectivas proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de poli-histidinas ou a proteína GST, respectivamente. Estas construções foram usadas para transformar bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α e os clones positivos foram selecionados para mini e/ou maxi preparações dos DNAs plasmidiais, segundo Sambrook e Russel (2001). Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento.

4.7 Expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a uma sequência de poli-histidinas ou a glutathione S-transferase (GST), os vetores pET21a (Novagen) e pGEX4T3 (GE Healthcare) contendo o gene de interesse foram inseridos em cepas de células BL21 star de *E. coli* através de transformação por choque térmico. Para a transformação, as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4° C seguido de choque térmico a 37°C por 5 minutos com subsequente semeio das células transformadas em placa de petri contendo meio Agar Lb (Luria Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µg/µL) e incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico, como descrito anteriormente, e foram crescidas a 37°C, sob agitação de 160 rpm por 18 horas. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 10 mL das culturas crescidas foram inoculadas em 500 mL de meio LB com antibiótico e crescidas a 37°C sob agitação de 160 rpm, e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,5 ou 0,8, dependendo da proteína. Em seguida foi adicionado IPTG na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C (D.O. de 0,5) ou 1 hora a 25°C (D.O. de 0,8).

4.8 Purificação de proteínas recombinantes

Células bacterianas expressando as diferentes proteínas de interesse foram centrifugadas a 9600 g durante 10 minutos e o sedimento bacteriano obtido foi ressuspenso em 20mL de PBS, acrescido de inibidor de protease livre de

EDTA, de acordo com as instruções do fabricante (Roche). Em seguida a lise das bactérias foi realizada através de ultra-sonicação (6 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto), com posterior adição de 1% de Triton-X e centrifugação a 9600 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante pós lise foi incubado com 200 µL de resina Ni-NTA agarose (QIAGEN®) para as proteínas fusionadas a cauda de histidina ou Glutathione sefarose (GE Biosciences) para as proteínas fusionadas a GST e as purificações foram realizadas como descrito a seguir:

Para a purificação com a resina Ni-NTA agarose foi adicionado ao sobrenadante 300mM de imidazol e 200 µL de resina Ni-NTA agarose (QIAGEN®). Esta foi previamente equilibrada em PBS, após três lavagens de 10 mL cada. A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura de 4°C sob leve agitação. Após a incubação foi realizada uma centrifugação de 2500 rpm por dois minutos, descartado o sobrenadante, a resina foi lavada três vezes com 1mL de PBS. As proteínas ligadas foram eluídas da resina através de sucessivas lavagens com as soluções: 50 mM fosfato de sódio, 300 mM NaCl, 10% glicerol; pH 6.0 (tampão de lavagem); tampão de lavagem + 20 mM imidazol; tampão de lavagem + 0.5 M imidazol (1ª lavagem); tampão de lavagem + 0.5 M imidazol (2ª lavagem). Em seguida foi adicionado 200 µL de PBS à resina e a amostra congelada a -80 °C. Para 15 µL de cada eluato e da resina foi acrescido igual volume de tampão de gel de eletroforese de proteínas (duas vezes concentrado), e 15 µL desta mistura fracionados em SDS-PAGE 15% e visualizados após coloração com azul de Comassie R-250.

Para a purificação com a resina Glutathione-sefarose o sobrenadante foi incubado com 200 µL da resina, previamente equilibrada em PBS, após três

lavagens de 10 mL cada. A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura de 4°C sob leve agitação. Após a incubação foi realizada uma centrifugação de 1000g por 2 minutos, descartado o sobrenadante, a resina foi lavada três vezes com 1 mL de PBS, três lavagens de 1 mL. Em seguida foram eluídas duas vezes com 500 µL de glutathione reduzida (em 50mM de Tris-HCl pH 9.0) por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 200 µL de PBS a resina e a amostra congelada a – 80°C. Alíquotas de 15 µL de cada eluato foram processadas e analisadas em gel de SDS-PAGE como descrito.

Após purificação as proteínas purificadas foram submetidas à diálise da seguinte forma: os eluatos foram transferidos para sacos de diálise de 6mm de diâmetro (Sigma) e incubadas com 700 mL de tampão de diálise (44 mM de Na_2HPO_4 ; 5,2 mM NaH_2PO_4 , 50 mM de NaCl; 5 % de glicerol; 0,1 % TritonX-100), sob leve agitação por 6 horas a 4°C, sendo o tampão trocado três vezes a cada intervalo de duas horas. As proteínas dialisadas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% como descrito, sendo a quantificação das mesmas realizadas através da comparação da intensidade das bandas de diluições seriadas das proteínas recombinantes com diluições seriada de concentrações conhecidas de BSA, por meio do programa da câmera digital, *Kodak 1D Image Analysis Software*.

4.9 Transcrição e tradução *in vitro*

Para transcrição *in vitro*, com a enzima T7 RNA polimerase, primeiro as diferentes construções plasmidiais foram linearizadas com enzimas de restrição específicas para cada construção. As reações de transcrição foram realizadas em

um volume final de 50µL na presença de tampão de transcrição (40 mM Tris pH 8,0, 15 mM MgCl₂), rNTPs (4 mM de ATP, CTP e UTP, cada; 0,4 mM de GTP; todos da GE Healthcare), 0,5 mM de m7-GTP (New England Biolabs), 10 mM DTT, 30U de inibidor de RNase (Promega), 10 U de T7 RNA polimerase (Pharmacia) e cerca de 3 µg de DNA plasmidial previamente linearizado com a respectiva enzima de restrição e água deionizada, tratada com DEPC. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C, após os 30 minutos iniciais foi adicionado GTP para uma concentração final de 1mM, e após mais 30 minutos foi adicionado 2,5U de T7 RNA polimerase. Ao término das reações de transcrição, 1 µL de cada transcrito sintetizado foi analisado em gel de agarose 1% corado com Syber® safe. Os mRNAs sintéticos obtidos foram extraídos em fenol/clorofórmio 1:1, precipitados com 0,3 M NaCl e 2,5 volumes de etanol 100 % e o sedimento ressuspenso em água deionizada tratada com DEPC. Alíquotas de 0,1, 0,2 e 1µL dos RNAs purificados foram traduzidos em lisado de reticulócito de coelho (RRL), de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). As reações de tradução foram realizadas na temperatura de 30°C, durante 90 minutos. Após a tradução, alíquotas de 5 µL de cada amostra foram acrescidas de tampão de amostra para gel SDS-PAGE, e submetidas à migração por eletroforese. Após a migração, o gel foi corado com azul de Comassie R-250 (Sigma) e submetido a secagem em papel de filtro a 70°C, durante uma hora, sob vácuo. Para visualização das proteínas recombinantes marcadas com ³⁵S, o gel foi exposto a um filme de autorradiografia (X-OMAT – Kodak), que foi em seguida revelado.

4.10 Ensaio de interação proteína- proteína (*pull-down*)

Para os ensaios de interação proteína-proteína, a resina Glutathione-Sefarose 4B (GE Biosciences®) foi previamente equilibrada com o tampão de ligação B (100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Hepes pH 7.2, 0,2% NP-40, 5% glicerol). Em seguida a resina foi bloqueada utilizando o tampão B acrescido de 10µg/mL de BSA para evitar ligações inespecíficas. Para cada ensaio, aproximadamente 10 µL de cada resina bloqueada foi incubada com 2 µg de proteína recombinante em um volume final de 200 µL (em tampão B), durante 1 hora sob agitação, a 4°C. As resinas foram lavadas duas vezes com tampão B e incubadas com 5 µL de proteínas marcadas radiotivamente (no volume final de 200µL de tampão B), durante 2 horas sob agitação a 4°C. Após três lavagens com 500 µL de tampão B, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 40 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e 10 µL de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel 15%. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250, para visualização das proteínas recombinantes, e submetidos à autorradiografia para visualização das proteínas radioativas marcadas com ³⁵S (Dhalia *et al.*, 2005).

4.11 Fracionamento celular por centrifugação/ultracentrifugação

Cerca de 5×10^8 promastigotas de *L. major* em fase exponencial de crescimento foram incubadas com 10µg/mL de cicloheximida por 15 minutos a 26°C e centrifugadas a 3000g por 5 minutos, o sedimento foi então lavado uma

vez com tampão de lavagem C (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH7.4 e 100 µg/mL cicloheximida) e centrifugado por 5 minutos a 3000 g. Em seguida as células foram lisadas em tampão de lise (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH7.4, 10% Nonidet P-40, 2 mM sacarose, 100 µg/ml cicloheximida, 10 µM E-64, inibidor de protease 1X (Roche) e 20mg/mL de heparina) e tiveram sua lise monitorada em microscópio óptico.

Neste experimento foi utilizado um controle positivo utilizando EDTA. Cerca de 5×10^8 promastigotas de *L. major* em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos, o sedimento foi então lavado uma vez com tampão de lavagem C (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH7.4 e 100 µg/mL de Cicloheximida) e centrifugado por 5 minutos a 3000g. Em seguida as células foram lisadas em tampão de lise (300 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH7.4, 10% Nonidet P-40, 2 mM sacarose, 100 µg/mL cicloheximida, 10 µM E-64, inibidor de protease 1X (Roche) e 20 mg/mL de heparina) e tiveram sua lise monitorada em microscópio óptico. Em seguida foi adicionado EDTA para uma concentração final de 0,1 M por 30 minutos.

Após a lise as células foram centrifugadas por 16000g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colocado sobre um colchão de 30% de sacarose preparado em tampão de lavagem C e ultracentrifugado a 4°C por 1 hora e 30 minutos a 100.000 g em rotor Beckman 70Ti para obtenção da fração polissomal. O sobrenadante foi então ultracentrifugado a 4°C por 12 horas a 100.000 g em rotor Beckman 70Ti para obtenção da fração contendo mRNPs livre. Após centrifugação todas as amostras obtidas foram armazenadas a -80°C para posterior análise.

4.12 Métodos de amplificação e clonagem das PABPs de *L. infantum*

Para a obtenção dos genes das PABPs 2 e 3 fusionados a um segmento codificando para o peptídeo HA foram realizadas amplificações dos mesmos utilizando como molde DNA total de *L. infantum*. Para as reações de PCR foi utilizada a enzima Phusion DNA polimerase (New England Biolabs) com o respectivo tampão de reação e as recomendações do fabricante, oligonucleotídeos, e temperatura de anelamento entre 68°C a 48°C por 20 ciclos e 48°C nos 10 ciclos restantes. Em seguida os fragmentos amplificados foram purificados através do sistema de purificação *Mini Elute Gel* (Qiagen), segundo recomendações do fabricante. Uma vez purificados os fragmentos foram clonados utilizando o sistema do pGEMT-easy (Promega), segundo recomendações do fabricante. Essas construções foram utilizadas para transformar bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α e os clones positivos foram selecionados e então se procedeu às mini preparações dos DNAs plasmidiais resultantes através do Kit de minipreparação QIAprep (Quiagem). As mini preparações foram então enviadas a plataforma de sequenciamento para confirmação das sequencias. Uma vez confirmadas foram realizadas digestões com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III, tanto dos fragmentos quanto do vetor plasmidial de expressão pSPBT1, seguidos de etapas de subclonagem como descrito no item 4.6.

4.13 Transfecção das PABPs 1, 2 e 3 fusionadas a HA em *L. infantum*

Para cada transfecção 10mL de células de *L. infantum* no final da fase exponencial de crescimento (aproximadamente 10^7 células) em meio SDM-79 foram centrifugadas a 3000g por 5 minutos, seguidas de lavagem com 5 mL de solução de Hepes-NaCl (21 mM de HEPES pH7.05, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 6 mM glicose). Em seguida os sedimentos foram ressuspensos em 500 μL de Hepes-NaCl e transferidos individualmente para cuvetas de eletroporação de 0,2 cm (Bio-Rad) onde foram adicionados cerca de 50 μL das respectivas construções, seguido de incubação no gelo por 15 minutos. Após o resfriamento os parasitos foram transfectados em eletroporador para células eucarióticas, com um pulso elétrico nas condições de 500 μFa , 450V. Em seguida as células foram transferidas para 5 mL de meio novo e incubadas por 48 horas para a pré-seleção. Após as 48 horas foram retirados 1 mL de cada cultura e transferidos para dois novos frascos contendo 9 mL de meio novo contendo 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ do antibiótico Neomicina, seguido de nova incubação nas mesmas condições por cerca de 15 dias para seleção dos parasitas.

4.14 Ensaios de sedimentação em gradiente de sacarose

O perfil de sedimentação de polissomos foi obtido através de centrifugação de extratos citoplasmáticos em gradientes de sacarose. O extrato de 10^9 células foi obtido de forma apropriadas para a estabilização de mRNAs envolvidos na tradução na forma de polissomos, após incubação das células com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

cicloheximida por 15 minutos a 37°C. As células foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos a temperatura ambiente e lavadas duas vezes, uma com PBS e outra vez com tampão de lise (20 mM HEPES KOH pH7.4, 75 mM acetato de potássio, 4 mM acetato de magnésio, 2 mM DTT), ambos suplementados com 100 µg/mL de cicloheximida. As células foram então ressuspensas em 400 µL de tampão de lise suplementado com 80U de RNase OUT (Invitrogen), inibidor de protease 1X (Roche) e inibidor de fosfatase 1X (Roche). A suspensão foi transferida para um novo tubo contendo um volume duas vezes maior de microesferas de vidro (Sigma) e todo o conjunto foi submetido à agitação intensa por 15 minutos. Após agitação o conjunto sem as microesferas de vidro foi transferido para outro tubo e o conteúdo passado cinco vezes em seringa de insulina e centrifugado a 16000 g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi adicionado no topo de um gradiente de sacarose linear (15% a 45%) preparado em tampão de gradiente (50 mM Tris-HCl pH7.4, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ e 1 mM DTT). O gradiente foi centrifugado a 35000 rpm por 2 horas a 4°C em ultracentrífuga Beckman com rotor SW40Ti. Após centrifugação dos gradientes de sacarose, cerca de 600 µL de cada fração foram coletados utilizando o equipamento ISCO. Este equipamento destina-se a coleta e quantificação de frações de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorbância contínuo (256 nm) à medida que as frações são coletadas. O fracionamento é obtido com a introdução de uma solução pesada (sacarose 65%) que é injetada perfurando-se a base do tubo que contém o gradiente previamente centrifugado. As frações ou uma mistura de frações selecionadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE e submetidas à eletroforese e testadas por *Western-blot* com o anti-soro contra HA diluído na proporção 1:4000.

4.15 Imunoprecipitação utilizando anticorpo monoclonal contra HA para espectrometria de massa

Para as análises em espectrometria de massas as imunoprecipitações se deram da seguinte forma: 60µL de “beads” magnéticas ligadas a proteína G (Dynabeads - Invitrogen), previamente lavadas duas vezes com PBS, foram incubadas com o anticorpo contra o HA (1:20) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida o anticorpo não ligado foi então removido através de duas lavagens com PBS e então adicionado os lisados citoplasmáticos obtidos a partir de células transfectadas com as respectivas proteínas fusionadas a HA e o conjunto foi incubado por 1h a 4°C. Em seguida o mesmo foi lavado cinco vezes com PBS e as “beads” ressuspensas em 60µL de tampão Laemlli 2X. O imunoprecipitado foi então aplicado em gel SDS-PAGE e quando a amostra atingiu o resolving do gel, este é corado e a banda referente ao imunoprecipitado é excisada do gel e enviado para sequenciamento em espectrometro de massas acoplada de cromatografia de afinidade de alta resolução. Estas análises foram feitas em parceria com a plataforma de espectrometria de massas da Universidade de Laval.

4.16 Imunoprecipitação seguida de RT-PCR

Foram realizados imunoprecipitações dos três homólogos da PABP fusionados a HA como descrito no tópico 4.6. Ao final da imunoprecipitação a resina foi ressuspensa em 300 µL de tampão proteinase K (30 mM Tris-HCl pH7.5),

15 µg/µl Proteinase K e 80U de RNase OUT (Invitrogen) e em seguida incubadas por 30 minutos a 37°C para digestão das proteínas e eluição do RNA. O RNA foi então transferido para um novo tubo onde se prosseguiu com a purificação. Nesta etapa, foi adicionado um volume de fenol-clorofórmio-isoamil e o conjunto agitado e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação a fase aquosa foi transferida para um novo tubo no qual foram adicionados 6 µL de glicogênio e 0,1 volumes de acetato de sódio a 3 M. O conjunto foi então agitado e ao mesmo foram adicionados três volumes de etanol 100% gelado e o RNA precipitado durante a noite a -80°C. Em seguida o conjunto foi centrifugado a 16000 g por 15 minutos a 4°C e o sedimento lavado com 200 µL de etanol 70% e recentrifugado a 8000 g por 5 minutos a 4°C e então seco a temperatura de 37°C por 30 minutos. Uma vez seco o mesmo foi ressuspenso em 20 µL de água livre de nuclease e incubado por 5 minutos a 65°C para solubilização do material. Após solubilização do mesmo foram adicionados 2,5 µL de tampão 10X da enzima turbo DNase e 4U da enzima Turbo DNase e incubado por 1 hora a 37°C. Para parar a reação foi adicionado 0,1 volumes do tampão de inativação da DNase e centrifugado por 2 minutos a 16000 g e o sobrenadante transferido para outro tubo. Para as reações de transcrição reversa foi utilizado o sistema de transcrição reversa baseado na enzima *SuperScript Reverse Transcriptase III* (Invitrogen), segundo recomendação do fabricante. Uma vez de posse dos respectivos cDNAs os mesmos foram diluídos 1/3 e em seguida foram utilizados em reação de PCR. Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Taq* polimerase (Sigma – Aldrich) com o respectivo tampão de reação e as recomendações do fabricante, oligonucleotídeos e temperatura de anelamento de 55°C. Os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% e corado com brometo de

etídio. Utilizando um aparelho emissor de ultravioleta de ondas longas, foi possível visualizar a banda referente ao fragmento.

5. Resultados

A proposta desta Tese foi a de dar continuidade à caracterização funcional dos homólogos de PABP identificados em *Leishmania* sp., com o intuito de determinar o papel destas proteínas no processo de síntese protéica bem como identificar novas funções associadas às mesmas, uma vez que moléculas de PABP podem estar envolvidas em muitos processos celulares. A identificação de três homólogos em espécies de *Leishmania*, organismos unicelulares, indica uma diversificação de função desta proteína ainda não observada em outros eucariotos. Além do que, o fato de que dos três homólogos encontrados em *L. major* apenas dois serem conservados em *T. cruzi* e *T. brucei*, sugere que, apesar destas espécies apresentarem muitas características básicas em comum, deve haver diferenças fundamentais em processos celulares associados à função da PABP nestes organismos.

5.1 Análise comparativa das sequências das três PABPs de *Leishmania* sp.

Os três homólogos da PABP identificados em *Leishmania* sp. possuem todas as regiões identificadas para as PABPs citoplasmáticas, porém nenhum destes parece ter relação com as PABPs nucleares descritas em humanos e leveduras. Nota-se a presença dos quatro domínios de ligação ao RNA (RRMs), da região central mais variável e da região C-terminal que contém o domínio PABC. Todos os três homólogos possuem tamanhos similares com pesos

moleculares preditos de 62.7, 65.4 e 60.9 kDa, respectivamente para as PABPs 1, 2 e 3. Análises de bioinformática mostraram que as estas três proteínas possuem baixa identidade entre si, porém todas possuem um grau de identidade maior com a PABP1 humana, o que sugere que esses homólogos são resultados de um processo de duplicação bem cedo na evolução (Tabela 1). Neste trabalho, análises de homologia entre regiões individuais das PABPs de *Leishmania* e da PABP1 de humanos foram realizados e pode-se observar que as regiões N e C-terminal dos três homólogos possuem um maior grau de identidade do que a proteína completa, o que pode ser devido à baixa identidade da região central. Quando se buscou analisar individualmente os quatro RRMs pôde-se observar que dentre estes o RRM2 parece ser o mais conservado para as PABPs 1 e 3, seguido do RRM1, e com o RRM 3 sendo o mais divergente. O mesmo não ocorre para a PABP2 que parece ser a mais divergente das três proteínas, com o RRM1 e o domínio PABC sendo mais conservados do que os RRM2, 3 e 4 (Tabela 1).

As sequências dos três homólogos da PABP de *Leishmania* foram então utilizadas juntamente com os respectivos ortólogos de *T. brucei*, o ortólogo da PABP 2 de *Arabidopsis thaliana* (Bravo *et al.*, 2005) e as proteínas originais de leveduras e humanos (Sachs *et al.*, 1986; Grange *et al.*, 1987) para realização de novos alinhamentos utilizando o programa ClustalW. Novamente podemos observar a conservação das regiões N e C-terminal (Figura 15), bem como a não conservação da região central. Pode-se observar que a PABP2 possui na região central um segmento adicional rico em metionina e glicina, que também é encontrado nos ortólogos de PABP2 de *L. infantum* e *L. braziliensis* (dados não mostrados). Os RRM 1 e 2, responsáveis pela interação com o poli-A, possuem

conservação de vários dos aminoácidos necessários para esta interação, com exceção dos ortólogos da PABP2 de *L. major* e *T. brucei*. Nestes, observa-se que vários dos aminoácidos responsáveis pela interação com o poli-A são substituídos por aminoácidos não relacionados, o que indica que esta proteína deve possuir especificidade diferente ao poli-A em relação aos outros dois homólogos de *Leishmania*.

Os RRM1 e 2 também são responsáveis pela interação com o fator de iniciação da tradução eIF4G em plantas, humanos e *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng and Gallie, 2007; Imataka *et al.*, 1998; Kessler and Sachs, 1998). Nas leveduras, inclusive, alguns dos aminoácidos necessários para esta interação já foram mapeados, localizados no RRM2 (Otero *et al.*, 1999), porém nenhuma das proteínas utilizadas em nosso alinhamento possui todos esses aminoácidos conservados. Em plantas os sítios de interação para os fatores eIF4G (eIF4G e eIFiso4G) são divergentes dos de leveduras, sendo o sítio de interação com o eIF4G situado no RRM1 e o sítio de interação com o eIFiso4G, situado, na região C-terminal do RRM1 e na região N-terminal do RRM2 (Cheng and Gallie, 2007). Observamos que os segmentos equivalentes nos ortólogos de PABP2 se encontram parcialmente conservados.

Tabela 1. Dados de homologia de sequência, comparando as proteínas completas e seus domínios individuais, entre a PABP1 de humano e os homólogos de *Leishmania*, levedura e planta. Os dados foram obtidos através do programa BLAST disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Nenhuma homologia foi encontrada utilizando a região central da proteína. Sc – *Saccharomyces cerevisiae*. At – *Arabidopsis thaliana*.

Homólogo de PABP de <i>L. major</i>	Dados de alinhamento comparados a PABP1 de humanos (% de identidade)						
	Completa	N-Terminal	C-Terminal	RRM1	RRM2	RRM3	RRM4
PABP1	38	46	45	55	59	37	48
PABP2	36	40	53	59	38	43	41
PABP3	36	42	44	48	50	28	48
Scpab1p	54	59	40	60	66	55	75
AtPABP2	44	54	54	52	69	53	61

Figura 15. Comparação entre as sequências das PABPs dos tripanossomatídeos (*L. major* e *T. brucei*) com as PABPs de humano, levedura e planta. Alinhamento no ClustalW comparando as sequências utilizadas mostrando os motivos conservados e divergentes. Os aminoácidos idênticos em mais de 60% das sequências estão destacados em cinza escuros, enquanto que os aminoácidos similares, baseado na matriz BLOSUM60, em mais de 60% das sequências estão destacados em cinza claro. Quando necessários, espaços foram inseridos para um melhor alinhamento. Estruturas secundárias preditas para os RRMs e o domínio PABC foram incluídas (H – α -hélices; S – β -fitas) baseadas nas estruturas publicadas para o homólogo de humano (25;31). As três hélices localizadas nos segmentos que conectam os RRMs 1 e 2, 2 e 3 e 3 e 4 que definem o final dos RRMs 1, 2 e 3, respectivamente, estão sublinhadas. O símbolo * define os dois motivos RNP de cada RRM. ▼ indicam os aminoácidos que interagem com o RNA enquanto que ↓ mostra os aminoácidos específicos envolvidos no reconhecimento do poli-A (25). ↓ define os resíduos no RRM2 da PABP2 de leveduras relevantes para a interação com o eIF4G (50). A região rica em metionina e glicina da PABP2 está dentro de uma caixa. O homólogo da PABP2 de *A. thaliana* foi incluído no alinhamento uma vez que dentre os homólogos de PABP de *A. thaliana* este é o mais parecido com a PABP1 de *Leishmania* (não mostrados) e a região de ligação ao eIF4G está indicada. Números de acesso relevantes: *LmPABP1* (PABP1 de *L. major*) – [LmjF35.5040](#); *LmPABP2* – [XP_843520](#) / [LmjF35.4130](#); *LmPABP3* – [XP_001683760](#) / [LmjF25.0080](#); *TbPABP1* – [XP_827237](#) / [Tb09.211.0930](#); *TbPABP2* – [XP_827358](#) / [Tb09.211.2150](#). Demais acessos no Gene bank.: *HsPABP* – [P11940](#); *Scpab1p* – [NP_011092](#); *AtPABP2* – [P42731](#).

5.2 Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 de *Leishmania major*

Neste trabalho decidiu-se iniciar a parte experimental confirmando a localização subcelular dos três homólogos da PABP em *L. major* através de ensaios de imunofluorescência utilizando formas promastigotas em crescimento exponencial. Como mostrado na figura 16 as três proteínas estão localizados em sua maior parte no citoplasma com pouca ou nenhuma localização nuclear. A localização citoplasmática dessas proteínas é então compatível com várias das funções já determinadas para homólogos de PABP, uma vez que a sua distribuição no citoplasma celular, bem como certo grau de localização na região peri-nuclear já foi demonstrada em diversos organismos (Gorlach *et al.*, 1994). A localização citoplasmática das PABPs 2 e 3, entretanto, contrasta com dados prévios de fracionamento celular descritos acima onde ambas as proteínas foram encontradas mais abundantemente em frações nucleares obtidas por centrifugação. Uma vez que os ensaios de localização através de imunolocalização são mais sensíveis sugerimos que ambas as proteínas devem estar baixando juntamente com membranas celulares ou organelas mais pesadas na fração nuclear.

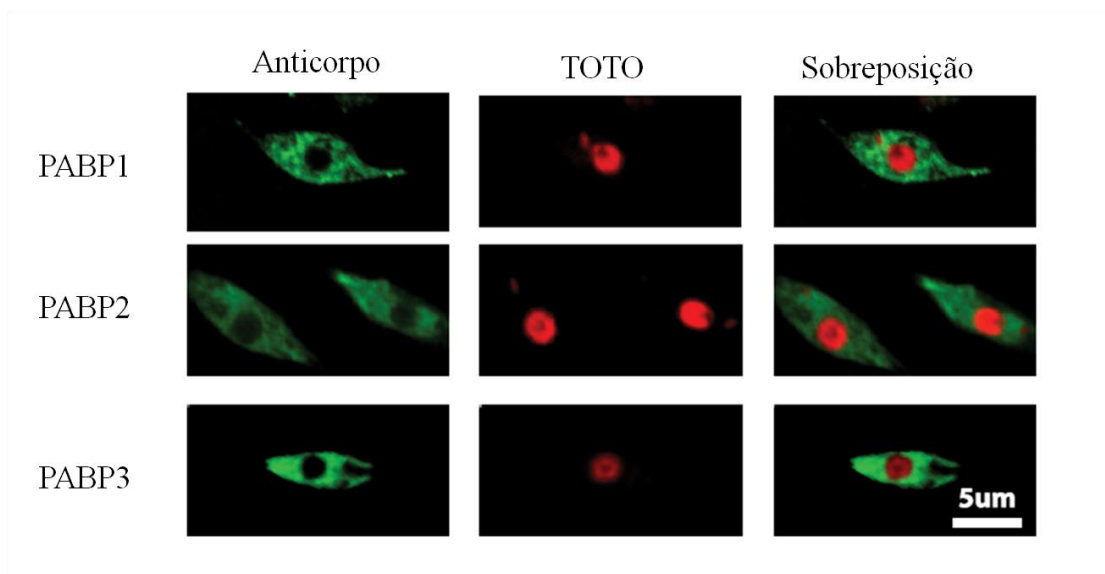


Figura 16. Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3. A determinação da localização celular dos três homólogos da PABP de *L. major* foi realizada através de imunofluorescência indireta utilizando os soros específicos para cada homólogo, seguido de incubação com fluoresceína – conjugada com o segundo anticorpo. Quando indicado, as células foram contra-marcadas como TOTO-3 para localização dos DNAs nucleares e do cinetoplasto.

Em células HeLA (humanas) foi observado que sob inibição da transcrição com Actinomicina D a distribuição da PABP citoplasmática muda e passa a ser detectada em grânulos no núcleo da célula (Afonina *et al.*, 1998), um comportamento também evidenciado para a PABP1 de *L. major* (Bates *et al.*, 2000). Neste trabalho, decidiu-se então comparar a localização subcelular dos três homólogos de PABP de *L. major* através de ensaios de imunofluorescência indireta em células em crescimento exponencial frente a inibidores de transcrição, tradução e processamento de mRNA, com o intuito de tentar associar funções a cada uma das três proteínas. Para a inibição da transcrição foi utilizado o inibidor Actinomicina D, que inibe a transcrição por ligar-se fortemente e especificamente ao DNA dúplice e, assim, impedir que ele seja molde para a transcrição. Para a

inibição da tradução foi utilizado o inibidor Cicloheximida que inibe a atividade de peptidil-transferase dos ribossomos de eucariotos (80S) abolindo a síntese protéica. Para inibição de processamento de RNA foi utilizado Sinefungina a qual bloqueia a metilação do cap presente na extremidade 5' dos RNAs e leva a uma inibição global do processamento dos mRNAs (Ullu and Tschudi, 1993).

Inicialmente foi utilizado o inibidor da transcrição Actinomicina D. Na figura 17 foi observada uma mudança de localização para as PABPs 2 e 3 que notavelmente migram para o núcleo com pouco ou nenhuma proteína sendo detectada no citoplasma. Dentro do núcleo, ambas as proteínas não co-localizam com o marcador de DNA, sugerindo uma localização diferencial dentro do nucleoplasma distinta daquela onde se encontra a cromatina. Já a PABP1 apresenta uma pequena migração para o núcleo, pouco visualizada na microscopia confocal, mas que está de acordo com o que foi demonstrado anteriormente (Bates *et al.*, 2000).

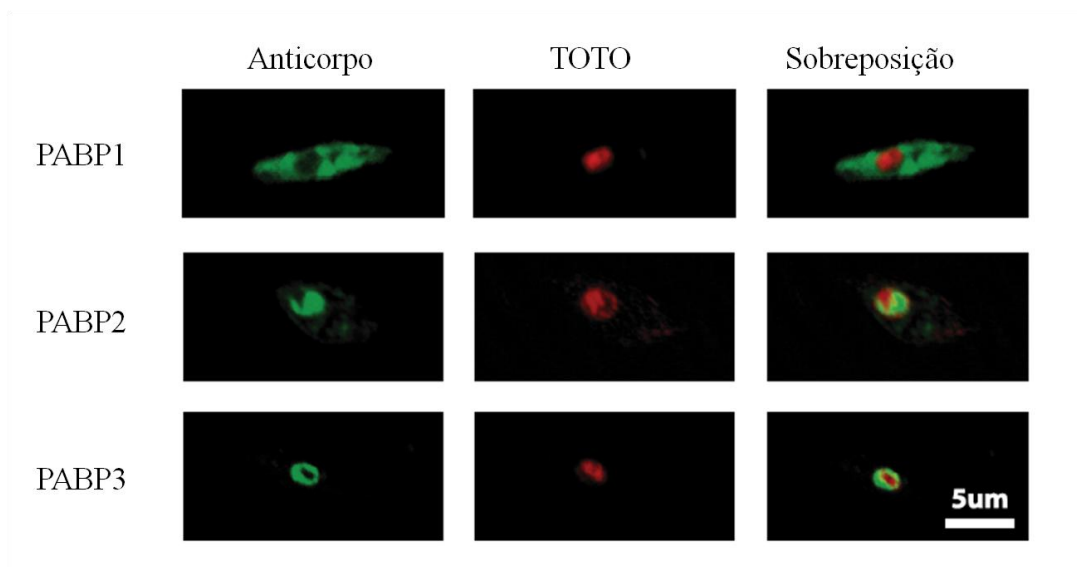


Figura 17. Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 frente a inibição da transcrição por incubação com Actinomicina-D. A determinação da localização celular dos três homólogos da PABP de *L. major* foi realizada através de imunofluorescência indireta utilizando os soros específicos para cada homólogo, seguido de incubação com fluoreceína – conjugada com o segundo anticorpo. Quando indicado, as células foram contra-marcadas como TOTO-3 para localização dos DNAs nucleares e do cinetoplasto.

O padrão de migração para o núcleo das PABPs 2 e 3 sugere que estas proteínas tenham funções durante a maturação e processamento do mRNA ou durante seu transporte do núcleo para o citoplasma. Desta forma decidiu-se determinar se também havia localização diferencial destas proteínas frente à inibição do processamento de mRNAs sob uso do inibidor Sinefungina. Entretanto nenhuma localização diferencial foi determinada para nenhum dos três homólogos (Figura 18A). Em seguida foi utilizado o inibidor da tradução Cicloheximida o qual também não induziu uma localização diferencial em nenhum dos três homólogos (Figura 18B).

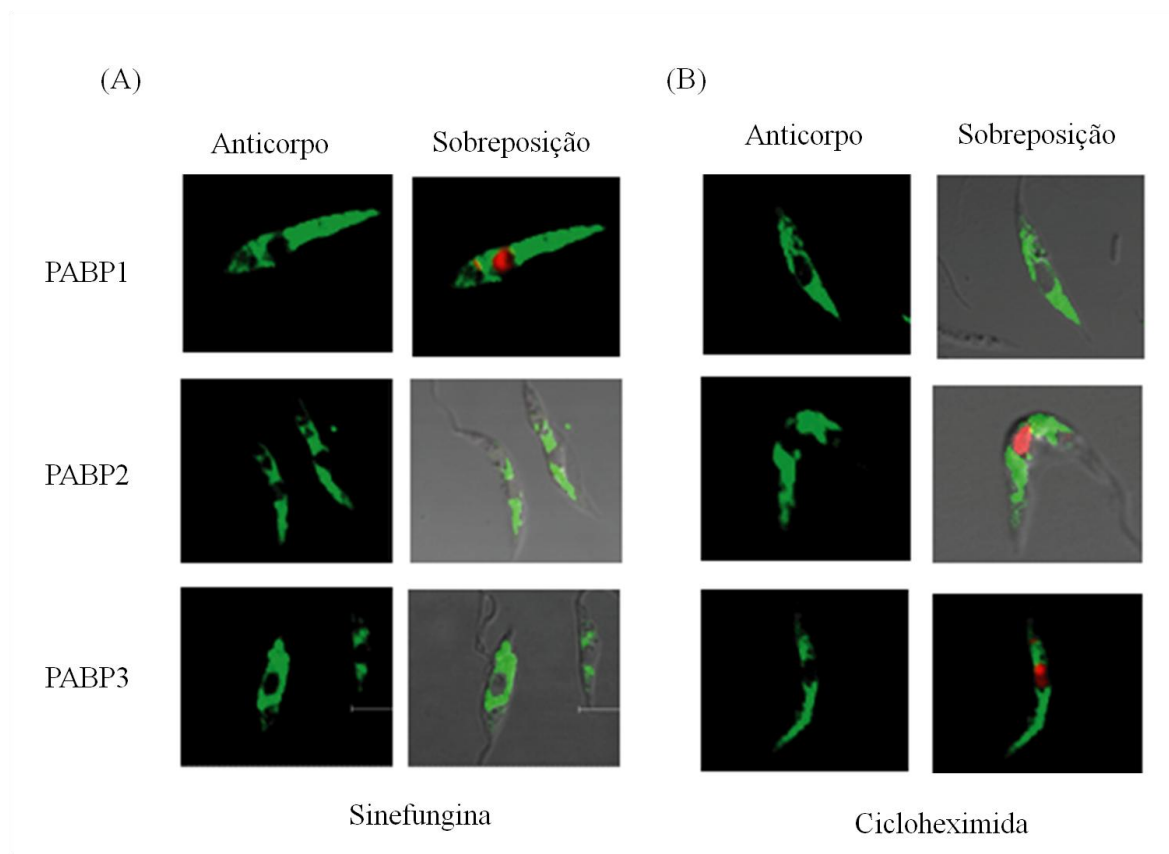


Figura 18. Localização subcelular das PABPs 1, 2 e 3 frente aos inibidores de processamento de RNA e tradução. Células na fase exponencial de crescimento em meio de cultura padrão na presença de Sinefungina (A) ou Cicloheximida (B).

5.3 Análise da expressão de isoformas da PABP1 na presença de inibidores de diferentes processos associados ao metabolismo de mRNAs e proteínas

Em trabalho anterior foi analisado o perfil de expressão das PABPs 1, 2 e 3 durante curvas de crescimento de *L. amazonensis*. Estas análises demonstraram uma grande variação no padrão de expressão dos três homólogos de PABP ao longo de curvas de crescimento do parasita. Enquanto que a PABP1 apresentou

múltiplas isoformas com comportamentos distintos ao longo da curva as PABP 2 e 3 apresentaram apenas uma isoforma, cada.

Uma vez que a PABP1 apresenta isoformas fosforiladas e não fosforilada e que estas possuem comportamentos diferenciados ao longo de curvas de crescimento decidiu-se investigar os eventos associados a fosforilação desta proteína via análise da sua expressão na presença de inibidores de transcrição, tradução, processamento de mRNAs, proteases e ainda inibidor de fosfatases. Para isto foi avaliada a expressão da PABP1 em curvas de crescimento realizadas utilizando-se células promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com os diferentes inibidores imediatamente quando do início destas curvas (Figura 19). Dentre as curvas de crescimento analisadas podemos observar três padrões distintos de fosforilação. No primeiro deles, após incubação com os inibidores de síntese e processamento de RNA, Actinomicina D e Sinefungina, observa-se uma diminuição na fosforilação global da PABP1, mais forte para a Sinefungina, e defosforilação completa no tempo 24 horas, quando em comparação com o controle positivo. No segundo, na incubação com os inibidores de tradução Cicloheximida e Puromicina, não é visualizado efeito no padrão de fosforilação logo após o início da cultura, porém ocorre defosforilação da PABP1 em 24h, provavelmente associada a morte celular. E por fim, no terceiro padrão, não foram observadas diferenças após a incubação ou, no caso do Acido Ocadáico, observamos um aumento das formas fosforiladas. Esses resultados sugerem que a formação de novos mRNAs pode estimular a fosforilação da PABP1, enquanto que a síntese protéica não é necessária para que a fosforilação inicial desta proteína ocorra.

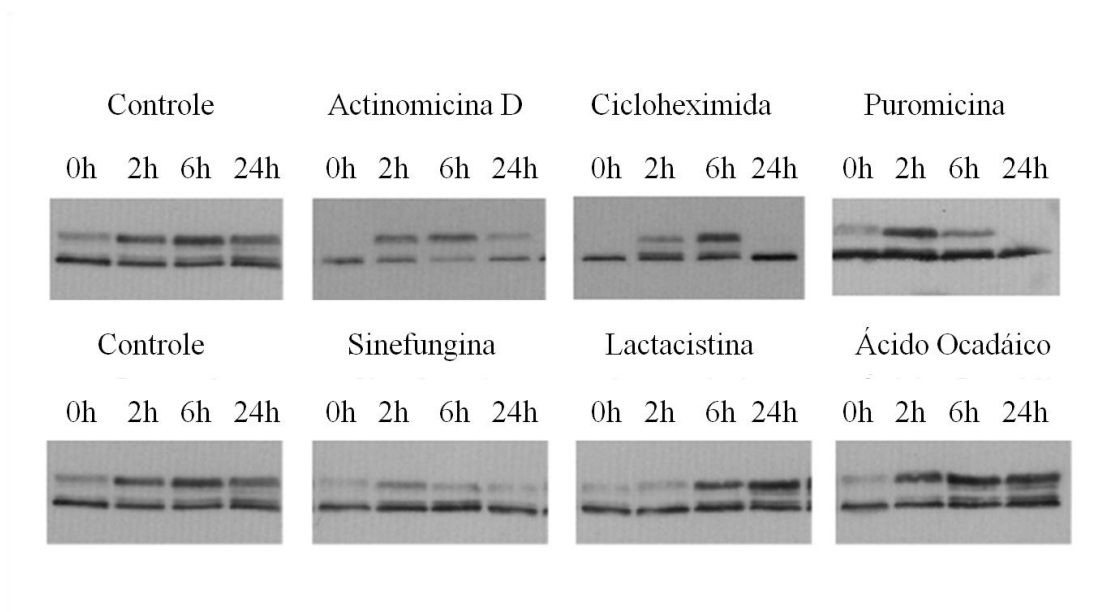


Figura 19. Análise da expressão da PABP1 sob inibição de diferentes processos celulares associados ao metabolismo de mRNAs e proteínas. Alíquotas representativas da curva controle de promastigotas ou aquelas produzidas na presença de Actinomicina D, Cicloheximida, Puromicina, Sinefungina, Lactacistina e Ácido Ocadáico foram analisadas por *Western-blot* com o soro contra a PABP1.

5.4 Análise da interação entre os homólogos de PABPs através de imunoprecipitação

A migração simultânea para o núcleo vista para as PABPs 2 e 3 através da inibição da transcrição sugere que estas duas proteínas devam interagir ou pelo menos se ligar aos mesmos mRNAs. Dados de nosso grupo utilizando experimentos de migração diferencial em gel não desnaturante (*band-shift*) demonstraram uma ligação diferencial entre os homólogos de PABP e sondas de RNA contendo sequências poli-A, onde se observou que a PABP1 se liga especificamente ao poli-A, enquanto que a ligação das PABPs 2 e 3 parece não

ser tão específica. Para investigar a possibilidade dos homólogos de PABP interagirem entre si ou ligar aos mesmos mRNAs, optou-se por imunoprecipitar individualmente as três PABPs nativas de extratos citoplasmáticos e testar os imunocomplexos precipitados, ou os respectivos sobrenadantes não ligados, quanto à presença ou ausência de cada uma das três proteínas. Como mostra a figura 20, cada um dos anticorpos purificados específicos foi capaz de imunoprecipitar e retirar do lisado (sobrenadante não ligado) toda ou quase toda a proteína alvo. Quando as amostras de PABP1 imunoprecipitada e seu sobrenadante foram investigados quanto à presença das PABPs 2 e 3 (painel a esquerda), não foi detectado nenhuma quantidade destas proteínas nos complexos precipitados (a esquerda), com ambas sendo encontradas apenas na fração não-ligada na mesma proporção em que foram utilizadas no ensaio (lisado). Da mesma forma quando amostras das imunoprecipitações das PABPs 2 e 3 foram utilizadas, não foi possível detectar nenhuma co-precipitação da PABP1. Porém quando a imunoprecipitação da PABP2 foi realizada foi possível detectar a presença da PABP3 no imunoprecipitado e sua depleção da fração não ligada (centro), mostrando que as duas interagem entre si, o mesmo foi observado quando realizado o ensaio reverso a partir da imunoprecipitação da PABP3 (a direita). Os resultados observados para as imunocitoquímicas e para as imunoprecipitações são consistentes com a interação direta entre as PABPs 2 e 3.

Com o intuito de investigar se a interação observada entre as PABPs 2 e 3 era dependente ou não de RNA os lisados foram pré-incubados com a enzima RNase antes da realização de novos ensaios de imunoprecipitação. Pode-se observar na figura 21 que as PABPs 2 e 3 são capazes de interagir tanto na

presença quanto na ausência de RNAs, mostrando que a ligação é independente de RNA.

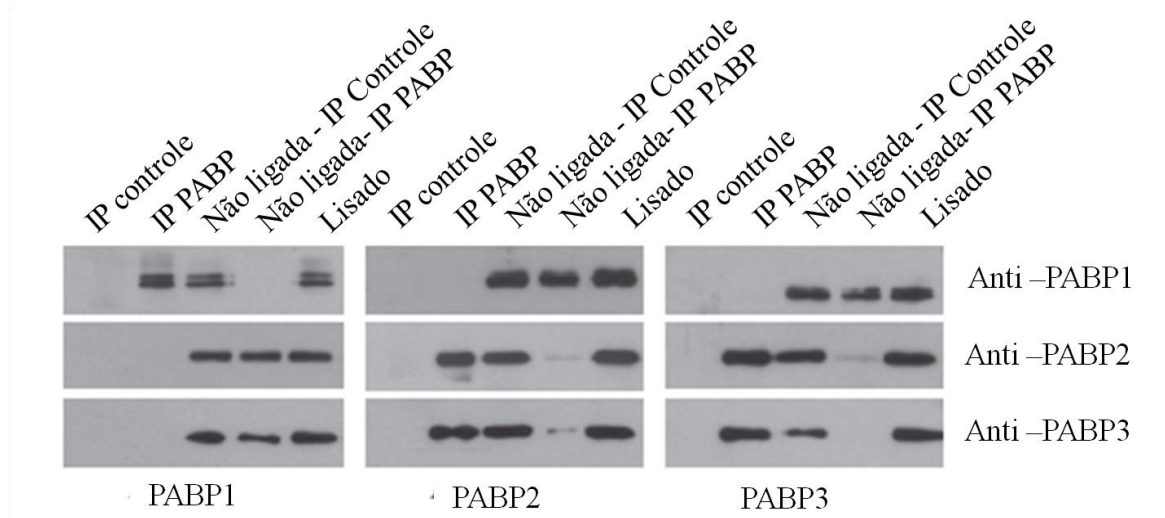


Figura 20. Análise da interação entre os três homólogos de PABP *in vivo*. Diferentes reações de imunoprecipitações foram realizadas utilizando um extrato citoplasmático de *L. major* e os respectivos anticorpos purificados dirigidos contra a PABP1 (painéis da esquerda), PABP2 (painéis do meio) e PABP3 (painéis da direita), bem como seus respectivos controles (soro pré-imune). Os imunocomplexos imunoprecipitados, bem como os sobrenadantes (não ligados) e amostras controle do lisado utilizados nas imunoprecipitações, foram então utilizados em reações distintas de *Western-blot* com os três conjuntos de anticorpos.

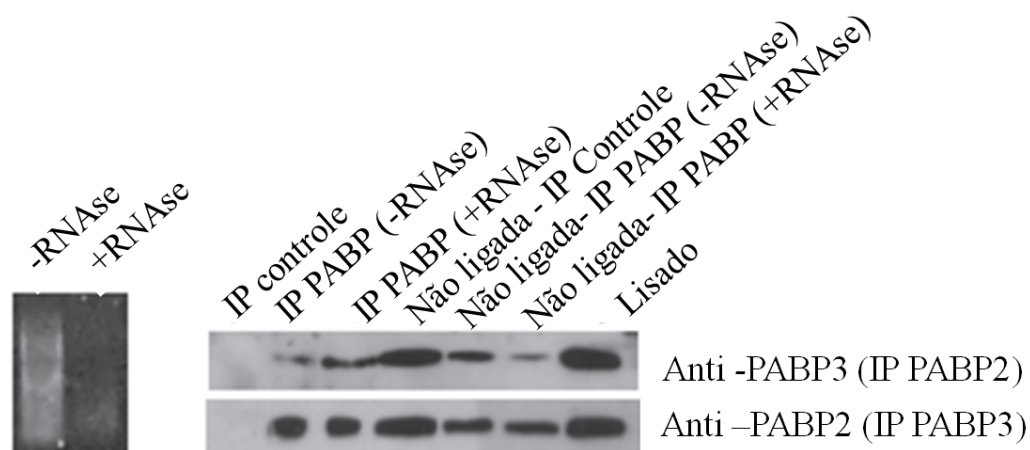


Figura 21. Análise da interação entre os homólogos de PABPs 2 e 3 na presença ou ausência de RNAs. Diferentes reações de imunoprecipitação foram realizadas utilizando extrato citoplasmático de *L. major*, na presença ou ausência de RNase, contra os respectivos anticorpos purificados anti-PABP2 e 3, bem como seus respectivos controles (soros pré-imune). Os imunocomplexos imunoprecipitados, bem como os sobrenadantes (não ligado) e alíquotas do Lisado (equivalente a quantidade de proteína adicionada na reação de imunoprecipitação), foram então utilizados em diferentes reações de *Western-blot* com os anticorpos citados. A esquerda, podemos observar o efeito do tratamento com RNase após de extração de RNA total de alíquotas das amostras utilizadas nas imunoprecipitações.

5.5 Análise das interações entre homólogos de PABP *in vitro* e mapeamento de sítios de ligação

Visando investigar melhor a interação observada entre as PABPs 2 e 3 e determinar os sítios responsáveis por estas ligações, partiu-se para a realização de ensaios *in vitro* com os homólogos de PABP de *L. major*. Foram então realizados ensaios de interação proteína-proteína do tipo *pull-down*, utilizando as proteínas recombinantes produzidas em *Escherichia coli* em fusão com GST

(Glutathione S-Transferase) (GST-PABP1, GST-PABP2 e GST-PABP3) e proteínas marcadas com ^{35}S sintetizadas em sistema de tradução *in vitro* eucariótico (^{35}S -PABP1, ^{35}S -PABP2, ^{35}S -PABP3). Estas proteínas foram inicialmente testadas quanto a sua capacidade de ligação umas com as outras na presença dos polinucleotídeos poli-A, mimetizando um excesso de mRNAs, e poli-C, como controle. Como pode ser visto na figura 22 todas as proteínas se mostram capazes de interagir uma com as outras, ao menos fracamente, *in vitro*. Entretanto, em comparação com o total de proteína marcada adicionada a reação (T.O. = tradução original), apenas a ligação da GST-PABP2 com as ^{35}S -PABP2 e ^{35}S -PABP3 se mostrou mais significativa em presença do poli-A, o que em parte coincide com os dados obtidos da imunoprecipitação.

Partiu-se então para mapear através de novos ensaios de *pull-down* o(s) sítio(s) nas PABPs 2 e 3 que seriam responsáveis pelas interações mais fortes evidenciadas entre as PABP2/PABP2 e PABP2/PABP3. Para o ensaio foram utilizadas as proteínas recombinantes em fusão com GST produzidas em *E. coli* (GST-PABP2, GST-PABP2NT₁₋₃₇₄, GST-PABP3, GST-PABP3NT₁₋₃₁₂ e GST-PABP3CT₂₆₁₋₅₄₄) e a proteína marcada ^{35}S PABP2 sintetizada em sistema de tradução eucariótico. Como pode ser visto na figura 23, a PABP2 marcada tem a capacidade de se ligar tanto com a GST-PABP2 completa quanto com a proteína referente ao domínio N-terminal (NT), porém nesta última com menor intensidade (Figura 23 - painel de cima). A truncagem referente a PABP2 C-terminal não foi utilizada uma vez que não foi possível expressar e/ou traduzir *in vitro* a mesma. Quando testado o domínio de interação entre a PABP2 e a PABP3 foi possível observar que a PABP2 é capaz de se ligar tanto na GST-PABP2 completa quanto nas truncagens contendo apenas os domínio N (NT) ou C (CT) terminais, embora

mais fracamente nas duas últimas, mostrando que pode haver mais de um sítio de interação ou que o sítio situe-se entre as duas regiões (Figura 23 – painel de baixo).

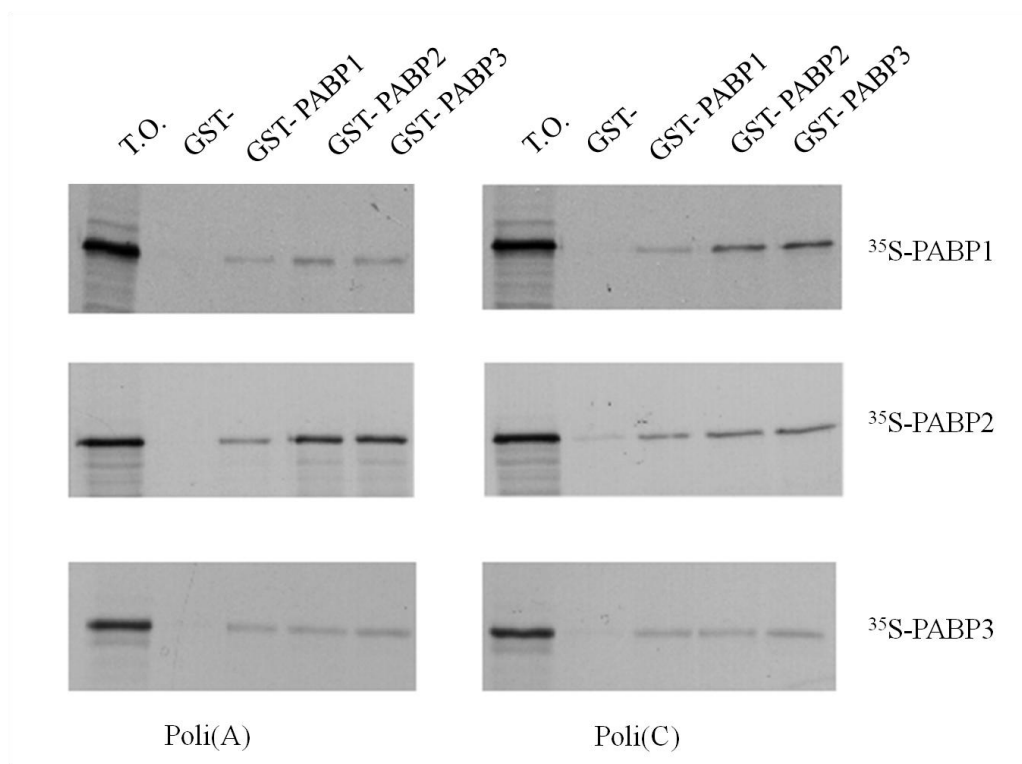


Figura 22. Análise de interação entre os homólogos da PABP. Autoradiografias dos ensaios de Pull-down entre as PABP fusionadas a GST com as PABPs marcadas [^{35}S].

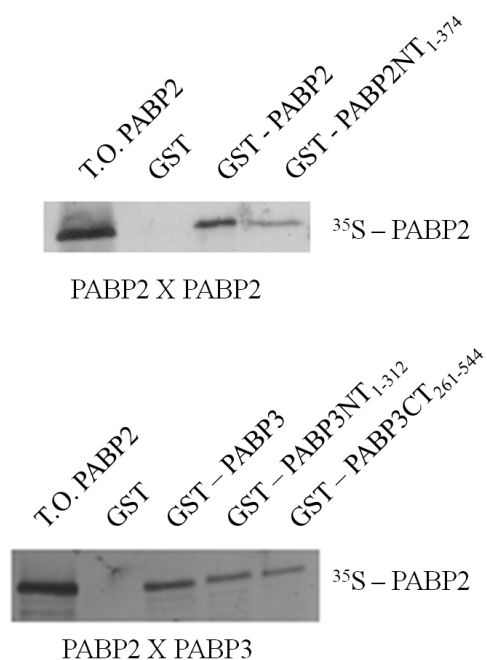


Figura 23. Mapeamento das regiões de interações entre as PABP2/PABP2 (painel de cima) e entre as PABP2/PABP3 (painel de baixo). Autoradiografias dos ensaios de *pull-down* entre as PABP2 completa e PABP2NT₁₋₃₇₄ fusionadas a GST (painel de cima) com o homólogo PABP2 marcado [³⁵S] e as entre a PABP3 completa e as PABP3NT₁₋₃₁₂ e PABP3CT₂₆₁₋₅₄₄ com a PABP2 marcada [³⁵S] (painel de baixo). (T.O. = tradução original).

5.6 Análise das interações entre as PABPs 1, 2 e 3 e a proteína EIF4G3, homólogo do fator de iniciação da tradução eIF4G de *L. major*

Em estudos prévios, ensaios de *pull-down* utilizando as PABPs fusionadas a GST (GST-PABP1, GST-PABP2, GST-PABP3) avaliaram a interação destas três proteínas com o homólogo do fator eIF4G mais diretamente implicado com a tradução nos tripanosomatídeos, a proteína EIF4G3, marcada radioativamente (³⁵S-EIF4G3). Nestes estudos se observou que todos os três homólogos de PABP

foram capazes de interagir *in vitro* com o EIF4G3, sendo a interação mais intensa aquela com a PABP1 (Reis, C.R S. -Tese de doutorado, 2009). No presente trabalho, para confirmar as interações observadas *in vitro* entre o EIF4G3 e os três homólogos da PABP fez-se necessário imunoprecipitar este homólogo de eIF4G, uma vez que a imunoprecipitação dos homólogos de PABP não possibilita a visualização do mesmo. Em um primeiro momento, a imunoprecipitação do EIF4G3 a partir de extratos de *L. major* foi testada para se avaliar não só a presença da proteína alvo, como a co-precipitação do EIF4E4, homólogo do eIF4E identificado como parceiro do eIF4G3 (Freire *et al.*, 2011); Reis, C.R S. -Tese de doutorado, 2009). Podemos observar na figura 24 que a imunoprecipitação do EIF4G3 foi bem sucedida, e toda a proteína foi depletada do lisado. Além disso, o EIF4E4 também é detectado na fração referente ao imunoprecipitado do EIF4G3 apesar de não totalmente depletado do lisado. Esse dado confirma a interação entre essas duas proteínas também em *L. major* e valida a abordagem de imunoprecipitação do EIF4G3.

Uma segunda imunoprecipitação foi então realizada nas mesmas condições e o produto desta, juntamente com os lisados antes e após incubação, foram testados quanto a presença de cada um dos três homólogos de PABP separadamente (Figura 25). Podemos observar que apenas a PABP1 foi especificamente detectada no produto da imunoprecipitação do EIF4G3, mesmo não tendo sido depletada do lisado. Já as PABPs 2 e 3 foram incapazes de ser detectadas na presença da proteína EIF4G3. Este resultado é consistente com a PABP1 participando ativamente do processo de tradução através de sua interação com as proteínas EIF4G3 e EIF4E4, como demonstrado *in vitro*, e sugere que as

três proteínas devem constituir um dos complexos formais de iniciação da tradução em *L. major* e outros tripanosomatídeos.

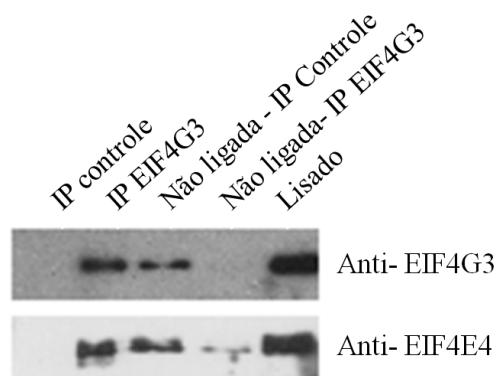


Figura 24. Análise da interação entre as proteínas EIF4G3 e EIF4E4 *in vivo*. Imunoprecipitação do homólogo de eIF4G, EIF4G3, nativo onde o produto da reação, bem como o sobrenadante não ligado e o lisado total foram submetidos a *Western-blot* com ambos os soros policlonais para o EIF4G3 e também para o homólogo de eIF4E parceiro, o EIF4E4.

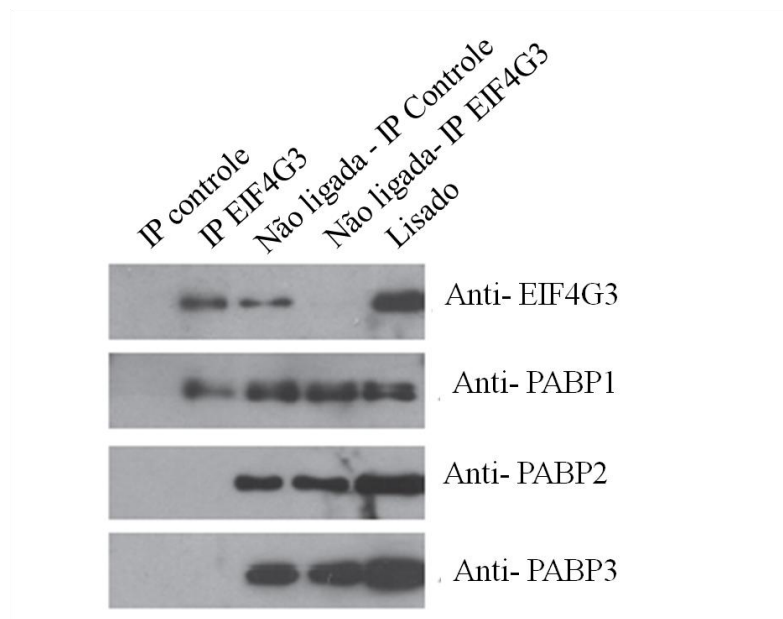


Figura 25. Análise da interação *in vivo* entre os homólogos de PABP e o homólogo do fator eIF4G de iniciação da tradução, o EIF4G3. Imunoprecipitação do EIF4G3 nativo onde o produto da reação, bem como o sobrenadante não ligado e o lisado total foram submetidos a *Western-blot* com cada um dos soros policlonais direcionados aos três homólogos da PABP.

Em seguida decidiu-se investigar os domínios da PABP1 responsáveis pela ligação ao EIF4G3. Para isso foram utilizadas a PABP1 completa fusionada a GST, bem como apenas seus domínios C e N-terminal (GST-PABP1, GST-PABP1NT₁₋₂₉₉ e GST- PABP1CT₂₃₇₋₅₆₁). Na figura 26 podemos observar que o ³⁵S-EIF4G3 foi capaz de se ligar a PABP1 completa e aos domínios C e N-terminais, porém as ligações com as duas últimas foram menos intensa, e assim não foi possível determinar os exatos sítios de ligação entre essas duas proteínas. Podemos então concluir que o sítio deve estar situado entre os domínios N e C terminal da proteína ou então que existam dois sítios distintos na PABP1 que contribuam para a ligação com o EIF4G3.

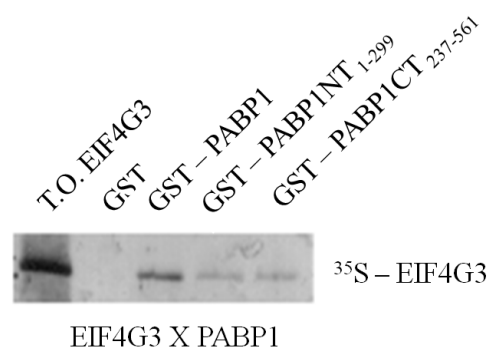


Figura 26. Mapeamento da região de interação da PABP1 com o fator EIF4G3. Autoradiografia dos ensaios de *pull-down* entre a PABP1 completa, PABP1NT₁₋₂₉₉ e PABP1CT₂₃₇₋₅₆₁ fusionadas a GST com o EIF4G3 marcado [³⁵ S]. O EIF4G3 interagiu não só com a PABP1 completa, como mais fracamente com ambas as metades N-terminal e C-terminal. (T.O. = tradução original)

5.7 Análise das interações entre as PABPs 1, 2 e 3 e dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E, eIF4E3 e 4, de *L. major*

Recentemente, foi descrito na literatura que a PABP1 de *Leishmania* é capaz de interagir diretamente com o fator eIF4E4, uma interação nova que até o momento não foi observada em outros eucariotos (Yoffe, 2009). Com base nessa informação e fazendo uso das ferramentas já disponíveis, decidiu-se avaliar a capacidade dos três homólogos de PABP de interagirem com o eIF4E4 e também com um segundo homólogo relacionado de eIF4E, o eIF4E3. Para isso foram utilizados as PABPs recombinantes fusionadas a GST (GST-PABP1, GST-PABP2, GST-PABP3) com as proteínas eIF4E3 e 4 radioativas (³⁵S- eIF4E3 e 4). Na figura 27 pode-se observar que tanto o eIF4E3 quanto o eIF4E4 foram capazes de se ligar às PABPs 1 e 3, sendo a interação com a PABP1 mais intensa.

Podemos observar também que os dois homólogos ligam bem mais fracamente a PABP2. Decidiu-se então determinar quais sítios na PABP1 estavam envolvidos nesta interação. Para isso foram utilizadas as proteínas truncadas GST-PABP1NT₁₋₃₂₄ e GST-PABP1CT₂₆₁₋₅₆₁. Na figura 28 observa-se que tanto o ³⁵S-EIF4E3 quanto o ³⁵S-EIF4E4 são capazes de se ligar apenas à região C-terminal da PABP1, confirmando a especificidade da interação e seu ineditismo, pois nada semelhante está descrito na literatura. Posteriormente serão estudados quais aminoácidos são diretamente responsáveis por esta ligação.

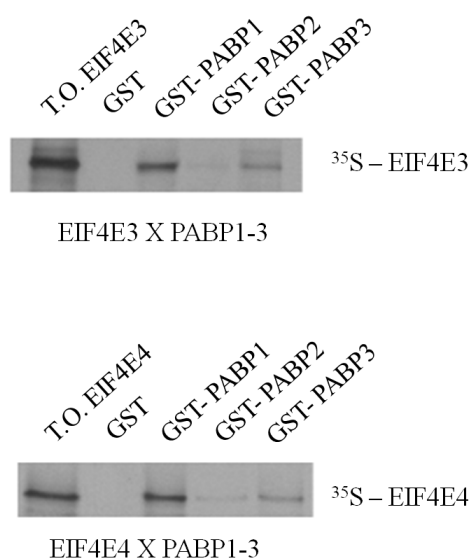


Figura 27. Análises das interações entre os homólogos de PABP e dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E, os EIF4E3 e 4. Autorradiografias dos ensaios de *pull-down* entre as PABPs 1, 2 e 3 fusionadas a GST com os homólogos de eIF4E, EIF4E3 e 4 marcados [³⁵S]. Foi observado que ambos os homólogos do eIF4E interagem com os três homólogos de PABP, sendo a interação de ambos com a PABP1 a mais intensa e com a PABP2 bem fraca.

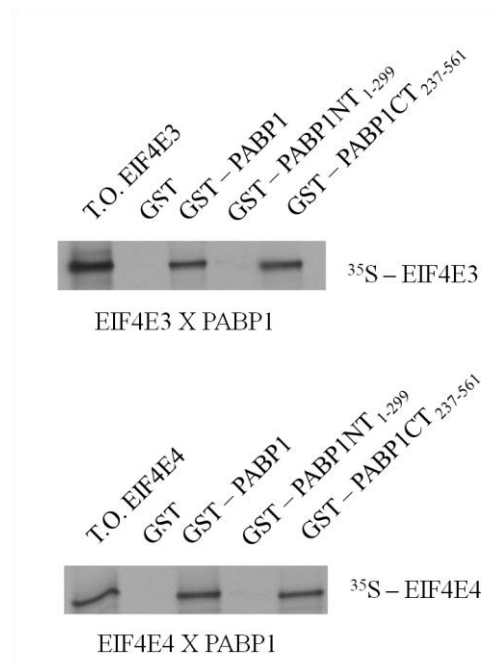


Figura 28. Mapeamento da região de interação da PABP1 com os fatores EIF4E3 e 4. Autorradiografias dos ensaios de *pull-down* entre as PABP1 completa, PABP1NT₁₋₂₉₉ e PABP1CT₂₃₇₋₅₆₁, fusionadas a GST, com os EIF4E3 e 4 marcados [³⁵ S]. Os EIF4E3 e 4, ao contrário do EIF4G3, interagem não só com a PABP1 completa como especificamente com a sua região C-terminal. (T.O. = tradução original)

5.8 Análise da associação de PABPs nativas com populações de mRNPs celulares em *L. major*

A associação a polissomos é um forte indício da participação de uma determinada proteína no processo de tradução, denotando a associação desta proteína ao mRNA ou a um complexo protéico ligado a este. Para avaliar a presença dos três homólogos de PABP junto a fração polissomal de *L. major*, foram produzidos lisados de promastigotas de fase exponencial de *L. major* que foram subsequenteemente fracionados por meio de centrifugações e/ou

ultracentrifugações sucessivas em colchão de sacarose de forma a se obter frações referentes a fração nuclear (enriquecida em núcleos e restos de membrana), polissomal (complexos de RNAs e proteínas associados a polissomas), mRNPs livres (complexos de RNAs e proteínas livres de polissomas) e sobrenadante pós mRNPs livres (fração protéica solúvel). Estas frações foram preparadas na presença de Cicloheximida, que mantém os polissomos unidos, ou EDTA, quelante que desfaz os polissomos. Alíquotas de cada fração foram então utilizadas em ensaios de *Western-blot* e o experimento validado por meio de soro direcionado contra uma proteína ribossomal denominada P0. Esta proteína foi encontrada principalmente na fração polissomal, quando utilizado a Cicloheximida, e se deslocou para as frações de mRNP livres e de proteínas solúveis quando utilizado o EDTA, demonstrando desta forma que o experimento funcionou.

Em um primeiro momento, decidiu-se investigar a interação ou não de homólogos de eIF4E e eIF4G selecionados com os polissomos no intuito de ajudar na caracterização funcional destas proteínas. Soros purificados contra as proteínas EIF4E3 e 4 e EIF4G4, foram então utilizados em reações de *Western-blot* utilizando as frações descritas acima. Na figura 29 podemos observar que o EIF4G4 e o EIF4E3 só foram detectados na fração de proteínas solúveis (pós mRNP livres), o que indica que estas proteínas não são capazes de interagir com os polissomas. Em contraste as diferentes isoformas do EIF4E4 se encontram na fração polissomal e na fração de mRNP livres com Cicloheximida e se deslocam para a fração de mRNPs livres e pós mRNPs livres na presença de EDTA. Isso mostra que EIF4E4 em todas suas isoformas está associado aos polissomas.

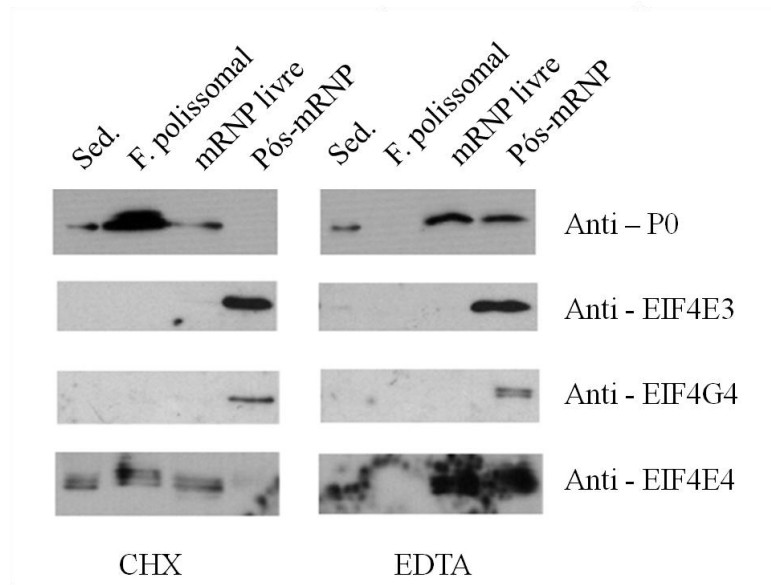


Figura 29. Perfil polissomal dos EIF4E3 e 4 e EIF4G4. Frações de lisados de *L. major* foram produzidos sob duas diferentes condições (Cicloheximida ou EDTA) através de ultracentrifugação em colchão de sacarose para obtenção das frações nucleares e de membranas (Sed.), polissomais (F. polissomal), mRNPs livres (mRNP livre) e de proteínas solúveis (Pós-mRNP). Cada fração foi então avaliada por *Western-blot* com anticorpo dirigido contra a proteína ribossomal P0 e contra os homólogos de eIF4E e eIF4G selecionados.

Em seguida foi analisado a associação das PABPs 1, 2 e 3 com os polissomos. Quando se observou a associação da PABP1, foi possível determinar que suas diferentes isoformas se encontram na fração polissomal, em presença de Cicloheximida, e se deslocam para a fração de mRNPs livre na presença de EDTA (Figura 30). Isso mostra que a PABP1 em suas várias isoformas deve estar especificamente associada a mRNAs em fase ativa de tradução. Já as PABPs 2 e 3 foram detectadas em todas as frações estudadas, sem deslocamento para a fração de mRNP livres ou outra quando adicionado EDTA, o que não permite uma definição clara quanto uma associação ou não com a maquinaria de tradução.

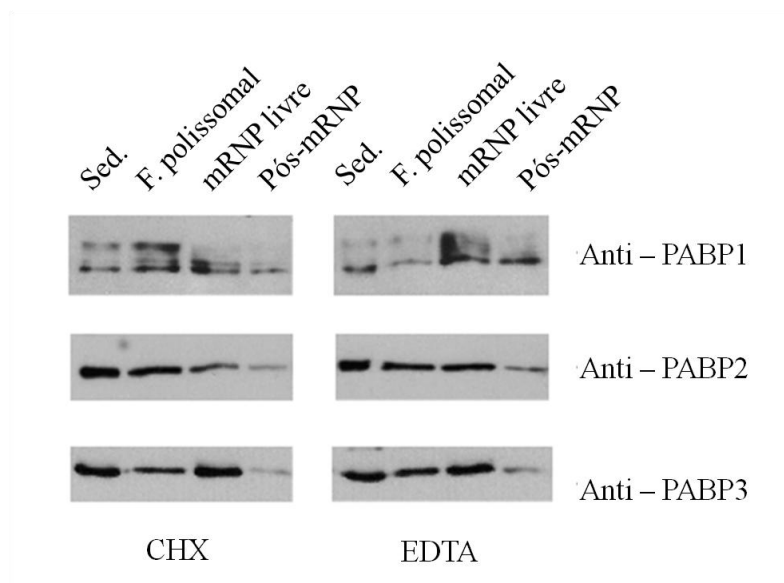


Figura 30. Perfil polissomal das PABPs 1, 2 e 3. Lisados celulares foram produzidos e fracionados como descrito na Figura anterior e estas frações avaliadas por os anticorpos dirigidos contra as três proteínas.

5.9 Análise da associação com polissomas de PABPs fusionadas a HA superexpressas em *L. infantum*

A fim de confirmar através de uma abordagem mais precisa a participação ou não dos três homólogos de PABP no processo de síntese protéica foram realizados fracionamentos em gradientes de sacarose (15 a 45%) utilizando as PABPs superexpressas em *L. infantum* fusionadas a HA. Primeiramente os genes codificantes das PABPs 2 e 3 de *L. infantum* foram amplificados e clonados em plasmídeos episomais (pSP-BT1) para a expressão das mesmas fusionadas ao epítipo HA. No caso do homólogo PABP1 a construção equivalente foi obtida independentemente e cedida pelo orientador desta Tese. As construções PABP1/pSP-BT1, PABP2/pSP-BT1 e PABP3/pSP-BT1 foram individualmente

transfectadas em células de *L. infantum* e após a etapa de seleção, para a confirmação da superexpressão das três proteínas, foram obtidos extratos proteicos, os quais foram analisados através de *Western-blot* (Figura 31).

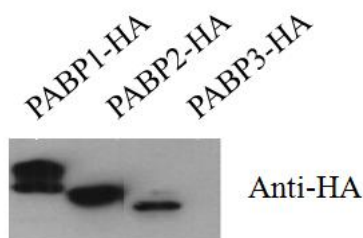


Figura 31. Análise da superexpressão das proteínas heterólogas PABP1, 2 e 3 fusionadas a HA. Extrato total de células de *L. infantum* transfectadas com os respectivos plasmídeos foram fracionados em gel SDS-PAGE 15 % seguido de reação de *Western-blot* contra o soro anti-HA.

Uma vez confirmada as superexpressões de cada um dos homólogos de PABP partiu-se para a realização do fracionamento em gradiente de sacarose. Primeiramente optou-se por realizar o ensaio utilizando células de *L. infantum* em fase exponencial na presença ou ausência de Cicloheximida e EDTA que não continham nenhum plasmídeo transfectado com o intuito de analisar o padrão das proteínas nativas utilizando os respectivos anticorpos específicos. O ensaio do gradiente de sacarose nos permite separar as frações referentes aos mRNPs livres, as subunidades ribossomais 40S e 60S, o ribossoma completo 80S e a fração polissomal as quais foram testadas através *Western-blot* contra o anticorpo da PABP1. Foi observado que a PABP1 se encontra em todas as frações na ausência de EDTA e o seu deslocamento dos polissomos quando adicionado EDTA, como controle positivo foi utilizado a proteína ribossomal P0

(dados não mostrados). Em seguida, células do transfectante PABP1-HA foram coletadas em duas fases distintas, a exponencial, onde a síntese de proteínas é bastante intensa, e a fase estacionária, onde um menor número de mRNAs está sendo traduzido, e produzidos lisados citoplasmáticos os quais foram levados ao fracionamento e as frações (como descrito acima) testadas através de *Western-blot*. Podemos observar que em fase exponencial as três PABPs se encontram em todas as frações testadas sendo mais abundantes nas frações 80S e polissomais (Figura 32A). Já em fase estacionária podemos observar que a PABP1 se encontra nas frações referentes aos mRNPs livres, 40S+60S e, 80S, enquanto as PABPs 2 e 3 se encontram apenas na fração de mRNPs livres (Figura 32B). Estes resultados em conjunto com os obtidos no item 5.6 mostram que todas as três PABPs devem participar no processo de síntese proteica, mesmo não sendo observadas interação entre as PABPs 2 e 3 com o fator EIF4G3 de iniciação da tradução, através dos métodos utilizados, e os mesmo não se deslocando da fração polissomal quando na presença de EDTA (Figura 30).

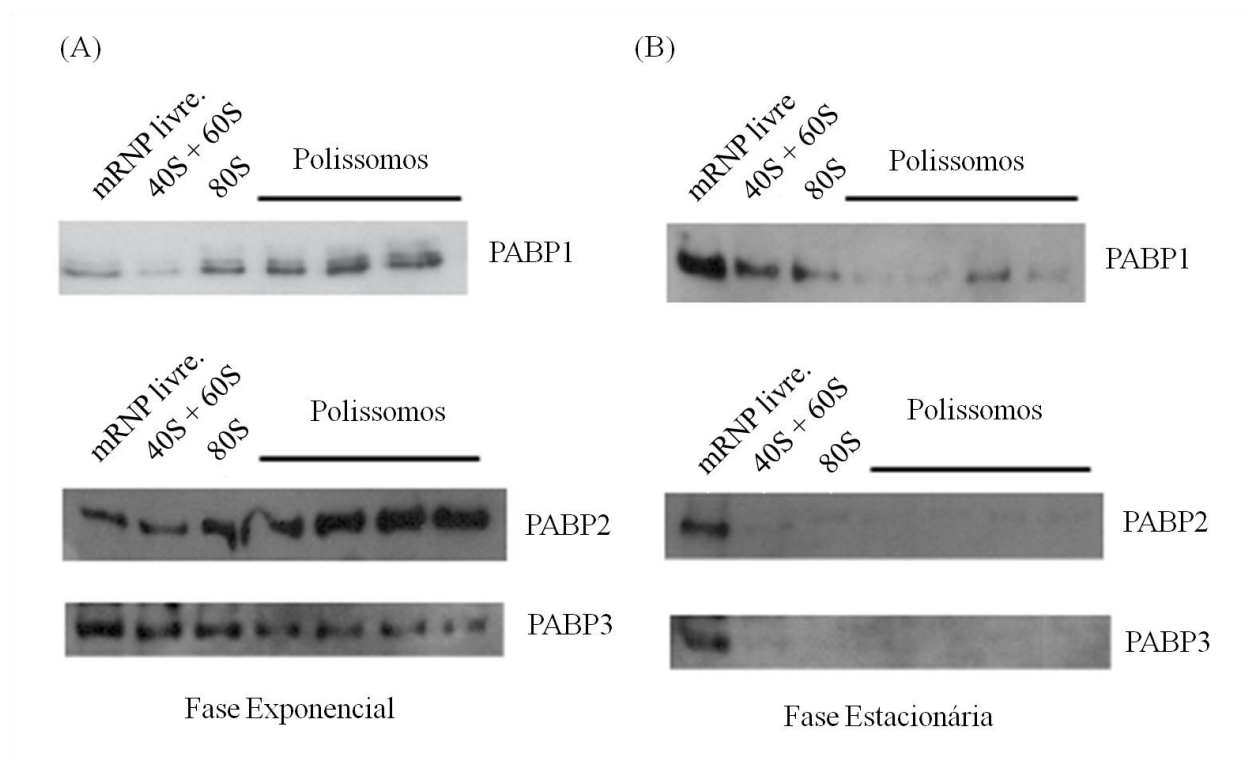


Figura 32. Associação com os polissomos em fases exponencial (A) e estacionária (B) dos três homólogos de PABP. Lisados citoplasmáticos de células transfectadas individualmente com os homólogos de PABP fusionados a HA foram fracionados em gradiente de sacarose (15%-45%). As frações foram então analisadas individualmente por *Western-blot* com o anticorpo anti-HA. As posições correspondentes as mRNPs livres, subunidades 40S e 60S, ribossoma completo 80S e polissomos estão indicadas.

5.10 Identificação de parceiros funcionais através de espectrometria de massa das PABPs.

Com o intuito de complementar os estudos de interação entre os homólogos de PABP e seus parceiros funcionais, bem como identificar novos parceiros que possam dar indícios de funções diferenciadas associadas aos três homólogos de PABP de *Leishmania*, foram realizadas imunoprecipitações em *L.*

infantum utilizando as três PABPs fusionadas a HA (dados não mostrados), as quais foram enviadas para a análise em espectrometro de massas. Cada experimento foi realizado em triplicata, porém resultados confiáveis de apenas um das réplicas estão disponíveis para análise no momento.

Uma vez de posse dos resultados as proteínas encontradas foram analisadas e colocadas em forma de tabela para uma melhor compreensão. Na tabela 2 podemos observar que as proteínas foram separadas por classe a qual pertencem (vertical) e de acordo com o número de achados para cada uma das PABPs (horizontal). No geral os resultados das análises nos permitiu confirmar algumas das interações demonstradas pelo nosso grupo de pesquisa bem como aquelas presentes nesta tese além de identificar novas que parecem indicar novas funções ao menos para as PABPs 2 e 3.

Primeiramente podemos observar que cada uma das três proteínas está presente como produto dos seus próprios imunoprecipitados, como se é esperado para este tipo de análise. Observamos também que as PABPs 2 e 3 co-imunoprecipitam uma com a outra, confirmando nossos dados de ligação entre as duas proteínas. Não se deixando de observar que neste tipo de análise as PABP 1 e 2 aparecem co-precipitando, porém em número menor que a interação PABP3/PABP3, e que pode ser resultado da superexpressão das proteínas cujos genes estão presentes em número de cópias (em plasmídeos episomais) acima do usual. Podemos observar também o aparecimento dos homólogo EIF4E4 e EIF4A1 de iniciação da tradução no imunoprecipitado da PABP1, reforçando dados anteriormente obtidos por nosso grupo sobre a participação desta em complexo com os EIF4G3 (não observado porém menos abundante) e EIF4E4.

Observamos também a interação dos três homólogos de PABP com o fator de alongação 1 alfa, e outros fatores de tradução e de proteínas de ribossomais que parecem ser específicos da PABP1.

Dentre as RNAs helicase e proteínas de ligação a RNA se destaca a ligação entre o homólogo da proteína Ded1p1 com a PABP2, esta proteína em *T. brucei* já foi descrita como envolvida na formação do complexo 43S durante a iniciação da tradução, reforçando que a PABP2 possui papel na síntese proteica. No mais se pode observar a existência de outras RNAs helicases e proteínas de ligação a RNA específicas tanto para ambas as PABP2 e 3 quanto para a PABP1. Entre estas destacamos a presença de duas proteínas associadas ao processamento e transporte de ribossomas e uma proteína associada ao transporte de mRNAs especificamente associadas às PABPs 2 e/ou 3, proteínas estas que poderiam explicar o comportamento diferenciado destes homólogos de PABP na sua migração ao núcleo em presença de Actinomicina D e reforçar um papel no transporte nucleo-citoplasmático de RNAs. Uma quarta proteína associada ao controle da tradução de mRNAs (ALBA) e associada especificamente a PABP2 também podem sugerir novas funções distintas para esta proteína.

No mais, proteínas como as relacionadas ao estresse celular, como a proteína heat-shock hsp70, ao citoesqueleto, como alfa e beta tubulina, bem como um grande número de proteínas hipotéticas se encontram presentes nas análises dos três homólogos. Proteínas individuais que se ligam exclusivamente a um determinado homólogo como o caso de proteínas mitocondriais para a PABP2 ou proteínas como as de transporte Sec-23 e Sec-24, que devem pertencer a uma

mesma via ou complexo, que parecem ser mais abundantemente associadas a PABP3 também foram observadas.

Tabela 2. Análise de parceiros funcionais das PABPs 1, 2 e 3 na fase exponencial de *L. infantum*

Proteínas Identificadas		Número de Acesso	PABP1HA	PABP2HA	PABP3HA
PABPs	PABP1	LinJ.35.5360	22	4	
	PABP2	LinJ.35.4200	1	30	15
	PABP3	LinJ.25.0080		7	9
Fatores de iniciação da tradução	EIF4E4	LinJ.30.0460	2	1	
	EIF4AI		2		
Outros fatores de tradução e proteínas ribossomais	elongation factor 1-alpha	LinJ.17.0090 (+5)	19	10	12
	elongation factor Tu, putative	LinJ.18.0740	1		
	elongation factor 2	LinJ.36.0190 (+2)	4		
	40S ribosomal protein S3, putative	LinJ.15.1010 (+1)	1		
	60S ribosomal protein L10a, putative	LinJ.18.0630 (+1)		1	
RNA helicases e proteínas de ligação a RNA	RNA-binding protein, putative	LinJ.17.0610	5		
	RNA-binding protein, putative	LinJ.04.1190	1		

Continuação: Tabela 2. Análise de parceiros funcionais das PABPs 1, 2 e 3 na fase exponencial de *L. infantum*

RNA helicases e proteínas de ligação a RNA	RNA helicase, putative	LinJ.21.1820	1		2
	Ded1p-1 homologue	LinJ.32.0410	2	10	4
	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative	LinJ.07.0130		2	1
	RNA binding protein, putative	LinJ.32.0790		3	1
	hypothetical protein, conserved	LinJ.34.2410		3	
	RNA-binding protein, putative	LinJ.35.2240		4	
Proteínas relacionadas a estresse	heat-shock protein hsp70, putative	LinJ.28.2960 (+2)	12	6	12
	heat shock protein 83-1	LinJ.33.0360 (+1)	9		1
	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor, putative	LinJ.30.2480 (+2)	3	1	1
	heat shock protein, putative	LinJ.33.2520	4		
	chaperonin alpha subunit, putative	LinJ.32.3470	2		1
	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	LinJ.36.2130(+2)	7	6	4
	chaperonin TCP20, putative	LinJ.13.1400	1		
	chaperonin containing t-complex protein, putative	LinJ.32.1060	3		
	T-complex protein 1, beta subunit, putative	LinJ.27.1150	1		
	T-complex protein 1, gamma subunit, putative	LinJ.23.1460	1		1
	T-complex protein 1, delta subunit, putative	LinJ.21.1330	2		

Continuação: Tabela 2. Análise de parceiros funcionais das PABPs 1, 2 e 3 na fase exponencial de *L. infantum*

Proteínas mitocondriais e não relacionadas a estresse	mitochondrial RNA binding protein 2,MRP2, gBP25	LinJ.09.1180		2	
	p22 protein precursor, putative	LinJ.30.1030		6	
Proteínas envolvidas em secreção de vesícula e transporte	protein transport protein Sec24C, putative	LinJ.25.1380	4	2	14
	protein transport protein Sec23-like protein	LinJ.36.6710	2		8
	vesicle-associated membrane protein, putative	LinJ.08.0030			2
	adaptin-related protein-like protein	LinJ.11.0990			3
Proteases e proteínas relacionadas	proteasome regulatory non-ATPase subunit, putative	LinJ.29.0120	1		
	proteasome regulatory ATPase subunit 5, putative	LinJ.22.0490	1		
	proteasome regulatory ATPase subunitcc118.3, putative	LinJ.12.0190			1
	ubiquitin-conjugating enzyme-like protein	LinJ.13.1320	1		
	polyubiquitin	LinJ.09.0950 (+3)	2	1	1
	GP63, leishmanolysin	LinJ.10.0490 (+2)	1	1	3
Proteínas quinases e proteínas relacionadas	serine/threonine-protein kinase, putative	LinJ.21.1870	1		
	14-3-3 protein-like protein	LinJ.36.3360	1		

Continuação: Tabela 2. Análise de parceiros funcionais das PABPs 1, 2 e 3 na fase exponencial de *L. infantum*

Citoesqueleto	alpha tubulin	LinJ.13.0330 (+1)	11	7	12
	beta tubulin	LinJ.08.1290 (+1)	15	5	9
Apoptose	programmed cell death 6 protein-like protein	LinJ.13.1500	1	4	6
Metabolismo de carboidratos e enzimas	hexokinase, putative	LinJ.21.0300 (+1)	4	1	3
	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	LinJ.30.2990 (+1)	1	3	
	phosphoglycerate kinase C, glycosomal	LinJ.20.0110 (+1)	1		
	malic enzyme, putative	LinJ.24.0790	5		
	ATP-dependent phosphofructokinase	LinJ.29.2620		1	
	3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase, putative	LinJ.25.1850		1	1
	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor, putative	LinJ.31.2320 (+1)	1		
	vacuolar ATP synthase subunit b, putative	LinJ.28.2610	2		
	vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, putative	LinJ.34.3460	1		
	ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	LinJ.27.1970	1		
	4-methyl-5(beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein, putative	LinJ.30.0800	1		
	transcription elongation factor-like protein	LinJ.33.2950	1		

Continuação: Tabela 2. Análise de parceiros funcionais das PABPs 1, 2 e 3 na fase exponencial de *L. infantum*

Proteínas hipotéticas ligadas a todas PABPs	hypothetical protein, conserved	LinJ.18.0660	2	11	11
	hypothetical protein, conserved	LinJ.27.1220	6	10	4
	hypothetical protein, conserved	LinJ.26.2670	4	2	4
	hypothetical protein, conserved	LinJ.21.0490	1	3	2
Proteínas hipotéticas ligada as PABP2 e/ou 3	hypothetical protein, conserved	LinJ.29.1570		4	
	hypothetical protein, conserved	LinJ.18.1160			2
	hypothetical protein, conserved	LinJ.36.1530		1	1
	hypothetical protein, conserved	LinJ.36.2340		1	1
	hypothetical protein	LinJ.20.0650		2	3
	hypothetical protein, conserved	LinJ.03.0710			1
Proteínas hipotéticas únicas a PABP1	hypothetical protein, conserved	LinJ.20.1670	3		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.29.0820	1		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.09.1070	1		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.33.2340	1		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.36.2340	1		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.18.0300	1		
	hypothetical protein, unknown function	LinJ.29.1330	2		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.35.3230	1		
	hypothetical protein	LinJ.20.0650	1		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.11.0980	1		
	hypothetical protein, conserved	LinJ.18.0520	1		

5.11. Identificação de RNAs alvos das PABPs

Com o intuito de identificar mRNAs alvo que se ligam a cada um dos homólogos de PABP foram utilizadas duas abordagens, sendo a primeira realizada pela Dr. Fabíola Barbieri Holetz e a segunda realizada como parte desta Tese a partir de dados obtidos através da primeira abordagem. No experimento inicial foram então realizadas imunoprecipitações dos três homólogos de PABP a partir de lisados de *L. major*, usando os soro policlonais de coelho específicos para cada proteína, e os produtos das mesmas foram submetidos a extrações de RNA seguidas de purificação dos RNAs co-purificados com essas proteínas. Após a purificação os mesmos foram sequenciados em plataforma Solid. Os resultados mais significativos (principais) das análises estão demonstrados nas tabelas 3 (mRNAs alvo para a PABP1) e 4 (mRNAs alvo para as PABPs 2 e 3). Estes resultados foram obtidos a partir da identificação de mRNAs preferencialmente ligados a PABP1, em comparação com as PABPs 2 e 3, e vice-versa. Pode-se observar que os mRNAs que mais possuem preferência pela PABP1 são em sua maioria codificantes de proteínas ribossomais enquanto que aqueles que ligam-se preferencialmente às PABPs 2 e 3 são em geral codificantes de vários tipos de histonas (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Identificação de mRNAs alvos da PABP1. Aqueles mRNAs que, após análise estatística, mostraram se preferencialmente associados à PABP1 (quando comparados às PABPs 2 e 3) estão listados.

Descrição dos genes	
LmjF36.2870	40S ribosomal protein S24e
LmjF36.2860	40S ribosomal protein S24e
LmjF35.3780	60S ribosomal protein L27A/L29, putative
LmjF35.3760	60S ribosomal protein L27A/L29, putative
LmjF35.3290	60S ribosomal subunit protein L31, putative
LmjF35.3280	60S ribosomal subunit protein L31, putative
LmjF35.0410	40S ribosomal protein S3a, putative
LmjF35.0400	40S ribosomal protein S3a, putative
LmjF31.2030	ubiquitin-fusion protein
LmjF31.1900	ubiquitin-fusion protein
LmjF30.3730	60S acidic ribosomal protein P2, putative
LmjF28.1030	ribosomal protein s20, putative
LmjF28.1010	ribosomal protein s20, putative
LmjF22.1330	hypothetical protein, conserved
LmjF15.0440	hypothetical protein, unknown function
LmjF15.0370	60S acidic ribosomal protein, putative
LmjF11.1130	60S ribosomal protein L28, putative
LmjF11.1110	60S ribosomal protein L28, putative

Tabela 4. Identificação de mRNAs alvos das PABPs 2 e 3. Aqueles mRNAs que, após análise estatística, mostraram se preferencialmente associados às PABPs 2 e 3 (quando comparados à PABP1) estão listados.

Descrição dos genes	
LmjF15.0010	histone h4
LmjF36.1610	universal minicircle sequence binding protein, putative
LmjF19.0050	histone H2B
LmjF27.0130	hypothetical protein, conserved
LmjF19.0030	histone H2B
LmjF19.0040	histone H2B
LmjF06.0010	histone h4
LmjF29.1740	histone H2A, putative
LmjF29.1730	histone H2A, putative
LmjF14.1160	Enolase
LmjF09.1340	histone H2B
LmjF27.1190	histone H1, putative
LmjF28.2770	heat-shock protein hsp70, putative

Na segunda abordagem foram utilizados oligonucleotídeos específicos para alguns dos mRNAs identificados no seqüenciamento a fim de confirmar os dados obtidos. Para isso foram realizadas imunoprecipitações dos homólogos de PABP fusionados a um *tag* de HA. Nessa abordagem, em lugar de soro policlonal específico contra cada proteína, foi utilizado soro monoclonal dirigido contra o *tag* de HA, e os extratos utilizados foram derivados de promastigotas de *L. infantum* expressando as proteínas de fusão. Os produtos das, os quais foram depois utilizados como molde para preparação de cDNA através de reação de transcrição reversa. Em seguida os cDNAs foram testados através de reações de PCR semiquantitativo utilizando oligonucleotídeos dirigidos contra mRNAs selecionados com base nas tabelas mostradas acima (Figura 33). Na figura podemos observar que utilizando oligonucleotídeos dirigidos ao gene da proteína da subunidade ribossomal 60S, L31, foi-se capaz obter amplificação do cDNA obtido através da imunoprecipitação da PABP1, bem como o da PABP2 porém a segunda com menor intensidade. Em contraste, quando os mesmos cDNAs foram testados contra os oligonucleotídeos dirigidos ao gene da histona H2B foi possível observar a amplificação dos cDNAs referentes aos imunoprecipitados das PABPs 2 e 3. Como controle negativo, foram utilizados oligonucleotídeos dirigidos ao gene da dineína, o qual não demonstrou preferência por nenhuma das PABPs, segundo a análise realizada. Nenhuma amplificação foi obtida com estes oligos, embora os mesmos foram capazes de amplificar o fragmento esperado do DNA genômico. Desta forma, os resultados obtidos de uma segunda abordagem independente confirmaram os dados iniciais. Assim, estes resultados, juntamente com aqueles obtidos através do fracionamento em gradiente sacarose, sugerem que apesar dos três homólogos de PABP estarem

participando do processo de tradução, os mesmos devem atuar ao menos em parte na tradução de populações diferentes de mRNAs.

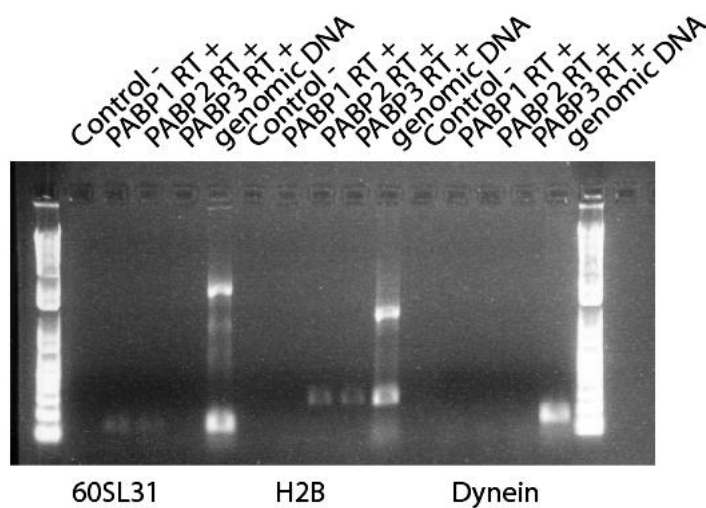


Figura 33. Análise do padrão de co-precipitação de mRNAs específicos junto às PABPs 1, 2 e 3. Gel de agarose 1% mostrando o resultado da amplificação dos cDNAs obtidos através das imunoprecipitações das PABP1-3 respectivamente seguido de extração de RNA e RT-PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos dirigidos a genes específicos obtidos através de dados de sequenciamento de RNAs como descrito acima.

6. Discussão

A PABP é uma proteína extremamente conservada entre os eucariotos e recentemente foi caracterizada como um fator de iniciação da tradução que atua na célula através de múltiplos mecanismos (Kahvejian *et al.*, 2005). Dentre os tripanossomatídeos foram inicialmente descritos homólogos individuais da PABP em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* (Batista *et al.*, 1994; Bates *et al.*, 2000; Pitula *et al.*, 1998), porém o genoma de *L. major* codifica três homólogos desta proteína, fato contrastante com o genoma de outros Tripanossomatídeos como *T. brucei* e *T. cruzi*, os quais possuem apenas duas PABPs. Os dados mostrados nesta Tese e em trabalhos anteriores sugerem que o terceiro homólogo da PABP atue de forma redundante com a PABP2 ou complementando as funções sugeridas para esta. A identificação de mais de uma PABP em *L. major* sugere que além de sua função de ligação a cauda poli-A dos mRNAs estas proteínas possuam funções especializadas adicionais *in vivo* (Mangus *et al.*, 2003). A presença de múltiplos homólogos de PABP já foi reportada em eucariotos superiores, tais como *Arabidopsis thaliana* (oito homólogos) (Belostotsky, 2003), *Caenorhabditis elegans* (três) e *H. sapiens* (cinco) (Mangus *et al.*, 2003), os quais cumprem funções adicionais à sua atividade comum de ligação a poli-A. Dentre os homólogos de PABP encontrados em humanos, a PAB 1 parece ter papel na tradução e no *turn-over* dos mRNAs, a PAB 2 está envolvida na poliadenilação de mRNAs citoplasmáticos e as PAB 3 e 5 são expressas apenas em alguns órgãos (Mangus *et al.*, 2003; Gorgoni and Gray, 2004; Brook *et al.*, 2009). Em *Arabidopsis thaliana* temos os oito homólogos agrupadas em quatro classes (Belostotsky,

2003): aqueles da classe I, encontrados apenas em tecidos reprodutivos e que podem servir de fatores regulatórios durante a gametogênese e o desenvolvimento precoce; os das classes II e III, agrupados de acordo com análises de expressão, onde os genes da classe II altamente expressos enquanto que os da classe III apresentam pouca e restrita expressão; já a classe IV contém a PAB1 que tem expressão apenas na raiz (Bravo *et al.*, 2005). A presença de múltiplos homólogos da PABP em *L. major* pode sugerir então que estas possuam diferentes funções na tradução e/ou metabolismo de mRNAs.

Dos três homólogos da PABP de *Leishmania* estudados apenas a PABP1 possui múltiplas isoformas, as quais respondem diferentemente quando submetidas a inibição de diversos processos celulares. Isoformas de PABP já foram descritas em levedura, ouriço, trigo e plantas (Drawbridge *et al.*, 1990; Le *et al.*, 1997; Le *et al.*, 2000) e foi postulado que estas modificações sejam devidas a fosforilação. Em plantas o estado fosforilativo da PABP não só influencia a ligação cooperativa com a poli-A como também determina a interação específica com aqueles fatores já identificados como capazes de interagir com a PABP. No mais foi levantada a possibilidade de que o estado fosforilativo das PABPs mediam a interação funcional entre o *cap* e a cauda de poli-A (Le *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2009; Brook *et al.*, 2012). Em *Leishmania sp.* foi descrita a presença de eventos de fosforilação na PABP1 bem como identificados possíveis sítios de fosforilação, como a presença de 7 sítios potenciais da proteína quinase C, cinco dos quais encontrados dentro dos RRM, e vários sítios não muito conservados da caseína quinase II (Bates *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 1996; Hamilton *et al.*, 1997). Mais recentemente, dados não publicados de nosso grupo indicam que pelo menos em *Leishmania* os sítios de fosforilação não se localizam nos RRM e sim na região

central de conexão da proteína e que estes se assemelham ao sítio consenso das map quinases. Fosforilação de ribonucleoproteínas está envolvida no controle das atividades de ligação do RNA, localização celular e formação de complexos ribonucleoproteicos (Brook *et al.*, 2012). É possível então que a fosforilação da PABP1 possa determinar a natureza de suas propriedades de ligação ao RNA como, por exemplo, especificando o tipo de interação ao poli-A e sua interação com outras proteínas.

Em tripanosomatídeos, diferentemente de outros eucariotos, não foram encontrados genes que codificam PABPs nucleares. Foi demonstrado que em alguns organismos um dos homólogos da PABP citoplasmática é encontrado não só no citoplasma, como também se desloca até o núcleo onde participa na exportação dos mRNA (Thakurta *et al.*, 2002; Burgess *et al.*, 2011; Burgess and Gray, 2012). As análises de imunocitoquímica mostradas nesta Tese confirmam a localização citoplasmática de todos os homólogos de PABP de *Leishmania*, compatível com várias das funções estabelecidas para as PABPs em outros organismos. A localização citoplasmática das PABPs 2 e 3 contrasta com os dados prévios obtidos para ambas as proteínas sendo encontradas em frações nucleares geradas por centrifugação, o que pode sugerir uma associação de ambas as proteínas com membranas celulares ou organelas que estariam baixando juntamente com a fração nuclear por serem mais pesadas. Além disso, quando submetidas a inibição da transcrição estas proteínas migram quase em sua totalidade para o núcleo enquanto que a PABP1 permanece predominantemente no citoplasma da célula. Estes dados sugerem que a PABP1 deve estar associada com as funções estabelecidas para as PABPs no citoplasma, enquanto que as PABPs 2 e 3 devem, além de suas funções no

citoplasma, estar envolvidas com funções dentro do núcleo, tais como a exportação dos mRNAs. Em tripanossomatídeos foi demonstrado que sinais de localização nuclear (SLN) estão presentes e são parcialmente conservados em relação a outros eucariotos (Marchetti *et al.*, 2000). Quando as seqüências das diferentes PABPs de *Leishmania* foram utilizadas em buscas para possíveis SLNs, foi identificado no final do RRM3 da PABP2, um possível motivo de localização nuclear. Embora estes motivos não tenham sido encontrados na sequência da PABP3, um segmento constituído de uma região rica em aminoácidos positivamente carregados, geralmente encontrados nos SLNs (Cokol *et al.*, 2000) , pode ser identificado em região equivalente desta proteína. O conjunto completo de resultados obtidos sugere então papéis diferenciados para pelo menos dois dos três homólogos de PABP que podem estar associados a sua localização subcelular diferenciada como uma participação nuclear no metabolismo dos mRNAs.

Como descrito na literatura as moléculas de PABP são capazes de se multimerizar através de uma região encontrada entre os domínios N e C terminal da proteína , porém nunca foi estudado a possibilidade de interação de duas moléculas diferentes de PABP. Aqui nossos estudos mostram, de forma inédita, que moléculas diferentes de PABP também são capazes de se interagir. No mais, mostramos que a interação é independente de mRNA e que essa interação deve ocorrer no RRM 4 ou até mesmo a possibilidade da ocorrência de dois sítios distintos de ligação, fato este que expande o repertório de interações conhecidas para a PABP.

A interação entre PABP e outros fatores de iniciação da tradução já está bem caracterizada em diversos organismos. Diferentemente do que ocorre na maioria destes, entretanto, os fatores de iniciação da tradução que formam o complexo EIF4F e a PABP nos tripanossomatídeos possuem um número elevado de homólogos de expressão simultânea, indicando uma grande complexidade na iniciação da sua síntese protéica. Várias das interações entre os fatores de iniciação que participam do processo de sínteses proteica nestes organismos já vêm sendo estudadas pelo nosso grupo (Dhalia *et al.*, 2005;Dhalia *et al.*, 2006;Freire *et al.*, 2011) . Em alguns organismos foi observado que interação direta da PABP com o EIF4G estimula a interação entre o EIF4F e o mRNA em humanos e leveduras (Kahvejian *et al.*, 2005;Amrani *et al.*, 2008;Svitkin *et al.*, 2009) e que a mesma aumente a afinidade do EIF4F pelo *cap* em plantas e levedura (Svitkin *et al.*, 2009). Neste trabalho foi possível determinar que *in vivo* apenas a PABP1 é capaz de se ligar ao EIF4G3, enquanto que as outras duas não possuíam capacidade de ligação. No mais, com o intuito de determinar um complexo EIF4F-PABP ativo na tradução confirmamos não só a capacidade de ligação do fator EIF4G3 ao EIF4E4 como também a interação do EIF4G3 com a PABP1 e entre esta com o EIF4E4. Recentemente estudos de duplo híbrido sugerem que, ao menos em *Leishmania*, a PABP1 não é capaz de interagir com o EIF4G3, e sim que sua ligação seria indireta através do EIF4E4 (Zinoviev *et al.*, 2011). Uma vez que nossos dados de imunoprecipitação e de espectrometria apontam as PABP1/EIF4G3 como parceiros diretos é possível que no caso da abordagem de duplo híbrido, impedimentos produzidos pela abordagem utilizada possam ter dificultado a detecção desta interação. Dados de nosso grupo demonstraram um segundo complexo eIF4F em tripanosomatídeos, centrado nas

proteínas EIF4G4 e EIF4E3 (Freire *et al.*, 2011). Resta a dúvida se este complexo não poderia atuar via alguma interação ainda não identificada com as PABPs 2 e 3.

Em eucariotos superiores já foram identificados os motivos responsáveis por algumas das interações descritas acima sendo uma das interações mais estudadas a que ocorre entre os homólogos do EIF4G e PABP. Foi demonstrado tanto em humanos quanto em leveduras que a região de interação esta situada entre os RRM 1 e 2 da PABP, sendo o RRM 2 o mais importante para que a ligação ocorra, embora o mesmo sozinho tenha sua capacidade de ligação diminuída (Kessler and Sachs, 1998; Imataka *et al.*, 1998; Cheng and Gallie, 2007). Neste estudo não foi possível identificar de forma exata o domínio de ligação entre os homólogos PABP1 e EIF4G3, porém sugerimos que esta ligação seja diferente da previamente descrita, pelo menos em *L. major*, já que nossos dados apontam a possível participação do RRM 4 ou até mesmo a necessidade de dois sítios distintos. Outra interação da PABP1, como mostrado acima é com o homólogo EIF4E4 (Zinoviev *et al.*, 2011), porém o sítio de ligação na PABP1 nunca havia sido descrito e aqui mostramos pela primeira vez não só a capacidade de interação desta proteína com o EIF4E3 como também que a região de interação esta presente na sua região C- terminal.

A associação com os polissomas é um indício de que as proteínas estejam participando do processo de tradução. A associação de PABP com os polissomos já foi descrita em diversos organismos (Kimura *et al.*, 2009; Mangus *et al.*, 2003; Kuhn *et al.*, 2009; Amrani *et al.*, 2008). Nosso estudo mostrou que todos os três homólogos se encontram na fração polissomal em células exponenciais da

forma promastigota, com a PABP1 sendo deslocada quando se adiciona EDTA, bem como a ausência dos mesmos em células de fase estacionária o que demonstra uma forte evidência da participação dos mesmos no processo de síntese proteica. Aqui, juntamente com dados do nosso grupo e por ser a PABP1 o único homólogo que se liga *in vivo* ao EIF4G3, homólogo com papel associado a tradução, sugerimos que esta efetue um papel mais ativo na tradução e que as PABPs 2 e 3 estejam envolvidas na tradução de RNAs mais específicos. Com a falta de ligação observada das PABP2 e 3 ao EIF4G3, porém com as mesmas participando da tradução, podemos sugerir que pelo menos para esses dois homólogos a tradução se dê de forma diferente ao já descrito na literatura. Uma das hipóteses seria de que essas duas proteínas podem sim se ligar ao EIF4G3, porém de uma forma transitória, que não foi possível ser observada pelos métodos testados, ou que as mesmas poderiam se ligar a outro homólogo do EIF4G em determinadas condições. No mais, através de espectrometria de massas foram observadas algumas proteínas hipotéticas que se ligam diferencialmente a esses dois homólogos e que poderiam estar mediando esta interação.

No tripanossomatídeo parasita de inseto *Crithidia fasciculata* foi descrita uma proteína denominada RBP63, pertencente ao complexo protéico CSBP11, a qual foi predita como sendo um ortólogo da proteína de ligação a cauda poli-A em *L. major*. Esta proteína, ortólogo da PABP2, se ligou a elementos sequenciais presentes em vários mRNAs que se acumulam periodicamente durante o ciclo celular (Mittra and Ray, 2004). Nossos resultados também sugerem que as PABPs 2 e 3 em *L. major* se liguem a mRNAs alvos distintos, os quais são encontrados em fases específicas do ciclo celular, como é o dos mRNAs de

histonas, cuja tradução é necessária na fase S do ciclo celular. Até o momento não está claro quais as seqüências nos mRNAs que podem mediar esse reconhecimento diferenciado, nem tão pouco como se daria sua tradução seletiva, mas estes serão futuros alvos de investigação.

O presente trabalho então contribuiu no entendimento das possíveis funções associadas aos três homólogos de PABP de *Leishmania* e seus parceiros funcionais. Foi possível determinar que estes três homólogos devem estar participando do processo de síntese protéica, porém associados a classes diferentes de RNAs. No mais, além da função na tradução, as PABPs 2 e 3 devem participar em outros processos como no transporte de mRNAs do núcleo para o citoplasma da célula ou no metabolismo de mRNAs. A associação com parceiros funcionais como EIF4G e EIF4E e com a própria PABP vêm auxiliando no entendimento do papel desses homólogos, porém mais estudos precisam ser realizados. O conjunto desses resultados constituirá uma contribuição altamente relevante ao estudo da síntese de proteínas em tripanosomatídeos além de ampliar o conhecimento sobre o espectro de ação de uma proteína tão relevante em eucariotos como é a PABP.

7. Conclusões

- Os três homólogos de PABP possuem localização citoplasmática em condições normais de crescimento, enquanto que apenas os homólogos PABP2 e 3 apresentam localização diferenciada sob inibição da transcrição
- Todos os homólogos de PABP são capazes de interagir entre si *in vitro*, porém, com diferentes afinidades sendo a interação entre as PABP2 e 3 as mais fortes. No entanto, *in vivo* apenas os homólogos PABP2 e 3 são capazes de interagir e esta interação é independente de RNA
- Os três homólogos de PABP interagem *in vitro* com o fator de tradução eIF4G3, com diferentes afinidades, sendo a interação entre a PABP1 e o eIF4G3 a mais forte. No entanto *in vivo* observou-se apenas a interação PABP1/eIF4G3
- Dos homólogos de PABP a PABP1 se liga mais fortemente ao fator de tradução eIF4E4 e a ligação se dá através do domínio C-terminal da PABP1
- Os três homólogos de PABP parecem estar envolvidos com a iniciação da tradução, porém se ligam a RNAs alvos distintos
- Em *Leishmania* deve haver pelo menos um complexo de iniciação da tradução formado pelas proteínas eIF4G3/eIF4E4/eIF4A1/PABP1

8. Referências Bibliográficas

Aebischer T (1994) Recurrent Cutaneous Leishmaniasis: a Role for Persistent Parasites? *Parasitol Today* 10:25-28.

Afonina E, Stauber R and Pavlakis G N (1998) The Human Poly(A)-Binding Protein 1 Shuttles Between the Nucleus and the Cytoplasm. *J Biol Chem* 273:13015-13021.

Ambrosio DL, Barbosa C F, Vianna V F and Cicarelli R M (2004) Trypanosoma Cruzi: Establishment of Permeable Cells for RNA Processing Analysis With Drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99:617-620.

Amer AO and Swanson M S (2002) A Phagosome of One's Own: a Microbial Guide to Life in the Macrophage. *Curr Opin Microbiol* 5:56-61.

Amrani N, Minet M, Le G M, Lacroute F and Wyers F (1997) Yeast Pab1 Interacts With Rna15 and Participates in the Control of the Poly(A) Tail Length in Vitro. *Mol Cell Biol* 17:3694-3701.

Awasthi A, Mathur R K and Saha B (2004) Immune Response to Leishmania Infection. *Indian J Med Res* 119:238-258.

Bag J and Bhattacharjee R B (2010) Multiple Levels of Post-Transcriptional Control of Expression of the Poly (A)-Binding Protein. *RNA Biol* 7:5-12.

Bangs JD, Crain P F, Hashizume T, McCloskey J A and Boothroyd J C (1992) Mass Spectrometry of MRNA Cap 4 From Trypanosomatids Reveals Two Novel Nucleosides. *J Biol Chem* 267:9805-9815.

Bates EJ, Knuepfer E and Smith D F (2000) Poly(A)-Binding Protein I of Leishmania: Functional Analysis and Localisation in Trypanosomatid Parasites. *Nucleic Acids Res* 28:1211-1220.

Batista JA, Teixeira S M, Donelson J E, Kirchhoff L V and de Sa C M (1994) Characterization of a Trypanosoma Cruzi Poly(A)-Binding Protein and Its Genes. *Mol Biochem Parasitol* 67:301-312.

Belostotsky DA (2003) Unexpected Complexity of Poly(A)-Binding Protein Gene Families in Flowering Plants: Three Conserved Lineages That Are at Least 200 Million Years Old and Possible Auto- and Cross-Regulation. *Genetics* 163:311-319.

Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C and Guilbride D L (2005) Messenger RNA Processing Sites in Trypanosoma Brucei. *Mol Biochem Parasitol* 143:125-134.

Berlanga JJ, Baass A and Sonenberg N (2006) Regulation of Poly(A) Binding Protein Function in Translation: Characterization of the Paip2 Homolog, Paip2B. *RNA* 12:1556-1568.

Besteiro S, Barrett M P, Riviere L and Bringaud F (2005) Energy Generation in Insect Stages of Trypanosoma Brucei: Metabolism in Flux. *Trends Parasitol* 21:185-191.

Besteiro S, Williams R A, Coombs G H and Mottram J C (2007) Protein Turnover and Differentiation in Leishmania. *Int J Parasitol* 37:1063-1075.

Bi X and Goss D J (2000) Wheat Germ Poly(A)-Binding Protein Increases the ATPase and the RNA Helicase Activity of Translation Initiation Factors EIF4A, EIF4B, and EIF-Iso4F. *J Biol Chem* 275:17740-17746.

Bienroth S, Keller W and Wahle E (1993) Assembly of a Processive Messenger RNA Polyadenylation Complex. *EMBO J* 12:585-594.

Bienroth S, Wahle E, Suter-Crazzolara C and Keller W (1991) Purification of the Cleavage and Polyadenylation Factor Involved in the 3'-Processing of Messenger RNA Precursors. *J Biol Chem* 266:19768-19776.

Blanco P, Sargent C A, Boucher C A, Howell G, Ross M and Affara N A (2001) A Novel Poly(A)-Binding Protein Gene (PABPC5) Maps to an X-Specific Subinterval in the Xq21.3/Yp11.2 Homology Block of the Human Sex Chromosomes. *Genomics* 74:1-11.

Blobel G (1973) A Protein of Molecular Weight 78,000 Bound to the Polyadenylate Region of Eukaryotic Messenger RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:924-928.

Boothroyd JC and Cross G A (1982) Transcripts Coding for Variant Surface Glycoproteins of Trypanosoma Brucei Have a Short, Identical Exon at Their 5' End. *Gene* 20:281-289.

Bravo J, guilar-Henonin L, Olmedo G and Guzman P (2005) Four Distinct Classes of Proteins As Interaction Partners of the PABC Domain of Arabidopsis Thaliana Poly(A)-Binding Proteins. *Mol Genet Genomics* 272:651-665.

Brook M, McCracken L, Reddington J P, Lu Z L, Morrice N A and Gray N K (2012) The Multifunctional Poly(A)-Binding Protein (PABP) 1 Is Subject to Extensive

Dynamic Post-Translational Modification, Which Molecular Modelling Suggests Plays an Important Role in Co-Ordinating Its Activities. *Biochem J* 441:803-812.

Brook M, Smith J W and Gray N K (2009) The DAZL and PABP Families: RNA-Binding Proteins With Interrelated Roles in Translational Control in Oocytes. *Reproduction* 137:595-617.

Brune C, Munchel S E, Fischer N, Podtelejnikov A V and Weis K (2005) Yeast Poly(A)-Binding Protein Pab1 Shuttles Between the Nucleus and the Cytoplasm and Functions in mRNA Export. *RNA* 11:517-531.

Burd CG, Matunis E L and Dreyfuss G (1991) The Multiple RNA-Binding Domains of the mRNA Poly(A)-Binding Protein Have Different RNA-Binding Activities. *Mol Cell Biol* 11:3419-3424.

Buttner K, Wenig K and Hopfner K P (2006) The Exosome: a Macromolecular Cage for Controlled RNA Degradation. *Mol Microbiol* 61:1372-1379.

Campbell DA, Thomas S and Sturm N R (2003) Transcription in Kinetoplastid Protozoa: Why Be Normal? *Microbes Infect* 5:1231-1240.

Caponigro G and Parker R (1996) Mechanisms and Control of mRNA Turnover in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiol Rev* 60:233-249.

Cheng S and Gallie D R (2010) Competitive and Noncompetitive Binding of EIF4B, EIF4A, and the Poly(A) Binding Protein to Wheat Translation Initiation Factor EIFiso4G. *Biochemistry* 49:8251-8265.

Cheng S and Gallie D R (2007) EIF4G, EIFiso4G, and EIF4B Bind the Poly(A)-Binding Protein Through Overlapping Sites Within the RNA Recognition Motif Domains. *J Biol Chem* 282:25247-25258.

Clayton C and Shapira M (2007) Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression in Trypanosomes and Leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156:93-101.

Coller JM, Gray N K and Wickens M P (1998) mRNA Stabilization by Poly(A) Binding Protein Is Independent of Poly(A) and Requires Translation. *Genes Dev* 12:3226-3235.

Cosson B, Braun F, Paillard L, Blackshear P and Beverley O H (2004) Identification of a Novel *Xenopus Laevis* Poly (A) Binding Protein. *Biol Cell* 96:519-527.

Craig AW, Haghighat A, Yu A T and Sonenberg N (1998) Interaction of Polyadenylate-Binding Protein With the EIF4G Homologue PAIP Enhances Translation. *Nature* 392:520-523.

Cunningham AC (2002) Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72:132-141.

da Costa Lima TDC (2007) Caracterização funcional de homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) de *Leishmania major*. (Dissertação de Mestrado em Genética) Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife

D'Orso I and Frasch A C (2002) TcUBP-1, an mRNA Destabilizing Factor From Trypanosomes, Homodimerizes and Interacts With Novel AU-Rich Element- and Poly(A)-Binding Proteins Forming a Ribonucleoprotein Complex. *J Biol Chem* 277:50520-50528.

De Lange T, Michels P A, Veerman H J, Cornelissen A W and Borst P (1984) Many Trypanosome Messenger RNAs Share a Common 5' Terminal Sequence. *Nucleic Acids Res* 12:3777-3790.

de Melo Neto OP, Standart N and Martins de S C (1995) Autoregulation of Poly(A)-Binding Protein Synthesis in Vitro. *Nucleic Acids Res* 23:2198-2205.

de Melo Neto OP, Walker J A, Martins de Sa C M and Standart N (2000) Levels of Free PABP Are Limited by Newly Polyadenylated MRNA in Early Spisula Embryogenesis. *Nucleic Acids Res* 28:3346-3353.

Deardorff JA and Sachs A B (1997) Differential Effects of Aromatic and Charged Residue Substitutions in the RNA Binding Domains of the Yeast Poly(A)-Binding Protein. *J Mol Biol* 269:67-81.

Deo RC, Bonanno J B, Sonenberg N and Burley S K (1999) Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein. *Cell* 98:835-845.

Deo RC, Sonenberg N and Burley S K (2001) X-Ray Structure of the Human Hyperplastic Discs Protein: an Ortholog of the C-Terminal Domain of Poly(A)-Binding Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4414-4419.

Dhalia R, Marinsek N, Reis C R, Katz R, Muniz J R, Standart N, Carrington M and de Melo Neto O P (2006) The Two EIF4A Helicases in Trypanosoma Brucei Are Functionally Distinct. *Nucleic Acids Res* 34:2495-2507.

Dhalia R, Reis C R, Freire E R, Rocha P O, Katz R, Muniz J R, Standart N and de Melo Neto O P (2005) Translation Initiation in Leishmania Major: Characterisation of Multiple EIF4F Subunit Homologues. *Mol Biochem Parasitol* 140:23-41.

Drawbridge J, Grainger J L and Winkler M M (1990) Identification and Characterization of the Poly(A)-Binding Proteins From the Sea Urchin: a Quantitative Analysis. *Mol Cell Biol* 10:3994-4006.

Eckmann CR, Rammelt C and Wahle E (2011) Control of Poly(A) Tail Length. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:348-361.

El-Sayed NM, Myler P J, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey E A, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu D C, Haas B J, Tran A N, Wortman J R, Alsmark U C, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton J M, Cerqueira G C, Creasy T, Delcher A L, Djikeng A, Embley T M, Hauser C, Ivens A C, Kummerfeld S K, Pereira-Leal J B, Nilsson D, Peterson J, Salzberg S L, Shallom J, Silva J C, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville S E, Donelson J E, Andersson B, Stuart K D and Hall N (2005) Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309:404-409.

Feral C, Guellaen G and Pawlak A (2001) Human Testis Expresses a Specific Poly(A)-Binding Protein. *Nucleic Acids Res* 29:1872-1883.

Freire ER, Dhalia R, Moura D M, da Costa Lima T D, Lima R P, Reis C R, Hughes K, Figueiredo R C, Standart N, Carrington M and de Melo Neto O P (2011) The Four Trypanosomatid EIF4E Homologues Fall into Two Separate Groups, With Distinct Features in Primary Sequence and Biological Properties. *Mol Biochem Parasitol* 176:25-36.

Gallie DR (1998) A Tale of Two Termini: a Functional Interaction Between the Termini of an mRNA Is a Prerequisite for Efficient Translation Initiation. *Gene* 216:1-11.

Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, Myler P, Berriman M, Ivens A, Andersson B, Bontempi E, Eisen J, Angiuoli S, Wanless D, Von A A, Murphy L, Lennard N, Salzberg S, Adams M D, White O, Hall N, Stuart K, Fraser C M and El-Sayed N M (2004) Gene Synteny and Evolution of Genome Architecture in Trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 134:183-191.

Gilinger G and Bellofatto V (2001) Trypanosome Spliced Leader RNA Genes Contain the First Identified RNA Polymerase II Gene Promoter in These Organisms. *Nucleic Acids Res* 29:1556-1564.

Ginger ML (2005) Trypanosomatid Biology and Euglenozoan Evolution: New Insights and Shifting Paradigms Revealed Through Genome Sequencing. *Protist* 156:377-392.

Gingras AC, Gygi S P, Raught B, Polakiewicz R D, Abraham R T, Hoekstra M F, Aebersold R and Sonenberg N (1999) Regulation of 4E-BP1 Phosphorylation: a Novel Two-Step Mechanism. *Genes Dev* 13:1422-1437.

Good PJ, Abler L, Herring D and Sheets M D (2004) Xenopus Embryonic Poly(A) Binding Protein 2 (EPABP2) Defines a New Family of Cytoplasmic Poly(A) Binding Proteins Expressed During the Early Stages of Vertebrate Development. *Genesis* 38:166-175.

Goodfellow IG and Roberts L O (2008) Eukaryotic Initiation Factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2675-2680.

Gorgoni B and Gray N K (2004) The Roles of Cytoplasmic Poly(A)-Binding Proteins in Regulating Gene Expression: a Developmental Perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3:125-141.

- Gorlach M, Burd C G and Dreyfuss G (1994) The mRNA Poly(A)-Binding Protein: Localization, Abundance, and RNA-Binding Specificity. *Exp Cell Res* 211:400-407.
- Gouyon F, Onesto C, Dalet V, Pages G, Leturque A and Brot-Laroche E (2003) Fructose Modulates GLUT5 mRNA Stability in Differentiated Caco-2 Cells: Role of CAMP-Signalling Pathway and PABP (Polyadenylated-Binding Protein)-Interacting Protein (Paip) 2. *Biochem J* 375:167-174.
- Grange T, de Sa C M, Oddos J and Pictet R (1987) Human mRNA Polyadenylate Binding Protein: Evolutionary Conservation of a Nucleic Acid Binding Motif. *Nucleic Acids Res* 15:4771-4787.
- Gray NK, Collier J M, Dickson K S and Wickens M (2000) Multiple Portions of Poly(A)-Binding Protein Stimulate Translation in Vivo. *EMBO J* 19:4723-4733.
- Groft CM and Burley S K (2002) Recognition of EIF4G by Rotavirus NSP3 Reveals a Basis for mRNA Circularization. *Mol Cell* 9:1273-1283.
- Gull K (1999) The Cytoskeleton of Trypanosomatid Parasites. *Annu Rev Microbiol* 53:629-655.
- Gunzl A (2010) The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? *Eukaryot Cell* 9:1159-1170.
- Haile S and Papadopolou B (2007) Developmental Regulation of Gene Expression in Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10:569-577.
- Hamilton BJ, Burns C M, Nichols R C and Rigby W F (1997) Modulation of AUUUA Response Element Binding by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein

A1 in Human T Lymphocytes. The Roles of Cytoplasmic Location, Transcription, and Phosphorylation. *J Biol Chem* 272:28732-28741.

Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes F R and Michels P A (2003) Evolution of Energy Metabolism and Its Compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2:11.

Hernandez G, Altmann M, Sierra J M, Urlaub H, ez del C R, Schwartz P and Rivera-Pomar R (2005) Functional Analysis of Seven Genes Encoding Eight Translation Initiation Factor 4E (EIF4E) Isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* 122:529-543.

Hershey JWB and Merrick WC. (2000). Translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Press, pp. 33-75.

Hornstein E, Git A, Braunstein I, Avni D and Meyuhas O (1999) The Expression of Poly(A)-Binding Protein Gene Is Translationally Regulated in a Growth-Dependent Fashion Through a 5'-Terminal Oligopyrimidine Tract Motif. *J Biol Chem* 274:1708-1714.

Hug M, Hotz H R, Hartmann C and Clayton C (1994) Hierarchies of RNA-Processing Signals in a Trypanosome Surface Antigen mRNA Precursor. *Mol Cell Biol* 14:7428-7435.

Imataka H, Gradi A and Sonenberg N (1998) A Newly Identified N-Terminal Amino Acid Sequence of Human EIF4G Binds Poly(A)-Binding Protein and Functions in Poly(A)-Dependent Translation. *EMBO J* 17:7480-7489.

Ivens AC, Peacock C S, Worthey E A, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M A, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N,

Bauser C, Beck A, Beverley S M, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi C V, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson R M, Cronin A, Cruz A K, Davies R M, De G J, Dobson D E, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch A C, Fraser A, Fuchs M, Gabel C, Goble A, Goffeau A, Harris D, Hertz-Fowler C, Hilbert H, Horn D, Huang Y, Klages S, Knights A, Kube M, Larke N, Litvin L, Lord A, Louie T, Marra M, Masuy D, Matthews K, Michaeli S, Mottram J C, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'neil S, Pentony M, Pohl T M, Price C, Purnelle B, Quail M A, Rabinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz J C, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz D C, Seeger K, Seyler A, Sharp S, Shin H, Sivam D, Squares R, Squares S, Tosato V, Vogt C, Volckaert G, Wambutt R, Warren T, Wedler H, Woodward J, Zhou S, Zimmermann W, Smith D F, Blackwell J M, Stuart K D, Barrell B and Myler P J (2005) The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania Major*. *Science* 309:436-442.

Jackson RJ, Hellen C U and Pestova T V (2010) The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113-127.

Jacobson A and Peltz S W (1996) Interrelationships of the Pathways of mRNA Decay and Translation in Eukaryotic Cells. *Annu Rev Biochem* 65:693-739.

Joshi B, Cameron A and Jagus R (2004) Characterization of Mammalian EIF4E-Family Members. *Eur J Biochem* 271:2189-2203.

Kahvejian A, Roy G and Sonenberg N (2001) The mRNA Closed-Loop Model: the Function of PABP and PABP-Interacting Proteins in mRNA Translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66:293-300.

Kahvejian A, Svitkin Y V, Sukarieh R, M'Boutchou M N and Sonenberg N (2005) Mammalian Poly(A)-Binding Protein Is a Eukaryotic Translation Initiation Factor, Which Acts Via Multiple Mechanisms. *Genes Dev* 19:104-113.

Kapp LD and Lorsch J R (2004) The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu Rev Biochem* 73:657-704.

Keiper BD, Gan W and Rhoads R E (1999) Protein Synthesis Initiation Factor 4G. *Int J Biochem Cell Biol* 31:37-41.

Keller RW, Kuhn U, Aragon M, Bornikova L, Wahle E and Bear D G (2000) The Nuclear Poly(A) Binding Protein, PABP2, Forms an Oligomeric Particle Covering the Length of the Poly(A) Tail. *J Mol Biol* 297:569-583.

Keller W, Bienroth S, Lang K M and Christofori G (1991) Cleavage and Polyadenylation Factor CPF Specifically Interacts With the Pre-mRNA 3' Processing Signal AAUAAA. *EMBO J* 10:4241-4249.

Kerwitz Y, Kuhn U, Lilie H, Knoth A, Scheuermann T, Friedrich H, Schwarz E and Wahle E (2003) Stimulation of Poly(A) Polymerase Through a Direct Interaction With the Nuclear Poly(A) Binding Protein Allosterically Regulated by RNA. *EMBO J* 22:3705-3714.

Kessler SH and Sachs A B (1998) RNA Recognition Motif 2 of Yeast Pab1p Is Required for Its Functional Interaction With Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. *Mol Cell Biol* 18:51-57.

Khaleghpour K, Kahvejian A, De C G, Roy G, Svitkin Y V, Imataka H, O'Connor-McCourt M and Sonenberg N (2001) Dual Interactions of the Translational Repressor Paip2 With Poly(A) Binding Protein. *Mol Cell Biol* 21:5200-5213.

Kissinger JC (2006) A Tale of Three Genomes: the Kinetoplastids Have Arrived. *Trends Parasitol* 22:240-243.

Kleene KC, Wang M Y, Cutler M, Hall C and Shih D (1994) Developmental Expression of Poly(A) Binding Protein MRNAs During Spermatogenesis in the Mouse. *Mol Reprod Dev* 39:355-364.

Korner CG, Wormington M, Muckenthaler M, Schneider S, Dehlin E and Wahle E (1998) The Deadenyating Nuclease (DAN) Is Involved in Poly(A) Tail Removal During the Meiotic Maturation of *Xenopus* Oocytes. *EMBO J* 17:5427-5437.

Kozlov G, De C G, Lim N S, Siddiqui N, Fantus D, Kahvejian A, Trempe J F, Elias D, Ekiel I, Sonenberg N, O'Connor-McCourt M and Gehring K (2004) Structural Basis of Ligand Recognition by PABC, a Highly Specific Peptide-Binding Domain Found in Poly(A)-Binding Protein and a HECT Ubiquitin Ligase. *EMBO J* 23:272-281.

Kozlov G and Gehring K (2010) Molecular Basis of ERF3 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein. *PLoS One* 5:e10169.

Kozlov G, Siddiqui N, Coillet-Matillon S, Trempe J F, Ekiel I, Sprules T and Gehring K (2002) Solution Structure of the Orphan PABC Domain From *Saccharomyces Cerevisiae* Poly(A)-Binding Protein. *J Biol Chem* 277:22822-22828.

Kozlov G, Trempe J F, Khaleghpour K, Kahvejian A, Ekiel I and Gehring K (2001) Structure and Function of the C-Terminal PABC Domain of Human Poly(A)-Binding Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4409-4413.

Kuhn U, Gundel M, Knoth A, Kerwitz Y, Rudel S and Wahle E (2009) Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-Binding Protein Regulating the Interaction Between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor. *J Biol Chem* 284:22803-22814.

Kuhn U and Pieler T (1996) Xenopus Poly(A) Binding Protein: Functional Domains in RNA Binding and Protein-Protein Interaction. *J Mol Biol* 256:20-30.

Kuhn U and Wahle E (2004) Structure and Function of Poly(A) Binding Proteins. *Biochim Biophys Acta* 1678:67-84.

Kulkarni MM, McMaster W R, Kamysz E, Kamysz W, Engman D M and McGwire B S (2006) The Major Surface-Metalloprotease of the Parasitic Protozoan, *Leishmania*, Protects Against Antimicrobial Peptide-Induced Apoptotic Killing. *Mol Microbiol* 62:1484-1497.

Laufer G and Gunzl A (2001) In-Vitro Competition Analysis of Procyclin Gene and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Site Transcription in *Trypanosoma Brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 113:55-65.

Laufer G, Schaaf G, Bollgonn S and Gunzl A (1999) In Vitro Analysis of Alpha-Amanitin-Resistant Transcription From the RRNA, Procyclic Acidic Repetitive Protein, and Variant Surface Glycoprotein Gene Promoters in *Trypanosoma Brucei*. *Mol Cell Biol* 19:5466-5473.

Le H, Browning K S and Gallie D R (2000) The Phosphorylation State of Poly(A)-Binding Protein Specifies Its Binding to Poly(A) RNA and Its Interaction With Eukaryotic Initiation Factor (EIF) 4F, EIFiso4F, and EIF4B. *J Biol Chem* 275:17452-17462.

- Le H, Chang S C, Tanguay R L and Gallie D R (1997) The Wheat Poly(A)-Binding Protein Functionally Complements Pab1 in Yeast. *Eur J Biochem* 243:350-357.
- LeBowitz JH, Smith H Q, Rusche L and Beverley S M (1993) Coupling of Poly(A) Site Selection and Trans-Splicing in Leishmania. *Genes Dev* 7:996-1007.
- Lei J, Mesters J R, von B A and Hilgenfeld R (2011) Crystal Structure of the Middle Domain of Human Poly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 1. *Biochem Biophys Res Commun* 408:680-685.
- Li CH, Irmer H, Gudjonsdottir-Planck D, Freese S, Salm H, Haile S, Estevez A M and Clayton C (2006) Roles of a Trypanosoma Brucei 5'->3' Exoribonuclease Homolog in mRNA Degradation. *RNA* 12:2171-2186.
- Liang XH, Haritan A, Uliel S and Michaeli S (2003) Trans and Cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryot Cell* 2:830-840.
- Linder P (2003) Yeast RNA Helicases of the DEAD-Box Family Involved in Translation Initiation. *Biol Cell* 95:157-167.
- Liu B, Liu Y, Motyka S A, Agbo E E and Englund P T (2005) Fellowship of the Rings: the Replication of Kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 21:363-369.
- Lodge R and Descoteaux A (2005) Modulation of Phagolysosome Biogenesis by the Lipophosphoglycan of Leishmania. *Clin Immunol* 114:256-265.
- Lopes AH, Souto-Padrón T, Dias FA, Gomes MT, Rodrigues GC, Zimmermann LT, Alves e Silva- TL and Vermelho AB (2010) Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. *The Open Paras Journ* 4: 30-59
- Lowell JE, Rudner D Z and Sachs A B (1992) 3'-UTR-Dependent Deadenylation by the Yeast Poly(A) Nuclease. *Genes Dev* 6:2088-2099.

Lukes J, Hashimi H and Zikova A (2005) Unexplained Complexity of the Mitochondrial Genome and Transcriptome in Kinetoplastid Flagellates. *Curr Genet* 48:277-299.

Ma S, Bhattacharjee R B and Bag J (2009) Expression of Poly(A)-Binding Protein Is Upregulated During Recovery From Heat Shock in HeLa Cells. *FEBS J* 276:552-570.

Mandel CR, Bai Y and Tong L (2008) Protein Factors in Pre-mRNA 3'-End Processing. *Cell Mol Life Sci* 65:1099-1122.

Mangus DA, Evans M C and Jacobson A (2003) Poly(A)-Binding Proteins: Multifunctional Scaffolds for the Post-Transcriptional Control of Gene Expression. *Genome Biol* 4:223.

Mangus DA, Smith M M, McSweeney J M and Jacobson A (2004) Identification of Factors Regulating Poly(A) Tail Synthesis and Maturation. *Mol Cell Biol* 24:4196-4206.

Martineau Y, Derry M C, Wang X, Yanagiya A, Berlanga J J, Shyu A B, Imataka H, Gehring K and Sonenberg N (2008) Poly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 1 Binds to Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 to Stimulate Translation. *Mol Cell Biol* 28:6658-6667.

Martinez-Calvillo S, Nguyen D, Stuart K and Myler P J (2004) Transcription Initiation and Termination on Leishmania Major Chromosome 3. *Eukaryot Cell* 3:506-517.

- Martinez-Calvillo S, Saxena A, Green A, Leland A and Myler P J (2007) Characterization of the RNA Polymerase II and III Complexes in *Leishmania Major*. *Int J Parasitol* 37:491-502.
- Martinez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda J C, Florencio-Martinez L E, Manning-Cela R G and Figueroa-Angulo E E (2010) Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010:525241.
- Matthews KR, Tschudi C and Ullu E (1994) A Common Pyrimidine-Rich Motif Governs Trans-Splicing and Polyadenylation of Tubulin Polycistronic Pre-mRNA in Trypanosomes. *Genes Dev* 8:491-501.
- McKean PG (2003) Coordination of Cell Cycle and Cytokinesis in *Trypanosoma Brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6:600-607.
- McKendrick L, Pain V M and Morley S J (1999) Translation Initiation Factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 31:31-35.
- Melo EO, Dhalia R, Martins de S C, Standart N and de Melo Neto O P (2003) Identification of a C-Terminal Poly(A)-Binding Protein (PABP)-PABP Interaction Domain: Role in Cooperative Binding to Poly (A) and Efficient Cap Distal Translational Repression. *J Biol Chem* 278:46357-46368.
- Michels PA, Hannaert V and Bringaud F (2000) Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae - New Data and Views. *Parasitol Today* 16:482-489.
- Millevoi S and Vagner S (2010) Molecular Mechanisms of Eukaryotic Pre-mRNA 3' End Processing Regulation. *Nucleic Acids Res* 38:2757-2774.

Milone J, Wilusz J and Bellofatto V (2002) Identification of mRNA Decapping Activities and an ARE-Regulated 3' to 5' Exonuclease Activity in Trypanosome Extracts. *Nucleic Acids Res* 30:4040-4050.

Minvielle-Sebastia L, Preker P J, Wiederkehr T, Strahm Y and Keller W (1997) The Major Yeast Poly(A)-Binding Protein Is Associated With Cleavage Factor IA and Functions in Premessenger RNA 3'-End Formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7897-7902.

Mitchell P and Tollervey D (2001) mRNA Turnover. *Curr Opin Cell Biol* 13:320-325.

Mittra B and Ray D S (2004) Presence of a Poly(A) Binding Protein and Two Proteins With Cell Cycle-Dependent Phosphorylation in *Crithidia Fasciculata* mRNA Cycling Sequence Binding Protein II. *Eukaryot Cell* 3:1185-1197.

Moura DMN (2007) Utilização de abordagens moleculares in vivo no estudo de homólogos do fator de iniciação da tradução 4G (eIF4G) de tripanosomatídeos. (Dissertação de Mestrado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Mukherjee D, Gao M, O'Connor J P, Rajmakers R, Puijn G, Lutz C S and Wilusz J (2002) The Mammalian Exosome Mediates the Efficient Degradation of MRNAs That Contain AU-Rich Elements. *EMBO J* 21:165-174.

Nielsen PJ and Trachsel H (1988) The Mouse Protein Synthesis Initiation Factor 4A Gene Family Includes Two Related Functional Genes Which Are Differentially Expressed. *EMBO J* 7:2097-2105.

Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T and Gull K (2000) Architecture of the Trypanosoma Brucei Nucleus During Interphase and Mitosis. *Chromosoma* 108:501-513.

Onesto C, Berra E, Grepin R and Pages G (2004) Poly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 2, a Strong Regulator of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA. *J Biol Chem* 279:34217-34226.

Otero LJ, Ashe M P and Sachs A B (1999) The Yeast Poly(A)-Binding Protein Pab1p Stimulates in Vitro Poly(A)-Dependent and Cap-Dependent Translation by Distinct Mechanisms. *EMBO J* 18:3153-3163.

Palenchar JB and Bellofatto V (2006) Gene Transcription in Trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 146:135-141.

Parker R and Song H (2004) The Enzymes and Control of Eukaryotic mRNA Turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11:121-127.

Parsons M, Nelson R G, Watkins K P and Agabian N (1984) Trypanosome MRNAs Share a Common 5' Spliced Leader Sequence. *Cell* 38:309-316.

Patel GP, Ma S and Bag J (2005) The Autoregulatory Translational Control Element of Poly(A)-Binding Protein mRNA Forms a Heteromeric Ribonucleoprotein Complex. *Nucleic Acids Res* 33:7074-7089.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz J C, Quail M A, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream M A, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf S L, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge D P, Oyola S O,

Hilley J D, Brito L O, Tosi L R, Barrell B, Cruz A K, Mottram J C, Smith D F and Berriman M (2007) Comparative Genomic Analysis of Three *Leishmania* Species That Cause Diverse Human Disease. *Nat Genet* 39:839-847.

Peng J and Schoenberg D R (2005) mRNA With a <20-Nt Poly(A) Tail Imparted by the Poly(A)-Limiting Element Is Translated As Efficiently in Vivo As Long Poly(A) mRNA. *RNA* 11:1131-1140.

Pitula J, Ruyechan W T and Williams N (1998) *Trypanosoma Brucei*: Identification and Purification of a Poly(A)-Binding Protein. *Exp Parasitol* 88:157-160.

Preiss T and Hentze W (2003) Starting the Protein Synthesis Machine: Eukaryotic Translation Initiation. *Bioessays* 25:1201-1211.

Prevot D, Darlix J L and Ohlmann T (2003) Conducting the Initiation of Protein Synthesis: the Role of EIF4G. *Biol Cell* 95:141-156.

Price HP, Menon M R, Panethymitaki C, Goulding D, McKean P G and Smith D F (2003) Myristoyl-CoA:Protein N-Myristoyltransferase, an Essential Enzyme and Potential Drug Target in Kinetoplastid Parasites. *J Biol Chem* 278:7206-7214.

Ptushkina M, Berthelot K, von der H T, Geffers L, Warwicker J and McCarthy J E (2001) A Second EIF4E Protein in *Schizosaccharomyces Pombe* Has Distinct EIF4G-Binding Properties. *Nucleic Acids Res* 29:4561-4569.

Reis CRS (2009) Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G de *Leishmania major*. (Tese de Doutorado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Rhoads RE (2009) EIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J Biol Chem* 284:16711-16715.

Roberts LJ, Foote S J and Handman E (2000) A New Standard for the Assessment of Disease Progression in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol* 22:231-237.

Rochette A, Raymond F, Ubeda J M, Smith M, Messier N, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Ouellette M and Papadopoulou B (2008) Genome-Wide Gene Expression Profiling Analysis of *Leishmania Major* and *Leishmania Infantum* Developmental Stages Reveals Substantial Differences Between the Two Species. *BMC Genomics* 9:255.

Roy G, De C G, Khaleghpour K, Kahvejian A, O'Connor-McCourt M and Sonenberg N (2002) Paip1 Interacts With Poly(A) Binding Protein Through Two Independent Binding Motifs. *Mol Cell Biol* 22:3769-3782.

Sachs AB, Bond M W and Kornberg R D (1986) A Single Gene From Yeast for Both Nuclear and Cytoplasmic Polyadenylate-Binding Proteins: Domain Structure and Expression. *Cell* 45:827-835.

Sachs AB and Davis R W (1989) The Poly(A) Binding Protein Is Required for Poly(A) Shortening and 60S Ribosomal Subunit-Dependent Translation Initiation. *Cell* 58:857-867.

Sachs AB, Davis R W and Kornberg R D (1987) A Single Domain of Yeast Poly(A)-Binding Protein Is Necessary and Sufficient for RNA Binding and Cell Viability. *Mol Cell Biol* 7:3268-3276.

Sachs AB, Sarnow P and Hentze M W (1997) Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes. *Cell* 89:831-838.

Sacks D and Kamhawi S (2001) Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol* 55:453-483.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). In: *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos AL, Branquinha M H and vila-Levy C M (2006) The Ubiquitous Gp63-Like Metalloprotease From Lower Trypanosomatids: in the Search for a Function. *An Acad Bras Cienc* 78:687-714.

Searfoss A, Dever T E and Wickner R (2001) Linking the 3' Poly(A) Tail to the Subunit Joining Step of Translation Initiation: Relations of Pab1p, Eukaryotic Translation Initiation Factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol* 21:4900-4908.

Seli E, Lalioti M D, Flaherty S M, Sakkas D, Terzi N and Steitz J A (2005) An Embryonic Poly(A)-Binding Protein (EPAB) Is Expressed in Mouse Oocytes and Early Preimplantation Embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:367-372.

Sheth U and Parker R (2003) Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* 300:805-808.

Siddiqui N, Kozlov G, D'Orso I, Trempe J F and Gehring K (2003) Solution Structure of the C-Terminal Domain From Poly(A)-Binding Protein in *Trypanosoma Cruzi*: a Vegetal PABC Domain. *Protein Sci* 12:1925-1933.

Simpson AG, Stevens J R and Lukes J (2006) The Evolution and Diversity of Kinetoplastid Flagellates. *Trends Parasitol* 22:168-174.

Simpson L, Aphasizhev R, Gao G and Kang X (2004) Mitochondrial Proteins and Complexes in Leishmania and Trypanosoma Involved in U-Insertion/Deletion RNA Editing. *RNA* 10:159-170.

Sladic RT, Lagnado C A, Bagley C J and Goodall G J (2004) Human PABP Binds AU-Rich RNA Via RNA-Binding Domains 3 and 4. *Eur J Biochem* 271:450-457.

Smith DF, Peacock C S and Cruz A K (2007) Comparative Genomics: From Genotype to Disease Phenotype in the Leishmaniasis. *Int J Parasitol* 37:1173-1186.

Sonenberg N and Hinnebusch A G (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136:731-745.

Sonenberg N, Morgan M A, Merrick W C and Shatkin A J (1978) A Polypeptide in Eukaryotic Initiation Factors That Crosslinks Specifically to the 5'-Terminal Cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4843-4847.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler R E, McKerrow J, Reed S and Tarleton R (2008) Kinetoplastids: Related Protozoan Pathogens, Different Diseases. *J Clin Invest* 118:1301-1310.

Svitkin YV, Evdokimova V M, Brasey A, Pestova T V, Fantus D, Yanagiya A, Imataka H, Skabkin M A, Ovchinnikov L P, Merrick W C and Sonenberg N (2009) General RNA-Binding Proteins Have a Function in Poly(A)-Binding Protein-Dependent Translation. *EMBO J* 28:58-68.

Tarun SZ, Jr. and Sachs A B (1997) Binding of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (EIF4E) to EIF4G Represses Translation of Uncapped mRNA. *Mol Cell Biol* 17:6876-6886.

Tarun SZ, Jr., Wells S E, Deardorff J A and Sachs A B (1997) Translation Initiation Factor EIF4G Mediates in Vitro Poly(A) Tail-Dependent Translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9046-9051.

Teixeira MC, de Jesus S R, Sampaio R B, Pontes-de-Carvalho L and dos-Santos W L (2002) A Simple and Reproducible Method to Obtain Large Numbers of Axenic Amastigotes of Different Leishmania Species. *Parasitol Res* 88:963-968.

Tucker M and Parker R (2000) Mechanisms and Control of mRNA Decapping in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* 69:571-595.

Ullu E and Tschudi C (1993) 2'-O-Methyl RNA Oligonucleotides Identify Two Functional Elements in the Trypanosome Spliced Leader Ribonucleoprotein Particle. *J Biol Chem* 268:13068-13073.

Van der Ploeg LH, Bernards A, Rijsewijk F A and Borst P (1982) Characterization of the DNA Duplication-Transposition That Controls the Expression of Two Genes for Variant Surface Glycoproteins in *Trypanosoma Brucei*. *Nucleic Acids Res* 10:593-609.

van HA and Parker R (2002) Messenger RNA Degradation: Beginning at the End. *Curr Biol* 12:R285-R287.

Voeltz GK, Ongkasuwan J, Standart N and Steitz J A (2001) A Novel Embryonic Poly(A) Binding Protein, EPAB, Regulates mRNA Deadenylation in *Xenopus* Egg Extracts. *Genes Dev* 15:774-788.

Wahle E (1991) A Novel Poly(A)-Binding Protein Acts As a Specificity Factor in the Second Phase of Messenger RNA Polyadenylation. *Cell* 66:759-768.

Wahle E (1995a) 3'-End Cleavage and Polyadenylation of mRNA Precursors. *Biochim Biophys Acta* 1261:183-194.

Wahle E (1995b) Poly(A) Tail Length Control Is Caused by Termination of Processive Synthesis. *J Biol Chem* 270:2800-2808.

Wahle E and Ruegsegger U (1999) 3'-End Processing of Pre-mRNA in Eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 23:277-295.

Wakiyama M, Honkura N and Miura K I (2001) Interference With Interaction Between Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G and Poly(A)-Binding Protein in *Xenopus* Oocytes Leads to Inhibition of Polyadenylated mRNA Translation and Oocyte Maturation. *J Biochem* 130:737-740.

Walker J, Dale M and Standart N (1996) Unmasking mRNA in Clam Oocytes: Role of Phosphorylation of a 3' UTR Masking Element-Binding Protein at Fertilization. *Dev Biol* 173:292-305.

Wang X and Grumet R (2004) Identification and Characterization of Proteins That Interact With the Carboxy Terminus of Poly(A)-Binding Protein and Inhibit Translation in Vitro. *Plant Mol Biol* 54:85-98.

Wang Z and Kiledjian M (2001) Functional Link Between the Mammalian Exosome and mRNA Decapping. *Cell* 107:751-762.

Wei CC, Balasta M L, Ren J and Goss D J (1998) Wheat Germ Poly(A) Binding Protein Enhances the Binding Affinity of Eukaryotic Initiation Factor 4F and (Iso)4F for Cap Analogues. *Biochemistry* 37:1910-1916.

Weinstein DC, Honore E and Hemmati-Brivanlou A (1997) Epidermal Induction and Inhibition of Neural Fate by Translation Initiation Factor 4AIII. *Development* 124:4235-4242.

Wells SE, Hillner P E, Vale R D and Sachs A B (1998) Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Mol Cell* 2:135-140.

Wilson R, Bates M D, Dostalova A, Jecna L, Dillon R J, Volf P and Bates P A (2010) Stage-Specific Adhesion of Leishmania Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay. *PLoS Negl Trop Dis* 4.

Wilusz CJ, Gao M, Jones C L, Wilusz J and Peltz S W (2001) Poly(A)-Binding Proteins Regulate Both mRNA Deadenylation and Decapping in Yeast Cytoplasmic Extracts. *RNA* 7:1416-1424.

Yoder-Hill J, Pause A, Sonenberg N and Merrick W C (1993) The P46 Subunit of Eukaryotic Initiation Factor (EIF)-4F Exchanges With EIF-4A. *J Biol Chem* 268:5566-5573.

Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Stepinski J, Altmann M, Darzynkiewicz E and Shapira M (2006) Binding Specificities and Potential Roles of Isoforms of Eukaryotic Initiation Factor 4E in Leishmania. *Eukaryot Cell* 5:1969-1979.

Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira Z, Keasar C, Orr-Dahan I, Jankowska-Anyszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E and Shapira M (2004) Cap-Binding Activity of an EIF4E Homolog From Leishmania. *RNA* 10:1764-1775.

Zhao J, Hyman L and Moore C (1999) Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships With Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:405-445.

9. Anexo

9.1 Trabalho Publicado Associado a Tese

da Costa Lima TD, Moura DM, Reis CR, Vasconcelos JR, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RC, de Melo Neto OP. Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. Eukaryot Cell. 2010 Oct;9(10):1484-94.

Functional Characterization of Three *Leishmania* Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners[▽]

Tamara D. da Costa Lima,¹ Danielle M. N. Moura,¹ Christian R. S. Reis,¹ J. Ronnie C. Vasconcelos,^{1†} Louise Ellis,² Mark Carrington,² Regina C. B. Q. Figueiredo,¹ and Osvaldo P. de Melo Neto^{1*}

Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife, PE 50670-420, Brazil,¹ and Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, United Kingdom²

Received 11 June 2010/Accepted 19 July 2010

Trypanosomatid protozoans are reliant on posttranscriptional processes to control gene expression. Regulation occurs at the levels of mRNA processing, stability, and translation, events that may require the participation of the poly(A) binding protein (PABP). Here, we have undertaken a functional study of the three distinct *Leishmania major* PABP (*LmPABP*) homologues: the previously described *LmPABP1*; *LmPABP2*, orthologous to the PABP described from *Trypanosoma* species; and *LmPABP3*, unique to *Leishmania*. Sequence identity between the three PABPs is no greater than 40%. In assays measuring binding to A-rich sequences, *LmPABP1* binding was poly(A) sensitive but heparin insensitive; *LmPABP2* binding was heparin sensitive and less sensitive to poly(A), compatible with unique substitutions observed in residues implicated in poly(A) binding; and *LmPABP3* displayed intermediate properties. All three homologues are simultaneously expressed as abundant cytoplasmic proteins in *L. major* promastigotes, but only *LmPABP1* is present as multiple isoforms. Upon transcription inhibition, *LmPABP2* and -3 migrated to the nucleus, while *LmPABP1* remained predominantly cytoplasmic. Immunoprecipitation assays showed an association between *LmPABP2* and -3. Although the three proteins bound to a *Leishmania* homologue of the translation initiation factor eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) (*LmEIF4G3*) *in vitro*, *LmPABP1* was the only one to copurify with native *LmEIF4G3* from cytoplasmic extracts. Functionality was tested using RNA interference (RNAi) in *Trypanosoma brucei*, where both orthologues to *LmPABP1* and -2 are required for cellular viability. Our results indicate that these homologues have evolved divergent functions, some of which may be unique to the trypanosomatids, and reinforces a role for *LmPABP1* in translation through its interaction with the eIF4G homologue.

Trypanosomatids are flagellated protozoans, which are best represented by pathogenic species belonging to the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*, responsible for diseases with worldwide impact, such as leishmaniasis, sleeping sickness, and Chagas' disease. These organisms display unique biological and molecular features rarely found in other eukaryotes, including polycistronic transcription (33) and coupled *trans*-splicing and polyadenylation (41), to produce typical monocistronic mRNAs with a 5' cap and a 3' poly(A) tail. The lack of one promoter for one protein-coding gene implies a much reduced role for transcription in regulating gene expression. Therefore, it is assumed that such regulation occurs mainly at the post-transcriptional level, possibly through mechanisms that act upon mRNA processing, stability, and translation (14, 15).

Initiation is the most likely target for mechanisms involved in the regulation of translation. During translation initiation, ribosomes are recruited to the mRNA and positioned at the first adequate AUG codon, a process mediated by the translation initiation factors (eukaryotic initiation factors [eIFs])

(reviewed in references 27 and 52). Poly(A) binding protein (PABP), the major cytoplasmic mRNA binding protein (also known as PABPC or pab1p in *Saccharomyces cerevisiae*) binds to the 3'-end poly(A) tails of the mRNAs and participates in an extensive range of cellular functions (reviewed in references 8, 24, 39, and 42). In the initiation of translation, it promotes an interaction between the 3' and 5' ends of the mRNA by binding to the 3' poly(A) tail and to eIF4G (32, 40, 59), a component of the cap binding complex eIF4F (reviewed in references 23 and 53). The PABP/eIF4G interaction seems to enhance translation initiation and mRNA stability and may be a checkpoint for mRNA integrity prior to translation (3, 58). PABP also interacts with the release factor eRF3, an event that may couple translation termination with ribosome recycling and mRNA decay (29, 60). Aside from translation, PABP participates in several steps of mRNA biogenesis, processing, and degradation (11, 12, 30). In the last, dissociation of PABP from poly(A) may be required for deadenylation, the first step in the major decay pathway for many mRNAs. Furthermore, this protein seems to be involved in mRNA transport from the nucleus to the cytoplasm (9, 12, 22, 63).

The PABP structure is highly conserved (reviewed in reference 39), with its N-terminal two-thirds consisting of four tandem RNA recognition motifs (RRMs). Each RRM is defined by the presence of two unique RNP motifs and, at the structural level, assumes a canonical RNA binding fold of four

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife, PE 50670-420, Brazil. Phone: 55 81 2101 2636. Fax: 55 81 2101 2647. E-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br.

† Present address: CINTERGEN, UNIFESP-Escola Paulista de Medicina, Rua Mirassol, 207, São Paulo, SP 04044-010, Brazil.

[▽] Published ahead of print on 30 July 2010.

antiparallel β -strands backed by two α -helices (18). The first two RRM domains are sufficient for specific poly(A) binding (38) and have been implicated in the interaction between PABP and eIF4G (13, 32, 35). RRM3 and -4 lack poly(A) binding specificity and may mediate recognition of non-poly(A) sequences (36, 57). The PABP C-terminal region, although it does not bind RNA, contains a conserved domain, named PABC, which has been shown to be responsible for the binding of release factor eRF3, the PABP-interacting proteins Paip1 and Paip2, and the poly(A) nuclease PAN (37, 55). Connecting the RRMs to the PABC domain is a proline- and glutamine-rich linker region, the least conserved segment of the protein, which is important for the multimerization of PABP molecules on poly(A) (44) and has been implicated in the PABP function in mRNA deadenylation and decay in yeast (56, 64).

So far, PABP homologues have been described from several species of trypanosomatids (4, 5, 51). The first homologue identified was *Trypanosoma cruzi* PABP1, encoded by two tandemly repeated genes and constitutively expressed (5). The *Trypanosoma brucei* orthologue has also been characterized and found to be 86.4% identical (88.7% similar) to the *T. cruzi* protein (31). *Leishmania major* PABP1 (*LmPABP1*) is encoded by a single-copy gene constitutively expressed during the *L. major* life cycle and is only 35% identical to either of the *Trypanosoma* PABP homologues, a level of identity comparable to the 36% identity between the *Leishmania* and human proteins. *LmPABP1* is predominantly cytoplasmic and has at least two isoforms, one of which is phosphorylated. Complementation assays have demonstrated that it does not rescue the lethality of *pab1* deletion in *S. cerevisiae* (4).

We have previously identified, within available trypanosomatid genome sequences, multiple conserved homologues of the subunits of eIF4F, an observation that hints at a higher degree of complexity in translation initiation than might be expected for unicellular organisms (20). Three PABP homologues are also found in *L. major* genome sequences (*LmPABP1*, *LmPABP2*, and *LmPABP3*), with only the first two being conserved in *Trypanosoma* species. Here, we set out to characterize them functionally and to investigate potential roles in translation. The three *L. major* proteins are simultaneously expressed but differ in protein and RNA binding properties and in subcellular localization under conditions of transcription inhibition. Coupled with *in vivo* data for the two orthologues conserved in *T. brucei*, which are both essential for viability, these results are compatible with functional distinctions between these homologues that may have implications for the cellular translation apparatus.

MATERIALS AND METHODS

Protein sequences used in this study and sequence analysis methods. All of the *L. major* and *T. brucei* sequences described in the text were originally derived from the respective genome sequences and confirmed later through sequencing of the cloned fragments. The original annotation of the genomic *LmPABP1* sequence deposited in GenBank (accession no. XP_843606) lacks the first 17 residues, which have subsequently been included in the sequence deposited at GeneDb (ID, LmjF35.5040). The sequence that defines the full-length protein, then, is the one available at GeneDb. The genomic *LmPABP1* sequence and the one described previously (AAC 64372) differ further by 9 amino acids. These might reflect intraspecies polymorphism; however, we consider it an unlikely possibility, since the differences between the *Leishmania infantum* (XP_001469326/

LinJ35_V3.5360) and *L. major* genomic sequences for PABP1 are limited to only 5 positions. *LmPABP2* (XP_843520/LmjF35.4130) and *LmPABP3* (XP_001683760/LmjF25.0080) were the second and third *Leishmania* PABP homologues identified and were named accordingly. *TbPABP1* is the *T. brucei* sequence that encodes the *LmPABP1* orthologue (XP_827237/Tb09.211.0930). To avoid confusion, the previously described *T. brucei* PABP1 (31), which is 100% identical to the second genomic PABP from *T. brucei*, will be referred to throughout the text and figures as *TbPABP2* or PABP2 (XP_827358/Tb09.211.2150). For the same reasons, PABP2 or *TcPABP2* will be used to refer, when necessary, to the original *T. cruzi* PABP1 (5). Sequence analysis and alignments were carried out essentially as previously reported (20). Nuclear localization signals (NLS) were investigated using the PredictNLS program (16; <http://www.rostlab.org/services/predictNLS/>).

PCR and cloning. The coding sequences for the three *L. major* PABP homologues were amplified from total DNA extracted from the Friedlin strain. The *LmPABP1* and *LmPABP2* sequences were both amplified through two rounds of PCR. First, the full-length sequences were amplified using primers lacking restriction sites and that annealed just before and after the translation start and stop codons, respectively (*LmPABP1*, 5' primer, CAC TCA AAT GGC TGC TGC TGT CC, and 3' primer, CTT CTC GCT TAC GCC GTC TGA TG; *LmPABP2*, 5' primer, AA AGG AGA AGC AGC CAA CCA TG, and 3' primer, GCG CGC GTG CAT GCA CGG GTG). The resulting fragments were then used as templates in a second set of PCRs, which allowed their amplification flanked by sites for BamHI/HindIII (*LmPABP1*) or BamHI/NotI (*LmPABP2*) (*LmPABP1*, 5' primer, GTG GGA TCC ATG GCT GCT GCT GTC CAG GAA G, and 3' primer, TGA AGC TTC GCC GTC TGA TGC GCC TTG AGC; *LmPABP2*, 5' primer, GTG GGA TCC ATG GCC TTC ACT GGT CCG, and 3' primer, TGG CGG CCG CAA CGC TCA TGT GAC GGT TCA G; the cited restriction sites are underlined). *LmPABP3* was amplified in a single PCR flanked by BamHI/NotI (5' primer, TCC GGA TCC ATG GTG GCC CCA GCG CAA C; 3' primer, TCC GCG GCC GCA TTG CCA GTG TGC TGC TGG). The *LmPABP1* sequence was first cloned into the BamHI/HindIII sites of the plasmid vector pET21A (Novagen) for the expression of a recombinant C-terminally tagged His fusion. Later, it was recovered by partial digestion and subcloned into the BamHI/NotI sites of pGEX4T3 (GE Healthcare), which allowed the expression of recombinant protein with glutathione S-transferase (GST) at its N terminus. *LmPABP2* and -3 were cloned directly into the BamHI/NotI sites of both pET21A and pGEX4T3 for the expression of similar recombinant proteins. All amplified fragments and constructs were confirmed through automatic sequencing.

For the RNA interference (RNAi) experiments, the sequences encoding the two *T. brucei* PABP homologues were amplified from genomic DNA flanked by sites for HindIII and BamHI and subcloned into the same sites of the transfection vector p2T7-177 (61) using exactly the approach described previously (34).

Expression and purification of recombinant proteins. For the expression of either His- or GST-tagged recombinant proteins, plasmids were transformed into *Escherichia coli* BLR or BL21 cells. The transformed bacteria were grown in LB medium and induced with IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside). The induced cells were sedimented, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), and lysed by sonication. Protein purification was performed as described previously (17) with either Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) agarose (Qiagen) or glutathione-4B-Sepharose (Amersham Biosciences). Protein products were analyzed in 15% SDS-PAGE stained with Coomassie blue R-250. For the quantification of the recombinant proteins, serial dilutions were compared in Coomassie-stained gels with serial dilutions of known concentrations of bovine serum albumin (BSA).

Antibody production and Western blotting. Rabbit antisera were raised against *LmPABP1*, -2, and -3 by immunizing adult New Zealand White rabbits with the His-tagged recombinant forms. To reduce the background, the various antibodies were affinity purified and stored in aliquots at -80°C prior to use. Western blotting was performed with the Immobilon-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore), using as the second antibody peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories) or protein A-peroxidase (GE Healthcare). Reactions were detected by enhanced chemiluminescence (ECL). Densitometric scanning of the various results was performed with Kodak 1D Image Analysis Software, version 3.5 for Windows.

Parasite cultures. Promastigotes of *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin) were generally maintained in modified LIT medium prepared as described previously (20). Total protein lysates used for the expression analysis were obtained from log-phase hemocytometer-quantified parasite cell pellets resuspended directly in SDS-PAGE sample buffer. For the immunofluorescence assays, the same cells were grown in Schneider's insect medium supplemented with antibiotics and

10% fetal calf serum. Procyclic forms of *T. brucei* Lister 427(pLEW29, pLEW13) (62) were maintained as previously described (19).

Fluorescence microscopy. For the indirect immunofluorescence assay, mid-log-phase *L. major* promastigotes (5×10^6 /ml) were harvested, washed with PBS, fixed with 3% paraformaldehyde, and allowed to adhere to poly-L-lysine-coated slides. Permeabilization was carried out with 0.1% NP-40, followed by blocking with 1% BSA. Antibody detection of *LmPABP1*, *LmPABP2*, and *LmPABP3* followed standard procedures. DNA was stained using TOTO-3 (Molecular Probes), and cells were visualized using a Leica SPII-AOBS confocal microscope.

EMSAs. To generate the RNA probes used in the assays, a pTZ18R-derived plasmid containing a 61-nucleotide-long A-rich sequence (17) was linearized with *Xba*I prior to being used as a template for transcription with T7 RNA polymerase in the presence of [α - 32 P]ATP (GE Healthcare). The resulting RNAs were purified by centrifugation through ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) and quantitated after precipitation with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed as described previously (44), with the binding reaction performed at room temperature and heparin added only when specifically stated. Electrophoresis was performed at 18°C. For the experiments with the competitor polynucleotides [poly(A), poly(U), and poly(C)], the polynucleotides were included in the binding reactions prior to the addition of the labeled probe.

RNAi and metabolic labeling. All procedures for the creation of transgenic *T. brucei* cell lines and RNAi experiments were carried out essentially as described previously (19). For metabolic labeling, cultures at selected times after RNAi induction were washed with methionine-free SDM-79 medium and then resuspended at 1×10^7 cells/ml in the same medium containing 25 μ Ci/ml of [35 S]methionine and incubated for 1 h at 27°C prior to being harvested and analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Pulldown assays. Pulldown assays were performed essentially as described previously (20), using glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare). The beads alone or GST or GST-tagged PABP fusions immobilized on the beads were assayed for the ability to bind to 35 S-labeled *LmEIF4G3*, obtained after transcription and translation of the full-length gene cloned on the pET21D plasmid. Alternatively, GST-tagged full-length *LmEIF4G3* (GST-*LmEIF4G3*₁₋₆₃₆ [21]) was incubated with the 35 S-labeled *Leishmania* PABP homologues obtained through the transcription and translation of the pET21A-derived plasmids linearized with either *Not*I (*LmPABP2* and -3) or *Hind*III (*LmPABP1*).

IPs. Immunoprecipitations (IPs) were carried out with *L. major* cytoplasmic extracts and protein A-Sepharose beads from GE Healthcare. For the cytoplasmic extracts, exponentially grown promastigote cells were harvested, washed with PBS, and resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 75 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 2 mM dithiothreitol [DTT], supplemented with protease inhibitors) at a concentration of 2×10^8 cells/ml. The cells were lysed by several cycles of freeze-thawing, followed by centrifugation at $10,000 \times g$ for 15 min to remove cellular debris. The supernatant was used for the IPs, which essentially followed standard procedures. For each reaction, 30 μ l of beads (~ 3 mg) was incubated overnight at 4°C with 1 to 2 μ g of selected affinity-purified antibodies, or 5 μ l of the total preimmune sera as a control, in 0.5 ml of PBS. After being washed, antibody-bound beads were incubated with 100 μ l of the cytoplasmic extracts (2 h at 4°C). Specifically, bound proteins were eluted in SDS-PAGE sample buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. If necessary, during the Western blotting procedures, the IgG heavy-chain band was cut out from the membrane to prevent its reaction with the secondary antibody.

RESULTS

Identification of three distinct PABP homologues from *L. major*. The low level of identity observed between the first PABP homologues described from *Leishmania* and *Trypanosoma* species implied that they were not true orthologues and that more than one PABP homologue could exist within the trypanosomatids. Indeed, the sequencing of the *L. major* genome confirmed the presence, not only of the previously described *Leishmania* PABP (*LmPABP1*), but also of a second homologue, here called *LmPABP2*, which is the orthologue of the proteins identified previously from *T. cruzi* and *T. brucei* (5, 31). These orthologues are clearly identifiable, with 70% and 64% identities, respectively, between the PABP1 and PABP2 orthologues from *L. major* and *T. brucei*. Later, with the com-

pletion of the sequencing of the first *Leishmania* genome (33), a third PABP homologue was identified (*LmPABP3*); however, it has no trypanosome counterpart.

All trypanosomatid PABP homologues conform to the classical division into the N terminus, containing the four conserved RRM; a central linker region; and the C terminus, with the PABC domain. The overall identities between the three proteins are quite low (32% for *LmPABP1/LmPABP2*, 33% for *LmPABP1/LmPABP3*, and 33% for *LmPABP2/LmPABP3*) and are concentrated in the N terminus and the PABC domain, with no significant similarity within the linker region. The *L. major* PABP RRM are more similar to the corresponding RRM from other homologues than to each other, implying an early duplication process of the full-length gene. Compared with the human protein, RRM2 from *LmPABP1* and -3 is the most conserved domain, followed by RRM1 and -4, with RRM3 being clearly more divergent. RRM2 is also the most conserved, and RRM3 the most divergent, when plant and yeast PABPs are compared with their human counterparts. In contrast, for *LmPABP2*, the most conserved domain by far is RRM1, followed by RRM3 and -4, with RRM2 being the most divergent.

When the sequences from RRM1 and -2 from the *L. major* and *T. brucei* homologues are compared with the prototype yeast and human PABP sequences (1, 26, 54), as well as *Arabidopsis thaliana* PABP2, representing the various plant PABP homologues (7), unique distinctions can be observed for the trypanosomatid PABP2 orthologues (Fig. 1). Several amino acid residues that perform direct contact with the RNA substrate and/or are responsible for the poly(A) binding specificity (based on reference 18) and are generally conserved are specifically replaced in these proteins. These residues are mainly positioned within RRM2, where both RNP motifs are altered, but substitutions are also found within RRM1 and the segment connecting the two RRM. In contrast, residues that localize to the first two RRM and have been previously defined as important for the PABP/eIF4G interaction (13, 32, 35, 48) are overall less strictly conserved, and no specific feature was observed for any of the proteins investigated. Outside of RRM1 and -2, no further distinctions were observed for any of the proteins, with the exception of the *LmPABP2* linker region. This possesses an extended segment (~ 50 amino acids long) very rich in methionine and glycine, sometimes arranged as multiple repeats of the triplet MGG (or VGG), which is conserved in orthologues from *L. infantum* and *Leishmania braziliensis* (not shown) but is mostly absent from *Trypanosoma* orthologues.

Quantitation of intracellular levels in *L. major* promastigotes. To start their functional characterization, the genes encoding the three *L. major* PABP homologues were cloned, and the corresponding proteins were expressed, His tagged or as GST fusions, in *E. coli*, and antisera were generated in rabbits against these recombinant proteins. Figure 2A shows a representative gel with aliquots of the recombinant proteins used throughout this work. *LmPABP1* migrated as the largest protein, with roughly the same size as *LmPABP2*; *LmPABP3* was smaller. The three sera were tested in Western blots against the three distinct recombinant proteins. They were found to be specific to the protein for which they were made (Fig. 2B), although the sera against *LmPABP2* weakly cross-reacted with

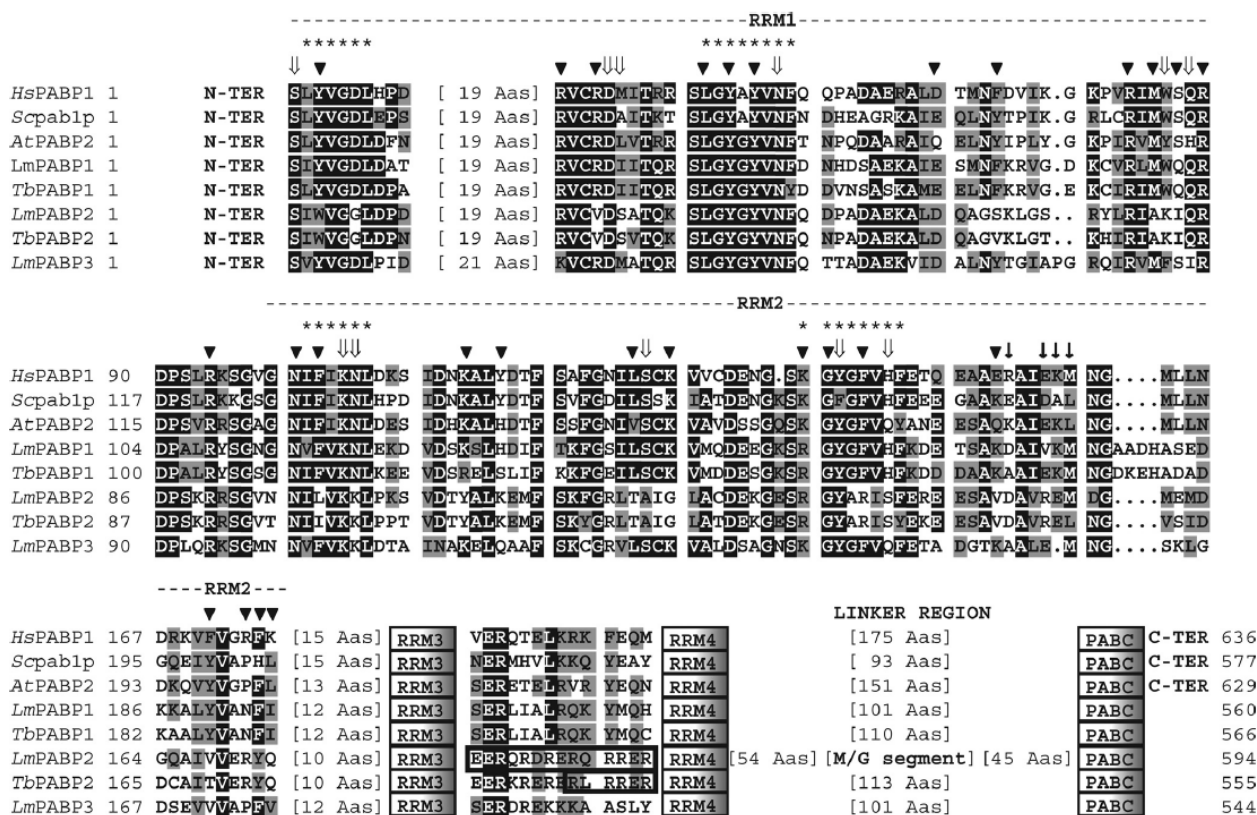


FIG. 1. Sequence analysis of the *L. major* and *T. brucei* PABP homologues. Shown is a ClustalW alignment comparing the sequences from RRM1 and -2 of the human (*Hs*), yeast (*Sc*; *S. cerevisiae*), and plant (*At*; *A. thaliana*) PABP homologues with the various *L. major*/*T. brucei* proteins. The two RRM1s are indicated, as well as the positions of RRM3 and -4, the linker region, and the PABC domain. Sequences between RRM3 and -4 where putative NLS were identified in the PABP2 orthologues are also shown. Within the aligned regions, amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, while amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, in more than 60% of the sequences are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dots) to allow better alignment. The asterisks define the two RNP motifs. The arrowheads indicate amino acids that have been shown to interact with the RNA, while $\downarrow$ highlights amino acids specifically involved in poly(A) recognition (18). $\downarrow$ symbols indicate the residues in yeast PABP RRM2 relevant to the interaction with eIF4G (based on reference 48). The location of the methionine/glycine-rich segment within the linker region from *LmPABP2* is highlighted. The *A. thaliana* PABP2 homologue was included in the alignment because it is the nearest homologue to *LmPABP1* within the various *A. thaliana* PABPs (not shown). For the GenBank/GenBank accession numbers for the trypanosomatid PABP homologues, see Materials and Methods. The other GenBank accession numbers are as follows: *HsPABP*, P11940; *ScPab1p*, NP_011092; *AtPABP2*, P42731.

recombinant *LmPABP3*, producing a much weaker signal, and only when 12.5-fold more of the *LmPABP3* protein was blotted. Likewise, the anti-*LmPABP3* sera also produced a very weak reaction with *LmPABP2*. Considering the clear differences in the molecular weights of the two native proteins and the lack of any significant cross-reaction in samples from total parasite extracts, these weak cross-reaction events were not deemed to affect the results described below. Next, total protein extracts from *L. major* promastigotes grown exponentially were assayed in Western blots to investigate the expression of each PABP homologue, as well as to produce a rough estimate of their intracellular concentrations (Fig. 2C). *LmPABP1* was represented by at least two distinctly migrating bands with apparent molecular masses of approximately 69 and 75 kDa, with the larger band representing the phosphorylated form of the protein, as previously described (4). *LmPABP2* and -3 were detected as single bands with no indication of phosphorylation. Quantitation of the intracellular levels of the three proteins

produced estimates of 7×10^4 , 2×10^5 , and 1.5×10^5 molecules/cell for *LmPABP1*, -2, and -3, respectively (for *LmPABP1*, the values obtained were derived from the sum of the quantitations of both phosphorylated and nonphosphorylated forms). Considering the number of mRNA molecules per *T. brucei* procyclic cell to be around 5×10^4 (19) and assuming similar levels for *L. major* promastigotes, the quantitation values indicate that all three PABP homologues are present in excess of the number of individual mRNAs.

Poly(A) binding assays. To investigate the binding of the *Leishmania* PABP homologues to RNA, EMSAs were carried out with the three recombinant GST fusions, using as a probe a labeled A-rich RNA derived from the 5' untranslated region (UTR) of the human PABP mRNA. This probe consisted of sets of 5 to 8 A residues interspersed among 3 to 6 pyrimidines within a 61-nucleotide-long A-rich tract; it has been shown to be bound by human PABP in both EMSA and UV cross-linking experiments (17, 44). The three *Leishmania* proteins

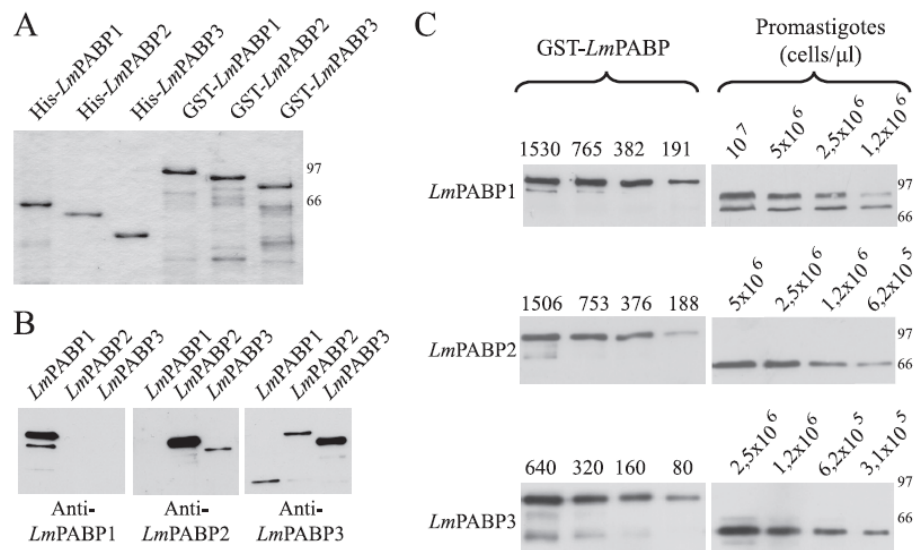


FIG. 2. Quantitation of intracellular levels of *LmPABP1*, -2, and -3. (A) His- and GST-tagged recombinant versions of the three *L. major* PABP homologues used in this work. The sizes of molecular mass markers (kDa) run on the same gel are shown on the right. (B) Specificities of the antibodies produced against the PABP homologues. The three GST fusions were blotted with three different antisera (indicated below each blot). (Left) Eight nanograms of *LmPABP1* and 100 ng of *LmPABP2* and -3. (Middle) Eight nanograms of *LmPABP2* and 100 ng of *LmPABP1* and -3. (Right) Eight nanograms of *LmPABP3* and 100 ng of *LmPABP1* and -2. (C) Quantitation of the expression levels of *LmPABP1*, -2, and -3 in extracts of exponentially grown *L. major* promastigotes. The different recombinant GST fusions, diluted to appropriate concentrations (in femtomoles), and different dilutions of whole parasite extracts were blotted with the corresponding antisera. The results were quantitated by densitometry, and the values were used to estimate the number of molecules per cell, as described previously (20). The results shown are representative of at least four different experiments using a minimum of three independently grown cell cultures. The larger band observed in the *LmPABP3* blot represents a minor cross-reaction to one of the other two PABP homologues, probably *LmPABP2*.

differ in the way they bind to the probe. Binding by GST-*LmPABP1* produces a distinct shift pattern that is resistant to the addition of 5 mg/ml heparin. In contrast, GST-*LmPABP2* produces a strong single shift that is prevented by the addition of 1 mg/ml heparin, while GST-*LmPABP3* produces two shifts, with the higher one being inhibited by heparin at 1 mg/ml (Fig. 3 and data not shown). The specificity of binding to the probe was investigated by performing the assays, again using the A-rich probe, in the presence of the unlabeled competitors

poly(A), poly(C), and poly(U). Binding by GST-*LmPABP1* was impaired by the addition of even low levels of poly(A) (1 μg/ml), while binding by GST-*LmPABP2* and -3 was affected only when 10-fold more of the polynucleotide was added. Poly(C) did not interfere with the binding of any of the three proteins even at the highest concentration added (10 μg/ml), while poly(U) produced an effect in all three proteins at 10 μg/ml, probably as a consequence of its base pairing to the probe and producing an RNA duplex (Fig. 3).

Subcellular localization of *LmPABP1*, -2, and -3. Mammalian PABP has been shown to be distributed throughout the cytoplasm, with a certain degree of localization to the perinuclear region (25). Upon transcription inhibition with actinomycin D, this distribution changes, and the protein can also be detected in the nucleus (2), a behavior that also has been shown to occur with *LmPABP1* (4). To compare the subcellular localizations of the three *L. major* PABP homologues, the corresponding antisera were used in indirect immunofluorescence assays with exponentially grown cells and visualized under a confocal microscope. As shown in Fig. 4A, under normal growth conditions, all three proteins were localized mainly in the cytoplasm, with little or no nuclear localization and no further compartmentalization within the cytoplasm. Preincubation of the cells with actinomycin D, performed as reported previously (4), led to a minor migration of *LmPABP1* to the nucleus (observed only through the fluorescence microscope) (not shown), but the protein remained predominantly within the cytoplasm (Fig. 4B). Under the same circumstances, both *LmPABP2* and -3 migrated in their entirety to the nucleus with

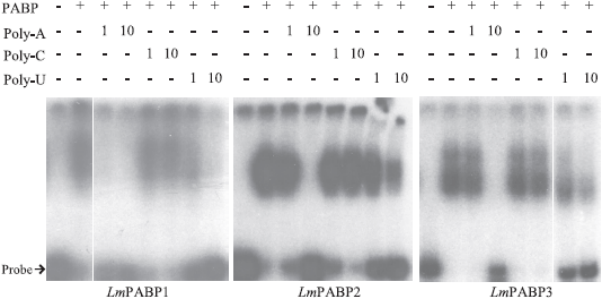


FIG. 3. Electrophoretic mobility shift assay to investigate binding of the *Leishmania* PABPs to an A-rich RNA probe. The assay was performed by incubating the ³²P-labeled A-rich probe described in the text with a fixed amount (100 ng) of the three recombinant GST fusions and analysis on a 5% nondenaturing polyacrylamide gel. Shifts obtained in the presence of the proteins were compared with the probe on its own. Where stated, the binding reactions were supplemented with 1 or 10 μg/ml of the polynucleotide poly(A), poly(C), or poly(U).

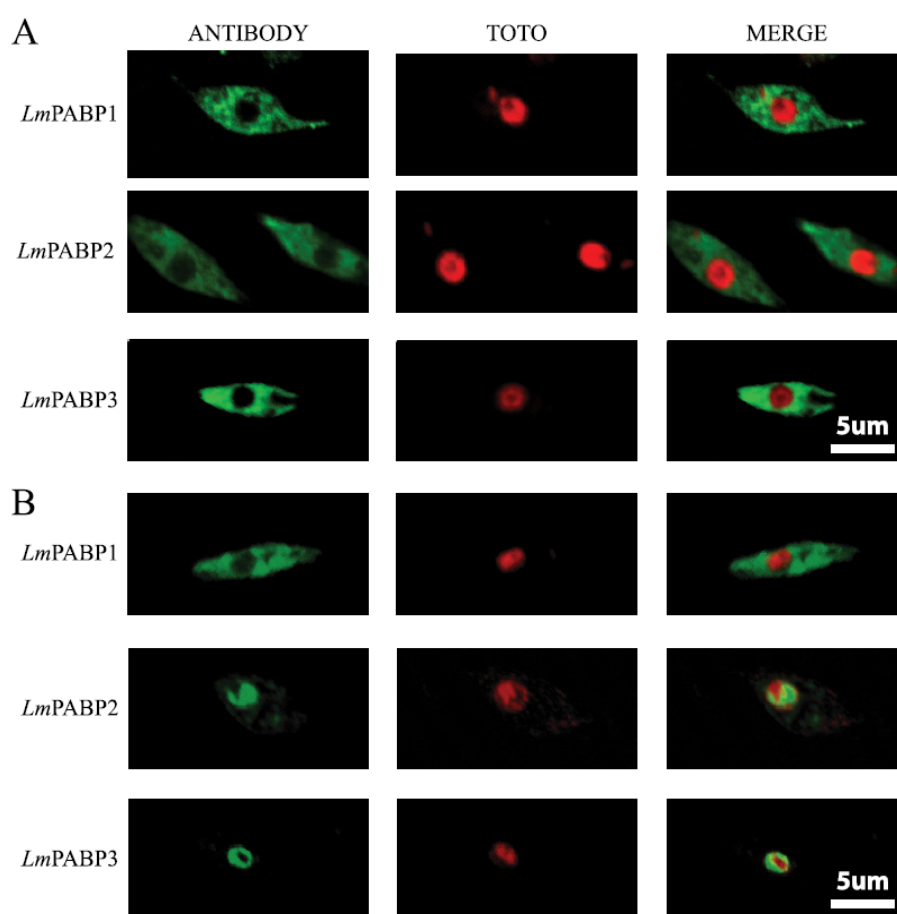


FIG. 4. Subcellular localization of *LmPABP1*, -2, and -3. Subcellular localization of the three *L. major* PABP homologues was carried out by indirect immunofluorescence using the distinct antiserum sets specific for each protein, followed by incubation with Alexa 488-conjugated secondary antibodies and analysis with a confocal microscope. Where indicated, the cells were counterstained with TOTO-3 to locate the nuclear and kinetoplast DNAs. (A) Exponentially grown *L. major* cells cultured under standard conditions in Schneider's insect medium. (B) Same as panel A, but with the addition of actinomycin D (10 μg/ml) to the growth medium for the last 10 h prior to harvesting and use in the assay.

very little of either protein remaining in the cytoplasm. This differential localization of *LmPABP2* and -3 is not induced upon incubation of the cells with the translational inhibitor cycloheximide (not shown). Within the nucleus, the two proteins do not colocalize with the DNA marker, suggesting a differential localization within the nucleoplasm distinct from the chromatin. A search for NLS, which are at least partially conserved in trypanosomatids (43), was then carried out using the different *Leishmania* PABP sequences. Putative motifs were found within both *L. major* and *T. brucei* PABP2 (Fig. 1), localized at the end of RRM3. These motifs are within a segment which, compared to other PABPs, has diverged in the PABP2 and -3 homologues. Although no predicted NLS was observed within *LmPABP3*, the equivalent segment was rich in positively charged residues, generally required for the nuclear localization elements (16).

Defining interactions between the different *Leishmania* PABP homologues. The simultaneous migration of *LmPABP2* and -3 to the nucleus upon transcription inhibition suggests that the two proteins may interact directly or at least bind to

the same target mRNAs. To investigate this possibility, we opted to individually immunoprecipitate the three native *Leishmania* PABPs from total cytoplasmic extracts and probe the precipitated immunocomplexes, or the resulting nonbound supernatants, for the presence of the remaining PABP homologues. As shown in Fig. 5A, each of the isoform-specific antibodies efficiently brought down nearly all of the corresponding proteins, with very little left in the respective nonbound supernatants, confirming the efficiency of the procedure. When the immunoprecipitated samples and supernatant of *LmPABP1* were investigated for the presence of *LmPABP2* and -3, no detectable amount of either protein was observed in the precipitated complexes, with both supernatant and input samples containing equivalent quantities of the two proteins. Likewise, when the samples from the immunoprecipitation of *LmPABP2* and -3 were assayed for the presence of *LmPABP1*, no evidence for its coprecipitation was observed. In contrast, immunoprecipitation of *LmPABP2* brought down *LmPABP3* and depleted both *LmPABP2* and -3 from the nonbound supernatant, while immunoprecipitation of *LmPABP3* also

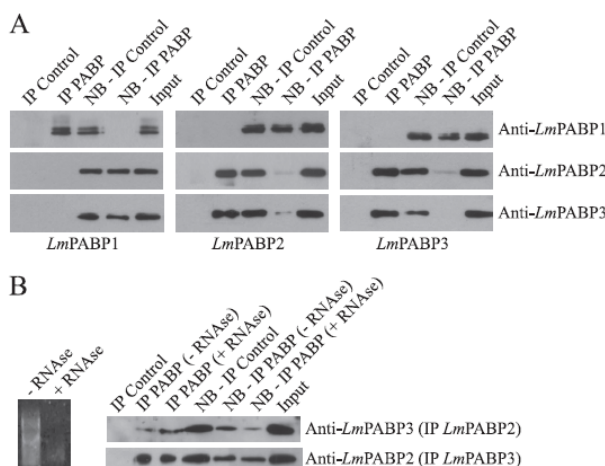


FIG. 5. Analysis of the interactions between the three PABP homologues *in vivo*. (A) Distinct IP reactions were set up using total *L. major* cytoplasmic extract and affinity-purified antibodies directed against LmPABP1 (left), LmPABP2 (middle), and LmPABP3 (right), as well as the respective preimmune control sera (Control). Precipitated immunocomplexes, as well as the nonbound supernatant (NB) and the "Input" (equivalent to the amount of protein added to the IP reaction mixture), were then used in Western blot assays with the three distinct antisera, as indicated. (B) Effect of RNase treatment on the interaction between LmPABP2 and -3. Aliquots of the cytoplasmic extract were incubated in the presence or absence of 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of RNase A (for 5 min at 37°C) prior to use in IP reactions carried out as for panel A with either the LmPABP2 or LmPABP3 antibody. For these assays, the IP of LmPABP2 was developed with the LmPABP3 antiserum and vice versa. On the left is shown the effect of the RNase treatment on the extract's RNAs.

brought down LmPABP2 and depleted both of them from the nonbound fraction. The LmPABP2 and -3 assays were then repeated, comparing the effects of pretreating the cytoplasmic extracts with RNase on the immunoprecipitation yields (Fig. 5B). Despite the nearly complete degradation of the endogenous RNA, both proteins continued to coprecipitate, indicating that they interact in an RNA-independent manner.

Analysis of the interaction of LmPABP1, -2, and -3 with a *Leishmania* eIF4G homologue. The binding between PABP and eIF4G is a critical event for the activity of PABP in translation. In *Leishmania*, several eIF4G homologues have been reported, one of which (LmEIF4G3) has been shown to interact with both the human and *Leishmania* eIF4A homologues (20) and has been shown to function within the context of an eIF4F complex (65). To investigate binding interactions between the three *Leishmania* PABP homologues and LmEIF4G3, pulldown assays were carried out. First, the recombinant GST fusions of LmPABP1 through -3 were immobilized on glutathione-Sepharose beads and tested for the ability to bind to the ^{35}S -labeled full-length LmEIF4G3. In these assays GST alone and its fusion to the *Leishmania* eIF4A homologue, LmEIF4AI (originally named LmEIF4A1), were used as negative and positive controls, respectively. The LmEIF4G3 labeled protein bound to all three GST-PABP fusions, with the binding to GST-LmPABP1 being somewhat more efficient than those to the other two proteins (Fig. 6A). Binding to the positive-control GST-LmEIF4AI was superior

to binding to any of the GST-PABP constructs, but no binding to the negative GST control was observed. A reverse assay was also carried out with full-length GST-LmEIF4G3 immobilized on the beads and incubated with the distinct ^{35}S -labeled PABP homologues, again using GST as a negative control (Fig. 6B). Three concentrations of GST-LmEIF4G3 were used in these assays, and the input labeled proteins were diluted severalfold to produce a better picture of the different bindings. Binding by LmPABP1 was readily detected, even with the smallest amount of GST-LmEIF4G3 used. In contrast, even in the presence of 4-fold more of the recombinant GST-tagged protein, only trace amounts of labeled LmPABP2 and -3 bound to the beads. We then went on to investigate the interaction between the eIF4G homologue and LmPABP1, -2, and -3 *in vivo* after immunoprecipitation of native LmEIF4G3, followed by blotting with each of the three PABP antisera. As shown in Fig. 6C, only LmPABP1 was detected within the product of the immunoprecipitation reaction, with no signal produced with antibodies directed against LmPABP2 and -3.

The two PABP homologues conserved in *Leishmania* and *Trypanosoma* species are essential for cell viability. The conservation of the trypanosomatid PABP1 and -2 homologues in both *Leishmania* and *Trypanosoma* species is a strong indication that they perform conserved functions within the various trypanosomatid species and that results derived from one organism can generally be extrapolated to the whole group. To investigate the requirements for these two proteins for cellular viability in *T. brucei*, the genes encoding their orthologues (TbPABP1 and -2) were cloned into a tetracycline-inducible RNAi vector and transfected into procyclic cell lines, and synthesis of double-stranded RNA was induced by the addition of tetracycline.

Upon induction of the RNAi, the results obtained for both TbPABP1 and -2 were in general very similar, with reduction in cellular proliferation and cessation of growth occurring between 24 and 48 h after tetracycline addition (Fig. 7A and B). Cell death ensued within a few days, although it tended to be a more immediate consequence for TbPABP2 than for TbPABP1. Western blotting using the LmPABP1 and -2 antibodies, which cross-react with their *T. brucei* counterparts, confirmed the efficiency of both RNAi procedures. For TbPABP1, very little of the protein was detected within 24 h of RNAi induction and at subsequent time points (Fig. 7A), while the levels of the translation initiation factor TbEIF4AI, used as a control, or TbPABP2 remained unaffected. Likewise for TbPABP2, the antibodies confirmed major decreases in levels within 24 h of RNAi induction, but in contrast to the TbPABP1 RNAi, residual levels of the protein (<25%) could be detected even 72 h after tetracycline addition. No effect was seen, however, on the levels of TbPABP1 or the control, TbEIF4AI (Fig. 7B). Metabolic labeling with [^{35}S]methionine was also carried out to monitor changes in protein synthesis at selected time points after RNAi (Fig. 7C). For both proteins, an overall inhibition of protein synthesis was observed within 72 h of tetracycline addition, although at this stage, it is not possible to rule out for either protein a nonspecific effect on translation caused by the cell stress induced by the RNAi procedure. The lack of qualitative changes in the profiles of proteins being synthesized, nevertheless, indicates that the two proteins are not involved in the translation of different mRNA populations.

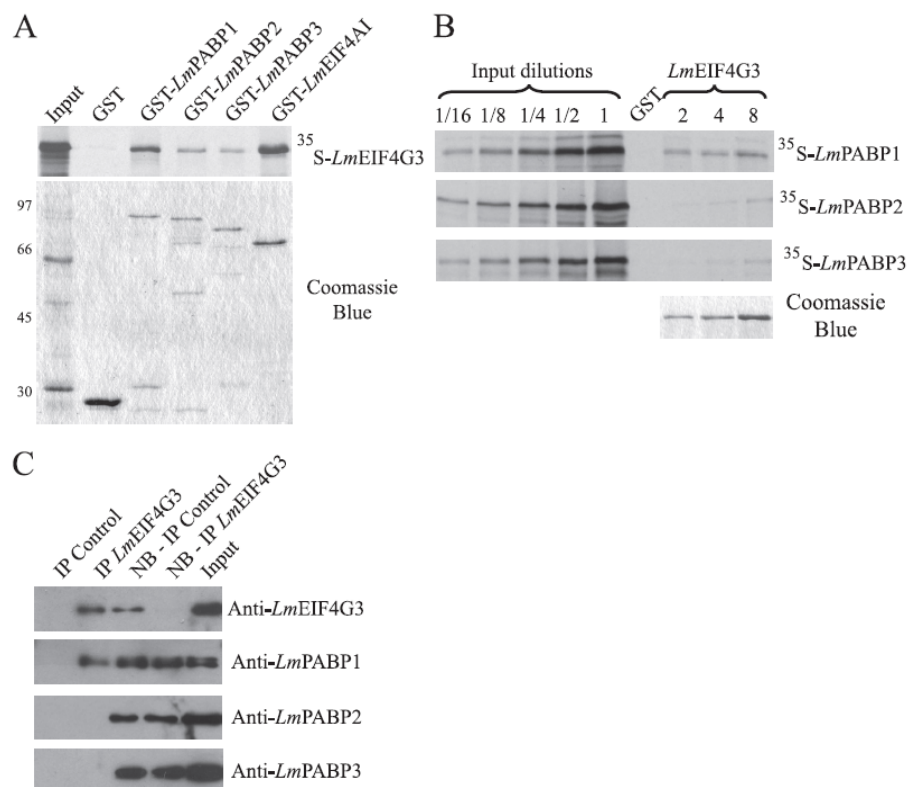


FIG. 6. Analysis of the interaction between an *L. major* eIF4G homologue (*LmEIF4G3*) and *LmPABP1*, -2, and -3. (A) Pulldown assays between GST-PABP fusions and 35 S-labeled *LmEIF4G3*. GST-*LmEIF4AI* was used as a positive control. On top is shown the autoradiography with the pulldown results, while below is shown the equivalent Coomassie-blue stained gel (molecular mass markers [kDa] are shown on the left). (B) Reverse pulldown assay with GST-*LmEIF4G3* immobilized on the glutathione-Sepharose beads and incubated with the labeled *LmPABP1*, -2, and -3. Three different concentrations of GST-*LmEIF4G3* (2, 4, and 8 μ g, shown on the gel stained with Coomassie blue at the bottom right) were used in equivalent pulldown reactions with the three 35 S-labeled proteins. For this assay, aliquots of the "Input" (equivalent to the same amount of labeled protein used in the pulldown reactions) plus serial dilutions (up to 16-fold) were also run on the gel and autoradiography for comparison with the amount of protein bound to the beads. In both panels A and B, GST alone bound to the beads was used as a negative control. (C) Immunoprecipitation of native *LmEIF4G3*, performed as described for Fig. 5. The product of the reaction, the nonbound (NB) supernatant, and the "Input" were then individually blotted with the anti-*LmEIF4G3* serum and each of the three PABP antisera.

DISCUSSION

The origin of PABP, with its four-RRM arrangement plus the PABC domain, seems to predate the split of the main eukaryotic lineages. PABP homologues with the same conserved structure are present in all eukaryotes investigated so far, with the possible exception of *Giardia lamblia*, in which a true homologue could not be found within the sequences derived from the published genome (47). The trypanosomatid PABPs are no exception in this regard, although some features, particularly for the PABP2 homologue, are unique and might indicate novel functions that have evolved within this group of protozoa. The results presented here clearly indicate that trypanosomatid PABP1 and PABP2 bind to different targets and perform nonredundant and essential functions for cellular survival, despite being simultaneously expressed as abundant cytoplasmic proteins. It also seems very likely that the third homologue (PABP3) in *Leishmania* species either acts redundantly with PABP2 or is required to complement its function. At this stage, however, it is not known whether its absence from *Trypanosoma* species reflects an origin after the

split between the *Leishmania* and *Trypanosoma* lineages or a loss from the latter.

The literature concerning protein synthesis in trypanosomatids is still scarce. The availability of selected genome sequences (33) and the analysis of the number of isoforms of subunits of eIF4F (20) have indicated a potentially complex translation initiation. The distinct PABP homologues observed may add yet a further element of complexity to the translation initiation process in trypanosomatids. So far, the results presented here, including the sequence analysis and poly(A) binding data, subcellular localization experiments, and pulldown assays, clearly implicate the PABP1 homologue as the major candidate to perform the functions already defined for PABP in translation in other eukaryotes. Other roles cannot be ruled out, and this homologue has already been shown to be able to prevent the deadenylation of RNAs *in vitro* (45). Lack of coprecipitation between the PABP1 and -2 homologues clearly highlights their potential to perform distinct roles; however, the abundance of PABP2, as well as the results from the RNAi experiments in *T. brucei*, also confirms that it plays a major role

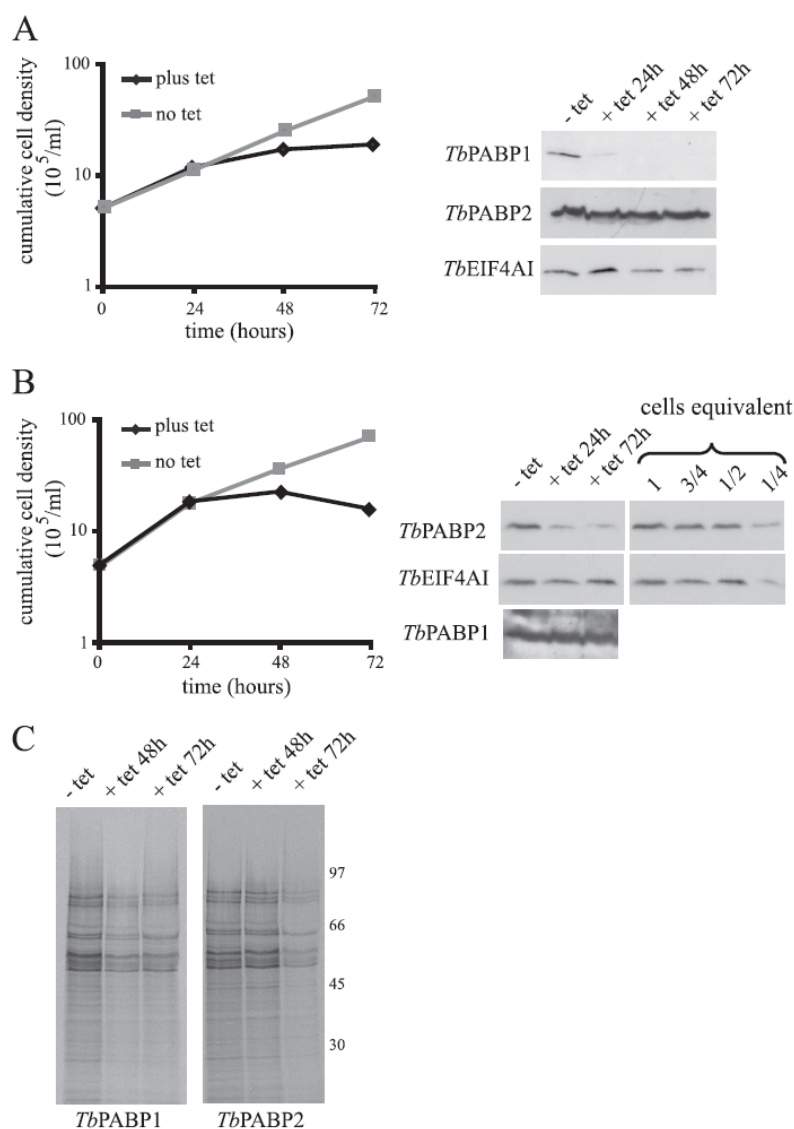


FIG. 7. RNA interference of the *T. brucei* PABP homologues. (A and B) Representative growth curves after tetracycline (tet) induction of the RNAi for *TbPABP1* (A) and *TbPABP2* (B). Growth was monitored by counting the viable cells, and the expression of *TbPABP1* and -2 or an endogenous control protein (*TbEIF4AI*) was assayed to monitor the efficiency of the RNAi procedure (shown on the right). Note the various dilutions of total cell extract used to estimate the efficiency of RNAi depletion for *TbPABP2* (1 to 1/4 cell equivalent; 1 cell equivalent was equal to 10^6 cells and was used in the various RNAi lanes). The same RNAi samples were blotted on a second membrane, loaded with twice as much cellular extract, to detect *TbPABP1*. (C) Total protein synthesis at selected time points after tetracycline addition. Metabolic labeling was performed by incubating aliquots of the cells in the presence of $[^{35}\text{S}]$ methionine, followed by SDS-PAGE and autoradiography. The sizes of molecular mass markers (in kDa) run on the same gel from the autoradiography are shown on the right. The RNAi results are representative of multiple experiments performed with two distinct transfected cell lines, each submitted to at least one independent labeling experiment.

in mRNA metabolism in the trypanosomatids. The presence of yet a third homologue in *Leishmania* clearly deserves further attention to its function and how it relates to that of PABP2, especially considering the fact that they likely interact and/or bind to the same messages.

The sequence analysis of RRM1 and -2 from PABP2 suggested unique differences in RNA binding affinity and/or specificity, a result corroborated by the *in vitro* RNA binding assays. These differences may indicate novel functions that neverthe-

less seem to be conserved within the trypanosomatids. Considering that both RRM2 and PABC have been implicated in mediating the interaction of PABP with protein partners, such as eIF4G and eRF3 (28, 32, 35), the divergence of RRM2 in PABP2 might indicate a functional differentiation in comparison with PABP1, perhaps through interaction with novel RNA and protein partners, without losing the activities associated with the PABC domain. Indeed, in *Crithidia fasciculata*, the PABP2 orthologue has been found to be part of a complex that

recognizes sequence elements in the untranslated regions of mRNAs that accumulate periodically during the cell cycle (46). Again, in *T. cruzi*, its orthologue was found to interact directly with TcUBP-1, an RNA binding protein that binds to AU-rich sequences in the 3' UTRs of mRNAs, which are selectively destabilized in the trypomastigote stage of the parasite (21). Interestingly, TcUBP-1 can form homodimers through a glycine-rich region that is reminiscent of the central linker segment of PABP2. More recently, TcUBP-1 has been shown to migrate to the nucleus under conditions of arsenite-induced stress (10), a behavior similar to that observed for *Lm*PABP2 and -3 under transcription inhibition. In another possible parallel with *Lm*PABP2, this shuttling is dependent on the presence of a nuclear localization signal localized within the unique RRM of TcUBP-1. Nevertheless, the *T. cruzi* PABP2 protein does not shuttle to the nucleus in the presence of arsenite, and treatment with actinomycin D prevents the nuclear localization of TcUBP-1 (10), suggesting different mechanisms for the shuttling of the two proteins. Overall, it is possible that PABP2 may function as a general partner of different RNA binding proteins involved in the posttranscriptional control of the expression of selected mRNAs. Other roles could be associated with mRNA processing and export, considering the striking effect on subcellular localization of PABP2 (and also PABP3) induced upon inhibition of transcription. This may explain why the *T. brucei* PABP2 orthologue has been found associated with the U1 snRNP complex, required for the *cis* splicing of the intron-containing poly(A) polymerase message (49, 50).

The presence of three distinct PABP homologues in *Leishmania*, two of which are conserved in *Trypanosoma* species, is remarkable when it is considered that single-cell eukaryotes normally have only one homologue (42). In metazoans, the numbers of PABP homologues vary from one in *Drosophila* to four in humans (reviewed in reference 24), but multiple homologues might be a consequence of the need to differentially modulate mRNA translation and gene expression in different cellular types and tissues during development. In plants, the situation is more complex, with eight distinct homologues described for *Arabidopsis*, which vary as to their patterns of expression, the presence or absence of the PABC domain, and requirements for viability (6, 7). Noteworthy is the fact that all of the plant PABP homologues display conserved residues within the RNP motifs of RRM1 and -2, unlike what is seen in the trypanosomatid PABP2 proteins, indicating a possible conservation of poly(A) binding specificity. Taking everything together, defining in detail the function of the trypanosomatid PABPs remains a relevant goal that can unravel novel and unique mechanisms associated with mRNA metabolism and translation in these peculiar organisms, with possible impacts on the understanding of these processes in eukaryotes in general.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partially funded by grants provided by the Brazilian funding agencies FACEPE (006/2003-CNPq/PPP) and CNPq (476255/2004-0). T.D.D.C.L., D.M.N.M., and C.R.S.R. received studentships from CAPES and FACEPE. J.R.C.V. received a PQ ("pesquisador visitante") scholarship from FIOCRUZ. Work in M. Carrington's laboratory is funded by the Wellcome Trust, and L.E. received a studentship funded by the BBSRC.

Technical assistance in growing the *Leishmania* cells was provided by B. S. Lima. We thank C. Docena and the PDTIS-FIOCRUZ Program for Technological Development in Tools for Health for access and help with confocal microscopy and sequencing.

REFERENCES

- Adam, S. A., T. Nakagawa, M. S. Swanson, T. K. Woodruff, and G. Dreyfuss. 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* 6:2932-2943.
- Amrani, E., R. Stauber, and G. N. Pavlakis. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 273:13015-13021.
- Amrani, N., S. Ghosh, D. A. Mangus, and A. Jacobson. 2008. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 453:1276-1280.
- Bates, E. J., E. Knuepfer, and D. F. Smith. 2000. Poly(A)-binding protein 1 of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res.* 28:1211-1220.
- Batista, J. A., S. M. Teixeira, J. E. Donelson, L. V. Kirchhoff, and C. Martins de Sa. 1994. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67:301-312.
- Belostotsky, D. A. 2003. Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics* 163:311-319.
- Bravo, J., L. Aguilar-Henonin, G. Olmedo, and P. Guzman. 2005. Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly(A)-binding proteins. *Mol. Genet. Genomics* 272: 651-665.
- Brook, M., J. W. Smith, and N. K. Gray. 2009. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* 137:595-617.
- Brune, C., S. E. Munchel, N. Fischer, A. V. Podtelejnikov, and K. Weis. 2005. Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* 11:517-531.
- Cassola, A., and A. C. Frasch. 2009. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 284:35015-35028.
- Chang, T. C., A. Yamashita, C. Y. Chen, Y. Yamashita, W. Zhu, S. Durdan, A. Kahvejian, N. Sonenberg, and A. B. Shyu. 2004. UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev.* 18:2010-2023.
- Chekanova, J. A., and D. A. Belostotsky. 2003. Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA* 9:1476-1490.
- Cheng, S., and D. R. Gallie. 2007. eIF4G, eIF504G, and eIF4B bind the poly(A)-binding protein through overlapping sites within the RNA recognition motif domains. *J. Biol. Chem.* 282:25247-25258.
- Clayton, C., and M. Shapira. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156: 93-101.
- Clayton, C. E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21:1881-1888.
- Cokol, M., R. Nair, and B. Rost. 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* 1:411-415.
- de Melo Neto, O. P., N. Standart, and C. Martins de Sa. 1995. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* 23: 2198-2205.
- Deo, R. C., J. B. Bonanno, N. Sonenberg, and S. K. Burley. 1999. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* 98:835-845.
- Dhalia, R., N. Marinsek, C. R. Reis, R. Katz, J. R. Muniz, N. Standart, M. Carrington, and O. P. de Melo Neto. 2006. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res.* 34:2495-2507.
- Dhalia, R., C. R. Reis, E. R. Freire, P. O. Rocha, R. Katz, J. R. Muniz, N. Standart, and O. P. de Melo Neto. 2005. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol. Biochem. Parasitol.* 140:23-41.
- D'Orso, I., and A. C. Frasch. 2002. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *J. Biol. Chem.* 277:50520-50528.
- Dunn, E. F., C. M. Hammell, C. A. Hodge, and C. N. Cole. 2005. Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev.* 19:90-103.
- Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:913-963.

24. Gorgoni, B., and N. K. Gray. 2004. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct. Genomic Proteomic* 3:125–141.
25. Görlach, M., C. G. Burd, and G. Dreyfuss. 1994. The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp. Cell Res.* 211:400–407.
26. Grange, T., C. Martins de Sa, J. Oddos, and R. Pictet. 1987. Human mRNA polyadenylate binding protein: evolutionary conservation of a nucleic acid binding motif. *Nucleic Acids Res.* 15:4771–4787.
27. Hershey, J. W. B., and W. C. Merrick. 2000. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis, p. 33–88. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
28. Hoshino, S., N. Hosoda, Y. Araki, T. Kobayashi, N. Uchida, Y. Funakoshi, and T. Katada. 1999. Novel function of the eukaryotic polypeptide-chain releasing factor 3 (eRF3/GSPT) in the mRNA degradation pathway. *Biochemistry* 64:1367–1372.
29. Hosoda, N., T. Kobayashi, N. Uchida, Y. Funakoshi, Y. Kikuchi, S. Hoshino, and T. Katada. 2003. Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J. Biol. Chem.* 278:38287–38291.
30. Hosoda, N., F. Lejeune, and L. E. Maquat. 2006. Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. *Mol. Cell. Biol.* 26:3085–3097.
31. Hotchkiss, T. L., G. E. Nerantzakis, S. C. Dills, L. Shang, and L. K. Read. 1999. *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. *Mol. Biochem. Parasitol.* 98:117–129.
32. Imataka, H., A. Gradi, and N. Sonenberg. 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* 17:7480–7489.
33. Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Blanchettin, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Brusch, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duysterhoeft, G. Fazolina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Lark, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, and P. J. Myler. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309:436–442.
34. Kelly, S., J. Reed, S. Kramer, L. Ellis, H. Webb, J. Sunter, J. Salje, N. Marinsek, K. Gull, B. Wickstead, and M. Carrington. 2007. Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Mol. Biochem. Parasitol.* 154:103–109.
35. Kessler, S. H., and A. B. Sachs. 1998. RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.* 18:51–57.
36. Khanam, T., R. S. Muddashetty, A. Kahvejian, N. Sonenberg, and J. Brosius. 2006. Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol.* 3:170–177.
37. Kozlov, G., J. F. Trempe, K. Khaleghpour, A. Kahvejian, I. Ekiel, and K. Gehring. 2001. Structure and function of the C-terminal PABP domain of human poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98:4409–4413.
38. Kühn, U., and T. Pieler. 1996. *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.* 256:20–30.
39. Kühn, U., and E. Wahle. 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1678:67–84.
40. Le, H., R. L. Tanguay, M. L. Balasta, C. C. Wei, K. S. Browning, A. M. Metz, D. J. Goss, and D. R. Gallie. 1997. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* 272:16247–16255.
41. Liang, X. H., A. Haritan, S. Uliel, and S. Michaeli. 2003. *trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot. Cell* 2:830–840.
42. Mangus, D. A., M. C. Evans, and A. Jacobson. 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4:223.
43. Marchetti, M. A., C. Tschudi, H. Kwon, S. L. Wolin, and E. Ullu. 2000. Import of proteins into the trypanosome nucleus and their distribution at karyokinesis. *J. Cell Sci.* 113:899–906.
44. Melo, E. O., R. Dhalla, C. Martins de Sa, N. Standart, and O. P. de Melo Neto. 2003. Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. *J. Biol. Chem.* 278:46357–46368.
45. Milone, J., J. Wilusz, and V. Bellofatto. 2004. Characterization of deadenylation in trypanosome extracts and its inhibition by poly(A)-binding protein Pab1p. *RNA* 10:448–457.
46. Mittra, B., and D. S. Ray. 2004. Presence of a poly(A) binding protein and two proteins with cell cycle-dependent phosphorylation in *Crihidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding protein II. *Eukaryot. Cell* 3:1185–1197.
47. Morrison, H. G., A. G. McArthur, F. D. Gillin, S. B. Aley, R. D. Adam, G. J. Olsen, A. A. Best, W. Z. Cande, F. Chen, M. J. Cipriano, B. J. Davids, S. C. Dawson, H. G. Elmendorf, A. B. Hehl, M. E. Holder, S. M. Huse, U. U. Kim, E. Lasek-Nesselquist, G. Manning, A. Nigam, J. E. Nixon, D. Palm, N. E. Passamaneck, A. Prabhu, C. I. Reich, D. S. Reiner, J. Samuelson, S. G. Svard, and M. L. Sogin. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. *Science* 317:1921–1926.
48. Otero, L. J., M. P. Ashe, and A. B. Sachs. 1999. The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates *in vitro* poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. *EMBO J.* 18:3153–3163.
49. Palfi, Z., W. S. Lane, and A. Bindereif. 2002. Biochemical and functional characterization of the *cis*-splicingosomal U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121:233–243.
50. Palfi, Z., B. Schimanski, A. Gunzl, S. Lucke, and A. Bindereif. 2005. U1 small nuclear RNP from *Trypanosoma brucei*: a minimal U1 snRNA with unusual protein components. *Nucleic Acids Res.* 33:2493–2503.
51. Pitula, J., W. T. Ruyechan, and N. Williams. 1998. *Trypanosoma brucei*: identification and purification of a poly(A)-binding protein. *Exp. Parasitol.* 88:157–160.
52. Preiss, T., and M. W. Hentze. 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25:1201–1211.
53. Prévôt, D., J. L. Darlix, and T. Ohlmann. 2003. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* 95:141–156.
54. Sachs, A. B., M. W. Bond, and R. D. Kornberg. 1986. A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. *Cell* 45:827–835.
55. Siddiqui, N., D. A. Mangus, T. C. Chang, J. M. Palermino, A. B. Shyu, and K. Gehring. 2007. Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 282:25067–25075.
56. Simón, E., and B. Seraphin. 2007. A specific role for the C-terminal region of the poly(A)-binding protein in mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* 35:6017–6028.
57. Sladic, R. T., C. A. Lagnado, C. J. Bagley, and G. J. Goodall. 2004. Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. *Eur. J. Biochem.* 271:450–457.
58. Svitkin, Y. V., and N. Sonenberg. 2006. Translational control by the poly(A) binding protein: a check for mRNA integrity. *Mol. Biol.* 40:684–693.
59. Tarun, S. Z., Jr., and A. B. Sachs. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* 15:7168–7177.
60. Uchida, N., S. Hoshino, H. Imataka, N. Sonenberg, and T. Katada. 2002. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* 277:50286–50292.
61. Wickstead, B., K. Ersfeld, and K. Gull. 2002. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125:211–216.
62. Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt, and G. A. Cross. 1999. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99:89–101.
63. Woods, A. J., T. Kantidakis, H. Sabe, D. R. Critchley, and J. C. Norman. 2005. Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. *Mol. Cell. Biol.* 25:3763–3773.
64. Yao, G., Y. C. Chiang, C. Zhang, D. J. Lee, T. M. Laue, and C. L. Denis. 2007. PAB1 self-association precludes its binding to poly(A), thereby accelerating CCR4 deadenylation *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 27:6243–6253.
65. Yoffe, Y., M. Leger, A. Zinoviev, J. Zuberek, E. Darzynkiewicz, G. Wagner, and M. Shapira. 2009. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res.* 37:3243–3253.

9.2 Trabalho Publicado Associado a Tese

Freire ER, Dhalia R, Moura DMN, **da Costa Lima TD**, Lima RP, Reis CRS, Hughes K, Figueiredo RCBQ, Standart N, Carrington M and de Melo Neto OP. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2011. 176:25-36



The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties

Eden R. Freire^a, Rafael Dhalia^a, Danielle M.N. Moura^a, Tamara D. da Costa Lima^a, Rodrigo P. Lima^a, Christian R.S. Reis^a, Katie Hughes^b, Regina C.B.Q. Figueiredo^a, Nancy Standart^b, Mark Carrington^b, Osvaldo P. de Melo Neto^{a,*}

^a Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife, PE 50670-420, Brazil

^b Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB2 1GA, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2010

Received in revised form 15 October 2010

Accepted 16 November 2010

Available online 24 November 2010

Keywords:

Translation

eIF4E

eIF4G

Trypanosomatid

Leishmania

ABSTRACT

Translation initiation in eukaryotes requires eIF4E, the cap binding protein, which mediates its function through an interaction with the scaffolding protein eIF4G, as part of the eIF4F complex. In trypanosomatids, four eIF4E homologues have been described but the specific function of each is not well characterized. Here, we report a study of these proteins in *Trypanosoma brucei* (TbEIF4E1 through 4). At the sequence level, they can be assigned to two groups: TbEIF4E1 and 2, similar in size to metazoan eIF4E1; and TbEIF4E3 and 4, with long N-terminal extensions. All are constitutively expressed, but whilst TbEIF4E1 and 2 localize to both the nucleus and cytoplasm, TbEIF4E3 and 4 are strictly cytoplasmic and are also more abundant. After knockdown through RNAi, TbEIF4E3 was the only homologue confirmed to be essential for viability of the insect procyclic form. In contrast, TbEIF4E1, 3 and 4 were all essential for the mammalian bloodstream form. Simultaneous RNAi knockdown of TbEIF4E1 and 2 caused cessation of growth and death in procyclics, but with a delayed impact on translation, whilst knockdown of TbEIF4E3 alone or a combined TbEIF4E1 and 4 knockdown led to substantial translation inhibition which preceded cellular death by several days, at least. Only TbEIF4E3 and 4 were found to interact with *T. brucei* eIF4G homologues; TbEIF4E3 bound both TbEIF4G3 and 4 whilst TbEIF4E4 bound only to TbEIF4G3. These results are consistent with TbEIF4E3 and 4 having distinct but relevant roles in initiation of protein synthesis.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The trypanosomatids, including the various *Leishmania* and *Trypanosoma* species, are pathogenic protozoans well known not only for the diseases they cause, but also for their complex biology and the unusual molecular mechanisms required for their gene expression. Transcription of protein coding genes occurs polycistronically [1,2] and processing to monocistronic mRNAs occurs through coupled *trans*-splicing and polyadenylation (reviewed in [3]). The result is that mRNAs have a common 39nt long spliced-leader (or mini-exon) sequence at the distal end of the 5' UTR, which is identical for all mRNAs of a given species. At the 5' end of the spliced-leader sequence lies the 7-methyl-GTP cap nucleotide (m⁷G), followed by four methylated nucleotides in the spliced-leader sequence, the cap4 structure [4]. Regulation of gene

expression in trypanosomatids is accomplished mainly through post-transcriptional mechanisms such as control of mRNA stability and possibly translation (for reviews see [5–7]). However, in contrast to the considerable characterization of their mechanisms of mRNA synthesis and processing, relatively little is understood regarding protein synthesis and how it can be regulated.

Translation initiation is the most complex stage of protein synthesis and the one which can vary more significantly between different taxonomic groups [8]. A major player in this process in eukaryotes, and also a major target for translation control, is eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), the m⁷G cap binding protein. eIF4E is a small polypeptide (24–25 kDa in mammals) which, apart from protein synthesis, has been implicated in a number of processes involved in mRNA metabolism such as transport and control of its stability (reviewed in [9–12]). In translation it is part of the heterotrimeric complex eIF4F, which also includes the RNA helicase eIF4A and the large scaffolding protein eIF4G [13]. eIF4F facilitates the recruitment of the small ribosomal subunit to the mRNA, which is accomplished with the help of another translation initiation complex, eIF3. eIF4E mediates the binding of the complex to the mRNA and, as part of eIF4F, can bind simultaneously to both the cap and

* Corresponding author at: Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife, PE 50670-420, Brazil. Tel.: +55 81 2101 2636; fax: +55 81 2101 2647.

E-mail address: opmn@cpqam.fiocruz.br (O.P. de Melo Neto).

eIF4G, which can then mediate interactions with other translation factors [14–16]. Despite its well described function in translation in the cytoplasm, substantial levels of eIF4E localize to the nucleus (reviewed in [17]), where it promotes the nuclear export of selected mRNAs [10,18,19].

The structure of eIF4E bound to 7-methyl-GDP [20,21] is shaped like a cupped hand, with the cap analogue located in a narrow cap-binding slot on the concave side of the protein. eIF4E is characterized by eight tryptophan residues located at conserved positions along the protein. Cap recognition is mediated by, among other interactions, base sandwich-stacking between W56 and W102 (mammalian eIF4E-1 numbering) whilst W73 is involved in the interaction with eIF4G [9,13,20]. The activity of eIF4E can be regulated in a number of ways such as through the action of eIF4E interacting proteins, eIF4E-BPs, or directly through phosphorylation (reviewed in [22–25]).

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* only one eIF4E homologue, essential for viability, is found [26]. More usually, multiple forms of this protein are present in any specific organism (reviewed by [27]). In mammals, three different classes of eIF4E have been described: eIF4E-1, the prototypical cap-binding protein; eIF4E-2 (also known as 4EHP), which binds the cap less well, does not interact with eIF4G and has a regulatory role [28,29]; and eIF4E-3, which binds both cap and eIF4G but has a restricted, tissue specific, expression pattern [30]. An extensive analysis of hundreds of eIF4E-related sequences has indicated that different events of duplication of the eIF4E gene may have occurred in distinct eukaryotic groups after divergence, resulting in new forms of the protein with novel or modified functions [31].

In trypanosomatids, the initial description of a single putative eIF4E homologue [32] was followed by the identification of four homologues in genome sequences from *L. major*, all of which are also conserved in *Trypanosoma* species [33]. The four *Leishmania* eIF4E homologues (*LmEIF4E1* through 4, *LeishEIF4E1* through 4 or simply EIF4E1 through 4) were shown to diverge in binding affinity for different synthetic cap analogues, in expression levels and in polysomal association in sucrose sedimentation gradients. None could rescue the growth of a yeast strain lacking a functional eIF4E and none could confidently be implicated as having a predominant role in translation or its control [33,34].

Here we describe work focused on the four *Trypanosoma brucei* proteins (here named *TbEIF4E1* through 4). First, sequence analysis identified features which distinguish *TbEIF4E1* and 2 from *TbEIF4E3* and 4. For all four homologues, the cap-binding affinities, subcellular localization, and the expression in two stages of the *T. brucei* life cycle were characterized. The effect of depletion, through RNAi, on cellular growth and translation was determined and the interaction between putative eIF4E/eIF4G homologues was also analyzed. The results presented allow the separation of the four proteins into two distinct groups. The first comprises *TbEIF4E1* and 2, which localize both to the nucleus and the cytoplasm, do not seem to be directly involved in translation but perform functions essential for cellular viability. The second group is formed by the *TbEIF4E3* and 4 homologues, more abundant, strictly cytoplasmic proteins which seem to be required for translation and take part in the formation of distinct eIF4F-like complexes.

2. Materials and methods

2.1. Sequence analysis

BLAST searches were carried out with the *T. brucei* genome sequences available at the Gene DB website of the Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit (www.genedb.org). Further sequence searches and Clustal W alignments were done as previ-

ously described [33]. Relevant trypanosomatid GeneDB accessions: *TbEIF4E1* – Tb11.18.0004; *TbEIF4E2* – Tb927.10.16070; *TbEIF4E3* – Tb11.01.3630; *TbEIF4E4* – Tb927.6.1870; *Lm (L. major) EIF4E1* – LmjF27.1620; *LmEIF4E2* – LmjF19.1500; *LmEIF4E3* – LmjF28.2500; *LmEIF4E4* – LmjF30.0450 (the annotated sequence for *LmEIF4E4* is missing 139 residues from what we believe is the N-terminus of the protein – they are encoded upstream of the annotated open reading frames and are homologous to the equivalent segment in the *T. brucei* orthologue).

2.2. PCR and cloning methods

All *T. brucei* eIF4E and eIF4G coding sequences were amplified from Lister 427 total genomic DNA and first cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega). All amplified fragments were first sequenced, and the resulting sequences compared with those from the *T. brucei* genome sequencing project, prior to their use in the subcloning reactions. In order to express N-terminal His-tagged fusion proteins the *TbEIF4E1* through 4 full length sequences were subcloned into the modified pET15b vector as described previously for the *T. brucei* eIF4A homologues [35]. Alternatively, to generate the eYFP and HA-tagged fusions and for the RNAi experiments, the same fragments were cloned respectively into the transfection vectors p2216 [35,36], p2477 [36] or p2T7-177 [37]. To generate the plasmids used in the transcription and translation reactions they were also subcloned into the pGEM3zf+ plasmid (Promega). To express the full length proteins as N-terminal GST tagged fusions, the *TbEIF4G3* and 4 sequences were subcloned into the pGEX4T3 plasmid (GE Healthcare). His-tagged *TbEIF4G3* and 4 were also expressed, with a C-terminal tag, as fragments consisting of the proteins' N-terminus plus the central MIF4G/HEAT domain (*TbEIF4G3*_{31–228} and *TbEIF4G4*_{1–319} – numbers indicating the residues from the wild type protein remaining in the recombinant product) using the pET21a vector (Novagen). Supplementary Table I lists all oligonucleotides used in the amplifications reactions as well as the strategies and restrictions enzymes used in the subsequent subcloning events cited above. For the double *TbEIF4E1/2* construct, for the RNAi experiments, the *TbEIF4E2* gene was reamplified flanked by sites for *Bgl* II and *Bam* HI and cloned into the dephosphorylated *Bam* HI site of the p2T7-177-*TbEIF4E1* construct. For the double *TbEIF4E1/4* construct, first the p2T7-177-*TbEIF4E1* was digested with *Bam* HI, which cuts internally to the *TbEIFE1* gene and at its 3' end at the site introduced after the original PCR reaction, releasing a ~360 bp fragment consisting of the second half of the target gene. This fragment was then cloned into the linearized *Bam* HI site of the p2T7-177-*TbEIF4E4* construct in a similar procedure as described for *TbEIF4E1/2*. Recombinant protein expression was performed according to standard procedures using the pET15, pET21 or pGEX4T3 derived constructs after transformation into *Escherichia coli*.

2.3. Cap binding assay

The four [³⁵S]-methionine labeled *TbEIF4Es* were synthesized after *in vitro* transcription of their respective genes cloned in the pGEM3zf+ vector, following linearization with *Xba* I (*TbEIF4E1* and 3) or *Bam* HI (*TbEIF4E2* and 4), with T7 RNA polymerase followed by translation with the nuclease treated Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega). For the *LmEIF4E4* homologue, its gene was amplified from *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin) genomic DNA flanked by sites for *Afl* III and *Not* I (5' primer – CT GAC ATG TCT ACC CCT CTC GAT GTG; 3' primer – TA TGC GGC CGC GTA GCG ACG ACG GTT CTT TTT C) and cloned into the *Nco* I/*Not* I sites of pET21D (Novagen). The resulting plasmid was sequenced and linearized with *Not* I prior to transcription and translation, as described above. Assays were performed essentially as described previously [33],

with non-specific binding removed by washes with 0.1 mM GTP and specific elution achieved with 50 μ M cap analogue. As positive control, the labeled *Xenopus laevis* eIF4E cDNA was used.

2.4. Parasite growth, transfection and RNA interference

Cultivation of procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*, Lister 427, as well as the procyclic cell line used for the ectopic expression and RNAi experiments, Lister 427 29-13 [38], were performed as previously described [35]. Cultures grown to mid-log phase (10^6 – 10^7 cells/ml for procyclic and 10^5 – 10^6 for bloodstream forms) were harvested for the production of total protein extract. For the RNAi of the bloodstream forms, Lister 427 90-13 was used [38], grown in the presence of 5 μ g/ml of G418 and hygromycin. Transfection procedures were performed using standard conditions with selection of stable DNA integration being carried out using phleomycin (2.5 μ g/ml for procyclic and 0.5 μ g/ml for bloodstream cells). For the RNAi experiments, and induction of eYFP and HA-tagged fusion proteins, 1 μ g/ml of tetracycline was added to mid-log phase cultures of transfected cells.

For metabolic labeling, methionine-free SDM-79 medium was used. Cultures were washed once in the same medium prior to being resuspended to a concentration of 1×10^7 cells/ml in the medium supplemented with 50 μ Ci/ml [35 S]-methionine and incubated at 28°C. Aliquots were then taken to measure the trichloroacetic acid precipitable incorporation into protein and for analysis through SDS-PAGE and autoradiography.

2.5. RNA and protein analysis

RNA extraction and Northern blots were performed using standard methods [35,39,40]. DNA fragments containing complete open reading frames were used as probes for *TbEIF4E1* through 4. Polyclonal serum against *TbEIF4E1* through 4 and *TbEIF4G3* and 4 were produced in rabbits using the corresponding recombinant His-tagged proteins. The different sets of antibodies were affinity purified and used in Western blotting assays with the respective recombinant proteins and different samples of total protein extract from both procyclic and bloodstream forms of *T. brucei*. The Western-blots were generally developed by ECL.

2.6. Fluorescence microscopy

For the indirect immunofluorescence assay, wild type procyclic cells grown to mid-log phase were harvested and washed with SDM-79 minus serum. The cells were fixed at a density of 5×10^6 /ml with 3% paraformaldehyde, washed once in PBS and adhered to poly-L-lysine coated slides. Permeabilization was carried out with 0.1% Triton X-100 followed by blocking with 1% BSA. Antibody detection of the eIF4E homologues followed standard procedures using the various rabbit anti-sera and goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Invitrogen – Molecular Probes, USA). For the eYFP fusions, after induction with tetracycline, over-expressing transfected cells were directly observed in 35 mm culture plates. All the samples were visualized using a Leica SP1-AOBS confocal microscope.

2.7. Pull-down assays

Pull-down assays were essentially performed as described previously [33] using Glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare). Beads alone, GST or GST-tagged *TbEIF4G3* and 4 were immobilized on the beads and assayed for their ability to bind to [35 S]-labeled *TbEIF4E1* through 4, obtained after transcription and translation of the full-length genes cloned in the pGEM3zf+ plasmid.

2.8. Immunoprecipitation assays

Immunoprecipitations (IPs) were carried out with *T. brucei* cytoplasmic extracts produced from exponentially grown procyclic cells lysed in lysis buffer (20 mM Hepes–KOH, pH7.4, 75 mM potassium acetate, 4 mM magnesium acetate, 2 mM DTT), through freeze-thawing, at a concentration of 2×10^8 cells/ml. IPs were carried out at 4°C using standard procedures. For the assays with the anti-*TbEIF4E3* and 4 sera, protein-A Sepharose beads (GE Healthcare) were used with the affinity purified antibodies, or the corresponding total pre-immune sera as controls and cytoplasmic extracts from wild type cells. For the IPs of the HA-tagged proteins, cytoplasmic extracts from transfected cells expressing each recombinant protein were directly incubated with the Monoclonal Anti-HA Agarose Conjugate (Sigma). In both instances, proteins were eluted in SDS-PAGE samples buffer and assayed in Western blots with affinity purified antibodies directed against the different *T. brucei* eIF4E, eIF4G or eIF4A homologues, as described in the text. For the Western blots of the IPs using the anti-*TbEIF4E3* and 4 sera, proteins transferred to the PVDF membranes were stained with Rouge Ponceau and the band corresponding to the heavy weight chain of IgG from the immunoprecipitated complexes was cut out prior to blocking and incubation with the primary and secondary antibodies.

3. Results

3.1. The *Trypanosoma* eIF4E homologues fall in two distinct sequence groups

Based on the alignment shown in Fig. 1, which compares the *T. brucei* and *L. major* eIF4E sequences with representative homologues from different eukaryotic lineages, including metazoans, plants, fungi and unrelated protozoans, the four trypanosomatid sequences can be broadly classified into two different groups. Group 1 comprises the EIF4E1 and 2 sequences, which are more similar in size to the human and yeast sequences, whilst group 2 includes EIF4E3 and 4, which share a few common features absent from the remaining proteins. These include a long N-terminus of more than 150 amino acids which share extensive homology between different orthologues of say, the EIF4E3 sequences, and also contain short segments of limited homology which seem to be conserved between the EIF4E3 and 4 sequences. Of the eight conserved tryptophan residues typical of eIF4E sequences, most are either conserved in the various trypanosomatid homologues or are replaced by other aromatic residues. The only exception is W112 (human eIF4E numbering), present in the EIF4E1 and 2 sequences but which is replaced by non-aromatic hydrophilic residues in EIF4E3 and 4. Additional noteworthy substitutions in the trypanosomatid sequences are D104, next to the near universally conserved W102E103, involved in cap binding [20] and conserved in all sequences shown but which is replaced by a histidine in EIF4E2 and 3; and V69E70, implicated in binding to eIF4G [41] but which is missing in the EIF4E4 homologues.

3.2. *TbEIF4E1*, 2 and 4, but not *TbEIF4E3*, can efficiently bind the m⁷G cap

To start the study of the *TbEIF4E* proteins, their genes were first cloned and the respective [35 S]-labeled proteins, synthesized *in vitro*, assayed as to their ability to bind to the commercially available m⁷G cap bound to Sepharose beads. Despite the significant differences between the more complex cap4 from trypanosomatids and the m⁷G cap from their metazoan hosts, this assay is useful to compare the substrate binding properties of the various

<i>TbEIF4E3</i>	1	MNPEAE EFVEKGNRTP	105 Aas	- P rich	PLSLSATPYT	STNPKISSKF	PATPEAQRGP	69 Aas
<i>LmEIF4E3</i>	1	MNPSAA AYIPQOSDAK	21 Aas		KLSAPAEFPV	EGPKQMSAT	STHVPKATT	54 Aas
<i>TbEIF4E4</i>	1	MQN.LRADAV EYTESWQKRS	92 Aas	- P rich	HMSPNAVSYV	E..RGAAAGS	LMPLPTSTAD	87 Aas
<i>LmEIF4E4</i>	1	MSTPLDVRRA EYSFSAVTM	118 Aas	- P rich	HMNPNATEFM	EERRNGPDGG	LEALPTSTAD	75 Aas
↓ ↓ * * ↓ ↓ * *								
<i>HseIF4E-1</i>	1	MATVEPETTP	25 Aas		KHFLQNRAT	WFFK.	5 Aas	
<i>SceIF4E</i>	1	MSVEEVSKKF	25 Aas		KHFLNTRKTL	WYTKP	6 Aas	
<i>AteIF4E</i>	1	MAVEDTPKSV	48 Aas		SHPLEHSTTF	WEDNP	7 Aas	
<i>PfeIF4E</i>	1	MKYLTFNKN	19 Aas		PLLLQYNWVI	WEQVS	8 Aas	
<i>GleIF4E</i>	1	ME.....			DIILDDDEWTL	FEESNQ	10 Aas	
<i>TbEIF4E1</i>	1	MAESSAKEM	27 Aas		RHILNRPWTL	WYDSV	6 Aas	
<i>LmEIF4E1</i>	1	MSAPSSVPPH	4 Aas		LHKLQRAWTL	WYDSP	6 Aas	
<i>TbEIF4E2</i>	1	MQTLRLRPFG	11 Aas		CTQLNGVWEM	WCVLP	30 Aas	
<i>LmEIF4E2</i>	1	MDPNTCAPAS	7 Aas		LTLLNGTDEM	WCMP	11 Aas	
<i>TbEIF4E3</i>	221	MLPSLFQVEV	8 Aas		PVRFNVTWAT	YADEH	8 Aas	
<i>LmEIF4E3</i>	122	KLPLKFGCHN	8 Aas		AIRTHASWDL	YADHD	16 Aas	
<i>TbEIF4E4</i>	227	KPSPFTLTPD	2 Aas		DMRFGDPWCL	FYLPV	9 Aas	
<i>LmEIF4E4</i>	244	QPSPLALAPS	8 Aas		EMMLDDLWCL	FYLPV	9 Aas	
↓ ↓ * * ↓ ↓ * *								
<i>HseIF4E-1</i>	85	MPGC.....			DYSLFKDCIE	PAWDEKNNR	GGR..WLITLN	
<i>SceIF4E</i>	87	DPLKS.....			DYHVFRRNDVR	PEWEDANAK	GGR..WSFQLR	
<i>AteIF4E</i>	111	MAHGA.....			DFYCFKHITIE	PKWEDPICAN	GGR..WTMTFP	
<i>PfeIF4E</i>	83	MLAQRSMTRF	SEDGIFRIVD		ALMIFRRDNQI	PMWEDPANGS	GGR..FEYKIL	
<i>GleIF4E</i>	58	IDCNQ.....			GWHFPRKGR	PAWEDPAHV	CIRIKIMIAS	
<i>TbEIF4E1</i>	89	IRVSA.....			QWHFPRGVR	PMWEDPNNKA	GGR..WVMSLD	20 Aas
<i>LmEIF4E1</i>	66	IRTS.....			QWHFPRGVR	PMWEDPNNKA	GGR..WVMSLD	20 Aas
<i>TbEIF4E2</i>	97	PPPG.....			NYLFRFRNTA	PMWHEANRR	GGR..WVMSLD	17 Aas
<i>LmEIF4E2</i>	74	PPPG.....			NYLFRFRNTA	PMWHEANRR	GGR..WVMSLD	5 Aas
<i>TbEIF4E3</i>	290	LPFA.....			TYHWFRRDIR	PMWHEANRR	GGR..WVMSLD	3 Aas
<i>LmEIF4E3</i>	199	LPFA.....			TYHWFRRDIR	PMWHEANRR	GGR..WVMSLD	3 Aas
<i>TbEIF4E4</i>	314	LPFA.....			TYHWFRRDIR	PMWHEANRR	GGR..WVMSLD	
<i>LmEIF4E4</i>	314	LPFA.....			TYHWFRRDIR	PMWHEANRR	GGR..WVMSLD	
↓ ↓ * ↓ ↓ *								
<i>HseIF4E-1</i>	138	I..GGSFDDYS	DDV		CGAVNVRAK	GD.....	KIAIW	TTECENREAV THIGRVYKER LGLPPK...
<i>SceIF4E</i>	138	I..GFTIDEDD	SQI		NCVLSIRKG	GN.....	KEALW	TK..SEDKEPL LRIGGKFKOV LKLTD...
<i>AteIF4E</i>	160	I..GQFDHG	DEI		CGAVNVIRGK	QE.....	RISIW	TKNASNEAAQ VSIQKQWKEF LDYN.....
<i>PfeIF4E</i>	152	I..GCSLKHID	LI		TCIRLVDKLS	TTRYG	YIRIETW	YTTITDESVK NYLRKDLKEH MCNRIDGS...
<i>GleIF4E</i>	107	FRGL..LDECP	KV		TCIEFRRGKV	VAN.....	EFIAIW	MRDKTDEDQK NLLAILKREF NLQD...
<i>TbEIF4E1</i>	164	V..GGLYLDYG	VEGEHI		MGVVLTKRKY	CN.....	RIALW	LKDAASDSAV AAIEKQLVKE AGLLPAT...
<i>LmEIF4E1</i>	141	V..GGLYLDYG	VEGEHI		MGVVLTKRKY	CN.....	RIALW	LKDAASDSAV AAIEKQLVKE AGLLPAT...
<i>TbEIF4E2</i>	168	I..GGLPQDE	TEI		CGAVVRAER	HN.....	RDWKLSEW	TRTAADRCTQ ERIGFFVKDL LHLE...
<i>LmEIF4E2</i>	132	I..GGLPQDE	TEI		CGAVVRAER	HN.....	RDWKLSEW	TRTAADRCTQ ERIGFFVKDL LHLE...
<i>TbEIF4E3</i>	348	S..GSLAEST	TNL		NCVMLKVRON	KPT.....	TLQIW	TASSDELKLR SLARSLRLL EKVIQPK...
<i>LmEIF4E3</i>	257	V..GGSFHECS	TTL		NCIMLKVRON	KPV.....	TLQIW	TAHSEVGLK AFANSVRDRL TKIMGAK...
<i>TbEIF4E4</i>	339	V..GGSWSRSV	R.....NSV		NCIALKVR..A	AAF.....	MLEWV	VTEQT....S ELMSDISELL HKFLGDA...
<i>LmEIF4E4</i>	362	I..GGSWSPSV	R.....ETV		NCVVLKVR..E	RAY.....	WLEIW	VTKNS....S ALQKDLAELW HPILGAS...
↓ ↓ ↓ ↓								
<i>HseIF4E-1</i>	192	IVIGYQ	SHADTATKSG	9 Aas	217			
<i>SceIF4E</i>	191	GHLEFF	PHSS...ANG	9 Aas	213			
<i>AteIF4E</i>	211	NSIGFI	IED.AKKLD	9 Aas	235			
<i>PfeIF4E</i>	212	TIFPPRVKSL	SHIHR		227			
<i>GleIF4E</i>	160	TSM	FHIQ		168			
<i>TbEIF4E1</i>	221	KPIFT	AGGASKA		233			
<i>LmEIF4E1</i>	203	SMVFT	KHGEAS		214			
<i>TbEIF4E2</i>	222	DGSLQYF	SHRELMOASE	12 Aas	251			
<i>LmEIF4E2</i>	204	SGIPSAMTYV	AHRDLMEAKQ	28 Aas	281			
<i>TbEIF4E3</i>	404	PLQKLEYF	SHORTQV...	23 Aas	442			
<i>LmEIF4E3</i>	313	TLQKLEYF	SHQKQA...	21 Aas	349			
<i>TbEIF4E4</i>	391	FOVPIYI	PHSVAQERAA	20 Aas	427			
<i>LmEIF4E4</i>	414	FATTYLL	THAMMOERS.	18 Aas	447			

Fig. 1. Sequence analysis of the four *T. brucei* eIF4E sequences. Clustal W alignment of the *T. brucei* and *L. major* eIF4E homologues with sequences from representative eukaryotic lineages. Amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, whilst amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, on more than 60% of the sequences, are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dots) to allow better alignment. The first two boxes highlight regions which share conserved elements in the N-terminus of the EIF4E3 and 4 homologues from *Leishmania* and *Trypanosoma* species, with phosphorylated residues identified in *TbEIF4E3* [49] indicated by the symbol S. The third box highlight the unique insertion observed in *LmEIF4E2*. * indicates the conserved tryptophan residues. Large arrows indicate non-tryptophan residues required for the interaction with the cap structure (based on [20]). Thin arrows indicate conserved non-tryptophan residues shown to be involved in eIF4G binding [41]. The symbol # marks the conserved D residue which is replaced by H solely in the trypanosomatid EIF4E2 and EIF4E3 sequences. GenBank accessions for the non-trypanosomatid sequences: *Hs* (human) eIF4E-1 – NP.001959; *Sc* (*Saccharomyces cerevisiae*) eIF4E – NP.014502; *At* (*Arabidopsis thaliana*) eIF4E – NP.193538; *Pf* (*Plasmodium falciparum*) eIF4E1 – XP.001351220; *Gl* (*Giardia lamblia*) eIF4E2 – XP.001710318.

homologues. *TbEIF4E1*, 2 and 4 were all found to be able to bind to the beads, and were specifically eluted with the soluble cap analogue, whilst *TbEIF4E3* did not show any binding (Fig. 2). A similar approach has been previously carried out for the first three *L. major*

eIF4E homologues [33], where neither *LmEIF4E2* nor *LmEIF4E3* bound to the cap-beads, whilst *LmEIF4E1* bound efficiently. Here, *L. major* *LmEIF4E4* was also assayed and bound efficiently to the resin, as its *T. brucei* orthologue. The sole difference between

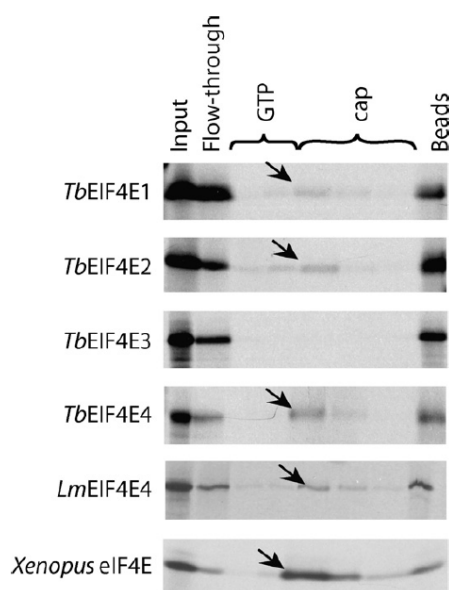


Fig. 2. Cap binding assays. Autoradiography of the cap binding chromatography performed with the four ^{35}S -labeled *T. brucei* eIF4E homologues, the *Leishmania* LmEIF4E4 and the *Xenopus leavis* eIF4E homologue as positive control. Aliquots of the various washes were run on SDS-PAGE and compared with samples from the original translation reaction (Input) as well as the non-bound fraction (Flow-through) and any protein remaining bound to the beads (Beads). The arrows indicate the proteins eluted by the cap analogue. The assay shows the affinity of TbEIF4E1, 2 and 4, as well as LmEIF4E4, for the 7-methyl-GTP Sepharose resin.

the two organisms then lies with the EIF4E2 orthologues whose sequences diverge by the presence of a unique insertion in the *Leishmania* protein, found near its C-terminus, which is absent from its *Trypanosoma* counterpart (Fig. 1).

3.3. All four eIF4E homologues are expressed in both procyclic and bloodstream forms

The four *T. brucei* eIF4Es were expressed as His-tagged recombinant proteins in *E. coli* and used to raise specific polyclonal antisera in rabbits (Supplementary Figure 1). Cloned DNAs and sera were then used in Northern and Western blots to assay for expression of each gene in exponentially growing procyclic and bloodstream cells. All four mRNAs were expressed with little variation in levels between the two stages (Supplementary Figure 2) and the same applied for the corresponding proteins (Fig. 3). The Western blot results were then quantitated and used to produce an estimate of the copy number of each protein (summarized in Table 1). TbEIF4E3 is by far the most abundant protein, especially in procyclic cells ($>5 \times 10^4$ molecules per cell), followed by TbEIF4E4, which also is

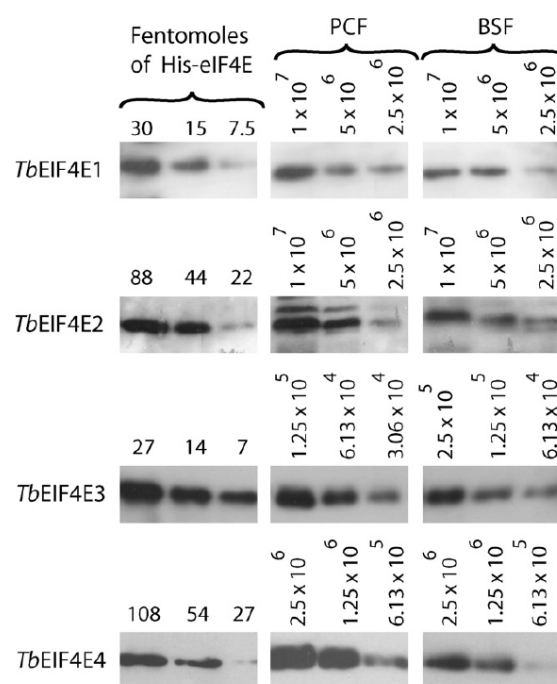


Fig. 3. Expression analysis of TbEIF4E1 through 4 in procyclic and bloodstream cells. Quantitation and expression analysis of TbEIF4E1, 3 and 4 proteins in procyclic/bloodstream forms. Recombinant His tagged TbEIF4E1, 2, 3 and 4 were quantitated, diluted to defined concentrations (in fentomoles) and run on SDS-PAGE gels with whole parasite extract obtained from known number of cells from both procyclic and bloodstream forms.

present at levels above 1×10^4 molecules per cell. In contrast, both TbEIF4E1 and 2 are present at much lower levels (compatible with the Northern results for TbEIF4E2 where its mRNA required a longer exposure than the remaining homologues in order to be detected). For most proteins the levels observed are slightly reduced in bloodstream forms, when compared with procyclics, which is consistent with the smaller cell volume. With the exception of EIF4E4, which was not previously quantified, the values observed for the *T. brucei* proteins are equivalent to those obtained for the *L. major* orthologues (Table 1 and Ref. [33]), presumably a reflection of conserved function.

3.4. TbEIF4E1 and 2 are found in both cytoplasm and nuclei, whereas TbEIF4E3 and 4 are confined to the cytoplasm

Immunofluorescence experiments were carried out for TbEIF4E proteins in procyclic cells. TbEIF4E3 and 4 have a very similar localization and both are found throughout the cytoplasm with very little or no localization to the nucleus (Fig. 4A and Supplementary Figure 3). In contrast, TbEIF4E1 and 2 can be clearly detected both in the cytoplasm as well as in the nucleus in the majority of cells. These results were confirmed in over-expression experiments using EIF4E-enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) fusions in transgenic procyclic *T. brucei* cells (Fig. 4B). TbEIF4E3 and 4 again were found confined to the cytoplasm, whilst TbEIF4E1 and 2 were found in the cytoplasm and in the nucleus, in good agreement with previously reported results [42].

Table 1

Estimate of the intracellular levels of the various *T. brucei* and *L. major* eIF4E homologues. ND: not determined.

Homologue	Protein levels (molecules/cell)		
	<i>T. brucei</i> procyclics	<i>T. brucei</i> bloodstream	<i>L. major</i> promastigotes ^a
EIF4E1	$3-8 \times 10^3$	$1.5-5 \times 10^3$	$2-4 \times 10^3$
EIF4E2	$1-5 \times 10^3$	$1-5 \times 10^3$	$\sim 1 \times 10^3$
EIF4E3	$5-10 \times 10^4$	$2-4 \times 10^4$	$4-10 \times 10^4$
EIF4E4	$2-4 \times 10^4$	$1-2 \times 10^4$	ND

^a Based on Ref. [33].

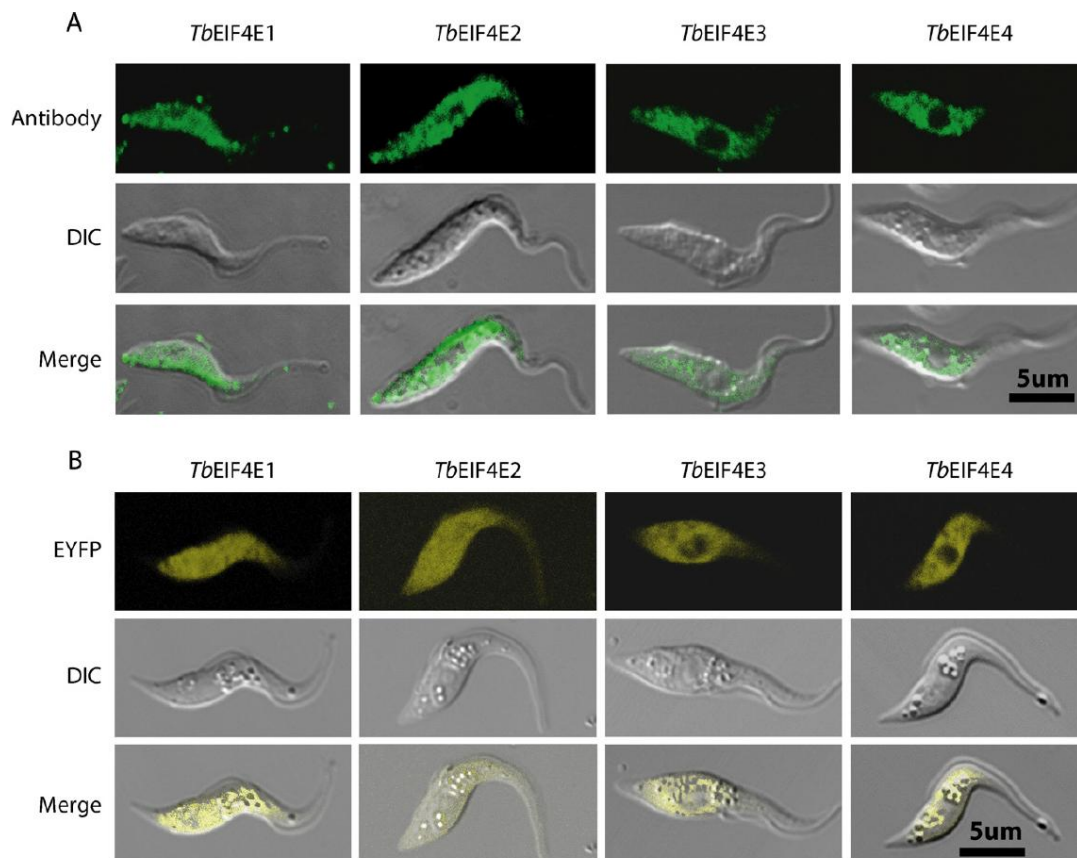


Fig. 4. Subcellular localization of *TbEIF4E1* through 4 in *T. brucei* procyclic forms. (A) Subcellular localization of the four eIF4E homologues in wild type *T. brucei* procyclic cells (WT 427) by indirect immunofluorescence. This was performed using the antibodies directed to the various homologues followed by incubation with the Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibody. (B) The localization of *TbEIF4E1* through 4 was also confirmed through the expression of eYFP fusion proteins in transfected *T. brucei* procyclic cells examined under the confocal microscope.

3.5. RNAi of *TbEIF4E3*, but not the remaining eIF4E homologues, in procyclic forms prevents cell viability whilst RNAi of *TbEIF4E1*, 3 and 4 in bloodstream forms impacts on cell proliferation and survival

The requirement for the various eIF4E homologues for cellular viability was then investigated in *T. brucei* procyclic and bloodstream forms by knockdown of their expression through RNA interference. Representative growth curves of the various knockdowns for procyclic cells are shown in Fig. 5. The phenotype of cells after RNAi ablation of *TbEIF4E1*, 2 and 4 (Fig. 5A, B and D) was similar and no significant impact on cell survival was observed after knockdown of any of the three proteins. For *TbEIF4E1*, a reduction in the rate of cellular growth was observed four days after addition of tetracycline, but the cells remained viable and cell numbers kept increasing. Western blotting, shown below each curve, confirmed major depletions of the respective proteins (over 90% depletion for *TbEIF4E1* and 4; 70–80% depletion for *TbEIF4E2*) within two to three days of RNAi induction, with no effect observed on the levels of the endogenous loading control, the *T. brucei* homologue of eIF4A1, *TbEIF4A1*. Knockdown of *TbEIF4E3* produced a very distinct phenotype, since proliferation stopped two days after RNAi induction, followed by subsequent cell death (Fig. 5C). The Western-blotting confirmed substantial reduction (over 90%)

in levels of *TbEIF4E3* within 48 h of tetracycline addition whilst the control, *TbEIF4A1*, remained unaffected. For both *TbEIF4E3* and 4 knockdowns, Western-blotting were also carried out to see if depletion of *TbEIF4E3* had any impact on *TbEIF4E4* and vice-versa. Whilst no effect was observed on the levels of *TbEIF4E4* after depletion of *TbEIF4E3*, knockdown of *TbEIF4E4* seemed to provoke a slight increase on the levels of *TbEIF4E3* (Fig. 5C and D). Two double RNAi experiments were also performed to test for redundancy: *TbEIF4E1* and 2, as these two are resident in the nucleus, and *TbEIF4E1* and 4, as their *L. major* orthologues are both reported to interact with an eIF4G homologue [43]. When the simultaneous knockdown of *TbEIF4E1* and 2 was performed, cells ceased proliferation and died (Fig. 5E), with cellular proliferation stopping within four days of tetracycline induction. A distinct phenotype was observed by the simultaneous knockdown of *TbEIF4E1* and 4 (Fig. 5F). Although cellular proliferation stopped after RNAi induction, at about the same timeframe as the *TbEIF4E1/2* RNAi, cell death did not occur for more than 15 days onwards (data after day 7 not shown).

The RNAi procedure was then repeated with transfected bloodstream cells. Knockdown of *TbEIF4E3* led to a cessation of proliferation around 24 h after induction followed by cell death (Fig. 6C). Knockdown of *TbEIF4E1* or 4 also caused the cells to stop growing between 24 and 48 h after induction (Fig. 6A and D). Cell death ensued for the *TbEIF4E4* RNAi cells, whilst the cells

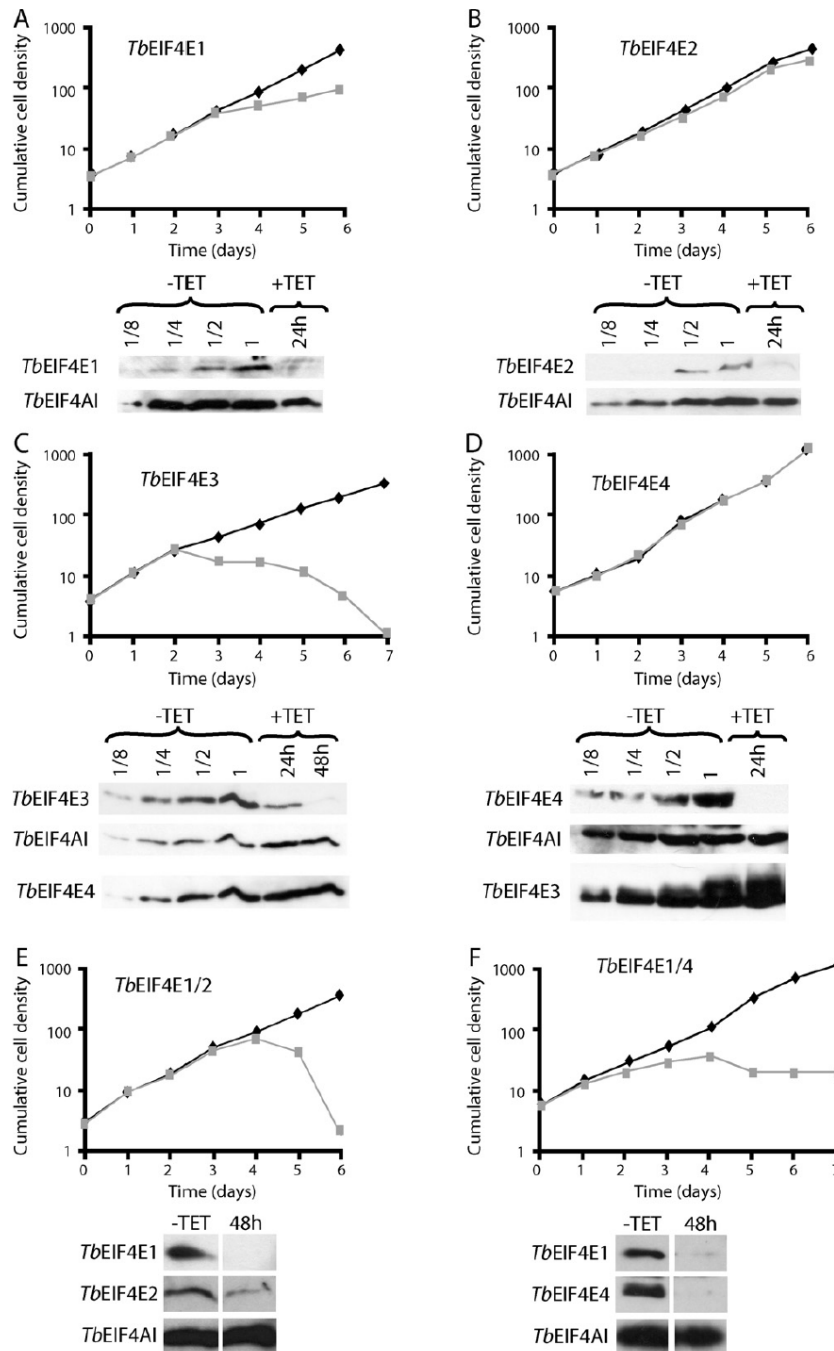


Fig. 5. RNA interference of *TbEIF4E1* through 4 in procyclic cells. Procyclic *T. brucei* cells were transfected with the p2T7-177 derived plasmid containing the individual eIF4E genes (*TbEIF4E1* (A), *TbEIF4E2* (B), *TbEIF4E3* (C), *TbEIF4E4* (D)) or the double constructs *TbEIF4E1/2* (E) and *TbEIF4E1/4* (F). Transfected cells were selected after growth in the presence of phleomycin and RNA interference induced after tetracycline addition. At regular intervals, cellular growth was monitored by counting the number of viable cells of cultures with and without tetracycline and the resulting values used to plot the curves shown (plus tetracycline – gray; minus tetracycline – black). The values shown are indicative of the cumulative cell density in 10^5 cells/ml. Below each graph are Western-blot analysis of the proteins being targeted, using the affinity-purified antisera specific for each protein. These were performed with a single sample derived from the curves minus tetracycline (–TET) as well as selected samples from the curves produced after the RNAi induction (in hours after tetracycline addition). For the single protein knock-downs, note the various dilutions of the –TET sample (1 to 1/8 cell dilution – 1 equals to the amount of cells used in the +TET lane) which allows for a better estimate of the RNAi efficiency. In general the same blot was reprobed with affinity purified antibodies against the endogenous control *TbEIF4AI*. The blot from the *TbEIF4E3* RNAi was further incubated with the anti-*TbEIF4E4* antibodies and likewise the blot from the *TbEIF4E4* experiment was assayed with the anti-*TbEIF4E3* antibodies. All RNAi results shown are representative of at least three different experiments performed with at least two distinct transfection events. In F only the first 7 days of the curve are shown but +TET RNAi curves, from different transfection events, were kept for 15 days or more without any increase in cell numbers.

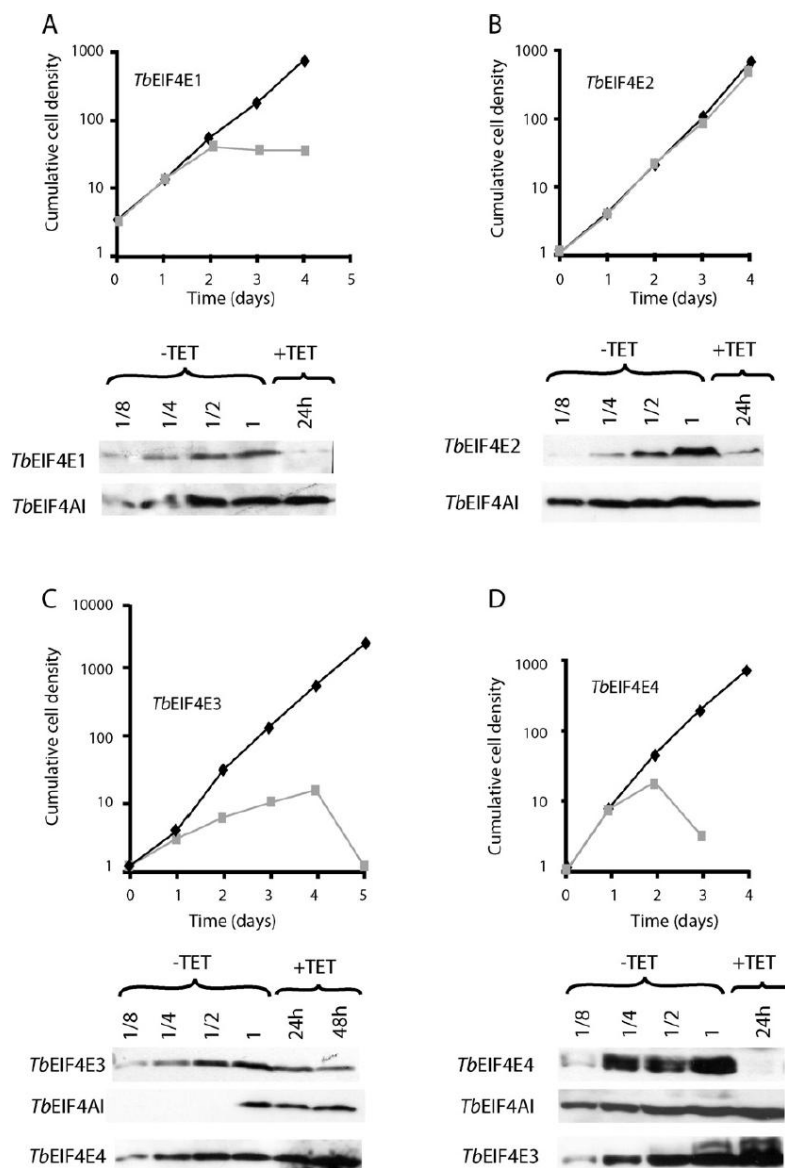


Fig. 6. RNA interference of *TbEIF4E1-4* in bloodstream cells. Bloodstream *T. brucei* cells were transfected with the p2T7-177 derived plasmids containing the eIF4E genes and monitored for cellular growth in the presence (gray curve) or absence (black curve) of tetracycline (*TbEIF4E1* (A), *TbEIF4E2* (B), *TbEIF4E3* (C), *TbEIF4E4* (D)). For all four RNAi procedures, expression of the targeted genes as well as the endogenous *TbEIF4AI* control was assayed in a sample from the control curve (–TET, diluted from 1 to 1/8 – 1 equals to the amount of cells used in the +TET lane) as well as in selected samples from the curve supplemented with tetracycline (+TET). The *TbEIF4E3* and 4 RNAi blots were further assayed with the anti-*TbEIF4E4* and anti-*TbEIF4E3* antibodies, respectively. All procedures were done as described in Fig. 5.

depleted of *TbEIF4E1* stopped growing but did not subsequently die, a phenotype which resembles what was observed for the double knockdown of *TbEIF4E1/4* in procyclic cells. As for *TbEIF4E2*, no effect was observed in cellular growth after induction of the RNAi procedure (Fig. 6B), as seen for procyclic cells. Western-blotting of selected samples confirmed the efficient depletion of the four proteins within their corresponding knockdown experiments (over 90% depletion for *TbEIF4E1* and 4; 70 to 80% depletion for *TbEIF4E2* and 3). As observed for procyclic cells, knock-down of *TbEIF4E4* also seemed to provoke a slight increase on the levels of *TbEIF4E3*.

3.6. *TbEIF4E3* and *TbEIF4E1/4* RNAi directly affects protein synthesis

To investigate if the no-growth or cellular death phenotypes observed after the knock-down of *TbEIF4E3* or the double constructs *TbEIF4E1/2* and *TbEIF4E1/4* was due to an inhibition of protein synthesis or to some unrelated process, we performed metabolic labeling with ³⁵S-methionine at selected time points after tetracycline addition for the respective RNAi curves. Incorporation of labeled methionine was monitored and the results obtained were compared with those derived from the control

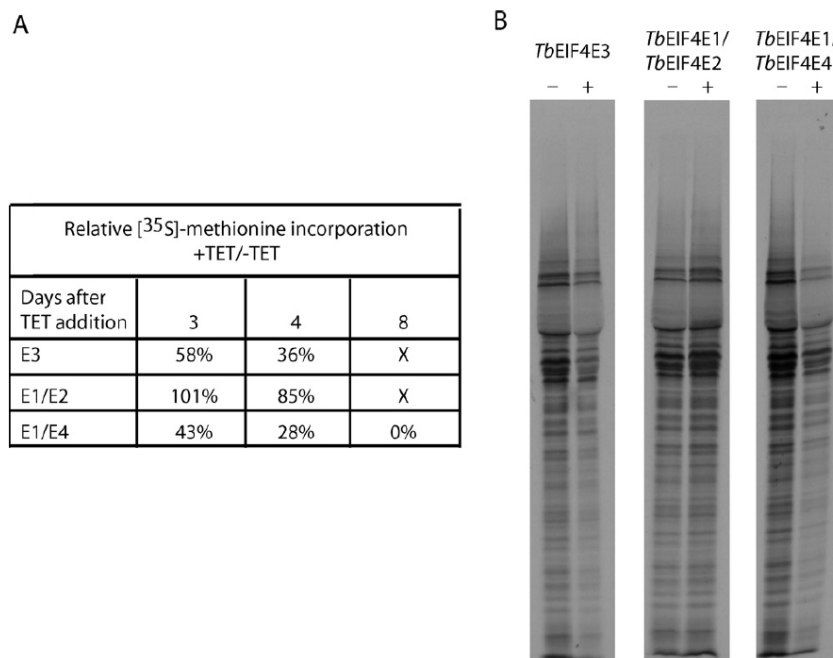


Fig. 7. Metabolic labeling of procyclic cells from select RNAi curves. (A) Total protein synthesis was estimated after RNAi for *TbEIF4E3* (E3) and the double constructs *TbEIF4E1/2* (E1/E2) and *TbEIF4E1/4* (E1/E4). At selected time points (3 and 4 days for the first two samples and 3, 4 and 8 days for *TbEIF4E1/4*), aliquots of the cells were incubated in the presence of ³⁵S methionine followed by TCA precipitation and quantitation of the incorporated radioactivity. To estimate the efficiency of translation in the RNAi treated cells in comparison with the minus tetracycline controls, the normalized incorporation values after two hours of incubation were used to calculate the ratios shown in the figure. (B) For a qualitative analysis of the proteins being synthesized, aliquots of 2×10^6 cells derived from an independent labeling experiment (4 days after tetracycline addition) were run on an SDS-PAGE gel followed by autoradiography.

curves without tetracycline. These values were used to calculate the total rate of protein synthesis between the two curves (plus and minus tetracycline) and estimate the effect on protein synthesis of the knockdown of the various proteins. As shown in Fig. 7A at three days after RNAi induction, no effect on protein synthesis is observed for the *TbEIF4E1/2* knockdown whilst depletion of *TbEIF4E3* and *TbEIF4E1/4* had significantly impaired translation. These results are consistent with both *TbEIF4E3* and *TbEIF4E1/4* knockdowns directly affecting protein synthesis since substantial translation inhibition preceded cell death for a minimum of three days for the *TbEIF4E3* RNAi or for much longer in the case of the *TbEIF4E1/4* knockdown. Nevertheless, in both cases no substantial changes in the profile of proteins synthesized were detected even in conditions of severe protein inhibition (Fig. 7B). In contrast, for the *TbEIF4E1/2* knockdown any inhibition of translation is only observed late in the RNAi curve, very near to the time of cell death. Although this does not rule out a direct role in protein synthesis as well, the inhibition observed could more likely be an indirect consequence of the various metabolic processes associated with cell death induced by the RNAi.

3.7. *TbEIF4E3* interacts with *TbEIF4G3* and 4, while *TbEIF4E4* binds *TbEIF4G3*

Since eIF4E participates in translation within the context of the eIF4F complex, bound to the eIF4G subunit, to investigate more directly the role of the four *T. brucei* eIF4Es in translation we opted to study their interaction with selected trypanosome eIF4G homologues. Of the five eIF4G homologues conserved in trypanosomatid species, only two (EIF4G3 and 4) share conserved features outside the HEAT domain, such as a short N-terminus, containing limited segments of similarity, and regions of homology on the C-terminal

half. Furthermore, the *L. major* EIF4G3 orthologue has been shown to be able to bind to EIF4A1 [33] as well as to orthologues of *TbEIF4E1* and 4 [43], therefore confirming a potential role in translation. Here, to investigate possible interactions between the eIF4G and eIF4E homologues *in vitro*, the genes encoding *TbEIF4G3* and 4 were cloned and expressed as N-terminal fusions with glutathione-S sepharose (GST). The resulting proteins, and GST alone used as negative control, were used in pull-down assays to analyze binding to the four [³⁵S]-labeled *T. brucei* eIF4E homologues. GST-*TbEIF4G3* specifically and efficiently bound to labeled *TbEIF4E4*, whilst GST-*TbEIF4G4* bound to *TbEIF4E3* (Fig. 8A). Minor bindings were also observed for both *TbEIF4E1* and 2 with the two eIF4G homologues and between *TbEIF4E3* and GST-*TbEIF4G3*.

To investigate if the same interactions occurred *in vivo* we used *TbEIF4E3* and 4 antibodies in immunoprecipitation reactions with *T. brucei* cytoplasmic extracts. Immunoprecipitation of *TbEIF4E3* was first carried out, with its presence in the immunoprecipitate as well as its depletion from the non-bound supernatant assessed by Western-blotting with the anti-*TbEIF4E3* antibody (Fig. 8B). The same blot was then re-probed with antibodies raised against *TbEIF4G3* and 4. All *TbEIF4G4*, and to a lesser extent *TbEIF4G3*, co-precipitated with *TbEIF4E3*. Immunoprecipitation of *TbEIF4E4* was performed likewise followed by Western-blotting with its own antibody as well as the one directed against *TbEIF4G3*. All *TbEIF4E4* was brought down by the procedure and some, but not all, *TbEIF4G3* co-precipitated as well (Fig. 8C). To compare the binding of *TbEIF4E1*, 3 and 4 with the same eIF4G homologues *in vivo* under equivalent conditions, we expressed HA-tagged versions of these proteins in *T. brucei* cells followed by immunoprecipitation of the resulting cellular extracts with anti-HA antibody and Western blotting (Fig. 8D and E). In agreement with the pull down data above, *TbEIF4G3* co-precipitated with both HA-tagged *TbEIF4E3*

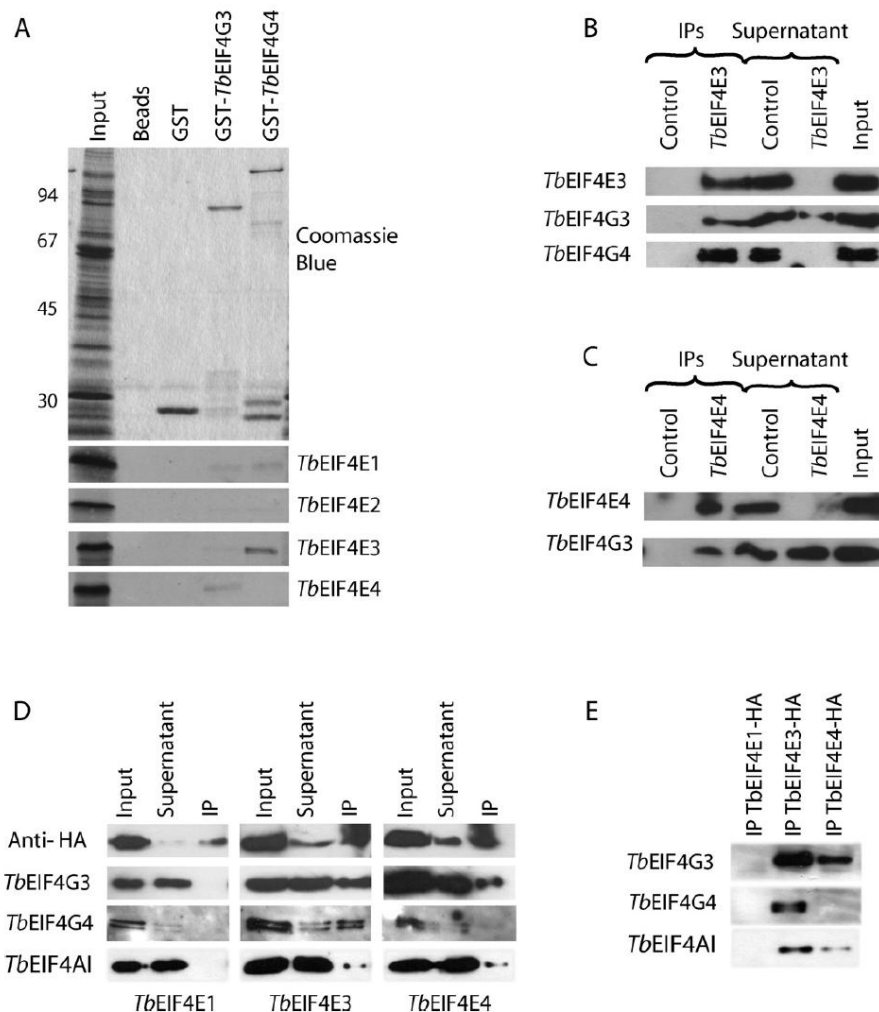


Fig. 8. Analysis of the interactions between *TbEIF4E3/TbEIF4E4* and *TbEIF4G3/TbEIF4G4*. (A) Pull-down assay using GST-tagged *TbEIF4G3* and 4 and ³⁵S-labeled *TbEIF4E1* through *TbEIF4E4*. As controls GST on its own or only the glutathione sepharose beads were tested for their ability to bind the labeled protein. Upper panel: Coomassie Blue stained gel showing total translation extract (Input) as well as recombinant GST or GST-*TbEIF4G3* and 4. Bottom panel: autoradiographies showing strong and specific binding between GST-*TbEIF4G3* and labeled *TbEIF4E4* and between GST-*TbEIF4G4* and labeled *TbEIF4E3*. (B) Immunoprecipitation (IP) assay confirming interactions between *TbEIF4E3* and *TbEIF4G3* and *TbEIF4G4* and between *TbEIF4E3* and *TbEIF4G3* *in vivo*. *T. brucei* cytoplasmic extracts were immunoprecipitated with the anti-*TbEIF4E3* affinity purified antibodies (2 µg) or 5 µl of the pre-immune total serum as control (Control). Precipitated immunocomplexes were then used in Western blot assays with the *TbEIF4E3*, *TbEIF4G3* or *TbEIF4G4* antisera. In the same blots, an aliquot of the non-bound supernatant (Supernatant) was compared with an equivalent aliquot of the cytoplasmic extract used in the IP reaction and blot (Input). Equivalent aliquot means that if 20% of an IP was blotted (the real % values varied according to the protein assayed), then 20% of the same volume of the original cytoplasmic extract used for the IP, or its supernatant, was blotted as well. (C) Assay confirming the interaction between *TbEIF4E4* and *TbEIF4G3* *in vivo*. Immunoprecipitation was carried out as described in B with anti-*TbEIF4E4* antibodies followed by Western-blot with the *TbEIF4E4* and *TbEIF4G3* antisera. (D) IP of HA-tagged eIF4E homologues. Cytoplasmic extracts from transfected *T. brucei* cells expressing HA-tagged *TbEIF4E1*, 3 and 4 (left, middle and right panels, respectively) were incubated with anti-HA beads and the precipitated samples, as well as equivalent aliquots of the non-bound supernatant and the input extract, were assayed for the presence of the HA-tagged beads, *TbEIF4G3* and 4 and *TbEIF4AI*. (E) To highlight the results from the IP lanes shown in D, these were run on another gel and blotted again with the *TbEIF4G3* and 4 and *TbEIF4AI* antisera, confirming the potential for both *TbEIF4E3* and 4 to reconstitute functional eIF4F complexes.

and 4, but no co-precipitation with *TbEIF4E1* was observed. In contrast, *TbEIF4G4* only co-precipitated with *TbEIF4E3*. To confirm that functional eIF4F complexes were being formed, the blots were also incubated with anti-*TbEIF4AI* anti-sera. Both *TbEIF4E3* and 4 were able to bring down the eIF4AI homologue, but no interaction was observed with *TbEIF4E1* (Fig. 8D and E). These binding results then confirmed specific interactions of *TbEIF4E3* with both *TbEIF4G3* and 4 and of *TbEIF4E4* with *TbEIF4G3*, and highlight their potential to reconstitute three functional trypanosomatid eIF4F complexes.

4. Discussion

In cells with multiple eIF4E homologues, it has been proposed that only one acts as a general initiation factor functioning during the translation of the majority of the mRNAs, whilst the remainder perform more specialized functions, related or not, to protein synthesis [27,44]. Most of the evidence for this proposal comes from multicellular organisms whereas the need for distinctions in the translation apparatus between different tissues or during development may be the driving force behind the evolution of various eIF4E

homologues. In unicellular eukaryotes this may not apply although one initial aspect investigated here was the possibility that different eIF4E homologues would be differentially expressed during distinct life stages of the trypanosomatid life cycle, as indeed has been proposed for *Leishmania* EIF4E1 [34]. Overall the data presented rule out large differences in expression for the four eIF4E homologues between the two stages of the *T. brucei* cycle, consistent with the different homologues acting on different aspects of mRNA metabolism or on different mRNA populations, whilst reinforcing differences in abundance previously observed for the *L. major* proteins, with EIF4E3, and also EIF4E4, being present at significantly higher levels than EIF4E1 and 2. The distinct RNAi phenotypes in procyclic and bloodstream cells might suggest differences in the translation machinery, but the differential sensibilities of the two stages to the knockdowns could also be a consequence of their different metabolic rates, with bloodstream cells, which grow much faster, being most sensitive to changes in translation rate.

The localization data suggests that TbEIF4E3 and 4 do not function in the nucleus though TbEIF4E1 and 2 may have nuclear roles. In mammals, at least, nuclear eIF4E localize to speckles which are also the sites where splicing factors are found [45]. This localization pattern differs from what was seen for the endogenous or the over-expressed TbEIF4E1 and 2 which are spread throughout the nucleoplasm. The RNAi data does implicate both TbEIF4E1 and 2 as having important and possibly redundant roles for cellular survival, which could be associated with their nuclear localization, although the possibility remains that the two proteins participate in independent processes which, upon simultaneous inhibition by the double RNAi procedures, result in sufficient overall damage to produce the phenotype observed (the same applies to the TbEIF4E1/4 knockdown discussed below). So far EIF4E2 seems to be the least conserved of the four trypanosomatid eIF4E homologues studied. Although TbEIF4E2 binds to the m⁷G Sepharose in a similar manner to TbEIF4E1 and 4, *Leishmania* LmEIF4E2 does not bind this cap [33], but rather, preferentially binds the methylated cap4 [34]. This difference, plus the existence of insertions in the *Leishmania* EIF4E2 which are missing from its *T. brucei* or *T. cruzi* orthologues, or even the human and yeast sequences, imply a divergence in function unique to the *Leishmania* protein.

In *L. major*, both EIF4E1 and 4 bind the cap4 structure, physically interact with EIF4G3 and all co-migrate with polysomes in sucrose gradients, strongly implicating these proteins in translation [34,43]. *Leishmania* EIF4G3 also binds efficiently to the eIF4A homologue involved in translation [33,35] and *T. brucei* EIF4G3 acts in protein synthesis, since its depletion rapidly blocks translation (D. Moura, unpublished data). Both TbEIF4E1 and 4 are required for growth of the bloodstream cells although the lack of a phenotype after knockdown in procyclics does not rule out a minor requirement for them in levels below the threshold produced after RNAi (considering the efficiency of the RNAi procedure, any requirements are nevertheless well below their original intracellular levels). Here we have confirmed, by both *in vitro* and *in vivo* approaches, the interaction between the EIF4G3 and EIF4E4 in *T. brucei* which clearly implicates the latter in protein synthesis. However, contrary to a previously reported interaction [43], neither *in vitro* (with *L. major* and *T. brucei*) nor *in vivo* (*T. brucei*) assays detected any interaction between EIF4G3 and EIF4E1 (this work and unpublished data). This discrepancy remains unresolved but it is nevertheless possible that in Fig. 8D minor amounts of TbEIF4G3 co-precipitated with HA-tagged TbEIF4E1 but was not detected through the Western-blotting procedure.

The similarities observed between TbEIF4E3 and 4 at the sequence level, their similar subcellular localization, abundance and their ability to bind to eIF4G partners are consistent with both performing related roles as part of distinct eIF4F complexes. So far, the existence of multiple eIF4F complexes, with distinct eIF4E

and eIF4G subunits and within the same organism, has only been reported from plants where they were named eIF4F and eIF(iso)4F [46]. These two complexes can co-exist and differ in their ability to translate different classes of mRNAs [47,48], raising the possibility that something similar may be happening with the trypanosomatid proteins. A potential role for phosphorylation in regulating their activity is also possible since TbEIF4E3 has been identified as a phosphoprotein [49] and TbEIF4E4 migrates in gels with a pattern indicative of post-translational modifications. Indeed the phosphorylated residues in TbEIF4E3 are located next to one of the two blocs of conserved residues unique to the N-terminus of both EIF4E3 and 4 sequences (see Fig. 1).

EIF4E3, the most abundant *Trypanosoma* and *Leishmania* eIF4E, is the only confirmed essential homologue in procyclic and bloodstream *T. brucei*. Nevertheless, when compared with EIF4E4 in *L. major*, it binds much less efficiently to the trypanosomatid cap4 [34]. Moreover, *L. major* EIF4E3 does not seem to associate with polysomes [34], although this does not necessarily exclude a role in translation since the majority of mammalian eIF4E is not bound to ribosomes either [50]. To date, eIF4F-like complexes participate only in translation, so it seems plausible to suggest then that both EIF4E3 and 4 participate in protein synthesis; however their distinct cap binding affinities may indicate distinct modes of mRNA recognition leading to binding to different target mRNAs. It is possible that EIF4E3 may only bind to mRNAs in the context of an eIF4F complex or when associated with some other RNA binding protein. In metazoans the eIF4E-2 homologue (4EHP), involved in the selective translation repression of target messages, is recruited to selected mRNAs by binding proteins associated with their 3' UTRs [28,29,51]. This protein binds very weakly to the cap [52], so it cannot compete with eIF4E-1 in the absence of its co-factors. It is plausible to suggest then that, despite its abundance, for the parasite EIF4E3 to bind to the message RNAs it needs some other protein partner which can mediate selectivity in mRNA binding with a direct consequence on translation.

Acknowledgements

This work was partially funded with grants provided from the Brazilian funding agencies FACEPE (006/2003-CNPq/PPP) and CNPq (475471/2008-3 and 476255/2004-0). ERF, RD, DMNM, TDCL, RPL and CRSR received studentships from CAPES and FACEPE. Work in MC's lab is funded by the Wellcome Trust. Work in NS's lab is funded by the Wellcome Trust and the BBSRC. Technical assistance to grow the *Leishmania* and *Trypanosoma* cells was provided by B.S. Lima. We would like to thank C. Docena and the PDTIS-FIOCRUZ Program for Technological Development in Tools for Health for access and help with the confocal microscopy and sequencing.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molbiopara.2010.11.011.

References

- [1] Johnson PJ, Kooter JM, Borst P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* 1987;51:273–81.
- [2] Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, et al. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 2003;11:1291–9.
- [3] Liang XH, Haritan A, Uliel S, et al. *trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2003;2:830–40.
- [4] Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, et al. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 1992;267:9805–15.
- [5] Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 2002;21:1881–8.

- [6] Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 2007;156:93–101.
- [7] Haile S, Papadopolou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:569–77.
- [8] Marintchev A, Wagner G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* 2004;37:197–284.
- [9] von der Haar T, Gross JD, Wagner G, et al. The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:503–11.
- [10] Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 2007;6:65–9.
- [11] Sonenberg N. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem Cell Biol* 2008;86:178–83.
- [12] Goodfellow IG, Roberts LO. Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:2675–80.
- [13] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999;68:913–63.
- [14] Hershey JWB, Merrick WC. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, editors. *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. p. 33–88.
- [15] Preiss T, Hentze MW. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 2003;25:1201–11.
- [16] Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:113–27.
- [17] Strudwick S, Borden KL. The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 2002;70:10–22.
- [18] Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, et al. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J Cell Biol* 2006;175:415–26.
- [19] Topisirovic I, Siddiqui N, Lapointe VL, et al. Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J* 2009;28:1087–98.
- [20] Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, et al. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 1997;89:951–61.
- [21] Matsuo H, Li H, McGuire AM, et al. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol* 1997;4:717–24.
- [22] Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:268–75.
- [23] Raught B, Gingras AC. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:43–57.
- [24] Schepers GC, Proud CG. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 2002;269:5350–9.
- [25] Lasko P, Sonenberg N. Coordinated transcriptional and translational control in metabolic homeostasis in flies. *Genes Dev* 2007;21:235–7.
- [26] Altmann M, Handschin C, Trachsel H. mRNA cap-binding protein: cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1987;7:998–1003.
- [27] Rhoads RE. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* 2009;284:16711–5.
- [28] Lasko P, Cho P, Poulin F, et al. Contrasting mechanisms of regulating translation of specific *Drosophila* germline mRNAs at the level of 5'-cap structure binding. *Biochem Soc Trans* 2005;33:1544–6.
- [29] Cho PF, Gamberi C, Cho-Park YA, et al. Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. *Curr Biol* 2006;16:2035–41.
- [30] Joshi B, Cameron A, Jagus R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem* 2004;271:2189–203.
- [31] Joshi B, Lee K, Maeder DL, et al. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* 2005;5:48.
- [32] Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, et al. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *RNA* 2004;10:1764–75.
- [33] Dhalia R, Reis CR, Freire ER, et al. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 2005;140:23–41.
- [34] Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, et al. Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 2006;5:1969–79.
- [35] Dhalia R, Marinsek N, Reis CR, et al. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res* 2006;34:2495–507.
- [36] Kelly S, Reed J, Kramer S, et al. Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Mol Biochem Parasitol* 2007;154:103–9.
- [37] Wickstead B, Ersfeld K, Gull K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:211–6.
- [38] Wirtz E, Leal S, Ochatt C, et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1999;99:89–101.
- [39] Carrington M, Roditi I, Williams RO. The structure and transcription of an element interspersed between tandem arrays of mini-exon donor RNA genes in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res* 1987;15:10179–98.
- [40] Webb H, Burns R, Ellis L, et al. Developmentally regulated instability of the GPI-PLC mRNA is dependent on a short-lived protein factor. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1503–12.
- [41] Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, et al. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 1999;3:707–16.
- [42] Kramer S, Queiroz R, Ellis L, et al. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. *J Cell Sci* 2008;121:3002–14.
- [43] Yoffe Y, Leger M, Zinoviev A, et al. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res* 2009;37:3243–53.
- [44] Hernandez G, Vazquez-Pianzola P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* 2005;122:865–76.
- [45] Dostie J, Lejbkiewicz F, Sonenberg N. Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J Cell Biol* 2000;148:239–47.
- [46] Browning KS, Webster C, Roberts JK, et al. Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* 1992;267:10096–100.
- [47] Gallie DR, Browning KS. eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 2001;276:36951–60.
- [48] Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD, et al. Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. *Plant Physiol* 2009;150:1844–54.
- [49] Nett IR, Martin DM, Miranda-Saavedra D, et al. The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1527–38.
- [50] Rau M, Ohlmann T, Morley SJ, et al. A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 1996;271:8983–90.
- [51] Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, et al. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 2005;121:411–23.
- [52] Zuberek J, Kubacka D, Jablonowska A, et al. Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *RNA* 2007;13:691–7.

9.3 Manuscrito em elaboração

Pereira MC, Malvezzi AM, Nascimento LM, **da Costa Lima TD**, Gouveia VA, Freire ER, Reis CRS and de Melo Neto OP. Subunits of two distinct Trypanosomatid EIF4F complexes are subjected to differential phosphorylation during growth in culture

Abstract

The heterotrimeric translation initiation complex eIF4F perform critical functions in the early stages of eukaryotic protein synthesis acting through interactions mediated by its three subunits (eIF4E, the cap binding protein; eIF4G, the scaffolding subunit; and eIF4A, an RNA helicase), other initiation factors and the poly-A binding protein (PABP). In pathogenic trypanosomatids multiple and conserved eIF4E, eIF4G and PABP homologues have been identified and two eIF4F complexes were confirmed (EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI and EIF4E3/EIF4G4/EIF4AI), the first one capable of interacting with the PABP1 homologue. Here we have analyzed the expression pattern of these two complexes during growth of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma brucei*. In both organisms the two sets of eIF4E and eIF4G homologues are constitutively expressed and represented by phosphorylated isoforms, with the eIF4E subunits being differentially phosphorylated during different stages of the *L. amazonensis* culture. Whilst phosphorylated EIF4E3 is typical of stationary cells, phosphorylated EIF4E4 is associated with lag and exponential growth phases, a behavior also observed for PABP1. No clear phosphorylation was observed for EIF4AI or *Leishmania* PABP2 and 3. Upon passaging to new cultures the changes in phosphorylation pattern of EIF4E3 and 4 were seen to be fast (less than two hours) but differentially affected by inhibitors of both mRNA synthesis/processing and translation. In *T. brucei*, phosphorylation of EIF4E3, but not EIF4E4, differed from its *Leishmania* orthologue, with a much more extensive phosphorylation pattern. Through the overexpression of full-length and truncated HA-tagged proteins in *T. brucei*, phosphorylation of EIF4E4, but not EIF4E3, was partially

mapped to its N-terminal region. Our results indicate that phosphorylation is associated with a further layer of complexity in translation initiation in trypanosomatids and may differentially regulate the activity of eIF4F subunits during growth.

Keywords: eIF4E, eIF4G, phosphorylation