

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MEMBROS DA FAMÍLIA
PROTÉICA eIF4E DE *Trypanosoma brucei***

EDEN RIBEIRO FREIRE

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MEMBROS DA FAMÍLIA
PROTÉICA eIF4E DE *Trypanosoma brucei***

EDEN RIBEIRO FREIRE

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Genética
da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de Doutor em
Genética pela UFPE

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**RECIFE
2010**

Freire, Eden Ribeiro

Avaliação funcional de membros da família protéica eIF4E de *Trypanossoma brucei* / Eden Ribeiro Freire – Recife: O Autor, 2010.

183 folhas : il., fig., tab.

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Pós-Graduação em Genética, 2010.**

Inclui bibliografia e anexos.

**1. Proteínas 2. Síntese protéica 3. Genética 4. Doenças
parasitárias I. Título.**

572.645

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 107

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA

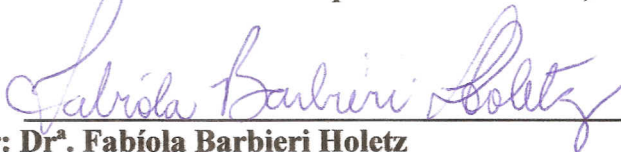
Parecer da comissão examinadora da tese de:
Eden Ribeiro Freire

Intitulada:
Avaliação funcional de membros da família protéica eIF4e de *Trypanosoma brucei*

A comissão examinadora considera o presente trabalho

APROVADO

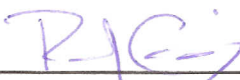
Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Eden Ribeiro Freire faz jus ao grau de Doutor em Genética pela UFPE. Recife, 16/04/2010.


1º Examinador: Dr^a. Fabíola Barbieri Holetz

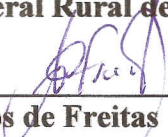
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, PE


2º Examinador: Dr^a. Viviane Alves Gouveia

Universidade Federal do Piauí


3º Examinador: Dr^a. Maria Raquel de Moura Coimbra

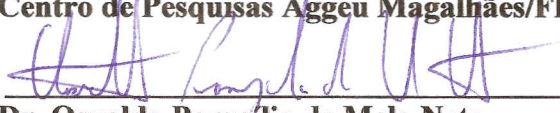
Universidade Federal Rural de Pernambuco


4º Examinador: Dr. Antônio Carlos de Freitas

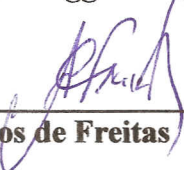
Universidade Federal de Pernambuco


5º Examinador: Dr^a. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, PE.


Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, PE.


Coordenador: Dr. Antônio Carlos de Freitas

***Dedico a minha esposa
e a minha família.***

Agradecimentos

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

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

À Dr^a. Laura Gil e ao Dr. Rafael Dhalia, do Departamento de Virologia e Terapia Experimental; à Dr^a Maria Helena, do Departamento de Entomologia; e à Dr^a Sílvia Montenegro, do Departamento de Imunologia, pelo suporte material e/ou permissão do uso das instalações de seus respectivos departamentos.

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.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

Item	Página
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Introdução	viii
1. Revisão da Literatura	1
1.1. Tripanossomatídeos	1
1.1.1. Origem e evolução dos tripanossomatídeos	1
1.1.2. Biologia celular dos tripanossomatídeos	4
1.1.3. Doenças causadas por tripanossomatídeos	6
1.1.4. Aspectos da biologia molecular dos tripanossomatídeos	16
1.1.4.1. Genoma e organização gênica	16
1.1.4.2. Transcrição nos tripanossomatídeos	18
1.1.4.3. <i>Trans-splicing</i> em tripanossomatídeos	21
1.1.4.4. Controle pós-transcricional da expressão gênica em tripanossomatídeos	28
1.2. Fatores de iniciação de tradução	31
1.2.1. O processo de síntese protéica cap dependente em eucariotos	31
1.2.2. eIF4E – a proteína de ligação ao cap	34
1.2.2.1. Família de proteínas eIF4E	35
1.2.2.2. Estrutura do eIF4E	37
1.2.2.3. Parceiros do eIF4E	38
1.2.2.3.1. eIF4G	39
1.2.2.3.2. 4E-BPs	42
1.2.2.3.3. Maskin	42
1.2.2.3.4. Cup	43
1.2.2.3.5. 4E-T (4E-transportador)	44

1.2.2.4. Controle da atividade do eIF4E		45
1.2.3. Fatores do complexo eIF4F em tripanossomatídeos		48
1.2.3.1. eIF4A em tripanossomatídeos		48
1.2.3.2. eIF4G em tripanossomatídeos		49
1.2.3.3. eIF4E em tripanossomatídeos		51
2. Objetivos		54
3. Materiais e Métodos		55
3.1. Cultivo de parasitas		55
3.2. Expressão das proteínas recombinantes e purificação de anticorpos.		56
3.3. Análise e quantificação da expressão dos <i>TbEIF4E1</i> a 4		58
3.4. Subclonagem dos <i>TbEIF4E1</i> a 4 nos vetores p2T7:177, p2216 e p2477		59
3.5. Transfecção dos parasitos e marcação metabólica		61
3.6. Localização subcelular das proteínas <i>TbEIF4E1</i> a 4.		63
3.7. Imunoprecipitação das proteínas <i>TbEIF4E1</i> a 4.		63
4. Resultados		65
4.1. Quantificação da expressão das proteínas <i>TbEIF4E1</i> a E4 em células procíclicas e sanguíneas de <i>T. brucei</i> .		65
4.2. Subclonagem dos homólogos ao eIF4E de <i>T. brucei</i> nos vetores p2T7:177, p2216 e p2477.		70
4.3. Determinação da localização subcelular das proteínas <i>TbEIF4E1</i> a 4 após sua superexpressão fusionadas à proteína fluorescente (EYFP).		71
4.4. Análise do efeito da depleção dos <i>TbEIF4E1</i> a 4, mediada por interferência de RNA (RNAi), na viabilidade celular do <i>T. brucei</i>		74
4.4.1. RNAi de células procíclicas de <i>T. brucei</i> (PCF)		75
4.4.2. RNAi duplo de <i>TbEIF4E1/E2</i> e <i>TbEIF4E1/E4</i> em células procíclicas de <i>T. brucei</i> .		78
4.4.3. Marcação metabólica com ³⁵ S das células submetidas a RNAi		80
4.4.4. RNAi de células sanguíneas de <i>T. brucei</i> (BSF)		84

4.5. Imunoprecipitação das proteínas <i>TbEIF4E1</i> a 4 para a identificação de complexos protéicos		87
5. Discussão		92
6. Conclusões		98
7. Referências Bibliográficas		99
8. Anexos		122
Anexo 1. Artigo científico		122

Lista de abreviaturas

4E-BP - Proteína ligante ao 4E (*4E binding protein*)
4E-T - Transportador do 4E (*4E transporter*)
ARE - Elementos ricos em AU (*AU-rich element*)
ASO - Oligonucleotídeos antisense (*Antisense oligonucleotides*)
BSA - Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)
BSF - Forma sanguínea (*Bloodstream form*)
CBC - Complexo de ligação ao cap (*cap binding complex*)
CBP - Proteína de ligação ao cap (*cap binding protein*)
CL - Leishmaniose cutânea (*Cutaneous leishmaniasis*)
DCL - Leishmaniose cutânea difusa (*Diffuse cutaneous leishmaniasis*)
DTT - Ditioneitol
DHFR - Dihidrofolato redutase
TS - Timidilato sintetase
DNA – Ácido desoxirribonucleico (*desoxiribonucleic acid*)
eIF - Fator de iniciação eucariótico (*eukaryotic initiation factor*)
EYFP - Proteína fluorescente amarela aumentada (*Enhanced yellow fluorescent protein*)
FAZ - Zona de ligação do flagelo (*flagellum attachment zone*)
HEAT - *Huntington, Elongation 3, A subunit of protein phosphatase 2a, target of rapamycin*)
IPTG - Isopropil β-D-1 tiogalactopiranosídeo
kDa – Kilodáton
m7GTP - 7- metilguanosina trifosfato (*7-methylguanosine Triphosphate*)
MAP - Proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen activated protein kinases*)
MCL - Leishmaniose mucocutânea (*Mucocutaneous leishmaniasis*)
mTOR- Alvo para rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target Of Rapamycin*)
Mnk1 - proteína quinase MAP de integração de sinal (*MAP-kinase signal-integrating kinases*)
OMS - Organização Mundial da Saúde
PABP - Proteína ligante à cauda poli-A (*Poli-A binding protein*)
PARPS - Proteínas procíclicas ácidas repetitivas (*Procyclic acid repetitive proteins*)
PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)
PCF - Forma procíclica de *Trypanosoma brucei* (*procyclic form*)

PGK - Fosfoglicerato kinase (*phosphoglycerate kinase*)

PVDF - fluoreto de polivinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)

RNA - Ácido ribonucléico (*Ribonucleic acid*)

RNAi - Interferência de RNA (*RNA interference*)

RNAP - RNA polimerase

RRM - Motivo de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif*)

rRNA - RNA ribossomal

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*)

SL - Sequência *spliced leader* ou mini-éxon

snRNA - pequeno RNA nuclear (*small nuclear RNA*)

UTR - Região não traduzida (*untranslated egion*)

VL - Leishmaniose visceral (*Visceral leishmaniasis*)

VSG - Glicoproteína variante de superfície (*Variant Surface Glycoprotein*)

WT - tipo de linhagem selvagem (*wild type*)

tRNA – Ácido ribonucléico transportador

tRNAi – tRNA iniciador

AMINOACIDOS											
A	Alanina	Ala	G	Glicina	Gly	M	Metionina	Met	S	Serina	Ser
C	Cisteína	Cys ou Cis	H	Histidina	His	N	Asparagina	Asn	T	Treonina	Thr ou The
D	Ácido aspártico	Asp	I	Isoleucina	Ile	P	Prolina	Pro	V	Valina	Val
E	Ácido glutâmico	Glu	K	Lisina	Lys ou Lis	Q	Glutamina	Gln	W	Triptofano	Trp ou Tri
F	Fenilalanina	Phe ou Fen	L	Leucina	Leu	R	Arginina	Arg	Y	Tirosina	Tyr ou Tir

Lista de Figuras

Figura 1. Micrografia eletrônica de três membros do filo Euglenozoa	2
Figura 2. Representação da forma típica dos tripanossomatídeos	4
Figura 3: Células coradas demonstrando os estágios do desenvolvimento encontrados na família Trypanosomatidae	5
Figura 4. Divisão celular dos tripanossomatídeos	6
Figura 5. Distribuição geográfica mostrando as regiões endêmicas para as leishmanioses, doença de chagas e doença do sono	7
Figura 6. <i>Leishmania</i> e seus vetores	7
Figura 7. Resumo do ciclo de vida da <i>Leishmania sp</i>	8
Figura 8. Manifestações das leishmanioses	9
Figura 9. <i>Trypanossoma cruzi</i> e seu vetor	10
Figura 10. Resumo do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	11
Figura 11. Manifestação clínica da doença de Chagas	12
Figura 12. <i>T. brucei</i> e seu vetor	13
Figura 13. Resumo do ciclo de vida do <i>T. brucei</i>	14
Figura 14. Indivíduo infectado com <i>T. brucei</i> com sintomas avançados da doença do sono	15
Figura 15 Transcrição poliestrônica nos tripanossomatídeos	20
Figura 16. Maturação do mRNA dos tripanossomatídeos	23
Figura 17. Estrutura do <i>cap</i> e do <i>cap4</i>	26
Figura 18. Representação dos sítios de ação das enzimas envolvidas na geração do <i>cap4</i>	27
Figura 19. Esquema do processo de iniciação da tradução em eucariotos	33
Figura 20. Alinhamento de três homólogos do eIF4E	35
Figura 21. Representação gráfica demonstrando a interação do eIF4E com a estrutura <i>cap</i>	38
Figura 22. Representação da estrutura do eIF4GI e eIF4GII humanos	40
Figura 23. Representação gráfica da conformação da guanosina na cavidade do eIF4E e ligação com eIF4G	41
Figura 24. Representação da interação entre a proteína Maskin e o eIF4E na repressão do mRNA <i>c-mos</i>	43
Figura 25. Regulação da formação do complexo eIF4F pela interação das 4EBP's com o eIF4E	47
Figura 26. Esquema dos homólogos ao eIF4G de <i>L. major</i> e seus principais domínios	51
Figura 27. Representação dos possíveis complexos homólogos do eIF4F nos	53

tripanossomatídeos

Figura 28. Representação dos vetores p2t7-177, p2216 e p2477	61
Figura 29. Expressão das proteínas recombinantes <i>TbEIF4E1</i> a 4 para quantificação	66
Figura 30. Análise da especificidade dos anticorpos <i>TbEIF4E1</i> a 4	67
Figura 31. Análise da expressão e quantificação das proteínas <i>TbEIF4E1</i> a E4 em extratos totais de <i>T. brucei</i>	69
Figura 32. Clonagem dos genes <i>TbEIF4E1-4</i> nos vetores p2T7-177, p2216 e p2477	71
Figura 33. Análise da expressão das proteínas <i>TbEIF4E1-4</i> fusionadas à proteína EYFP	72
Figura 34. Localização celular das proteínas <i>TbEIF4E1-4</i>	73
Figura 35. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E1</i>	75
Figura 36. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E2</i>	76
Figura 37. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E3</i>	77
Figura 38. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E4</i>	78
Figura 39. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi duplo dos genes <i>TbEIF4E1</i> e <i>TbEIF4E2</i> .	79
Figura 40. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi duplo dos genes <i>TbEIF4E1</i> e <i>TbEIF4E4</i>	80
Figura 41. Auto-radiografia dos extratos protéicos das culturas de células de <i>T. brucei</i> submetidas ao RNAi	83
Figura 42. Crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E1</i>	85
Figura 43. Crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E2</i>	85
Figura 44. Crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E3</i> .	86
Figura 45. Crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene <i>TbEIF4E4</i>	86
Figura 46. Expressão das proteínas <i>TbEIF4E1</i> , E3 e E4 em fusão com o peptídeo HA	88
Figura 47. Avaliação por <i>Western-blot</i> dos lisados de células induzidas para a produção das proteínas <i>TbEIF4E1</i> , E3 e E4 em fusão com o peptídeo HA..	89
Figura 48. <i>Western-blot</i> dos ensaios de imunoprecipitação	89
Figura 49. SDS-PAGE corado com prata das imunoprecipitações <i>TbEIF4E1</i> -HA, E3-HA e E4-HA	90
Figura 50. <i>Western-blot</i> dos ensaios de imunoprecipitação (IP) confirmando a interação entre <i>TbEIF4E3</i> e <i>TbEIF4G3</i> ; <i>TbEIF4E3</i> e <i>TbEIF4G4</i> ; <i>TbEIF4E4</i> e <i>TbEIF4G3</i> <i>in vivo</i>	91

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos gêneros constituintes da família Trypanosomatidae	3
Tabela 2. Relação das proteínas que interagem com membros da família eIF4E	39
Tabela 3. Relação dos homólogos ao eIF4E de <i>Trypanosoma brucei</i> .	56
Tabela 4. Sumário da quantificação dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de <i>Trypanosoma brucei</i>	70
Tabela 5. Resultado da incorporação relativa de metionina radioativa em células submetidas ao RNAi	81

Resumo

A regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos é realizada principalmente por mecanismos pos-transcricionais tais como o controle da estabilidade dos mRNAs e da sua tradução. Em eucariotos a tradução é controlada principalmente no recrutamento dos ribossomos para os mRNAs, mediada pelos fatores eucarióticos de iniciação da tradução (eIFs). Neste contexto, o reconhecimento dos mRNAs é realizado principalmente pelo complexo eIF4F, composto pelas subunidades eIF4E, eIF4A, e eIF4G. Um dos principais fatores envolvidos no controle da tradução é o eIF4E, que além de participar na síntese de proteínas, tem sido implicado em um número de processos envolvidos no metabolismo de mRNAs, como o transporte e controle de sua estabilidade. Este trabalho visou a caracterização dos homólogos ao eIF4E de tripanossomatídeos usando como organismo modelo o *Trypanosoma brucei*. A avaliação da expressão dos quatro homólogos de *T. brucei* (aqui chamados TbEIF4E1 a 4) em extratos protéicos mostrou que todas as proteínas são expressas constitutivamente durante o seu ciclo de vida, e que as proteínas TbEIF4E3 e TbEIF4E4 são as mais abundantes. Quando fusionadas a proteínas fluorescentes *in vivo* os TbEIF4E1 e 2 apresentaram localização nuclear e citoplasmática, enquanto os TbEIF4E3 e 4 mostraram-se estritamente citoplasmáticos. A depleção por RNAi mostrou que o TbEIF4E3 é o único essencial para a viabilidade na forma procíclica. Já na forma sagúnea, TbEIF4E1, 3 e 4 foram essenciais. A depleção simultânea de TbEIF4E1/E2 causou a morte em células procíclicas, sem impacto na tradução, por outro lado o TbEIF4E3 ou duplo nocaute TbEIF4E1/E4 levaram à inibição substancial da tradução anterior a interrupção do crescimento e morte celular. Análises de imunoprecipitados mostraram que somente os TbEIF4E3 e 4 interagem com homólogos de eIF4G, as proteínas TbEIF4G3 e 4. Estes resultados são consistentes com a formação de complexos eIF4F distintos pelas proteínas TbEIF4E3 e 4, e estes complexos podem participar na tradução de maneira independente, o que revela propriedades da família eIF4E novas e intrigantes nestes organismos.

Palavras chave: tripanossomatídeos, eIF4E, Iniciação da tradução.

Abstract

The regulation of gene expression in trypanosomatids is mainly carried out by post-transcriptional mechanisms such as control of mRNA stability and translation. In other eukaryotes, translation is controlled mainly during the recruitment of ribosomes to mRNAs, through the action of the eukaryotic translation initiation factors (eIFs). In this context, mRNA recognition is carried out mainly by the eIF4F complex, composed by the subunits eIF4E, eIF4A, and eIF4G. One of the main factors involved in translation control is eIF4E which, in addition to participating in proteins synthesis, has been implicated in a number of processes involved in mRNA metabolism, such as transport and regulation of stability. This work was aimed at the characterization of the trypanosomatid eIF4E homologues, using *T. brucei* as a model organism. The evaluation of the expression of four *T. brucei* eIF4E homologues (here called *TbEIF4E1* through 4), in protein extracts, showed that all proteins are expressed constitutively during the parasite life cycle, with *TbEIF4E3* and *TbEIF4E4* being the most abundant. When fused to fluorescent proteins *in vivo*, *TbEIF4E1* and 2 displayed both cytoplasmic and nuclear localization, whilst *TbEIF4E3* and 4 were strictly cytoplasmic. Knockdown through RNAi showed that *TbEIF4E3* is the only one essential for viability in procyclic forms. In bloodstream forms, *TbEIF4E1*, 3 and 4 were essential. The simultaneous knockdown of *TbEIF4E1/E2* killed cells in procyclic forms, with no impact on translation. In contrast, knockdown of *TbEIF4E3* or double knockdown of *TbEIF4E1/E4* led to substantial translation inhibition prior to cessation of growth and cell death. Immunoprecipitation analysis showed that only *TbEIF4E3* and 4 interact with eIF4G homologues, the proteins *TbEIF4G3* and 4. These results are consistent with *TbEIF4E3* and 4 participating in the formation of distinct eIF4F complexes, with these complexes acting in translation independently from each other, and reveal new and intriguing properties of the eIF4E family within these organisms.

Key words: trypanosomatids, eIF4E, translation initiation.

Introdução

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida, cujas principais espécies representantes, dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, apresentam importância médica e veterinária. As doenças causadas por tripanosomatídeos constituem grave problema sócio-econômico, principalmente em países mais pobres, devido ao difícil controle e à falta de vacinas e agentes quimioterápicos eficientes.

Estes organismos divergiram cedo da linhagem evolutiva eucariótica e possuem características morfológicas, bioquímicas e genéticas que são exclusivas para o grupo. Uma dessas características reside no controle da expressão gênica, que ocorre principalmente através de mecanismos pós-transcricionais como: controle da maturação e da meia-vida de mRNAs e controle da sua tradução na síntese protéica. No entanto os mecanismos que regulam a tradução nestes organismos ainda não são bem compreendidos.

Sabe-se que em eucariotos a iniciação da síntese protéica começa com a ligação do complexo protéico eIF4F (formado pelas subunidades eIF4E, eIF4G e eIF4A) à estrutura *cap* presente na extremidade 5' dos RNAs mensageiros. Tal processo é essencial para o controle dos mRNAs a serem traduzidos. Já nos tripanosomatídeos, a presença de uma estrutura de *cap* bastante modificada (denominada de cap4) e da sequência “Spliced-Leader” na extremidade 5' de todos mRNAs, sugere a possibilidade de diferenças na forma de como os mRNAs são recrutados para a tradução nestes parasitos.

No presente trabalho consta a avaliação feita de homólogos ao eIF4E de *T. brucei*, através da quantificação da expressão destes durante o ciclo de vida, em extratos protéicos por *western-blotting*; detecção *in vivo* da sua localização subcelular através da expressão fusionados à proteína fluorescente EYFP; avaliação da viabilidade celular e da participação na síntese protéica pela inibição da produção das proteínas através de interferência de RNA e marcação radioativa; e por fim por detecção da sua participação na formação de complexos com outros fatores de iniciação. Desta forma buscou-se responder perguntas fundamentais sobre a atuação das proteínas estudadas neste organismo. A caracterização do processo de síntese protéica nos tripanosomatídeos, pela avaliação da atividade de membros da família eIF4E, é essencial para o conhecimento da biologia destes parasitas com possíveis aplicações futuras no desenvolvimento de agentes quimioterápicos.

1. Revisão da Literatura

1.1. Tripanossomatídeos

1.1.1. Origem e evolução dos tripanossomatídeos

A origem dos eucariotos é hoje estimada em torno de 850 milhões de anos (Cavalier-Smith, 2002), causada por pelo menos 60 modificações que promoveram a evolução de α -protopbactérias ao primeiro eucarioto ancestral (Cavalier-Smith, 2009a). Após o surgimento dos eucariotos ancestrais a primeira linhagem divergente gerou o filo Euglenozoa, que possui características únicas dentre os eucariotos (Cavalier-Smith, 2009b).

O filo **Euglenozoa** é composto por protozoários com um ou dois flagelos inseridos em uma bolsa anterior, sustentados por dois corpos basais que dão origem a três fitas microtubulares, possuindo ainda mitocôndria com cristas discóides (Cavalier-Smith, 1981). Esses organismos alimentam-se utilizando um aparelho de ingestão tubular em vez de um sulco ventral (Simpson, 2003). Possuem ainda em seus genomas uma base nitrogenada modificada, “base J”, possivelmente relacionada com controle da expressão de alguns genes e exclusiva deste grupo de organismos (revisado por Borst e Sabatinni, 2008). O Filo Euglenozoa é composto por três ordens: (1) Diplonemida, composto por organismos de vida livre, alguns heterótrofos e parasitas ocasionais, (2) Euglenida, composto por organismos fotossintetizantes e (3) **Kinetoplastida**, composto por protozoários bacteriófagos, micro-predadores e parasitas (Simpson e Roger, 2002) (figura 1). A maioria dos predadores desse filo alimenta-se ingerindo bactérias ou em alguns casos outras células eucarióticas (Lukes *et al.*, 2009). A autotrofia restrita ao grupo de euglenídeos foi obtida a partir da endossimbiose de uma alga verde por um predador euglenídeo ancestral (Leander *et al.*, 2007). Já o comportamento parasitário e comensal evoluíram em diversos eventos dentro da ordem Kinetoplastida (Simpson *et al.*, 2006).



Figura 1. Micrografia eletrônica de três membros do filo Euglenozoa: Euglenida (gênero *Lepocinlis*), Kinetoplastida (gênero *Leptomonas*) e Diplonemida (gênero *Diplonema*). (modificado de Lukes *et al.*, 2009).

A ordem **Kinetoplastida** teria surgido a partir de diferenciação dos peroxissomos em glicossomos e de modificações ocorridas na mitocôndria originando uma arquitetura original do DNA mitocondrial - o cinetoplasto (Hannaert *et al.*, 2003). Os membros dessa ordem possuem ainda arranjo dos genes em conjuntos (*clusters*) policistrônicos gigantes, mecanismos de processamento em *trans* (*trans-splicing*) de mRNAs de origem nuclear (Stevens *et al.*, 2001; Simpson 2006) e de editoração (*RNA editing*) de mRNAs mitocondriais (revisto por Stuart e Panigrahi, 2002 e Liu *et al.*, 2005). Essa ordem é constituída por duas famílias: (1) Bodonidae (formada por organismos aquáticos biflagelados de vida livre, mas com alguns membros ectoparasitas de peixes) e (2) Trypanosomatidae (formada por parasitas com um flagelo) (Stevens *et al.*, 2001). Um novo sistema foi proposto por Moreira *et al.* (2004) que divide os kinetoplastída em Prokinetoplastina (Ichthyobodo e Perkinsiella) e Metakinetoplastina (alguns bodonídeos e tripanossomatídeos).

A família **Trypanosomatidae** é formada exclusivamente por parasitas uniflagelados agrupados em dez gêneros, divididos em dois grupos: parasitas monoxênicos, que possuem um hospedeiro, e parasitas heteroxênicos, que possuem dois hospedeiros (Stevens *et al.*, 2001; Maslov *et al.* 2001) (tabela 1).

Tabela 1. Gêneros constituintes da família Trypanosomatidae, com seus respectivos hospedeiros e vetores (Stevens *et al.*, 2001).

Gêneros:		Descrito por:	Hospedeiros	Vetor
Monoxênicos	<i>Herpetomonas</i>	Kent (1880)	Insetos	-
	<i>Leptomonas</i>	Kent (1880)	Insetos, nematóides	-
	<i>Crithidia</i>	Leger (1902)	Insetos	-
	<i>Rhynchoidomonas</i>	Patton (1910)	Insetos dípteros	-
	<i>Blastocrithidia</i>	Laird (1959)	Insetos e ácaros	-
	<i>Wallaceina</i>	Podlipaev (1990)	Insetos hemípteros	-
Heteroxênicos	<i>Trypanosoma</i>	Gruby (1843)	Vertebrados	Artrópodes; sanguessugas
	<i>Leishmania</i>	Ross (1903)	Mamíferos, lagartos	Insetos-flebotomíneos
	<i>Endotrypanum</i>	Mesnil & Brimont (1908)	Preguiças	Insetos-flebotomíneos
	<i>Phytomonas</i>	Donovan (1909)	Plantas com flores	Insetos hemípteros

Estima-se em cerca de 350 o número de espécies de insetos identificadas como hospedeiros de tripanossomatídeos (em sua maioria das ordens Diptera e Hemiptera). No entanto, dentre um milhão de espécies conhecidas de insetos, cerca de 2.000-2.500 têm sido estudadas por parasitologistas e um número limitado destas foi examinada para a presença de tripanossomatídeos, sugerindo que o número de tripanossomatídeos que infectam insetos possa ser maior (Podlipaev, 2000).

Existem duas teorias atuais que propõem o surgimento dos tripanossomatídeos: (1) que eles teriam surgido de um ancestral de vida livre e/ou eventual ectoparasito semelhante aos atuais Bodonídeos (Simpson *et al.*, 2004), e o meio de vida parasitário teria surgido na família por uma eventual adaptação dos ectoparasitas ao invadirem os tecidos internos de peixes (fenômeno também detectado em alguns dos atuais Bodonídeos), tendo sanguessugas como vetores (Stevens *et al.*, 2001); ou (2) que os tripanossomatídeos surgiram primeiro como parasitas de invertebrados, baseada na hipótese de que os tripanossomatídeos exclusivos de insetos teriam surgido antes e teriam dado origem aos parasitas de vertebrados e plantas, que se adaptaram aos outros hospedeiros a partir do repasto sanguíneo (Baker, 1994; Simpson, *et al.*, 2006). Fernandes *et al.* (1993) propuseram que o parasitismo digenético na família teria surgido em quatro eventos independentes durante a história evolutiva dando origem às linhagens: (1) *Leishmania* e *Endotrypanum*; (2) *Phytomonas*; (3) *Trypanosoma cruzi* e (4) *Trypanosoma brucei*.

1.1.2. Biologia celular dos tripanossomatídeos

A evolução divergente precoce da família Trypanosomatidae permitiu o desenvolvimento de uma série de particularidades na biologia desses organismos. Uma dessas é refletida na forma de suas células, que possuem um arranjo singular que se modifica de acordo com os estímulos do ambiente em que se encontram (Alexander *et al.*, 1999). A forma celular dos tripanossomatídeos é definida por uma gaiola de microtúbulos subpeliculares organizada em arranjo de hélices ao longo do eixo longitudinal da célula (Gull, 1999; McKean, 2003). Um único flagelo reside anexado ao corpo celular através da zona de junção do flagelo ou FAZ (*Flagellum Attachment Zone*) localizado no bolso flagelar (*Flagellar Pocket*). Junto à zona de junção do flagelo está localizado o corpo basal (importante para divisão celular) e próximo a ele reside o cinetoplasto, localizado dentro de uma grande mitocôndria que percorre quase todo o corpo celular (McKean, 2003). Os tripanossomatídeos possuem organelas especializadas para a metabolização da glicose, os glicossomos (revisado por Michels *et al.*, 2000), e um núcleo localizado no centro da célula (Ogbadoyi *et al.*, 2000) (figura 2).

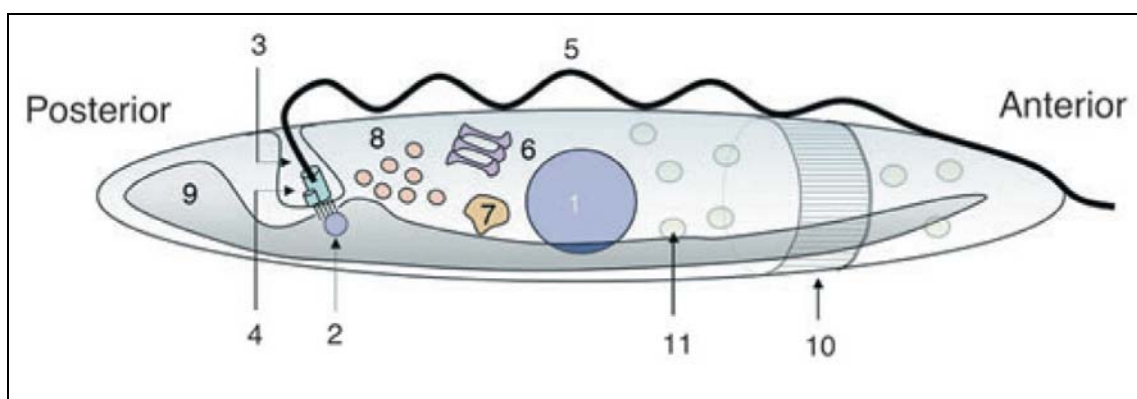


Figura 2. Representação da forma típica dos tripanossomatídeos, destacando a posição de estruturas como o (1) núcleo, (2) cinetoplasto, (3) Bolsa flagelar, (4) corpo basal e pro-basal, (5) flagelo, (6) complexo de golgi, (7) lisossomos, (8) endossomos, (9) mitocôndria, (10) microtúbulos, (11) Glicossomos (Matthews, 2005).

A sobrevivência e multiplicação destes organismos nos hospedeiros são moduladas por profundas modificações bioquímicas e morfológicas indispensáveis para sua adaptação em meios biológicos distintos (Alexander *et al.*, 1999). Assim os tripanossomatídeos assumem várias formas durante seu ciclo de vida, diferenciadas pelo tamanho do flagelo e pela posição da inserção deste (juntamente com o corpo basal) em relação ao núcleo. No entanto nenhum dos gêneros apresenta todas as formas durante seu ciclo de vida (Figura 3).

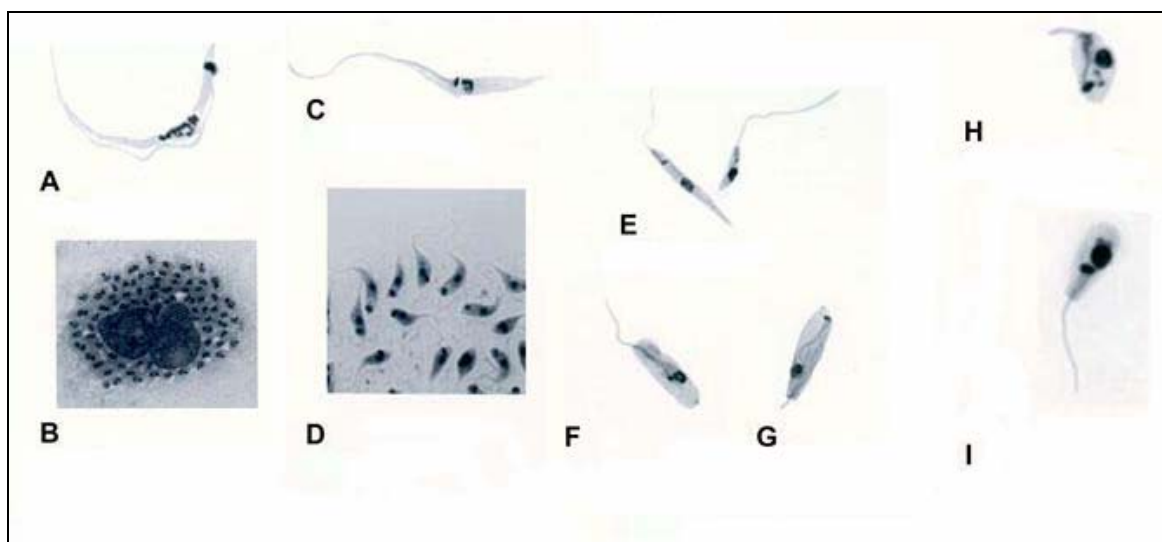


Figura 3. Células coradas demonstrando os estágios do desenvolvimento encontrados na família Trypanosomatidae. A - Tripomastigota, B - Amastigota (dentro de macrófagos de vertebrados), C - Epimastigota, D - Intermediário, E - Promastigota, F - Paramastigota, G - Opistomastigota, H - Opistomorfo e I - Coanomastigota (De Souza, 2002).

A divisão das células/reprodução dos tripanossomatídeos se dá por fissão binária. A sequência dos eventos na divisão é: (1) a produção do novo flagelo; (2) duplicação e divisão do núcleo; (3) duplicação e divisão do cinetoplasto; (4) segregação dos núcleos, flagelos e dos cinetoplastos para as extremidades; (5) citocinese antero-posterior no eixo longitudinal direcionada pela FAZ (McKean, 2003) (figura 4).

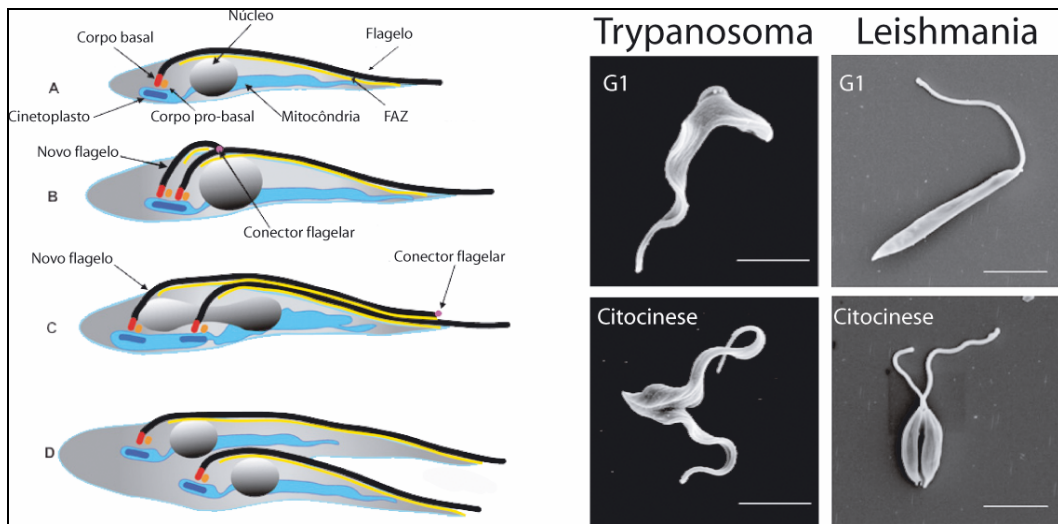


Figura 4. Divisão celular dos tripanossomatídeos. À esquerda: diagrama da estrutura (A) e divisão celular dos tripanossomatídeos (B-D), demonstrando a formação sequencial do flagelo (B), cinetoplasto e núcleo (C), seguidas da citocinese antero-posterior (D) (modificado de Vaughan e Gull, 2008). À direita fotomicrografias das células de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* na fase G1 (acima) e durante a citocinese (abaixo) (modificado de Hammarton *et al.*, 2007).

1.1.3. Doenças causadas por tripanossomatídeos

As principais doenças humanas causadas por tripanossomatídeos são as leishmanioses (causadas por parasitas do gênero *Leishmania*), a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e a doença do sono (*Trypanosoma brucei*) (Stuart *et al.*, 2008). Estas enfermidades afetam milhões de pessoas em dezenas de países, em especial os países em desenvolvimento (figura 5).

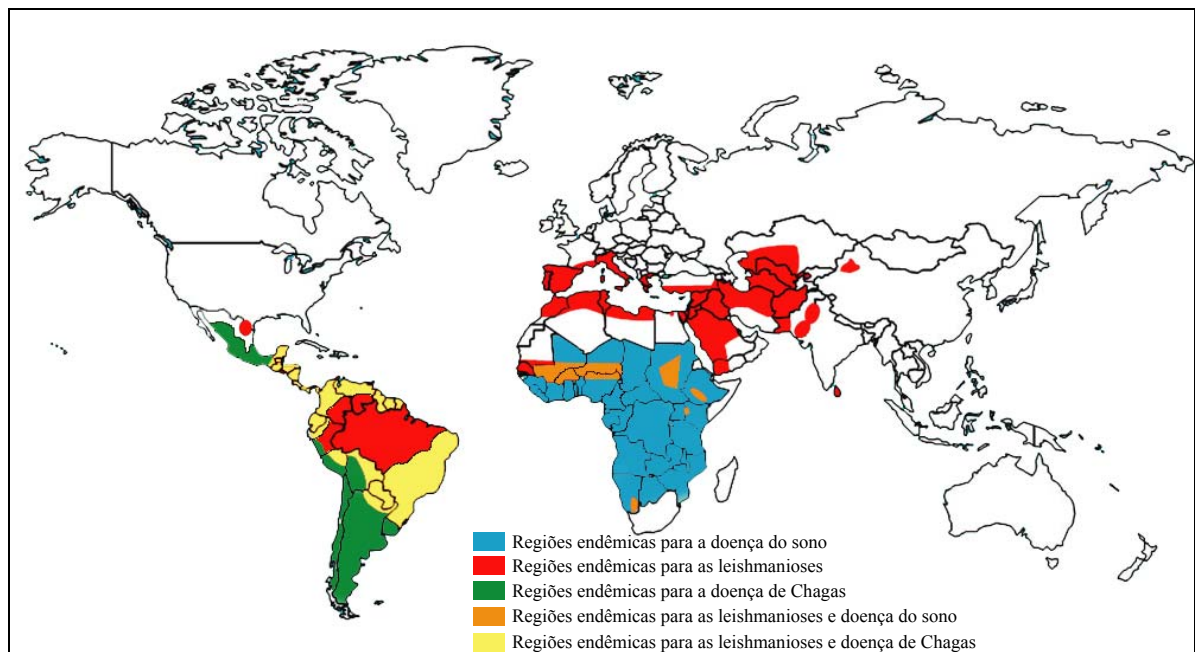


Figura 5. Distribuição geográfica mostrando as regiões endêmicas para as leishmanioses, doença de Chagas e doença do sono (modificado de Barrett *al.*, 2003 e Bailey e Lockwood, 2007).

As **leishmanioses** são causadas por cerca de 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos. O ciclo de vida da espécie *Leishmania* envolve a alternância entre os hospedeiros vertebrados (forma amastigota) e seus vetores (forma promastigota), insetos dípteros da subfamília Phlebotominae, que infectam os hospedeiros vertebrados após o repasto sanguíneo (figura 6).

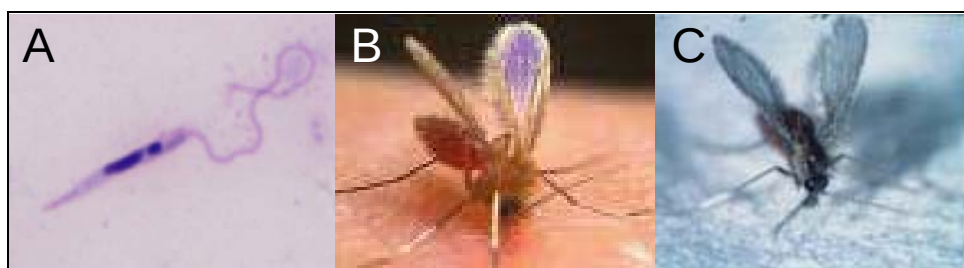


Figura 6. *Leishmania* e seus vetores. (A) *Leishmania* sp. e espécimes de flebotomíneos dos gêneros (B) *Phlebotomus* e (C) *Lutzomyia*, vetores de varias espécies de *Leishmania* (modificado de <http://tolweb.org/Leishmania/98022> e Sharma e Sigh, 2008).

Fêmeas dos flebotomíneos infectadas possuem em suas glândulas salivares os parasitas na forma de promastigota metacíclico e os injetam no hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo. Estes invadem os macrófagos do hospedeiro e dentro dos lisossomos diferenciam-se na forma amastigota. Dentro dos macrófagos esses amastigotas se multiplicam e provocam a lise da célula, podendo assim infectar novos macrófagos ou serem capturados em um novo repasto dos insetos. Quando o flebotomíneo faz o repasto sanguíneo, ingere sangue contaminado com os parasitas. Estes, no intestino do inseto, diferenciam-se para a forma de promastigota procíclicos e multiplicam-se sucessivamente. Em seguida diferenciam-se em promastigotas nectomonados e então migram pelo trato digestivo do inseto até o intestino médio, onde se transformam na forma de promastigota leptomonado. Multiplicam-se e por fim, diferenciam-se na forma de promastigota metacíclico (revisado por Gossage et al., 2003; Bates, 2007) (figura 7).

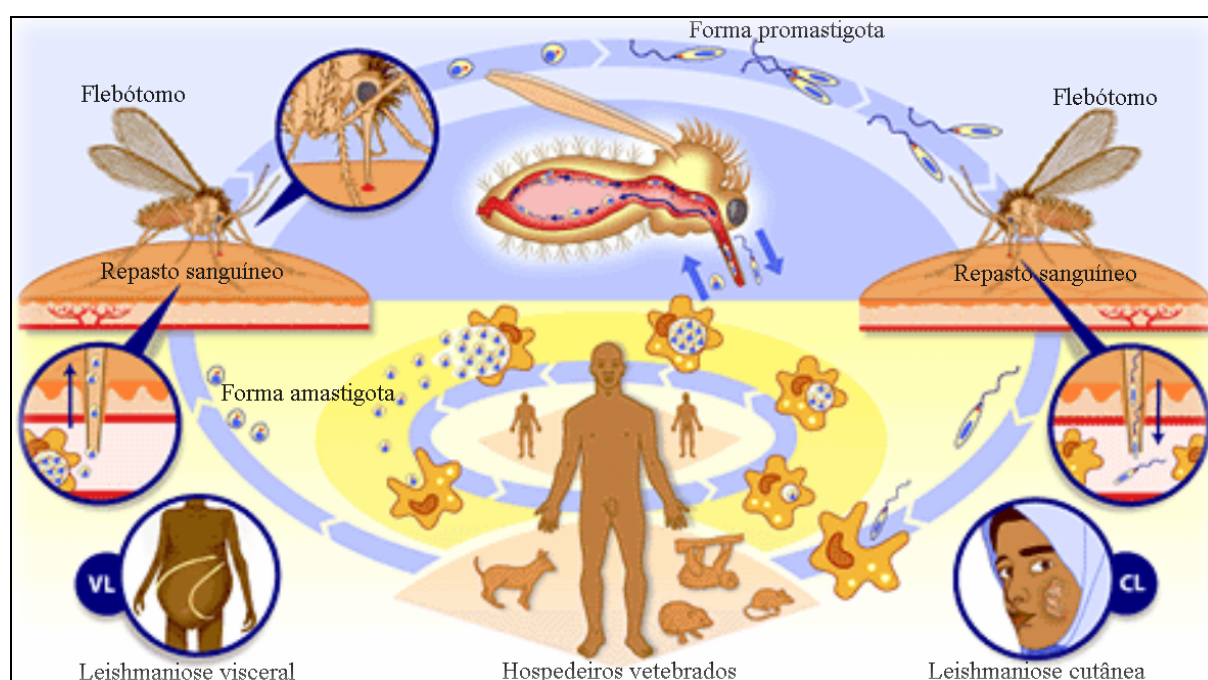


Figura 7. Resumo do ciclo de vida da *Leishmania* sp., demonstrando a transmissão do parasita do hospedeiro invertebrado para o vertebrado e suas respectivas formas morfológicas (<http://www.who.int/tdroid/diseases/leish/leish.htm>).

As formas clínicas das leishmanioses são particularmente diversas (dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida) representando um complexo de doenças: (1) leishmaniose cutânea (CL), (2) leishmaniose visceral, ou calazar (Kala-azar) (VL), (3) leishmaniose mucocutânea (MCL), (4) leishmaniose cutânea difusa (DCL). As manifestações clínicas são lesões na pele que se curam com o tempo (CL), mas que deixam cicatrizes; febre irregular, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatias e anemias (VL); extensiva destruição das cavidades oral-nasal e faríngea com lesões escondidas, mutilações na face (MCL) e lesões disseminadas pelo corpo (DCL) (Ashford, 2000) (figura 8).

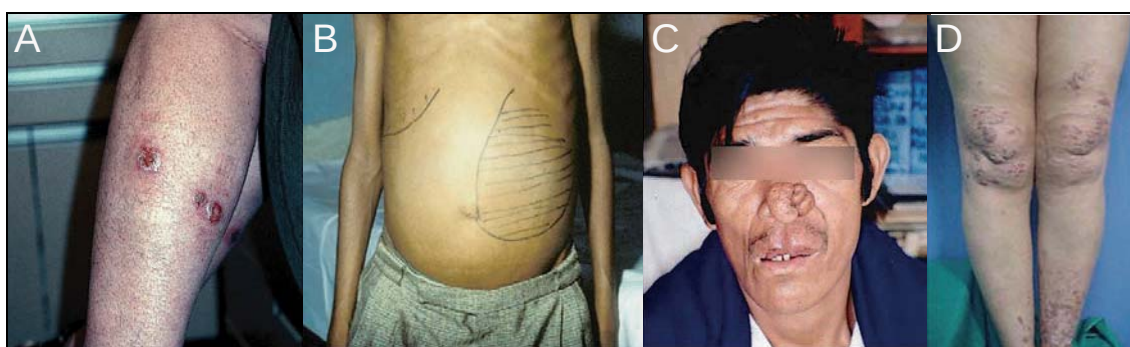


Figura 8. Manifestações das leishmanioses. Pacientes acometidos pelas leishmanioses (A) cutânea, (B) visceral, (C) mucocutânea e (D) cutânea difusa (modificado de Murray *et al.*, 2005).

As leishmanioses constituem um grave problema de saúde pública, afetando pessoas em 88 países: dentre esses, 72 estão em desenvolvimento e 16 são desenvolvidos (Desjeux, 1996; Desjeux 2004). A incidência anual das leishmanioses é de cerca de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e cerca de 500 mil de leishmaniose visceral, afetando um total de 12 milhões de pessoas e oferecendo risco a cerca de 350 milhões (Desjeux, 2004). Há provavelmente uma grande diferença entre o número de casos realmente ocorridos e do número relatado, uma vez que muitos casos não são diagnosticados, são diagnosticados e não declarados ou até podem ser diagnosticados erroneamente (Desjeux, 2004).

O tratamento contra as leishmanioses é através da administração de compostos antimoniais pentavalentes como o Pentostan e Glucantin, ou alternativamente com

Anfotericina B, Miltefosine, Cetoconazol, Rifampicina, Alopuritol e a Pentamidina. No entanto são de custo elevado e possuem diversos efeitos colaterais graves como: cardiotoxicidade, artralgias, mialgias, perda de apetite, febre, cefaléia, náuseas, urticária, leucopenia, trombocitopenia e elevação das enzimas pancreáticas. (Neuber, 2008).

A **doença de Chagas** é transmitida por insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília Triatominae (comumente conhecidos como barbeiros), que se alojam nas fendas em paredes e telhados das casas simples, em regiões das Américas do Sul e Central (figura 9).

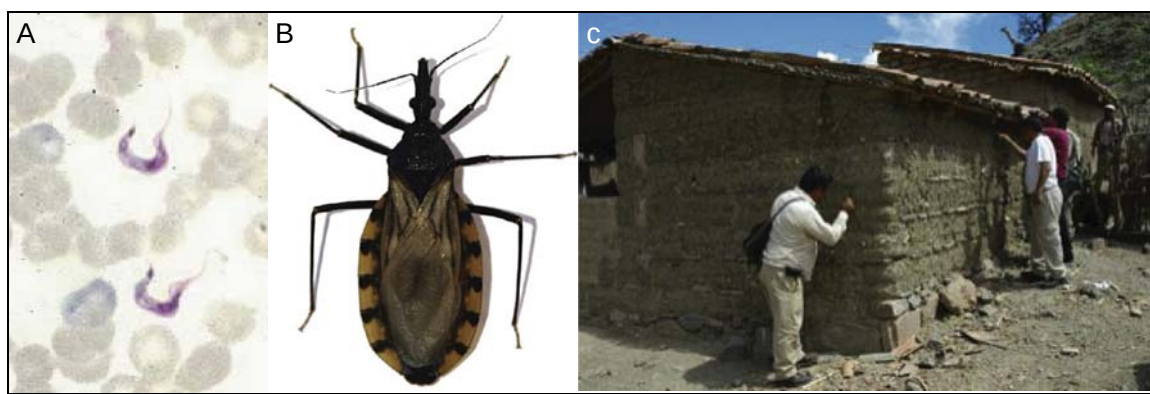


Figura 9. *Trypanosoma cruzi* e seu vetor. A - Esfregaço sanguíneo infectado com a forma tripomastigota do *T. cruzi*; B: fotografia do *Triatoma infestans*, principal vetor da doença de Chagas; C: Coleta de “barbeiros” em “casa de taipa” (modificado de Barrett *et al.*, 2003; Noireau *et al.*, 2009).

Os insetos tornam-se infectados com o *T. cruzi* depois fazer repasto sanguíneo em um animal ou humano contaminado. Após o repasto sanguíneo em outro indivíduo o inseto deposita fezes infectadas na pele, geralmente à noite, enquanto a pessoa está dormindo. Por fricção manual o indivíduo põe em contato as fezes contaminadas do inseto na área da picada, olhos ou boca, e contamina-se com o *T. cruzi* (figura 10).

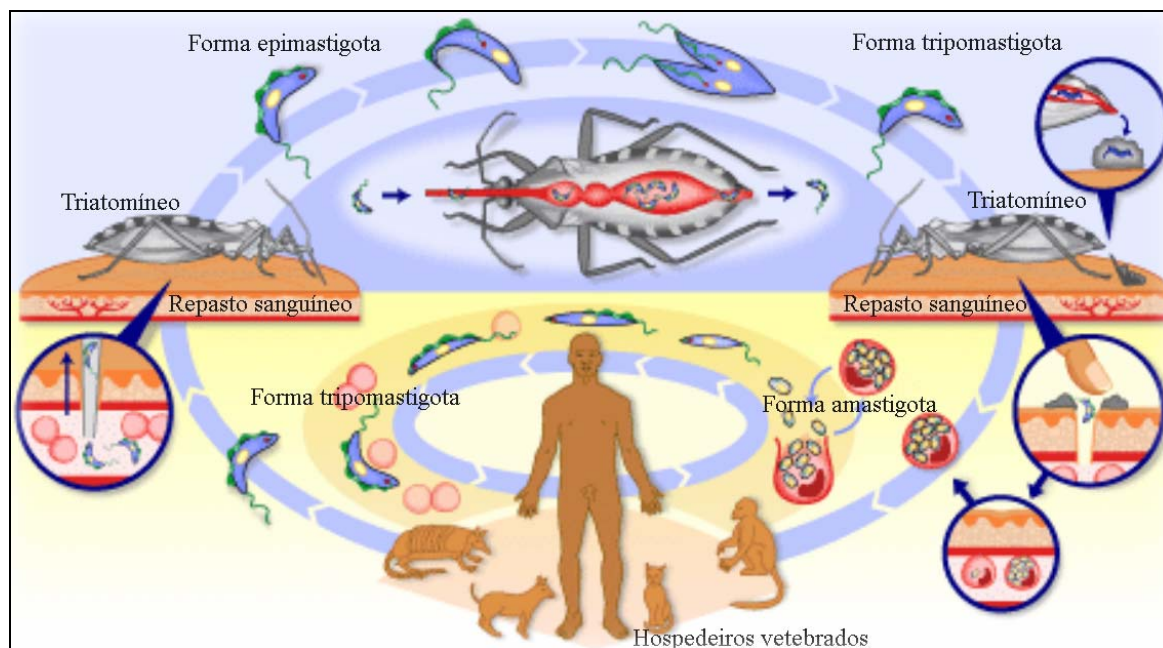


Figura 10. Resumo do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, demonstrando a transmissão do parasita do hospedeiro invertebrado para o vertebrado e suas respectivas formas morfológicas (<http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/lifecycle.htm>).

Após um período de incubação de 7-10 dias, ocorre um inchaço local no local da picada (chagomas). Na conjuntiva, podem resultar em edema periorbital unilateral e edema na pálpebra (Sinal de Romaña). A maioria dos pacientes é infectada durante a infância. A fase inicial da infecção geralmente não é grave, mas por vezes leva à morte, particularmente em crianças. No entanto, em cerca de um terço daqueles que estão infectados, os sintomas crônicos desenvolvem-se após 10-20 anos e são caracterizados por febre, mialgias, mal-estar, dores musculares, sudorese, hepatoesplenomegalia, insuficiência cardíaca de miocardite, derrame pericárdico e, menos frequentemente, meningoencefalite. Os sintomas da fase crônica são decorrentes de insuficiência cardíaca, arritmias cardíacas e tromboembolismo arterial ou venoso (figura 11) (revisado por Pununkollu *et al.*, 2007). A doença de Chagas afeta pessoas de 19 países da América Central de do Sul, com cerca de 8-11 milhões casos e 14.000 mortes por ano (Stuart, 2008).

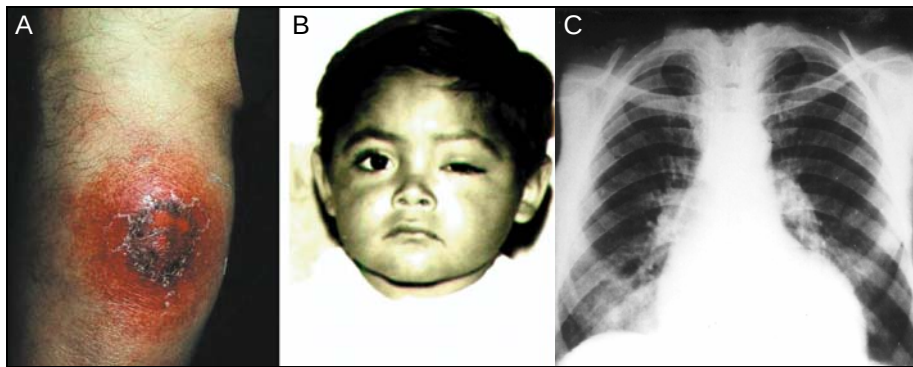


Figura 11. Manifestação clínica da doença de Chagas. (A) Fotografia de indivíduo com cancro tripanossomal ocasionado por infecção com o *T. cruzi*; (B) fotografia de indivíduo com o sinal de Romana; (C) Radiografia demonstrando um dos efeitos da fase crônica da doença de Chagas em indivíduo com aumento do tecido cardíaco (modificado de Barrett *et al.*, 2003).

Para a doença de Chagas na fase aguda da doença são indicados o benzonidazol e nifurtimox. Os principais efeitos colaterais são reações cutâneas, febre, distúrbios gastrintestinais, principalmente náuseas, anorexia, perda de peso, excitabilidade psíquica ou sonolência, linfadenopatia, dores musculares e articulares e depressão da medula óssea. Já na fase crônica, que ocorre em condições de imunossupressão e os medicamentos são pouco efetivos, faz-se o tratamento da insuficiência cardíaca, aplicação de marcapasso permanente, administração de drogas para arritmias e até transplante de coração (Punukollu *et al.*, 2007).

A **doença do sono** é transmitida por moscas *tsé-tsé* (família *Muscidae*, gênero *Glossina spp.*) contaminadas com parasitas da espécie *T. brucei* (figura 12). Mais de 20 espécies e subespécies de moscas *tsé-tsé* transmitem estes parasitas, mas apenas cerca de 1 por 1.000 moscas têm nas glândulas salivares a forma infectiva madura necessária para transmitir o parasita para os seres humanos (Stuart *et al.*, 2008).

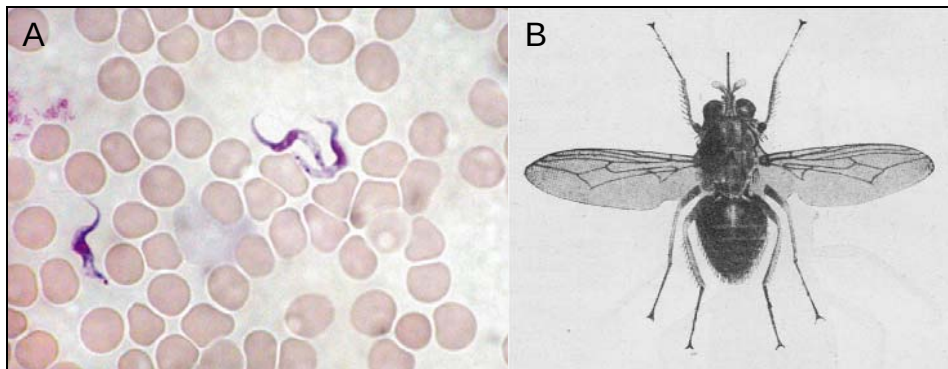


Figura 12. *Trypanosoma brucei* e seu vetor. (A) Esfregaço sanguíneo infectado com *T. brucei* e (B) Mosca Tsé-tsé, vetor do *T. brucei* (Barrett *et al.*, 2003; Lundkvist *et al.*, 2004)

Durante seu repasto sanguíneo as moscas tsé-tsé liberam parasitas procíclicos (PCF - *procyclic form*, replicativos) das suas glândulas salivares. Uma vez em contato com a corrente sanguínea, as formas procíclicas transformam-se na forma sanguínea delgada (BSF - *bloodstream slender form*, replicativa) e multiplicam-se assexuadamente no sangue, linfonodos e fluido espinhal, migrando para o cérebro em um estágio mais avançado da infecção. Em altos índices de parasitemia, esses parasitas diferenciam-se para uma forma sanguínea mais curta (*bloodstream stumpy form*, não replicativa) que possui características que possibilitam a sobrevivência no inseto. Estas formas sanguíneas são ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto e, no interior de seu intestino, iniciam uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas para adaptar-se às condições de baixa glicose do intestino do inseto. Diferenciam-se então na forma procíclica e migram para as glândulas salivares onde se multiplicam repetidas vezes, fechando o ciclo de transmissão do parasita (figura 13) (revisado por Stuart *et al.*, 2008).

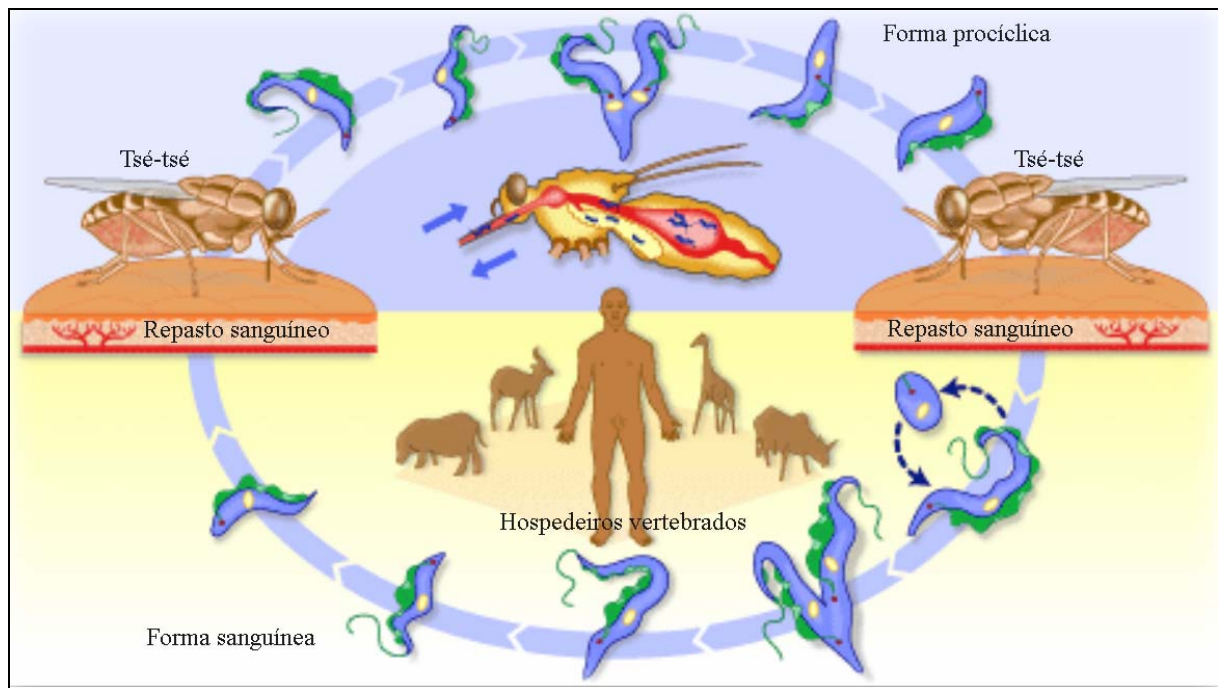


Figura 13. Resumo do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*, demonstrando a transmissão do parasita do hospedeiro invertebrado para o vertebrado e suas respectivas formas morfológicas (<http://www.who.int/tdroid/diseases/tryp/lifecycle.htm>).

O principal mecanismo utilizado pelo *T. brucei* para burlar os sistemas de defesa dos hospedeiros vertebrados consiste na variação antigênica de uma glicoproteína de superfície (VSG). O *T. brucei* tem mais de 1.000 genes e pseudogenes para VSGs, dos quais apenas um é transcrito por vez em um dos vários sítios de expressão telomérica. A mudança do gene ativo da VSG envolve rearranjos de DNA, substituindo a antiga VSG por uma nova, ou por controle transcricional (revisado por Pay *et al.*, 2004; Taylor e Rudenko, 2006).

No hospedeiro invertebrado esse parasita evade da ação das proteases do trato digestivo do inseto por expressar proteínas de superfície que lhe conferem proteção, chamadas de prociclinas ou PARPS (*Procyclic Acid Repetitive Proteins*). A família de genes das prociclinas (proteínas EP, que possuem extensas unidades de repetição em tandem do ácido glutâmico e prolina; e GPEET, que codificam proteínas com repetições do pentapeptídeo interno GPEET) é organizada em conjuntos de cópias em posições cromossômicas internas, precedidas por promotores para RNA polimerase I, e cuja expressão não é detectável na forma sanguínea do parasita (revisado por Clayton, 2002; Navarro *et al.*, 2007).

A espécie de *T. brucei* foi subdividida em três subespécies morfologicamente idênticas: *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* causam a doença do sono nos seres humanos enquanto a terceira subespécie, *T. b. brucei*, não é infecciosa para os seres humanos, mas infecta o gado e é causador da doença de importância econômica chamada “Nagana” na África (revisto por Courtin *et al.*, 2008). A doença do sono ocorre no Leste e no Nordeste da África, principalmente no Sudão, Congo, Uganda e Angola. Acomete cerca de dois milhões de pessoas, com 300-500 mil novos casos e cerca de 66 mil mortes anuais. Os sintomas iniciais são: febre, dor de cabeça, anemia, dores nas articulações, aumento das glândulas e do baço. Sintomas avançados ocorrem por invasão do parasita no sistema nervoso e incluem: desordens endócrinas e neurológicas, deterioração mental culminando em coma e morte em alguns dias ou semanas (El-Sayed *et al.*, 2000) (figura 14).

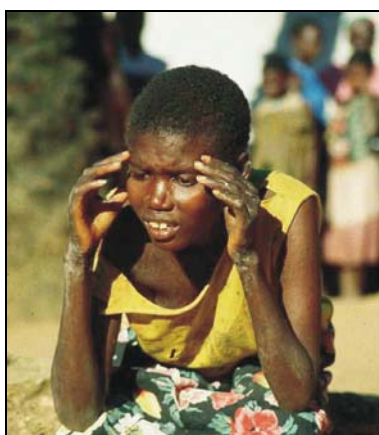


Figura 14. Indivíduo infectado com *T. brucei* com sintomas avançados (neurológicos) da doença do sono (Barrett *et al.*, 2003).

Poucas drogas estão disponíveis para o tratamento da doença do sono e a escolha da droga é baseada no estágio da doença e do patógeno envolvido. Para o tratamento de infecções com o *T. b. gambiense* são utilizadas o Pentamidine (estágio inicial), Eflornitine e Merlasoprol (para estágio avançado), já para o tratamento do *T. b. rhodesiense* são geralmente utilizados o Suramin (estágio inicial) e Melarsoprol (estágio avançado). No entanto estas drogas disponíveis possuem altos custos e efeitos colaterais como: reações epidérmicas,

náuseas, vômitos, diarreia, anemia, trombocitopenia, leucopenia, neuropatias e eventual morte do indivíduo (melarsoprol) (Brun *et al.*, 2009).

Diante do descrito acima, a descoberta de novas drogas, efetivas e fáceis de administrar para o tratamento das doenças causadas por tripanossomatídeos é considerada de grande importância pela OMS (Neuber, 2008). Para tal faz-se necessária uma maior compreensão da biologia desses organismos, em especial aspectos de sua biologia molecular, que possam ser explorados como via de tratamento como, por exemplo: metabolismo da glicose e glicosomo, enzimas da via de pentose-fosfato, metabolismo de lipídeos e de esteróis, cinetoplasto e edição de RNA, degradação protéica e **regulação da expressão gênica**, entre outros (Barrett *et al.*, 2003).

1.1.4. Aspectos da biologia molecular dos tripanossomatídeos

1.1.4.1 Genoma e organização gênica

A publicação dos três genomas dos tripanossomatídeos *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* foi um avanço científico de extrema relevância por impulsionar pesquisas que permitem a compreensão da biologia desses protozoários, propiciando a busca de novos quimioterápicos, desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas (Kissinger, 2006).

Embora os três agentes compartilhem muitas características gerais, incluindo as estruturas subcelulares como o cinetoplasto e glicosomos, cada um é transmitido por um inseto diferente e tem seu ciclo de vida com características próprias, com tecidos-alvo diferentes e distintos padrões de patogênese em seus hospedeiros mamíferos (El-Sayed *et al.*, 2005). No entanto, independentemente de terem divergido há mais de 200 milhões de anos atrás, os genomas de tripanossomatídeos apresentam uma notável preservação na organização dos genes (sintenia) (Ghedin *et al.*, 2004).

Especula-se que algum tipo de pressão seletiva deve restringir o arranjo dos genes, e argumenta-se que a conservação sintênica seja devido à incidência relativamente baixa de recombinação sexual, à organização policistrônica ou à replicação, mas ainda não está clara a razão de tal fenômeno em tripanossomatídeos (Ghedin *et al.* 2004; El-Sayed *et al.*, 2005b; Ginger *et al.*, 2005).

Os tripanossomatídeos são diplóides e funcionalmente assexuais, no entanto existem indícios de eventual reprodução sexual ou formação de híbridos (revisto por Heitman 2006). Possuem mitocôndria modificada, onde se situa o cinetoplasto, que constitui cerca de 10-30% do DNA total da célula e onde ocorre o processo de edição de mRNAs, que consiste na inserção ou remoção de uridinas (U) e é realizada por um complexo de proteínas chamado editossomo com o auxílio de RNA guias (Borst, *et al.*, 1982; revisto por Liu *et al.*, 2005). O conteúdo CG é geralmente alto nos genomas dos tripanossomatídeos, principalmente nas regiões não traduzidas (Alonso *et al.*, 1992; Stiles *et al.*, 1999).

O genoma do *T. brucei* tem em torno de $2,5 \times 10^7$ pb. Os seus cromossomos podem ser agrupados em três classes principais: (1) 11 mega cromossomos (1-6 Mb), e mais de 100 (2) cromossomos intermediários (200-900 Kb) e (3) minicromossomos (50-150 Kb). Os mega cromossomos são diplóides, mas a diploidia dos cromossomos intermediários e dos minicromossomos é incerta (El-Sayed *et al.*, 2000). O genoma de *Leishmania* contém cerca de $3,28 \times 10^7$ pares de bases (pb) e é organizado em cerca de 34-36 cromossomos que possuem regiões repetitivas nos telômeros. Estes cromossomos possuem também uma “plasticidade” manifestada pela variabilidade no seu tamanho, que pode ocorrer naturalmente ou ser provocado por estresse de nutrientes ou cultivo prolongado (Stiles *et al.*, 1999; Ivens *et al.*, 2005). O genoma de *T. cruzi* tem em torno de $5,5 \times 10^7$ pb em cerca de 28 cromossomos e estima-se que 50% do genoma seja constituído por seqüências repetitivas representadas por retrotransposons, seqüências teloméricas e famílias gênicas de proteínas de superfície. (El-Sayed *et al.*, 2005b).

Análises dos três genomas de tripanossomatídeos revelaram a existência de 6158 grupos de *clusters* gênicos ortólogos comuns aos três parasitas, apresentando cerca de 57% de identidade entre *T. brucei* e *T. cruzi*, e 44% de identidade entre *L. major* e os tripanossomas. Já a comparação dos domínios protéicos nos genomas revelou que poucos são exclusivos para os organismos individuais. Dos 1.617 domínios de proteínas identificados nos genomas, menos de 5% são exclusivos de uma única espécie, mostrando que embora a maioria dos genes esteja presente em um mesmo contexto genômico, existem diferenças substanciais que, presumivelmente, refletem adaptações específicas de cada espécie a distintas pressões de seleção e estratégias de sobrevivência (El-Sayed *et al.*, 2005).

1.1.4.2 Transcrição nos tripanossomatídeos

O arranjo de genes em tripanossomatídeos assemelha-se em alguns pontos aos conhecidos operons bacterianos sendo transcritos em unidades policistrônicas de grupos de genes contíguos que seguem uma mesma orientação numa mesma fita do DNA, e que são separadas umas das outras por regiões intergênicas (El-Sayed *et al.*, 2005a). Uma única região promotora é utilizada na transcrição de cada uma destas unidades, resultando em blocos inteiros de genes transcritos em grandes mRNAs precursores (transcrição policistrônica). Como em procariotos, os genes dos tripanossomatídeos não possuem íntrons, exceto em apenas quatro exemplos, para os mRNAs da poli-A polimerase, de uma DEAD/H RNA helicase ATP-dependente e de duas proteínas hipotéticas (Ivens *et al.*, 2005, material suplementar). No entanto ao contrário dos operons bacterianos e de nemátodos, as unidades policistrônicas dos tripanossomatídeos não aparentam codificar genes funcionalmente relacionados (Campbell *et al.*, 2003). Diferentemente da maioria dos outros organismos, a regulação da expressão gênica não é determinada em nível da iniciação da transcrição, visto que as taxas transcricionais não variaram muito (Campbell *et al.*, 2003).

Na família Trypanosomatidae quatro classes de RNA polimerases são encontradas: RNA pol I, II e III, todas nucleares; e uma localizada na mitocôndria, responsável pela transcrição no cinetoplasto (Grams *et al.*, 2002; revisto por Palenchar e Bellofatto, 2006). A RNA pol I (RNAP I) é responsável pela transcrição do cluster gênico dos pré-rRNAs (18S, 5.8S e 28S) e dos genes de proteínas de superfície prociclinas e VSG de *T. brucei*; a RNA pol II é responsável pela transcrição da maioria dos genes que são traduzidos em proteínas, pelos genes da *Spliced Leader* (SL) e de pequenos RNAs do nucléolo, os snoRNAs; e a RNA pol III é responsável pela transcrição dos tRNAs, do rRNA 5S e também de snRNAs (revisado por Palenchar e Bellofatto, 2006).

Alguns homólogos de subunidades das três RNAs polimerases estão ausentes nos tripanossomatídeos e diferenças importantes são observadas nas subunidades presentes (Ivens *et al.*, 2005). Por exemplo, enquanto ortólogos de todas as subunidades da RNA pol II eucariótica e a proteína de ligação ao motivo TATA (TATA-Box) estejam presentes, muitos dos fatores de transcrição basais parecem ausentes (revisado por Palenchar e Bellofatto, 2006). Promotores para RNA pol I e III são bem descritos na literatura (Cordingley, 1985; Campbell *et al.*, 1989; revisto por Clayton, 2002), mas ainda não foram caracterizados promotores para a RNA pol II, a exceção do promotor dos genes SL (Palenchar e Bellofatto, 2006).

A transcrição policistrônica e a ausência de promotores clássicos para RNA pol II indicam que a iniciação da transcrição não é um fator limitante na taxa de produção de mRNAs. Em vez disso, parece ocorrer uma transcrição constitutiva de genes pela RNA pol II, executada através de dois modos. No primeiro deles ocorre a codificação de grande número de genes em uma região de fita única de DNA precedida por um segmento não-transcrito com de cerca de 1-13 kb chamada de região de trocas de fita (ou *strand switch* em inglês) que seria responsável por direcionar esta transcrição. Na outra extremidade dessa região em geral se inicia um segundo conjunto de genes, codificada no sentido oposto, e cuja transcrição também depende da mesma. A finalização da transcrição se dá ao final dos grupos onde co-localizam

genes para tRNA, rRNA e ou snRNA (Ivens *et al.*, 2005; revisto por Palenchar e Bellofatto, 2006). Em um segundo modo, a transcrição inicia-se a partir de pontos subteloméricos, em direção oposta para o centro do cromossomo (Myler *et al.*, 2000; Myler *et al.*, 2008) (figura 15).

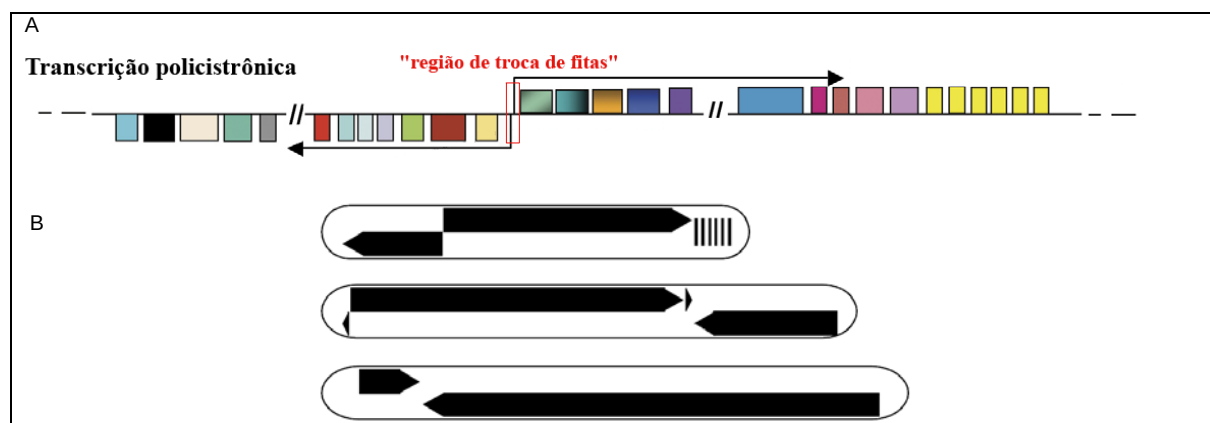


Figura 15. Transcrição policistrônica nos tripanossomatídeos. (A) Blocos gênicos (retângulos coloridos) estão agrupados em fitas distintas do DNA. A transcrição se inicia pela região de troca de fitas, ou por regiões subteloméricas, e os mRNAs precursores (setas pretas) são bidirecionalmente transcritos pela ação da RNAP II (modificado de Haile e Papadopoulos, 2007). (B) Exemplos de direcionamento da transcrição em sentido convergente ou divergente em diferentes cromossomos (modificado de Myler e Stuart, 2000).

Recentemente, foi constatado que, em *L. major*, a acetilação da histona H3 é encontrada em todas as regiões de troca de fita, em uma direção semelhante a do sentido da transcrição, sugerindo que esta acetilação representa o primeiro marcador para os locais da iniciação da RNAP II. A acetilação da histona funcionaria como um marcador de cromatina aberta, que torna regiões específicas do genoma disponíveis para ligação de complexos de iniciação da transcrição. As proteínas TBP (*TATA-binding protein*, ou proteína ligadora ao TATA) e SNAP₅₀ (*Small Nuclear Activating Protein*, ou pequena proteína de ativação nuclear) foram correlacionadas com acetilação da H3 na porção 5' dos conjuntos policistrônicos, sendo provável que a SNAP₅₀ tenha papel de fator de transcrição geral para destes parasitas, uma adaptação que seria única entre todos os eucariotos (Thomas *et al.* 2009).

Assim, o processo de transcrição mediado pela RNAP II gera mRNAs muito grandes, às vezes quase do tamanho do cromossomo inteiro (Myler e Stuart, 2000). Estes mRNAs precursores em seguida passam pelo processo de maturação onde os policistrons são divididos em unidades menores monocistrônicas, uma consequência de dois processos distintos: *trans-splicing* e a poliadenilação (Haile e Papadopoulou, 2007).

1.1.4.3 *Trans-splicing* em tripanossomatídeos

A maioria dos genes codificadores de proteínas eucarióticas apresenta uma estrutura interrompida, alternando éxons e íntrons. Após a transcrição, íntrons devem ser retirados do transcrito primário (pré-mRNA) para gerar um mRNA maduro traduzível. A excisão precisa dos íntrons e a união de éxons vizinhos é um processo complexo, chamado de *splicing*, e como esse tratamento ocorre em geral dentro de um único pré-mRNA, pode ser chamado de *cis-splicing* (Mayer e Floeter-Winter, 2005). No entanto a maturação dos mRNAs nos tripanossomatídeos difere do processo da maioria dos eucariotos, principalmente porque os genes que codificam proteínas são transcritos em policistrons e processados por um mecanismo bem diferente, o chamado *trans-splicing* ou processamento em *trans* (revisto por Liang *et al.*, 2003). Esse processamento existe em diversos organismos nos quais aparentemente se desenvolveu de forma independente durante a evolução (Douris *et al.*, 2009). No entanto somente os tripanossomatídeos possuem esse tipo de processamento em todos os mRNAs codificadores de proteínas (Mayer e Floeter-Winter, 2005).

Em 1982, um estudo da variação antigênica em formas infectantes de *T. brucei*, mostrou que todos os mRNAs para as VSGs possuíam uma sequência idêntica de 39 nucleotídeos na sua porção 5', ausente na vizinhança genômica correspondente das VSGs (Boothroyd & Cruz, 1982) porém codificada em um segmento distinto do genoma presente em aproximadamente 200 cópias iguais posicionadas em sequência (De Lange *et al.*, 1983).

Experimentos posteriores identificaram a mesma sequência em outros mRNAs de *T. brucei*, mostrando que a ocorrência não se restringe aos genes VSG, mas representava a adição de uma sequência líder em todos os mRNA desse parasita. Essa sequência também estava presente nos outros tripanosomatídeos e foi então denominada de *Spliced Leader* (SL) (De Lange *et al.* 1984; Parsons *et al.* 1984). Estudos de expressão mostraram que a transcrição das SL gerava um RNA de 135-147 nucleotídeos, que contém a sequência de 39 nucleotídeos líder na sua porção 5' (Milhausen *et al.*, 1984). Constatou-se que a sequência de 39 nucleotídeos era proveniente desse outro RNA, o RNA precursor da SL, e que ela era adicionada a todos os mRNAs dos tripanossomatídeos por *trans-splicing*. O RNA precursor da SL é constituído de uma estrutura formada por 3 alças, com um íntron de tamanho variável (dependente da espécie analisada) localizado após a sequência SL (revisto por Liang *et al.*, 2003; Mayer e Floeter-Winter, 2005).

O mecanismo de processamento em *trans* se dá através de reações de *trans*-esterificação, onde o sítio GU doador presente no RNA SL precursor funde-se a uma região próxima ao sítio AG aceptor do mRNA policistrônico, denominada de ponto de ramificação (normalmente uma adenosina), formando uma estrutura intermediária em forma de Y. Esse sinal é reconhecido pelo complexo de processamento (*spliceossomo*), as estruturas intermediárias são removidas e a sequência SL fusionada a extremidade 5' de cada mRNA. O sinal aceptor para o processamento no pré-mRNA propriamente é o dinucleotídeo AG quando localizado imediatamente após uma região rica em pirimidinas (Liang *et al.*, 2003) (figura 16).

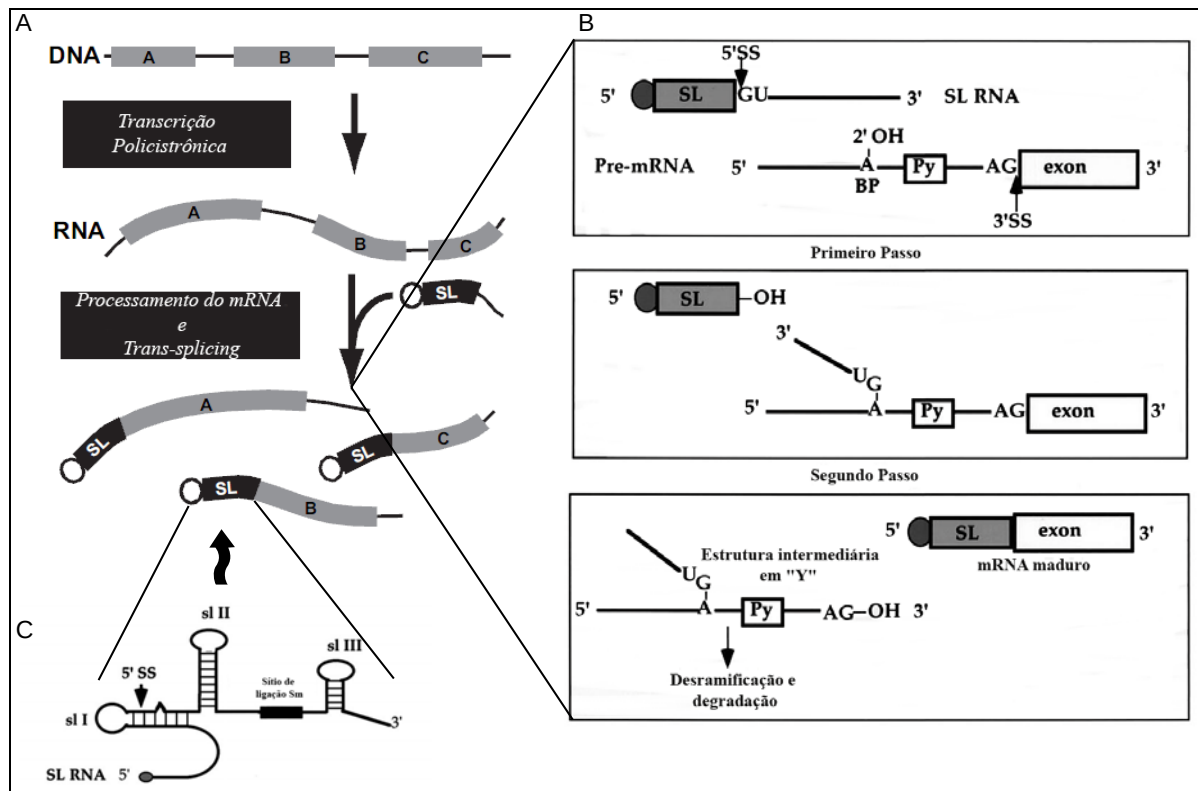


Figura 16. Maturação do mRNA dos tripanossomatídeos. (A) Após a transcrição, o policistron de mRNA é processado e aos mRNAs menores resultantes é adicionada a *Spliced Leader* (modificado de Lukes *et al.*, 2009). (B) Representação esquemática do *trans-splicing*, demonstrando os sítios aceptores de *splicing* da SL (5' SS, ou 5' splicing site, GU) e do mRNA (AG), ponto de bifurcação (BP) seguida do trato de polipirimidinas (Py). Ao final do processo a porção 5' do mRNA recebe a SL, caracterizando o mRNA maduro (Liang *et al.*, 2003). (C) Representação da estrutura secundária da SL. Mostrando as três estruturas em grampo (sl I, II e III), o sítio de ligação Sm, envolvido na maturação da SL (retângulo preto) e o cap (círculo cinza) (modificado de Liang *et al.*, 2003)

Em tripanossomatídeos, o processamento em *trans* parece ser acoplado à clivagem da região 3' e aos eventos de poliadenilação (LeBowitz *et al.*, 1993). Os sítios de poliadenilação estão localizados de 100 a 300 nucleotídeos antes do sítio de *tran-splicing* do mRNA subsequentemente presente no precursor policistrônico. Estas são as mesmas sequências polipirimidínicas (ricos em uridinas), que servem como sinais para o *trans-splicing* e que também parecem funcionar, na ausência de sinais típicos, na sinalização para poliadenilação (Clayton, 2002). Esse mecanismo de processamento é dependente do comprimento, composição e da posição do trato polipirimidínico. O tamanho ótimo detectado foi em torno de 25 nucleotídeos; tratos compostos unicamente de U e C foram cerca de 20 vezes mais

eficazes, enquanto os mesclados com purinas apresentaram uma diminuição no processamento e a posição do trato em relação a porção 3' do sítio de processamento também demonstrou ser de importância para a sua eficiência (Siegel *et al.*, 2005).

Posteriormente foi reportado que o mecanismo de *trans-splicing* de maturação dos mRNAs pode ocorrer em duas etapas. Sinais nas regiões intergênicas ou nas regiões não traduzidas dos mRNAs podem promover o escape dos mecanismos de *trans-splicing*/poliadenilação, gerando RNAs intermediários, como dicistrons e mRNAs com longas 3' UTRs, que só posteriormente sofreriam *trans-splicing* e poliadenilação e, finalmente, dariam origem aos mRNAs monocistrônicos maduros (Jager *et al.*, 2007).

Nos tripanossomatídeos, o processo de *trans-splicing* também serve para adicionar à extremidade 5' dos mRNAs maduros o nucleotídeo modificado, denominado de cap, característico dos eucariotos e que normalmente é adicionado aos mRNAs após sua transcrição. Nos tripanossomatídeos o *cap* já está presente na extremidade 5' da sequência SL, adicionado durante sua própria maturação, que precede sua utilização no *trans-splicing*, e é denominado de cap4 (Clayton e Shapira, 2007).

1.1.4.3.1 Estruturas *cap* e *cap4*

Durante a maturação do mRNA eucariótico há a adição de uma guanosina metilada na porção 5' de todos os mRNAs. Esta, também chamada de estrutura m⁷GTP *cap*, é posicionada de forma invertida em uma ligação 5'-5' com o nucleotídeo adjacente (Rottman *et al.*, 1974; Shatkin, 1976; Reddy *et al.*, 1992). Em eucariotos a modificação da porção 5' do mRNA ocorre bem cedo na transcrição, geralmente durante a polimerização dos primeiros 20 a 30 nucleotídeos (Orphanides e Reinberg, 2002). De leveduras aos humanos, essa modificação é necessária para a expressão eficiente dos genes e viabilidade celular. O cap é necessário para a tradução da maioria dos mRNAs e também está envolvido na estabilização

de mRNAs contra exonucleases, além de promover o processamento, poliadenilação e exportação nuclear dos mRNAs (revisado por Cowling, 2009).

A formação do cap ocorre quando o pré-mRNA substrato está sendo transcrito e é catalisada por enzimas que são recrutadas para a RNA polimerase II e que também promovem a elongação da transcrição. A adição do cap ocorre em três passos principais: (1) a enzima RNA 5'-Trifosfatase remove o primeiro fosfato do grupo trifosfato presente na porção 5' do transcrito nascente por hidrólise, gerando uma extremidade 5' no mRNA precursor do tipo pp(5')X (onde X pode ser qualquer nucleotídeo); (2) a enzima guanililtransferase acrescenta então a guanosina em uma posição invertida, em sentido 5'-5', por uma reação em dois passos onde inicialmente a guanililtransferase reage com o fosfato α do GTP, formando um intermediário enzima-GMP e liberando dois fosfatos, seguido da transferência do GMP da enzima para o pp(5')X, gerando o G(5')ppp(5')X; e (3) a guanosina é metilada pela enzima N⁷metiltransferase (Cougot *et al.*, 2004; Cowling, 2010). As guanililtransferases e metiltransferases do cap são conservadas em estrutura e modo de ação de leveduras a metazoários, enquanto as RNA 5'-Trifosfatases são completamente diferentes (Cowling, 2010).

Diferentes tipos de cap são encontrados em mRNAs, classificados de acordo com as modificações por metilação na guanosina invertida e nos nucleotídeos adjacentes dos mRNAs. Quanto às metilações na guanosina, as estruturas *cap* podem ser: (1) m⁷GpppN (com uma metilação) encontrada na maioria dos mRNAs; (2) m^{2,7}GpppN (com duas metilações) encontrada em alguns mRNAs; (3) m^{2,2,7}GpppN (com três metilações), encontrada em muitos snRNAs (RNAs pequenos nucleares) e em alguns mRNAs de nematódeos; e (4) mpppN (com metilação no grupo fosfato), também encontrada em alguns snRNAs. Quanto às 2'-O-metilações nos nucleotídeos adjacentes à guanosina invertida, as estruturas *cap* podem ser classificadas em: *cap0* (encontrado em leveduras, amebas e outros eucariotos mais simples), *cap1* (encontrado em snRNAs), *cap2* (encontrado nos mRNAs dos eucariotos

superiores) e **cap4** (característico dos tripanosomatídeos) (Reddy *et al.*, 1992; Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998) (figura 17).

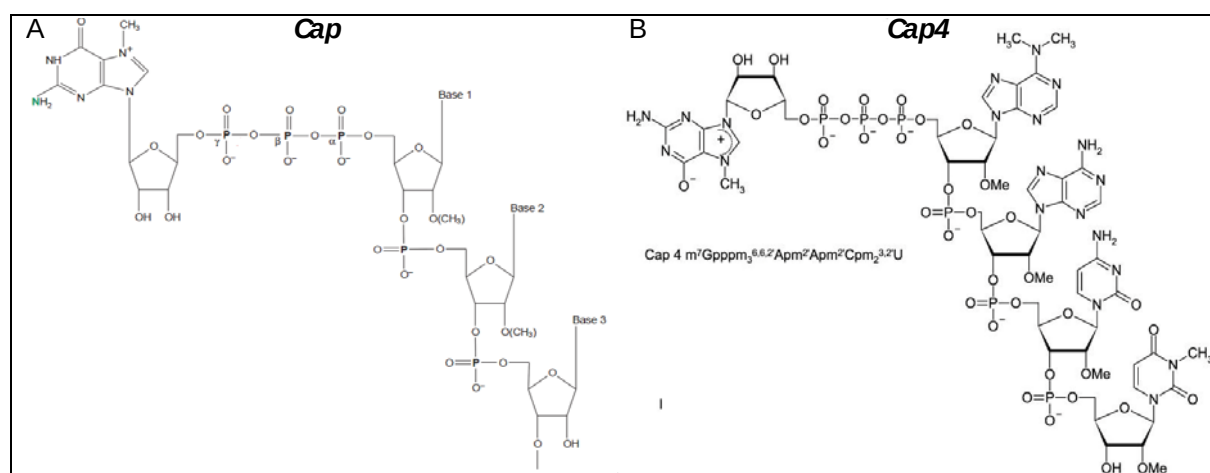


Figura 17. Estruturas do *cap* e *cap4*. (A) Estrutura química do *cap*, demonstrando os três fosfatos (nomeados α , β , e γ) ligando a guanosina invertida. (modificado de Cougot *et al.*, 2004). (B) Estrutura química do *cap4*, demonstrando as metilações nos quatro nucleotídeos adjacentes a guanosina invertida (modificado de Lewdorowicz *et al.*, 2004).

O *cap4* é característico da família Trypanosomatidae e, ao contrário dos demais eucariotos, a adição do cap ao mRNA ocorre em uma etapa pós-transcricional, quando a SL contendo o cap 4 é anexada ao mRNA (Mair *et al.*, 2000). A análise da estrutura da SL de *Crithidia fasciculata* e *T. brucei* revelou que na porção 5' terminal da SL o resíduo m7GTP adicionado é seguido por quatro nucleotídeos metilados, formando a estrutura: 7-metilguanosina(5')-ppp(5')-N⁶,N⁶,2'-O-trimetiladenosina-p-2'-O-metil-adenosina-p-2'-O-metilcitosina-p-N³-2'-O-dimetiluridina (Bangs *et al.*, 1992; Mair *et al.*, 2000).

A geração do *cap0* (que depois é metilado para se tornar o *cap4*) na sequência da SL é feita pela TbCet1, uma enzima trifosfatase e pela TbCgm1, uma enzima bifuncional com atividade de guanililtransferase e domínio metiltransferase (Ruan *et al.*, 2007; Takagi *et al.*, 2007). As metilações no *cap0* são feitas por três 2'-O-metiltransferases: TbMTr1, TbMTr2 e TbMTr3 (Zamudio *et al.*, 2007; Zamudio *et al.*, 2009). A TbMTr1 é uma metiltransferase de cap 1 que modifica o RNA SL e também o U1 snRNA (Zamudio *et al.*, 2007). Esta enzima

pertence a uma grande classe de metiltransferases eucarióticas não caracterizadas, com homólogos em humanos. Ela age com especificidade metilando o primeiro nucleotídeo da SL em *T. brucei* (Mittra *et al.*, 2008). As TbMTr2 e TbMTr3 desenvolveram capacidade de modificar especificamente os segundo e terceiro nucleotídeos, respectivamente. Elas são relacionadas a metiltransferases VP39 do *cap1* do vírus vaccinia (Arhin *et al.*, 2006a, Arhin *et al.*, b; Hall e Ho, 2006; Zamudio *et al.*, 2006) (figura 18).

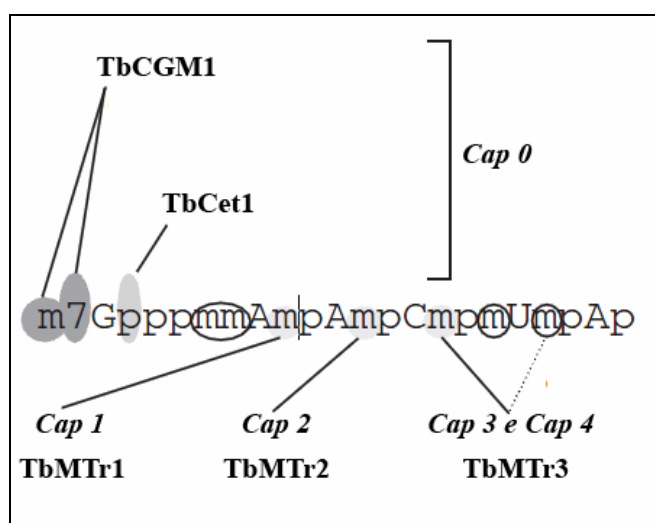


Figura 18. Representação dos sítios de ação das enzimas envolvidas na geração do cap4 (modificado de Mittra *et al.*, 2008).

Células com o gene para TbMTr1 deletado demonstraram um atraso no processamento de mRNAs e no crescimento, com o acúmulo de substratos SL com *cap0* e extensas porções 3', mas nível de tradução equiparado ao selvagem (Zamudio *et al.*, 2007); células sem gene para TbMTr2 se mostraram viáveis e possuíam mRNAs com SL sem modificação para *cap2* (Arhin *et al.*, 2006b); e células com deleção no TbMTr3 demonstraram falta de metilações no terceiro e quarto nucleotídeos, demonstrando que a TbMTr3 pode estar também envolvida na metilação do quarto nucleotídeo. Deleções nos TbMTr2/TbMTr3 resultaram na geração de RNAs *cap1* e não tiveram defeito na maturação 3', ao contrário do demonstrado pela deleção no TbMTr1, indicando um atraso em uma etapa distinta do processamento da SL ou no *trans-*

splicing. A ausência de cap 3 ou cap 4 levou a taxas reduzidas de tradução (Arhin *et al.*, 2006a; Zamudio *et al.*, 2006).

De uma forma geral, a presença do *cap4* é de extrema importância para os tripanosomatídeos. Estudos demonstraram que mRNAs com SL mutadas e *cap* não metilado não podem se associar aos polissomos, implicando o *cap 4* ou a sequência principal da SL na tradução (Zeiner., 2003).

1.1.4.4 Controle pós-transcricional da expressão gênica em tripanossomatídeos

Durante seu ciclo de transmissão, os tripanosomatídeos heteroxênicos precisam se adaptar rapidamente às diferentes condições dos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os mecanismos exatos da regulação da expressão gênica nestes organismos ainda não foram totalmente compreendidos, mas mudanças nos níveis de expressão das proteínas durante o desenvolvimento desses parasitas não são geralmente acompanhadas por mudanças equivalentes na transcrição. Os perfis de expressão gênica global durante o desenvolvimento destacam-se pelas várias centenas de genes diferencialmente regulados, onde 2 a 9% de todos são modulados em nível do RNA (presumivelmente através da estabilidade do mRNA) e entre 12 a 18% são regulados em nível de proteína (revisto por Haile e Papadopoulos, 2007). Desta forma, a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos pode ser efetuada por mecanismos pós-transcricionais como regulação do processamento, exportação e degradação dos mRNAs; e do controle da produção, modificação, transporte e degradação de proteínas (Stiles *et al.*, 1999; Clayton e Shapira, 2007).

A maturação dos transcritos por *trans-splicing* é dependente das sequências de polipirimidinas existentes nas regiões intergênicas. A eficiência dos sinais de processamento depende do tamanho e composição da sequência de polipirimidinas e das sequências das regiões 5' e 3' UTR correspondentes dos mRNAs (revisado por Clayton e Shapira, 2007). Outro modo de controle dos transcritos é mediado pela estabilidade dos mRNAs. Se a degradação é mais rápida do que o processamento do mRNA, o transcrito será pouco expresso. Um bom exemplo desse tipo de regulação pós-transcricional em tripanosomatídeos é observado na expressão do gene da fosfoglicerato quinase (PGK) de *T. brucei*. Existem três genes PGKs (PGKA, PGKB e o PGKC) que são co-transcritos pela RNA pol II. O mRNA do gene PGKA está sempre presente em um nível baixo por causa de um processamento pouco efetivo. O PGKB é específico da fase procíclica, e o PGKC da fase sanguínea do parasita. O controle da expressão tanto do PGKB quanto do PGKC é atribuído a regiões 3' UTRs distintas nesses genes, onde estão localizados elementos *cis* e *trans* que regulam a sua expressão diferencial nos dois estágios (revisado por Clayton, 2002; Clayton e Shapira, 2007).

O modelo atual de degradação do mRNA em tripanosomatídeos envolve duas vias. A primeira via, chamada de via regulada. Esta via é limitada para mRNAs estágio-específicos instáveis e, assim como em células de mamíferos, é afetada pelo exossomo ou pela exonuclease 5'-3' XRNA. A segunda via ocorre no sentido 3'-5' e é constitutiva, dependente de deadenilação e opera em uma cinética mais lenta durante a degradação de mRNAs estáveis e, provavelmente, uma subpopulação de mRNAs instáveis (revisado por Haile e Papadopoulos, 2007).

Nos mamíferos, a rápida degradação de mRNAs que codificam para citocinas ou reguladores do ciclo celular é crítico na regulação da resposta imune e do crescimento celular. Estes mRNAs contêm elementos ricos em AU (*AU-rich elements* – AREs) nas suas regiões 3'-UTRs. Os AREs são reconhecidos por proteínas reguladoras que estabilizam ou desestabilizam o mRNA por inibirem ou promoverem a deadenilação. Assim mRNAs que

contêm AREs podem ser degradados nas direções 3'-5' e 5'-3' (Stoecklin *et al.*, 2006). Em *T. cruzi* e *T. brucei*, foram identificadas AREs na região 3'UTR dos genes que codificam para mucina (SMUG) e para a proteína procíclica estágio-específica EP, respectivamente (Di Noia *et al.*, 2000; D'Orso e Frasch, 2001a; Irmer e Clayton, 2001). Estas seqüências atuam no processo de desestabilização dos mRNAs, em determinada fase do ciclo de vida do parasita, sendo reconhecidas diferencialmente por fatores protéicos específicos (D'Orso e Frasch, 2001b). Seqüências regulatórias ricas em G (GREs) também foram identificadas na região 3'UTR no gene SMUG, que favorecem a estabilização de seu mRNA de forma estágio-específica (D'Orso e Frasch, 2001b).

Em *Leishmania* foi identificada uma região 3' UTR conservada, de 450 nucleotídeos, também envolvida na regulação de expressão gênica estágio-específica, sendo ativada na forma amastigota intracelular do parasita (Boucher *et al.*, 2002). Adicionalmente, em *L. major* foram identificadas em regiões 3'-UTR de mRNAs duas classes de pequenos retroposons (SIDERs – *Short Interspersed Degenerated Retroposons*) (Bringaud *et al.*, 2007). O SIDER1 participa na regulação estágio-específica de alguns mRNAs em *L. major*, como por exemplo o mRNA da amastina, e foi demonstrado que o SIDER2 pode ter um papel geral da degradação de mRNAs, provavelmente participando em uma modulação global da expressão gênica (revisto por Haile e Papadopoulos, 2007). Mesmo com avanços no entendimento do controle da expressão em tripanosomatídeos, muito ainda está para ser esclarecido. O controle da tradução é provavelmente extremamente importante nesses organismos e a sua compreensão é um ponto crucial para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares desses organismos (Clayton, 2002; Clayton e Shapira, 2007).

1.2. Fatores de iniciação de tradução

1.2.1. O processo de síntese protéica *cap* dependente em eucariotos

O processo de síntese protéica constitui um dos eventos essenciais para a sobrevivência de todos os seres vivos. Ele representa o passo final para a via de expressão gênica, mediando a formação do proteoma a partir da informação genômica. Em comparação com a regulação da transcrição, o controle da tradução permite mudanças mais rápidas na concentração celular de proteínas e, portanto, pode ser usado para a manutenção fina da homeostase (Gebauer e Hentze, 2004; Sonenberg e Hinnenbusch, 2009). O processo de tradução eucariótico *cap* dependente pode ser dividido em iniciação, elongação, terminação e reciclagem dos ribossomos (Sonenberg e Hinnenbusch, 2009). Dentre as etapas de controle, a mais importante e mais estudada é a iniciação da tradução, pois enquanto a elongação e a terminação são assistidas por uma limitada quantidade de proteínas, a iniciação da tradução é regulada por mais de 25 polipeptídeos, denominados conjuntamente de Fatores de Iniciação Eucarióticos (eIFs-“eukaryotic initiation factors”) (Hershey e Merrick, 2000).

Nos eucariotos, após a transcrição e processamento no núcleo, o mRNA maduro caracteriza-se por possuir na sua extremidade 5' o *cap* e na extremidade 3' a cauda poli-A, sequência de poli-adeninas adicionada pós-transcricionalmente. Esse mRNA maduro é então exportado para o citoplasma, quando deve ser reconhecido pelos eIFs para só então se associar ao ribossomo para a tradução. Os eIFs podem ser compostos por diversas subunidades e isoformas. Até o momento foram identificados, em mamíferos, seis grupos de fatores de iniciação: eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5 e eIF6. Eles atuam em um processo altamente regulado onde a ausência de apenas um é suficiente para diminuir ou até mesmo impedir a síntese protéica (revisado por Hershey e Merrick, 2000).

Na iniciação da tradução os fatores eIF1, eIF1A, e eIF3 inicialmente promovem a dissociação dos ribossomos inteiros (80S) nas suas duas subunidades, maior (60S) e menor

(40S). Os mesmos fatores, juntamente com o eIF5, o complexo ternário formado por eIF2-GTP-Met-tRNA_i (este último indicanto o tRNA iniciador ligado a metionina) e a subunidade menor ribossomal 40S, formam o complexo de pré-iniciação 43S. Cocomitantemente o mRNA é ativado pela ligação do complexo eIF4F, formado pelos fatores eIF4E, eIF4G e eIF4A ao cap, evento reforçado pela ligação da PABP (proteína ligadora da cauda poli-A) à cauda de poli-adeninas do mesmo mRNA, o que provoca sua circularização *in vitro*. O complexo de pré-iniciação 43S recruta o mRNA ativado, através das interações do eIF3/eIF5 com a subunidade eIF4G e também com o eIF4B (parceiro do complexo eIF4F). Em seguida ocorre o “rastreamento ribossomal” (ou *scanning*) para localizar o códon de iniciação AUG em uma reação dependente de ATP. A ligação do complexo 43S ao códon AUG do mRNA ocorre através do pareamento deste com o tRNA iniciador, resultando na formação do complexo 48S. Nesta etapa, os fatores eIF1 e eIF5 garantem o correto início da tradução ao facilitar o reconhecimento do códon de iniciação AUG pelo Met-tRNA_i (revisado por Preiss e Hentze, 2004). O reconhecimento do AUG provavelmente desencadeia mudanças conformacionais que levam a dissociação do eIF1 da subunidade 40S, a hidrólise do GTP ligado ao eIF2 estimulada pelo eIF5 e o recrutamento da subunidade ribossomal 60S, reestruturando a unidade ribossomal 80S e liberando os demais fatores de iniciação. Ocorre então o posicionamento do tRNA_i no sítio P do ribossomo para o início da síntese protéica propriamente dita, pela adição seqüencial dos demais aminoácidos na fase de elongação (revisado por Gebauer e Hentze, 2004; Sonenberg e Hinnenbusch, 2009) (figura 19).

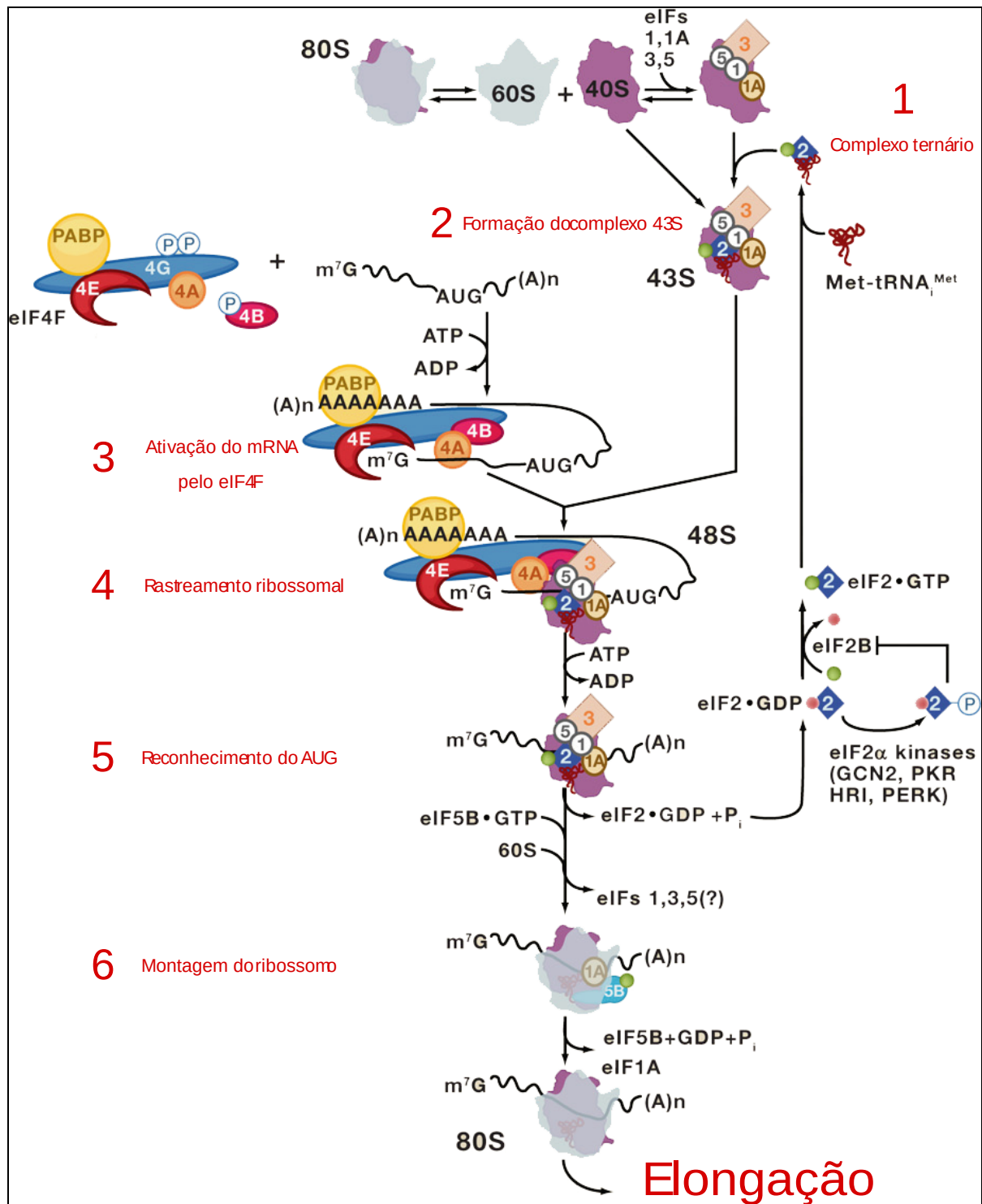


Figura 19. Esquema do processo de iniciação da tradução em eucariotos. Primeiro ocorre a (1) formação do complexo ternário composto pelo $\text{GTP-tRNA}_{\text{Met}}\text{-eIF2}$, em seguida há a associação deste a subunidade ribossomal 40S e (2) formação do complexo 43S. Ao mesmo tempo há o (3) reconhecimento do mRNA pela ligação do complexo eIF4F e, em seguida o (4) rastreamento ribossomal (*scanning*) e formação do 48S. Depois há o (5) o reconhecimento do códon de iniciação AUG e, por fim, ocorre a (6) montagem do ribossomo pela associação da subunidade ribossomal 60S, culminando na dissociação dos fatores de iniciação e início da fase de elongação (modificado de Sonenberg e Hinnebusch, 2009).

Dentre todos os fatores relacionados com a iniciação da tradução podemos destacar os do complexo eIF4F, formado pelas subunidades polipeptídicas eIF4A, eIF4E e eIF4G, e ainda auxiliado pelos fatores eIF4B, eIF4H e pela PABP. Este complexo é um dos principais responsáveis pela etapa de reconhecimento do mRNA pelo ribossomo, especialmente mediado pela interação direta do fator **eIF4E** com a estrutura cap presente em todos os mRNAs maduros (Gingras *et al.*, 1999).

1.2.2. eIF4E – a proteína de ligação ao cap

Em 1978 uma proteína citoplasmática de 24 kDa foi encontrada em experimentos de *cross-linking* com um análogo de m⁷GTP cap e foi designada proteína ligante ao cap de 24kDa (ou CBP I) do Complexo de Ligação ao Cap (Sonenberg *et al.*, 1978), posteriormente denominada eIF4E. Esta proteína estava diretamente envolvida na tradução no estágio de iniciação, e quando purificada por cromatografia de afinidade era isolada juntamente com duas proteínas de peso molecular de aproximadamente 50 e 200 kDa, depois identificadas como eIF4A e eIF4G, respectivamente (McKendrick *et al.*, 1999).

A iniciação da tradução na maioria dos mRNAs celular é mediada por um mecanismo cap-dependente, ou seja, o recrutamento dos mRNAs é mediado pelo reconhecimento da sua estrutura cap pelo complexo eIF4F, também conhecido como complexo de ligação ao cap. Além do eIF4E, participam neste complexo a RNA helicase eIF4A e o eIF4G, que atua como um estruturador do complexo atuando no recrutamento do mRNA para a subunidade 40S ribossomal através de sua interação com o eIF3 (Goodfellow e Roberts, 2008). O reconhecimento do cap é mediado diretamente pelo eIF4E (von der Haar *et al.*, 2000).

Comparações das seqüências do eIF4E de vertebrados com plantas e *Saccharomyces cerevisiae*, juntamente com análises de supressão em *S. cerevisiae* e no peixe *Danio rerio* (Ordem: *Cypriniformes*, Família: *Cyprinidae*), sugerem que as porções N e C-terminal de

eIF4E são dispensáveis para a tradução e que o núcleo do eIF4E, representado por cerca de 170 aminoácidos (dos resíduos His-37 ao His-200, números equivalente ao homólogo de humanos), é suficiente para a ligação com a estrutura cap e o eIF4G (Vasilescu *et al.*, 1996; Robalino *et al.*, 2004) (figura 20). No entanto as porções N- e C-terminal podem estar envolvidas na regulação da sua atividade (Scheper *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2003) ou afetar a estabilidade da proteína (Joshi *et al.*, 2005).

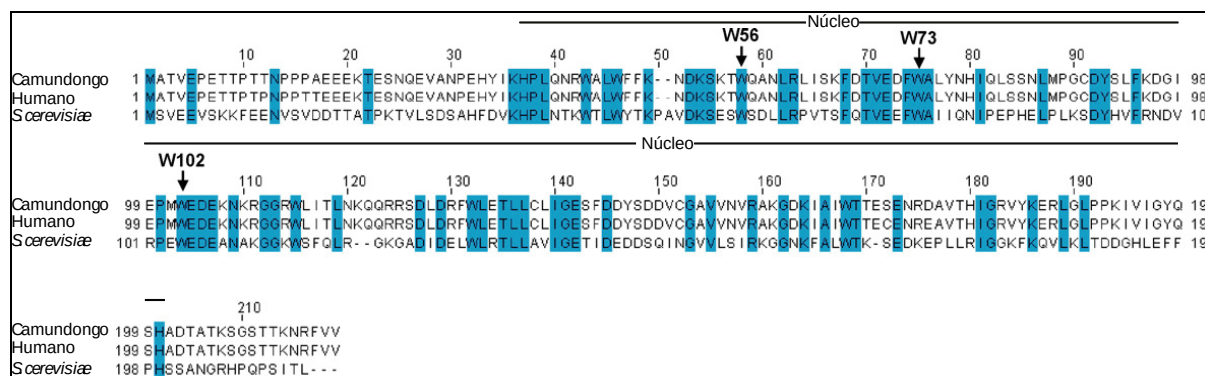


Figura 20. Alinhamento de três homólogos ao eIF4E (de camundongo, humano e de *S. cerevisiae*), destacando o “núcleo” central conservado na família eIF4E assim como os resíduos característicos Trp56, Trp73 e Trp102 conservados (modificado de Goodfellow e Roberts, 2008).

1.2.2.1 - Família de proteínas eIF4E

O eIF4E foi inicialmente assumido como a uma única proteína, mas posteriormente foram descobertos outros homólogos do eIF4E em diversos organismos, como dois homólogos em *Triticum vulgare* (Browning *et al.*, 1987); três no vegetal *Arabidopsis thaliana* (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998), cinco no nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Keiper *et al.*, 2000), dois em *Schizosaccharomyces pombe* (Ptushkina *et al.*, 2001), três em *Homo sapiens* (Joshi *et al.*, 2004) e oito em *Drosophila* (Hernandez *et al.*, 2005), entre outros. Hoje é reconhecido que praticamente todos os eucariotos expressam vários membros da família de proteínas eIF4E, e estes podem ter diferentes funções na célula. Membros da família eIF4E estão envolvidos no (1) recrutamento de mRNAs ao ribossomo, (2) como repressores de

tradução ou (3) atuando na tradução de mRNAs específicos através da interação com diferentes parceiros protéicos (Rhoads, 2009).

Joshi *et al.* (2005) identificaram 411 membros da família eIF4E em 230 espécies. Através da análise da conservação dos resíduos de triptofanos conservados no núcleo das proteínas eles chegaram ao consenso H(X₅)W(X₂)W(X₈₋₁₂)W-(X₉)F(X₅)FW(X₂₀)F(X₇)W(X₁₀)W(X₉₋₁₂)W(X₃₄₋₃₅)W(X₃₂₋₃₄)H para representar as proteínas dessa família. Os autores avaliaram estas proteínas e puderam separá-las em três classes de acordo com a conservação dos resíduos de triptofano Trp43 e Trp56 do homólogo eIF4E-1 de humanos: eIF4E Classe I são os membros que possuem resíduos Trp em ambas as posições; eIF4E classe II são os membros que possuem tirosina, fenilalanina ou leucina na primeira posição e Tirosina ou fenilalanina na segunda posição; e eIF4E classe III, que contém triptofano na primeira posição e cisteína ou tirosina na segunda.

Um eIF4E “verdadeiro” deve se ligar ao *cap* e ao eIF4G (ou, alternativamente, às 4E-BPs, descritas mais adiante), no entanto a capacidade de ligação de vários outros membros não é necessariamente conservada. Por exemplo, eIF4E-1 de mamíferos (classe I) liga-se ao *cap*, eIF4G, e as 4E-BPs, mas o eIF4E-2 de mamíferos (classe II) liga-se apenas ao *cap* e 4E-BPs, e o eIF4E-3 de mamíferos (Classe III) liga-se apenas ao *cap* e eIF4G (Joshi *et al.*, 2004). Já o eIF4E-1B (classe I) de *Danio rerio* é incapaz de interagir com os três ligantes (Robalino *et al.*, 2004). Em *A. thaliana*, o nCBP (classe II) liga ao m⁷GTP mais firmemente que o eIF(Iso)4E (classe I). O nematódeo *C. elegans* possui cinco isoformas funcionais de eIF4E (IFE1 a 5) e duas formas distintas de *cap* nos seus mRNAs (monometilado- m⁷GTP; e trimetilado- m^{32,2,7}GTP) (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998; Keiper *et al.*, 1999). O IFE-3 (classe I) e o IFE-4 (classe II) reconhecem apenas o *cap* monometilado; o IFE-1 (classe I), o IFE-2 (classe I) e o IFE-5 (classe I) se ligam a ambas estruturas (Keiper *et al.*, 1999; Miyoshi *et al.*, 2002), demonstrando uma seletividade funcional para diferentes tipos de mRNAs.

Esses ganhos e perdas nas propriedades de ligação fornecem pistas para as funções fisiológicas dos membros da família eIF4E, independentemente da classe em que se encontram. As características particulares de cada proteína adquiridas evolutivamente em cada organismo definem a participação destes no estímulo ou repressão da tradução. Provavelmente um único gene eIF4E ancestral sofreu duplicações gerando múltiplas classes estruturais de funções diversas, de tal forma que não é possível prever a função deles a partir da sequência primária de aminoácidos (Joshi *et al.*, 2005).

1.2.2.2 - Estrutura do eIF4E

A estrutura do núcleo eIF4E assemelha-se a uma mão fechada com o segmento responsável pelo reconhecimento do cap localizado na face côncava, através da ação de dois resíduos de triptofano altamente conservados. As estruturas terciárias dos eIF4Es de camundongos, de levedura, de humanos e de trigo são formadas por oito folhas- β antiparalelas e três longas α -hélices no lado convexo. O sítio de ligação ao cap está localizado na cavidade hidrofóbica do eIF4E entre dois dos oito resíduos de triptofano conservados (W56 e W102 do eIF4E-1 de camundongos e W58 e W104 de levedura), situados próximo das partes superior e inferior das margens dessa cavidade. Quando ligado ao *cap*, a guanosina é empacotada pelos dois triptofanos e imobilizada no local por interações entre os sistemas de anéis dos três componentes por um processo denominado “ π - π stacking” (ou empacotamento). Um forte efeito estabilizador é associado à presença do grupo metil, que induz uma carga positiva aumentando a interação de empacotamento. Adicionalmente o *cap* é estabilizado dentro da cavidade do eIF4E por várias ligações de *van der Waals* (mediadas pelos resíduos W166 e E103, sempre números do homólogo eIF4E-1 de mamíferos), além de pontes de hidrogênio (E103) e interações eletrostáticas (R112, R157 e R162) com os três grupos fosfatos e a ribose do análogo do cap (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Tomoo *et al.*, 2002; Niedzwiecka *et al.*, 2002).

Adicionalmente, a maioria dos parceiros do eIF4E identificados, incluindo o eIF4G e as 4E-BPs, ligam-se através da face convexa do eIF4E, com a participação do W73 (figura 21).

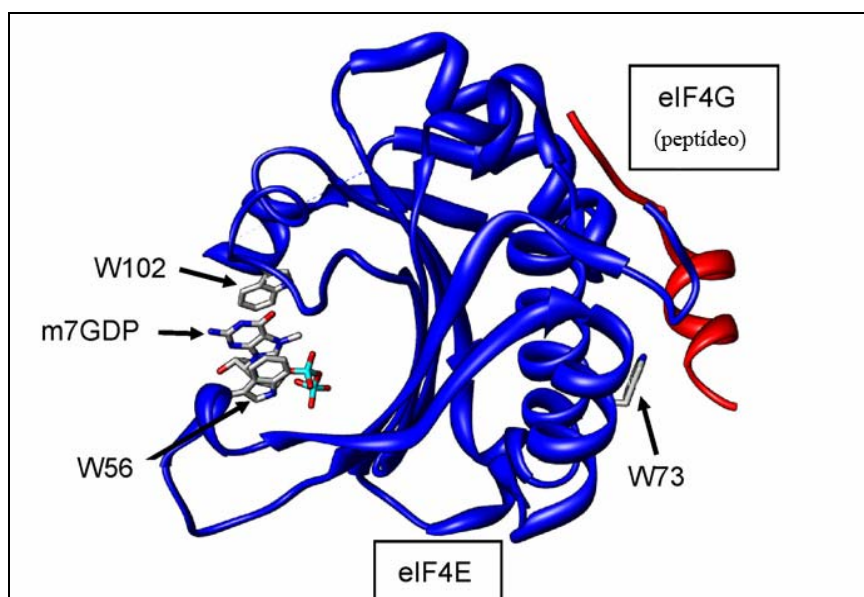


Figura 21. Representação gráfica demonstrando a interação do eIF4E (de camundongo) com a estrutura cap dos mRNAs, em destaque os resíduos W56 e W102, responsáveis pelo *stacking* do *cap* e seus análogos (m7GDP, destacado em banco, azul e vermelho) e o W73 envolvido na ligação ao eIF4G (peptídeo, parte destacada em vermelho) e 4E-BPs (modificado de Goodfellow e Roberts, 2008).

1.2.2.3 - Parceiros do eIF4E

A primeira proteína descoberta como parceira do eIF4E foi o eIF4G, quando o eIF4E foi redefinido como uma subunidade de um novo fator de iniciação em mamíferos, denominado eIF4F. Posteriormente foi demonstrado que o eIF4E pode se ligar a outras proteínas, além do eIF4G, como aquelas denominadas de 4E-BPs ou proteínas ligantes ao 4E (*4E-binding proteins*), responsáveis pela regulação da atividade do eIF4E (Pause *et al.*, 1994; Poulin *et al.*, 1998). Desde então o número de parceiros conhecidos do eIF4E tem crescido substancialmente. Muitos dos novos papéis do eIF4E que foram descobertos são mediados por sua interação com esses novos parceiros (tabela 2), alguns deles descritos mais adiante.

Tabela 2. Relação das proteínas que interagem com membros da família eIF4E (modificado de Rhoads *et al.*, 2009).

Proteína	Função
eIF4G	Recrutamento do eIF4A, eIF4E, eIF3 e PABP para a maquinaria de tradução
4E-BP	Repressão da tradução cap dependente
p20	Repressão da tradução cap dependente em <i>S. cerevisiae</i>
Maskin	Repressão da tradução de mRNAs com CPE (elemento de poliadenilação citoplasmático)
4E-T	Transporta o eIF4E para o núcleo
Lipoxigenase 2	Regula a atividade por competir com a ligação do eIF4E com o 4eIFG
Vpg	Reduz a afinidade do eIF4E pelo cap
PGL-1	Dirige o IFE-1 (<i>C. elegans</i>) para os grânulos de processamento
Cup	Repressão dos mRNAs <i>nanos</i> e <i>Oskar</i> em <i>Drosophila</i>
Bicoid	Repressão dos mRNAs caudais em <i>Drosophila</i>
BTF3	Regula a atividade por competir com a ligação do eIF4(Iso)4E com o eIF4(Iso)4G
Brat	Repressão dos mRNAs costais (<i>hunchbacks</i>) em <i>Drosophila</i>
Gemin5	Repressão da tradução cap dependente e via IRES
Neuroguidin	Repressão da tradução de mRNAs com CPE (elemento de poliadenilação citoplasmático)
CYFIP1	Repressão da tradução de mRNAs que se ligam a FMRP (proteína de retardo mental do X-frágil)

1.2.2.3.1 - eIF4G

O fator de iniciação da tradução eIF4G é a proteína organizadora central do complexo eIF4F no recrutamento do mRNA durante a iniciação da tradução. Os vários homólogos do eIF4G descritos até hoje compreendem uma família protéica de isoformas com discreta homologia e propriedades bioquímicas semelhantes (Keiper *et al.*, 1999). Dentre os homólogos ao eIF4G caracterizados atualmente destacam-se, dois homólogos em humanos (eIF4GI de 220 kDa e eIF4GII), dois descritos em plantas (eIF4G e eIFiso4G) e dois em levedura (TIF4631 e TIF4632) (revisado por Prévôt *et al.*, 2003).

Estruturalmente o eIF4GI pode ser dividido em três domínios: (1) o domínio N-terminal (resíduos nas posições 1-634 do homólogo de mamíferos), onde estão localizados os sítios de ligação ao eIF4E e à PABP; (2) o domínio central (resíduos de 635-1065, do homólogo de mamíferos), onde estão localizados os sítios de ligação ao RNA, ao eIF4A e ao eIF3 e onde está localizado o domínio conservado HEAT (*Huntington, Elongation 3, A subunit of protein phosphatase 2a, Target of rapamycin*); e (3) o domínio C-terminal, ausente em levedura, que contém um segundo sítio de ligação ao eIF4A e um sítio de ligação à quinase Mnk1 (revisado por Prévôt *et al.*, 2003) (figura 22).

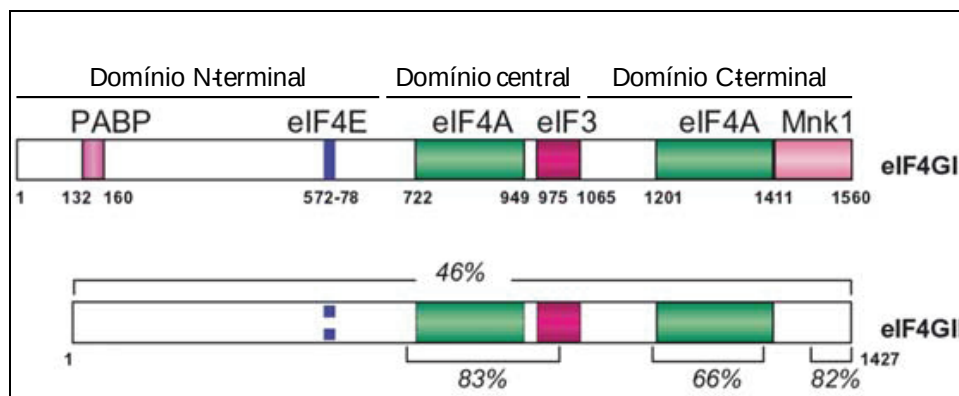


Figura 22. Representação da estrutura do eIF4GI e eIF4GII humanos, mostrando a posição dos sítios de ligação a PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3, e Mnk (modificado de Prévôt *et al.*, 2003).

O sítio de ligação ao eIF4E no eIF4G consiste em um pequeno motivo YXXXXLΦ (onde X pode ser um aminoácido qualquer e Φ usualmente é uma leucina, mas pode também ser uma metionina ou fenilalanina), que é altamente conservado nos eIF4Gs de levedura, *Drosophila*, plantas e mamíferos. Estudos *in vitro* mostraram que a afinidade do eIF4E pelo cap aumenta cerca de 10 vezes quando este está ligado ao eIF4G (Haghighat *et al.*, 1996), estimulando a tradução cap-dependente. Isto pode ser explicado pelo fato do eIF4G, quando ligado ao eIF4E, produzir mudanças conformacionais no eIF4E que aumentam a afinidade pelo cap, através da ligação do segmento compreendendo os resíduos 393 a 490 do eIF4G com a parte N-terminal do eIF4E (Gross *et al.*, 2003; Pestova e Hellen, 2003). O aumento da atividade do complexo pode ser também atribuído à capacidade do eIF4G de se ligar diretamente ao mRNA via RRM do eIF4G (Yanagiya *et al.*, 2009), o que pode estabilizar o complexo na estrutura do mRNA (Prévôt *et al.*, 2003).

Estudos independentes com eIF4Es mutantes de levedura e de murinos identificaram um epitopo necessário no eIF4E para a ligação com o eIF4G, formado pelos resíduos 71 a 75 e 139, que originam as hélices 1 e 2 do eIF4E. Tais resíduos encontram-se em uma porção distal ao sítio de ligação ao cap e não estão envolvidos na ligação entre o eIF4E e o cap (Ptushkina *et al.*, 1998; Marcotrigiano *et al.*, 1999). Estudos subsequentes em leveduras

demonstraram que a extremidade N-terminal da estrutura do eIF4E (resíduos 23 a 38) está envolvida por uma estrutura em forma de bracelete de cinco hélices formada pelo segmento ligante do eIF4G (resíduos 393-490), o que promove um aumento na associação do complexo ao cap, sendo necessária para o crescimento ótimo e associação com polissomos *in vivo* (Pestova e Hellen, 2000; Gross *et al.*, 2003) (figura 23). Deleções nesta extremidade do eIF4E reduzem a capacidade de ligação com o eIF4G *in vitro*, de modo que o contato da parte N-terminal do eIF4E é crucial para a conformação e interação deste com o eIF4G (von der Haar *et al.*, 2004). Foi mostrado também que a interação entre o eIF4E e o eIF4G depende do domínio correspondente à sequência V-E-X-X-W encontrada na extremidade aminoterminal do eIF4E (Ptushkina *et al.*, 1998).

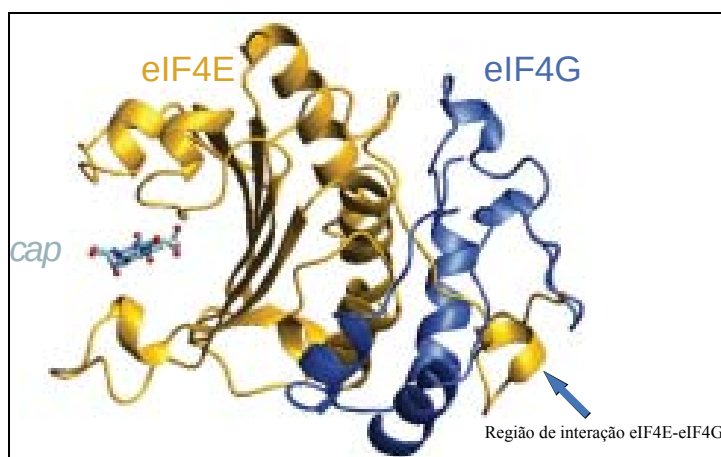


Figura 23. Representação gráfica da conformação da guanosina na cavidade do eIF4E (em amarelo) e ligação com eIF4G (resíduos 393-490 em azul), demonstrando a independência dos dois sítios de ligação (von der Haar *et al.*, 2004).

1.2.2.3.2 – 4E-BPs

As 4E-BPs são proteínas repressoras da tradução que se ligam ao eIF4E. Essa ligação impede a ligação do eIF4E com o eIF4G, o que priva o eIF4E da participação no complexo de iniciação 48 S, inibindo a tradução dos mRNAs de maneira cap dependente. Recentemente foi demonstrado que uma fração em torno de 30% da 4E-BP1 está localizada no núcleo, e em células submetidas à privação de soro ou tratamento com rapamicina, essa fração de 4E-BP nuclear atua seqüestrando o eIF4E, mantendo-o no núcleo e possivelmente controlando a liberação do eIF4E para o citoplasma, possivelmente ligado a mRNAs (Rong *et al.*, 2008).

Embora não exista um homólogo estrutural em leveduras para as 4EBP's, uma proteína que também se liga ao eIF4E denominada p20 foi encontrada. Essa proteína não apresenta homologia com as 4EBP's exceto pela presença do sítio de ligação ao eIF4E e possui a capacidade de inibir a tradução cap dependente. A sua superexpressão resulta em crescimento lento e sua deleção estimula o crescimento em cultura (Altmann *et al.*, 1997). Assim aparentemente o mecanismo de controle da atividade do eIF4E via inibição da sua interação com o eIF4G evoluiu independentemente em leveduras e animais (Raught e Gingras, 1999).

1.2.2.3.3 – Maskin

A proteína Maskin participa de um mecanismo seletivo de repressão da tradução em *Xenopus leavis*. Os oócitos de *Xenopus* em progressão meiótica contêm mRNAs maternos transcritos durante a oogênese e que são silenciados por um mecanismo que envolve a manutenção de pequenas caudas poli(A). Pelo menos em alguns mRNAs, como o mRNA *c-mos*, a ativação da tradução é acompanhada por um aumento de caudas via poliadenilação citoplasmática. Este processo envolve a interação entre um elemento regulador, o CPE

(*Cytoplasmic Polyadenylation Element*), na 3'UTR de mRNAs afetados, onde a proteína CPEB se liga reprimindo ou ativando aquele mRNA e regulando sua poliadenilação. Durante a repressão a CPEB se liga a Maskin, que por sua vez se liga ao eIF4E, impedindo a interação deste com o eIF4G. A exposição do oócito a progesterona desencadeia uma cascata de sinais que fosforilam a CPEB, o que provoca a liberação da poliadenilação pela CPSF (*Cleavage Polyadenylation Specificity Factor*) e o desligamento da Maskin do eIF4E, permitindo o início da tradução dos mRNAs correspondentes (revisto por Rhoads, 2009) (figura 24).

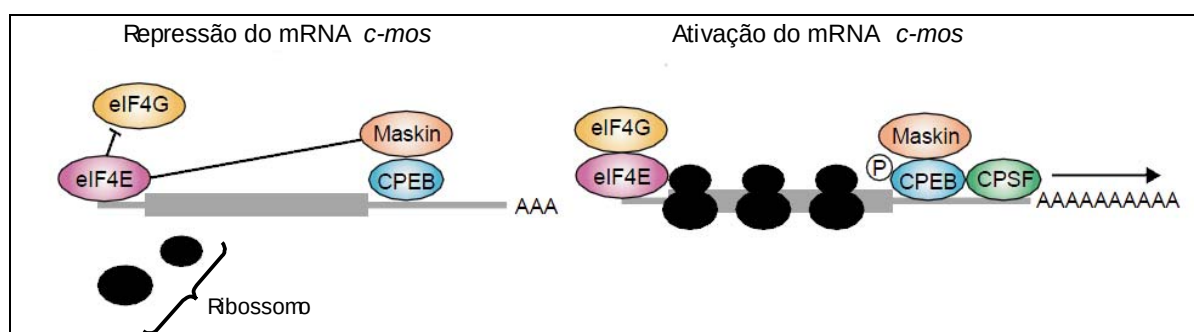


Figura 24. Representação da interação entre a proteína Maskin e o eIF4E na repressão do mRNA *c-mos* do oócito de *Xenopus leavis* (modificado de Macdonald *et al.*, 2001).

1.2.2.3.4 – Cup

Durante a ovogênese e embriogênese em *Drosophila*, a proteína Cup desempenha papel crucial no controle da tradução e localização de mRNAs específicos. Esta proteína também parece ser necessária para a localização adequada e acumulação do eIF4E na extremidade posterior do ovócito. Ela atua como competidor do complexo eIF4F porque possui o mesmo sítio de ligação ao eIF4E existente no eIF4G (YXXXXLΦ). Esta proteína é encontrada associada a mRNAs específicos, que são transportados durante a oogênese e cuja tradução é controlada (como os mRNAs Oskar e o nanos de *Drosophila*). Dessa forma a proteína Cup coordena a localização e tradução desses mRNAs durante ovogênese, resultando

em produtos protéicos distribuídos assimetricamente dentro do ovócito (revisto por Piccioni *et al.*, 2005).

1.2.2.3.5 – 4E-T (4E-transportador)

O 4E-T (4E-transportador) interage com eIF4E através do mesmo motivo conservado de reconhecimento do eIF4E (YXXXXLΦ) encontrado em eIF4G e 4E-BP. O 4E-T é uma proteína carregadora núcleo-citoplasmática que atua na importação nuclear do eIF4E através da via importina α/β e é regulado por uma quinase específica, a C1K/Sty (Dostie *et al.*, 2000a; Dostie *et al.*, 2000b). Uma vez no núcleo, o eIF4E é retido e liberado em um mecanismo dependente de 4E-BP (Rong *et al.*, 2008). A quantidade de eIF4E nuclear varia entre 12 a 68% do total, e concentra-se em cerca de 10 a 20 corpúsculos por núcleo (revisado por Culjkovic *et al.*, 2007; Goodfellow e Roberts, 2008). No núcleo o eIF4E ainda interage com proteínas que possuem domínios estruturais específicos que regulam sua ligação ao cap e inibem a exportação de mRNAs (Dostie *et al.*, 2000b, Culjkovic *et al.*, 2005). Cerca de 200 proteínas contêm domínios estruturais quem podem ser locais de ligação ao eIF4E e talvez estas possam desempenhar um papel na regulação do eIF4E, no crescimento e diferenciação celular (revisado por Culjkovic *et al.*, 2007). O 4E-T também atua transportando eIF4E ligado a mRNAs para os *P-bodies*, corpúsculos citoplasmáticos responsáveis pela estocagem e degradação de mRNAs, e assim participa no controle da transição, entre inibição da tradução e degradação dos mRNAs (Ferraiuolo *et al.*, 2005; Eulalio *et al.*, 2007).

1.2.2.4 – Controle da atividade do eIF4E

O eIF4E é um fator essencial para a estabilidade do complexo eIF4F na ligação ao cap (von der Harr *et al.*, 2000) e é limitante na célula. Seus níveis são relativamente baixos em lisados de reticulócitos de coelho (Goss *et al.*, 1990) e células HeLa (Duncan *et al.*, 1987). O eIF4E aparentemente participa de forma crucial no controle do ciclo celular (Strudwick e Borden, 2002), sua superexpressão causa perda deste controle (De Benedetti e Rhoads, 1990) e está associada a uma série de tumores humanos (De Benetti e Harris, 1999). Aparentemente o eIF4E também é importante na modulação da apoptose (Li *et al.*, 2002). A atividade do eIF4E é regulada em múltiplos níveis: (1) via **modulação de sua transcrição**, (2) por **fosforilação**, (3) através da sua **interação com as 4E-BPs**, e (4) por **degradação** (Raught e Gingras, 1999; revisto por Goodfellow e Roberts, 2008).

Embora os mecanismos de **regulação da transcrição do eIF4E** não estejam ainda bem esclarecidos, sabe-se que seu promotor contém dois sítios de ligação do regulador transcricional myc e um de hnRNPK, necessários para a expressão do gene (Jones *et al.*, 1996; Lynch *et al.*, 2005). Concordando com essa observação, o mRNA do eIF4E é mais expresso em células que superexpressam c-myc, e a transcrição do gene eIF4E é feita em resposta à ativação de um receptor de fusão myc-estrógeno (Rosenwald *et al.*, 1993). A presença de soro, fatores de crescimento ou de ativação imunológica nas células T têm sido associadas ao aumento da transcrição do gene eIF4E (Schmidt, 2004). É possível que o eIF4E esteja envolvido no aumento da tradução e/ou exportação de um conjunto de mRNAs específicos, que codificam proteínas envolvidas na proliferação celular e geração de tumores, e que contém em sua sequência uma estrutura conhecida como elemento sensível ao 4E (revisto por Goodfellow e Roberts, 2008).

A **fosforilação do eIF4E** é, geralmente, correlacionada com níveis de tradução e estado de crescimento celular (Kleinjn *et al.*, 1998). Sua fosforilação é feita pelas quinases

transdutoras de sinal MAP - Mnk1 e Mnk2 - em um único sítio, na serina 209 (posição no homólogo de mamíferos), que reside próximo à porção N-terminal da sequência primária do eIF4E (Joshi *et al.*, 1995). O efeito da fosforilação nas propriedades do eIF4E tem sido alvo de grande interesse e controvérsia. O eIF4E não é fosforilado durante a mitose (Bonneau e Sonenberg, 1987), fase em que as taxas de tradução são menores, e sob influência de estímulos extracelulares que provocam proliferação celular há um aumento da fosforilação (Raught e Gingras, 1999). Minich *et al.* (1994) postularam que a fosforilação do eIF4E aumenta a afinidade deste pela estrutura cap. Já estudos de fluorescência realizados mostraram que o eIF4E fosforilado possui uma afinidade 2,5 vezes menor a análogos do cap do que a proteína não fosforilada. Essa perda de afinidade seria pela criação de uma repulsão eletrostática entre a proteína e o nucleotídeo ligante carregado eletronegativamente. A fosforilação do eIF4E não afeta sua ligação com o eIF4G ao contrário do que acontece com proteínas de ligação ao 4E, as 4EBPs (Scheper *et al.*, 2002). Além disso, a inibição da fosforilação do eIF4E não possui efeito aparente na proliferação celular ou formação do complexo de iniciação, podendo apenas limitar a tradução sob certas condições fisiológicas, de uma maneira ainda desconhecida (Knauf *et al.*, 2001). Alternativamente sua fosforilação pode auxiliar na liberação do complexo eIF4F da estrutura cap no processo de “rastreamento” ribossomal, no entanto essas hipóteses ainda necessitam de validação experimental (Scheper *et al.*, 2002).

A ligação das 4E-BPs com o eIF4E é regulada por fosforilação em resposta a hormônios (como a insulina), fatores de crescimento, citocinas, mitógenos, e infecções por adenovírus pela via mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*, ou alvo para rapamicina em mamíferos) (Kleijn *et al.*, 1998; revisto por Rhoads, 2009) (figura 25). As 4EBPs em estado hipofosforilado seqüestram o eIF4E, inibindo a tradução. Já as 4EBPs hiperfosforiladas não possuem a capacidade de se ligar ao eIF4E, liberando-o para ligar-se à maquinaria de tradução.

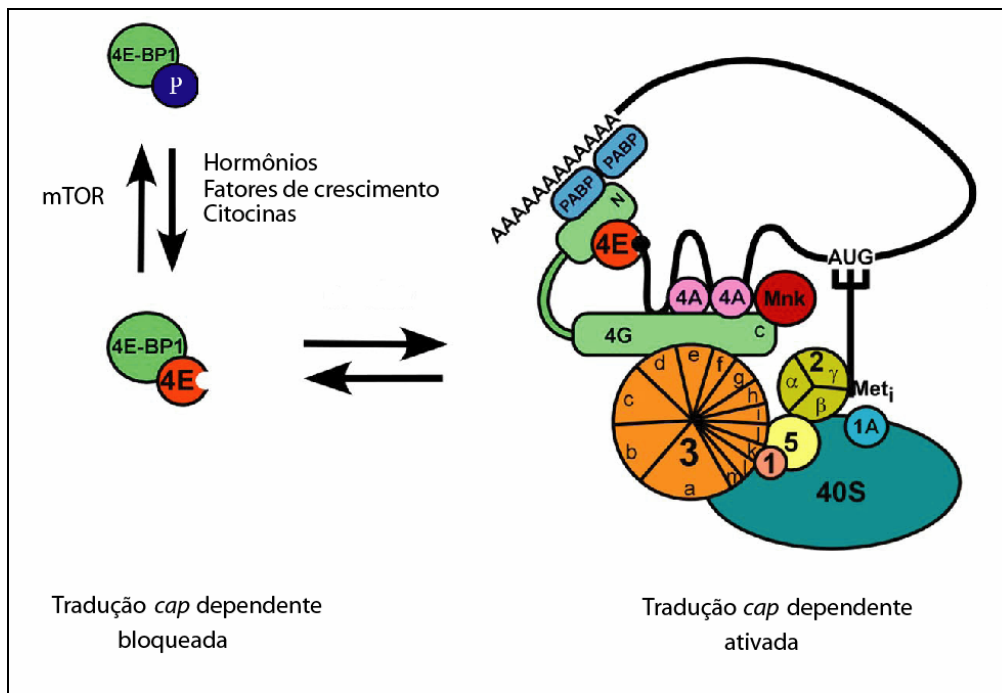


Figura 25. Regulação da formação do complexo eIF4F pela interação das 4EBPs com o eIF4E e controle da atividade das 4EBPs por fosforilação (P, círculo azul) mediada pelo estímulo de hormônios (insulina) (modificado de Rhoads, 2009).

Por fim o eIF4E está sujeito a ubiquitinação (principalmente no resíduo de lisina 159) e **degradação** proteasomo-dependente. Os eIF4Es ubiquitinados ainda podem se ligar ao cap, mas a sua fosforilação e capacidade de ligação ao eIF4G são reduzidas (Othumpangat *et al.*, 2006).

1.2.3 – Fatores do complexo eIF4E em tripanossomatídeos

Até o momento o processo de tradução em tripanossomatídeos, suas semelhanças e diferenças com outros eucariotos, ainda não foi adequadamente estudado (Clayton e Shapira, 2007), embora os mecanismos de controle da tradução nesses organismos muito provavelmente devam possuir grande papel na modulação da sua expressão gênica (Clayton, 2002).

1.2.3.1 – eIF4A em tripanossomatídeos

Quanto aos homólogos de subunidades do complexo eIF4F, um homólogo ao fator eIF4A de *L. major* (denominado LeIF) foi identificado como indutor de resposta imune mediada por sua porção N-terminal (resíduos 1-226) (Skeiky *et al.*, 1998). O homólogo LeIF de *L. infantum* possui atividade ATPase dependente de RNA e atividade helicase dependente de ATP *in vitro*. Possui ainda a capacidade de se ligar ao homólogo do eIF4G de levedura *in vitro* e é incapaz de resgatar a função do eIF4A de levedura *in vivo*, exibindo a capacidade de inibir a tradução em leveduras, provavelmente por competir por outros fatores de tradução (Barhoumi *et al.*, 2006).

Dhalia *et al.* (2005) identificaram e caracterizaram dois homólogos ao eIF4A de *L. major*, chamados *LmEIF4A1* (o mesmo LeIF) e *LmEIF4A2*. Os dois homólogos apresentaram diferenças em sua expressão na forma promastigota, sendo o *LmEIF4A1* encontrado em cerca de 4×10^5 moléculas/célula e o *LmEIF4A2* mostrou-se ausente ou está presente em níveis muito baixos. Ensaio de interação protéica por *pull-down* constataram que apenas o *LmEIF4A1* é capaz de se ligar a um homólogo de eIF4G de *L. major*, o *LmEIF4G3* (Dhalia *et al.*, 2005). Em *T. brucei*, também foram identificados dois homólogos ao eIF4A, chamados de *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* (ortólogos dos *LmEIF4A1* e *LmEIF4A2*, respectivamente). Foi

constatado que o *TbEIF4AI* apresenta localização citoplasmática, possui abundância de cerca de 1×10^5 moléculas/célula, é essencial para a viabilidade celular e sua ausência provocou uma diminuição na taxa de tradução. Já o *TbEIF4AIII* apresenta-se concentrado no núcleo, foi quantificado em cerca de 2×10^4 moléculas/célula, não se mostrou essencial para a viabilidade celular, mas sua depleção provocou um decréscimo na proliferação celular. Foi proposto que o *TbEIF4AI* seja o verdadeiro homólogo ao eIF4A e o *TbEIF4AIII* exerça funções semelhantes às descritas para o eIF4AIII humano, que não atua na síntese protéica e sim no processamento dos mRNAs no núcleo e no controle de sua degradação (Dhalia *et al.*, 2006).

1.2.3.2 – eIF4G em tripanossomatídeos

Cinco homólogos de eIF4G foram encontrados em *L. major*, com base na presença do domínio HEAT-1/MIF4G típico. Estas foram denominadas de *LmEIF4G1* a 5, e todas possuem seus respectivos ortólogos em *T. brucei* e *T. cruzi*. As cinco proteínas variam significativamente em tamanho e posição do domínio HEAT-1/MIF4G e apenas os *LmEIF4G3* e 4 são relacionados, possuindo regiões significativas de homologia ao longo de toda sua sequência. Baseado apenas em homologia de sequência, em nenhuma dessas proteínas foram identificados domínios para ligação a eIF3, eIF4E ou PABP (Dhalia *et al.*, 2005).

Os níveis intracelulares do *LmEIF4G3* foram determinados (cerca de $6,4 \times 10^3$ moléculas/célula) e observou-se que seu domínio HEAT-1/MIF4G foi capaz de se ligar especificamente à proteína *LmEIF4AI*, por outro lado os domínios dos *LmEIF4G1* e 2 não possuem essa capacidade (Dhalia *et al.*, 2005). Em *T. brucei* as proteínas *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* e *TbEIF4G5* apresentaram localização citoplasmática e se mostraram essenciais à viabilidade do parasita após ensaios de RNAi (*RNA interference* ou interferência de RNA).

Os perfis de sobrevivência das células após estes ensaios variaram, contudo, a depleção dos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* induziu morte celular rápida, ao contrário do *TbEIF4G5*, indicando que essas proteínas desempenham um papel importante no metabolismo de *T. brucei*. O RNAi do *TbEIF4G4* demonstrou ainda uma mudança na morfologia das células, que se mostraram arredondadas, indício que este ortólogo do eIF4G é importante para a integridade da morfologia celular. (Moura, D.M.N., 2007)

Recentemente foi mostrado que a proteína *LmEIF4G3* é capaz de interagir com as proteínas *LmEIF4A1*, *LmEIF4E1* e *LmEIF4E4*. A ligação entre o *LmEIF4G3* e os dois homólogos de eIF4E se dá através do consenso YPGFSL(D/E), onde o resíduo hidrofóbico conservado em outros eucariotos é substituído por um ácido aspártico em *Leishmania* e ácido glutâmico em tripanossomas (Yoffe *et al.*, 2009). Esses resultados são consistentes com ensaios de *pull-down* onde os homólogos *LmEIF4G1* a 4, mas não o *LmEIF4G5*, demonstraram ser capazes de se ligar ao *LmEIF4A1*, enquanto o *LmEIF4G3* liga-se especificamente aos *LmEIF4E4* e *LmPABP1* (um dos três homólogos de PABP em *L. major*) e o *LmEIF4G4* liga-se aos *LmEIF4E3* e *LmPABP1* (Reis, C.R.S., 2009; Yoffe *et al.*, 2009). Já o sítio de ligação do *LmEIF4E3* foi determinado entre os resíduos 20-27 do *LmEIF4G4* (Reis, 2009) (figura 26).

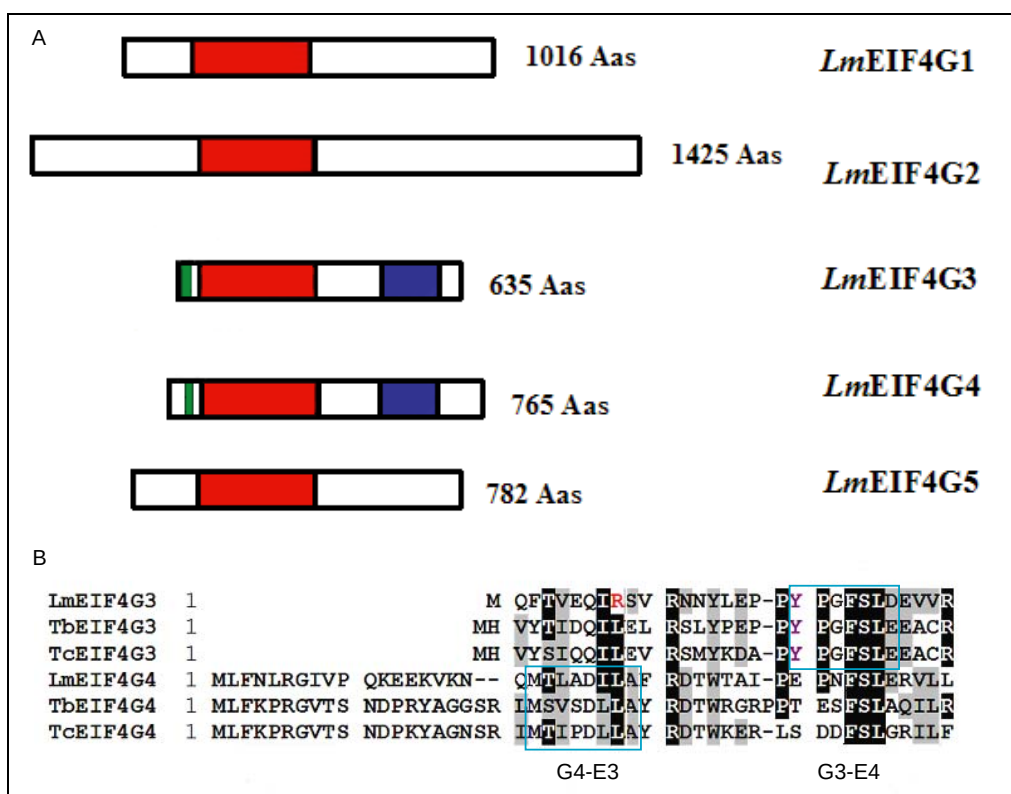


Figura 26. A: Esquema dos homólogos ao eIF4G de *L. major* e seus principais domínios: o domínio de ligação ao eIF4E (em verde) e os domínios de ligação ao *LmEIF4A1*: HEAT-1/MIF4G (em vermelho) e o domínio putativo HEAT-2/MA3 (em azul), que também interage com eIF4A em outros eucariotos. B: Alinhamento da porção N-terminal dos homólogos *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* destacando os motivos conservados de ligação a homólogos do eIF4E (modificado de Reis, C.R.S., 2009).

1.2.3.3 eIF4E em tripanossomatídeos

Inicialmente Yoffe *et al.* (2004) identificaram um ortólogo ao eIF4E em *L. major*, denominado de *LeishIF4E-1*, que possui considerável conservação filogenética, especialmente no sítio de ligação ao *cap*. Esse homólogo possui localização citoplasmática, mostrou capacidade de complementar a função do eIF4E em sistema de tradução *in vitro* e é ser capaz de ligar-se a análogos da estrutura *cap*, principalmente no *cap* monometilado (m^7 GTP) e no tetrametilado (*cap4*), característico dos tripanossomatídeos.

Posteriormente observou-se que em tripanossomatídeos existem quatro homólogos do eIF4E, denominados *LmEIF4E1-4* (Dhalia *et al.*, 2005). Análises das suas seqüências demonstraram que dos oito resíduos de triptofano conservados na família eIF4E sete foram

encontrados no homólogo *LmEIF4E1*, oito no *LmEIF4E2*, quatro no *LmEIF4E3*, e cinco no *LmEIF4E4*. Os homólogos *LmEIF4E1* e 2 possuem todas as características suficientes para a ligação ao cap enquanto que os *LmEIF4E3* e 4 possuem apenas algumas. Ensaio de ligação à estrutura *cap* mostraram que dos três homólogos inicialmente estudados (*LmEIF4E1* a 3) apenas o *LmEIF4E1* foi capaz de se ligar ao *cap*. A expressão dos homólogos na forma promastigota do parasita foi determinada e constatou-se que o *LmEIF4E1* e o *LmEIF4E2* estão presentes em pequenas quantidades em promastigotas de *L. major* enquanto que o *LmEIF4E3* está presente em níveis bem maiores (Dhalia *et al*, 2005).

Em um trabalho posterior foi constatado que os quatro homólogos de *L. major*, referidos como *LeishIF4E1* a 4, possuem localização citoplasmática. Foi constatado também que o *LeishIF4E1* é mais abundante em amastigotas e possui em seu mRNA um sinal característico para expressão nessa forma em sua 3' UTR. Apenas os homólogos *LeishIF4E1* e 4 possuem a capacidade de se ligar tanto ao cap monometilado (m7GTP) quanto ao cap4 e possuem ainda a capacidade de se ligar à 4EBP1 de mamíferos. O *LeishIF4E-2* se liga principalmente ao cap4 e migra juntamente com a fração 48S em gradientes de sacarose. Já o *LeishIF4E-3* liga-se apenas ao cap monometilado e é encontrado na fração 80S. Nenhum dos quatro homólogos foi capaz de complementar a função do eIF4E de levedura (Yoffe *et al.*, 2006).

Conforme descrito anteriormente, Yoffe *et al.* (2009) constataram que tanto o *LeishIF4E1* quanto o *LeishIF4E4* são capazes de se ligar ao *LeishIF4G3* (ou *LmEIF4G3*), e que talvez liguem em formas fosforiladas diferentes de *LeishIF4G3*. Estes autores propuseram que estes fatores (juntamente com o *LeishIF4A1*) provavelmente constituem o equivalente ao eIF4F em *L. major*. No entanto, existem evidências de que o complexo descrito não é o único existente, e que pelo menos dois complexos podem existir com papéis diferentes no controle da tradução em tripanossomatídeos (Reis, 2009) (figura 27).

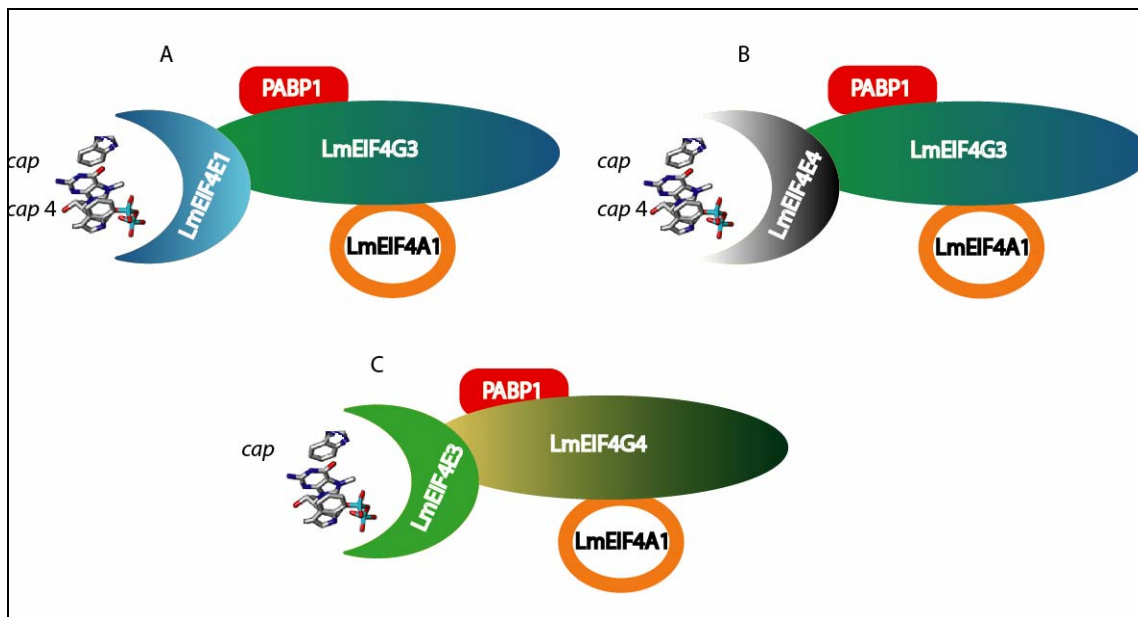


Figura 27. Representação dos possíveis complexos homólogos ao eIF4F nos tripanossomatídeos, com base nos ensaios de *pull-down* em *Leishmania major*. Formados por: (A) **LmEIF4E1** com *LmEIF4G3*, *LmEIF4A1*, e *LmPABP1*; (B) **LmEIF4E4** com *LmEIF4G3*, *LmEIF4A1*, e *LmPABP1* e (C) **LmEIF4G4** com o *LmEIF4A1*, *LmEIF4E3* e *LmPABP1* (baseado em Reis, 2009; Yoffe, *et al.*, 2009).

2. Objetivos

Objetivo geral

Caracterizar funcionalmente os homólogos do fator de iniciação eIF4E de *T. brucei*.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a expressão dos homólogos *TbEIF4E1* a 4 em células de *T. brucei* nas formas procíclica e sanguínea do seu ciclo de vida.
2. Determinar a localização subcelular *in vivo* dos homólogos ao eIF4E de *T. brucei* através da sua expressão fusionados à proteína fluorescente, em formas procíclicas.
3. Avaliar a viabilidade de células procíclicas e sanguíneas de *T. brucei* submetidas à técnica de interferência de RNA.
4. Analisar o padrão de síntese de proteínas em células procíclicas submetidas à interferência de RNA para os homólogos *TbEIF4E1* a 4.
5. Identificar possíveis complexos protéicos *in vivo* nas quais os homólogos de EIF4E estejam presentes por ensaios de imunoprecipitação.

3. Materiais e Métodos

3.1. Cultivo de parasitas

As culturas de células de *T. brucei* da forma procíclica (fase presente no inseto) foram cultivadas a 27°C em meio SDM-79 (Sigma®) suplementado com soro fetal bovino (10% v/v) e os antibióticos ampicilina (0,1%) e estreptomicina (0,1%) para a linhagem selvagem (PCF WT 427). Para a linhagem transgênica utilizada na transfecção (PCF 29-13, que possui em seu genoma os genes da T7 RNA polimerase e do repressor do operon da tetraciclina em expressão constitutiva), foram adicionados ao meio os antibióticos neomicina (15 µg/mL), higromicina (25 µg/mL) e fleomicina (2,5 µg/mL) para seleção após a transfecção. As culturas da forma sanguínea (fase presente no hospedeiro vertebrado) foram cultivadas a 37°C e 5% CO₂, em meio HMI-9 (Sigma®), contendo soro fetal bovino (10% v/v) e os antibióticos ampicilina (0,1%) e estreptomicina (0,1%) para linhagem selvagem (BSF WT 427). Para a linhagem utilizada na transfecção (BSF 90-13, que possui em seu genoma os genes da T7 RNA polimerase e do repressor do operon da tetraciclina em expressão constitutiva) foram adicionados ao meio os antibióticos neomicina (5 µg/mL), higromicina (5 µg/mL) e fleomicina (2,0 µg/mL) para seleção após a transfecção. Em todos os casos o crescimento celular foi monitorado por contagem em câmara de Newbauer e os extratos obtidos por centrifugação das culturas a 2500 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas em PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,3) e centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos. Finalmente as células foram ressuspensas em tampão Laemmli, fervidas por cinco minutos e armazenadas a -80°C.

3.2. Expressão das proteínas recombinantes e purificação de anticorpos.

Para expressar as proteínas recombinantes dos genes *TbEIF4E1* a 4 (tabela 3) fusionadas à uma sequência de poli-histidinas (genes clonados nos vetores de expressão pET2171 por Dhalia, R., 2005), as construções plasmidiais foram inseridas em cepas BL21star (Invitrogen®) de *Escherichia coli*. As bactérias foram transformadas por choque térmico, sendo incubadas com os DNAs a 4°C/30 minutos antes de sofrerem choque térmico a 37°C/5 minutos. As bactérias transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar LB sólido (na presença de ampicilina, 100 µg/ml) e em seguida foram incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias obtidas foram inoculadas em 15 ml de meio LB líquido acrescido de ampicilina (100µg/ml), e foram crescidas a 37°C, sob agitação de 150 rpm por 18 horas. Para a indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 1-10 ml das culturas obtidas foram inoculadas separadamente em 500 ml de meio LB com ampicilina (100µg/ml) crescidas a 37°C sob agitação de 150 rpm, e o crescimento bacteriano foi monitorado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir a densidade óptica (DO) entre 0.5. Após a adição de IPTG na concentração final de 0.1mM, a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C (DO igual a 0.5) ou alternativamente por 1 hora a 25°C (DO igual a 0.8). As culturas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 10 minutos, e o sedimento bacteriano obtido foi ressuspensionado em 20 ml de tampão laemmli, fervidas por 5 minutos e guardadas a -80 C°.

Tabela 3. Relação dos homólogos ao eIF4E de *Trypanosoma brucei*.

Gene	GenDB ID	Tamanho do gene (pb)	Peso molecular predito (kDa)
<i>Tb EIF4E1</i>	Tb11.18.0004	702	26,0
<i>Tb EIF4E2</i>	Tb10.61.0210	756	28,2
<i>Tb EIF4E3</i>	Tb11.01.3630	1329	47,9
<i>Tb EIF4E4</i>	Tb927.6.1870	1284	46,5

Os soros contra as diferentes proteínas homólogas ao eIF4E em *T. brucei* foram utilizados em ensaios de *Western-blot* para a expressão das diferentes proteínas nos parasitas selvagens ao longo das diferentes fases do seu ciclo de vida. Os soros anti-*TbEIF4E1*, *E3* e *E4* foram produzidos em trabalhos anteriores e o soro anti-*TbEIF4E2* foi obtido pela imunização de coelho adulto Nova Zelândia. Em cada inóculo do processo de imunização (num total de 4 inóculos, com intervalo de 15 dias entre eles), foram utilizados aproximadamente 100 µg de proteína, isolada diretamente de um gel preparativo SDS-PAGE 10%. A região do gel contendo a proteína de interesse foi excisada e macerada num sistema de válvulas acoplado a seringas de 5mL. Em seguida, foram acrescentados 200 µl de adjuvante de Freund (Gibco BRL Life Technologies®), adjuvante completo para o primeiro inóculo e adjuvante incompleto para os demais) e 600 µl de PBS. Os componentes homogeneizados foram aplicados por via subcutânea em coelhos (em 3 regiões diferentes do corpo). Após a 3ª inoculação, foi coletada uma alíquota de sangue venoso da orelha dos animais, para a confirmação da produção dos anticorpos. Depois dessa confirmação, foi realizado o 4º inóculo e após 1 semana, o animal foi sacrificado, sob anestesia, para a retirada de sangue através de punção cardíaca. O sangue incubado por 16 horas a 4° C para coagulação e então o soro foi separado por centrifugação a 2500 rpm, aliquoteado e armazenado a -80 °C.

Para a purificação dos anticorpos (imunoabsorção), aproximadamente 100 µg das proteínas recombinantes foram separadas em SDS-PAGE 10%, transferidas para membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore). As membranas foram coradas com vermelho Ponceau S 0.2% (p/v) em 1% de ácido tricloroacético, os fragmentos contendo as bandas protéicas de interesse foram cortados em pequenos fragmentos e colocadas em tubos de 1,5 mL. Estes fragmentos de membrana foram então bloqueados por 30 minutos com tampão PBS, leite desnatado 1% e Tween-20 0,05% e incubados com os respectivos soros, por 16 horas, a 4°C. Em seguida, os fragmentos foram lavados por três vezes com 1 ml de PBS e os anticorpos purificados eluídos com solução de glicina pH 2,5 (10 mM de Glicina). Depois foram

recuperados os sobrenadantes em novos tubos e o pH foi neutralizado com a adição de 20 µl de Tris 1M pH 8,5. Aos anticorpos purificados foram adicionados 220 µl de PBS 2X e foram em seguida conservados em alíquotas a -80° C.

3.3. Análise e quantificação da expressão dos *TbEIF4E1* a 4.

As proteínas recombinantes e amostras de extratos de *T. brucei* (fase procíclica e sangüínea) foram fracionadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas PVDF Immobilon-P (Millipore®) por método semi-seco conforme instruções do fabricante. Estas, por sua vez, foram bloqueadas com leite desnatado diluído em TBS-Tween (20mM Tris, 500mM NaCl, pH 7,5, 0,05% tween 20) por 1 hora e, em seguida, incubadas por mais 1 hora em solução contendo um dos anticorpos específicos (imunoadsorvido) na diluição de 1:500 em leite desnatado 5%- TBS-tween . Em seguida foram feitas três lavagens na membrana para a retirada do excesso de anticorpos, e depois incubadas com segundo anticorpo, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, na diluição de 1:10.000 em leite desnatado 5% - TBS-T. Após mais três lavagens com TBS-tween foi feita a revelação com uma solução contendo 1,2mM luminol, 0,4mM iodofenol (diluído em DMSO) e 0,03% peróxido de hidrogênio para a reação de quimioluminescência (ECL - *Enhanced Chemiluminescent*). A membrana foi seca com papel de filtro, exposta por 1, 5 ou 10 minutos contra filme específico para ECL (GE Healthcare®), que foi revelado através de sua incubação em solução 1:2 dektol (Kodak®), seguida de fixação em solução de ácido acético. Os resultados do *western-blot* foram analisados e utilizados na quantificação da expressão dos *TbEIF4E1* a 4 por densitometria segundo descrito em Dhalia, *et al* (2005).

3.4. Subclonagem dos *TbEIF4E1* a 4 nos vetores p2T7:177, p2216 e p2477.

Os genes *TbEIF4E1* a 4 previamente clonados em trabalho anterior (Dhalia, R. 2005) no plasmídeo p2T7 (descrito por Wirtz, *et al.*, 1999) para a indução de interferência de RNA, sob controle de dois promotores T7 em orientação reversa (regulados pela tetraciclina). Neste vetor os genes são flanqueados por seqüências de *T. brucei* para integração genômica estável numa região codificadora de rRNA. Os parasitos transfectados com estas construções são selecionados pela resistência à fleomicina, para posterior análise do efeito da interferência de RNA, através de curvas de crescimento, na presença e ausência de tetraciclina (+TET/-TET). No entanto, hoje se sabe que a região de integração do rRNA é passível de alta atividade transcricional, o que pode provocar um “escape” do controle da tetraciclina, causando uma indução prévia e não desejada da interferência de RNA ainda na fase de seleção dos transfectados. Este efeito pode causar a letalidade das células, inviabilizando o experimento. Para a solução deste problema os genes foram subclonados em uma versão aperfeiçoada desse vetor para RNAi, o p2T7:177 (figura 28). Este vetor permite a integração na região do minicromossomo de *T. brucei*, que não possui alta taxa de transcrição (Wickstead *et al.*, 2002).

Alíquotas de 20 µg dos quatro plasmídeos resultantes da subclonagem dos *TbEIF4E1-4* no vetor p2T7, e uma alíquota equivalente do vetor p2T7:177, foram digeridas com as enzimas *Hind* III e *Bam* HI (New England BioLabs®, 10 U de cada). Após as digestões os fragmentos foram purificados com kit QIAGEN® e os quatro genes foram clonados no vetor p2T7:77 por incubação durante 20h a 16°C com a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs®). Estas construções usadas para transformar em bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α, clones positivos foram selecionados e porcedeu-se às maxi preparações dos DNAs plasmidiais resultantes, segundo Sambrook e Russel (2001). Para construir o duplo *TbEIF4E1/4*, a construção p2T7:177-*TbEIF4E1* foi primeiro digerida com *Bam*HI, cortando o gene *TbEIFE1* internamente em sua extremidade 3' e liberando um fragmento de 360 bp

consistindo da segunda metade do gene alvo. Este fragmento foi então clonado na construção p2T7:177-*TbEIF4E4* linearizada com *BamHI*. As construções p2T7-177- *TbEIF4E3* e p2T7-177-*TbEIF4E1/E2* já haviam sido feitas em trabalho anterior (Dhalia, R., 2005).

Para a expressão dos genes fusionados à proteína fluorescente amarela (EYFP-*enhanced yellow fluorescent protein*), as construções plasmidiais feitas em trabalho anterior p2215-*TbEIF4E1 a 4* foram inicialmente utilizadas. No entanto, no vetor p2215 tanto o gene a ser analisado, quanto o gene de seleção à resistência ao antibiótico estão sob o controle do mesmo promotor T7 RNA polimerase, o que impediu uma seleção adequada após a transfecção. Para solucionar este problema os genes *TbEIF4E1 a 4* foram também subclonados no vetor p2216 (descrito por Kelly *et al.*, 2007) (figura 28), que possui controles diferentes para a indução da expressão do gene alvo e para expressão gene da marca de resistência. Aliquotas de 20 µg das maxi preparações p2215-*TbEIF4E1-4* e do vetor p2216 foram digeridas com as enzimas *HindIII* e *BamHI* (10 U de cada). Após as digestões os fragmentos foram ligados no vetor p2216 originando as construções p2216-*TbEIF4E1 a 4*. Para os ensaios de imunoprecipitação das proteínas *TbEIF4E1 a 4* fusionadas ao motivo HA (6xPYDVPDYA), epitopo da hemaglutinina do vírus *Influenza*, os fragmentos dos genes *TbEIF4E1 a 4* digeridos com *HindIII* e *BamHI* foram também clonados no vetor p2477 (descrito por Kelly *et al.*, 2007) (figura 28), originando as construções p2477-*TbEIF4E1 a 4*.

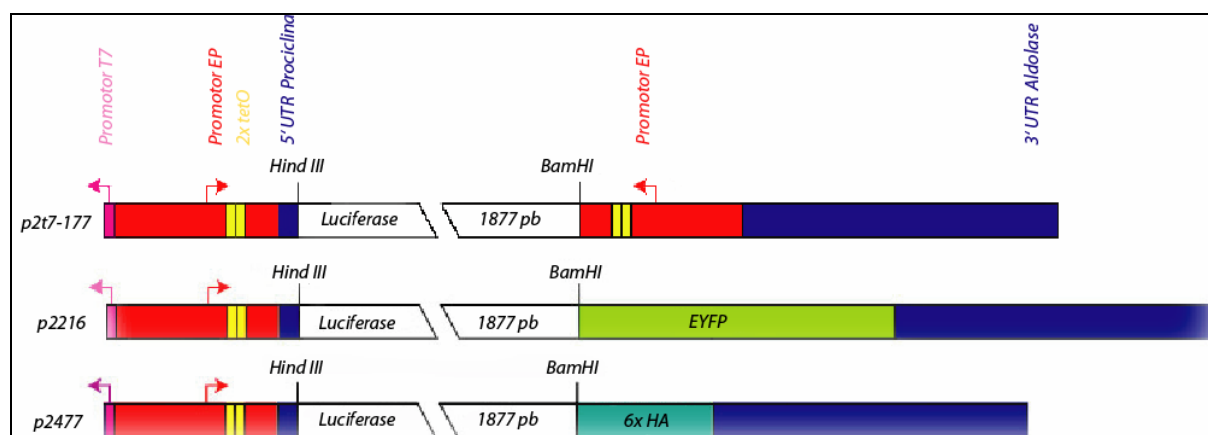


Figura 28. Representação dos vetores p2t7-177, p2216 e p2477. Demonstrando o peomotor da T7 RNA pol (rosa), promotor da prociclina EP (vermelho), operador da tetraciclina (amarelo), 5' UTR da prociclina (azul) e sítos de restrição *HindIII* e *BamHI* para clonagem (modificado de .

3.5. Transfecção dos parasitos e marcação metabólica

Culturas de parasitos foram monitoradas por microscopia óptica a cada 24 horas até atingirem a fase logarítmica média de crescimento ($10^6 - 10^7$ células/ml), ideal para a transfecção estável. Aliquotas de 2×10^7 células de culturas procíclicas (PCF 29-13) ou sanguíneas (BSF 90-13) foram incubadas em meio de eletroporação *ZPMF* (132 mM de NaCl, 8 mM de KCl, 8 mM de Na_2HPO_4 , 1.5 mM de KH_2PO_4 , 1.5 mM de $\text{MgOAC} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 90 μM de CaCl_2), para a linhagem procíclica, e *Cytomix* (2 mM de EGTA pH 7.6, 120 mM de KCl, 0,15 mM de CaCl_2 , 10 mM de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 7.6, 25 mM de HEPES pH 7.6, 5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.5% de Glicose, 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, 1 mM de Hipoxantina) para a linhagem sanguínea, e com 20 μg de DNA das construções plasmidiais p2T7:177-*TbEIF4E1 a E4*, previamente linearizados por digestão com a enzima *Not I*.

Os parasitos foram transfectados em eletroporador para células eucarióticas BTX ECM 830 (Genotronics), com três pulsos elétricos nas condições de 1,7 kV, 100 microssegundos de amplitude e 200 milissegundos de duração de pulso. Os parasitos transfectados PCF 29-13 foram selecionados por 15 dias, em 2 mL de meio SDM-79 suplementado com higromicina, neomicina e fleomicina. As linhagens sanguíneas

transformantes BSF 90-13 foram selecionadas por 5 dias, em 30 mL de meio HMI-9 suplementado com os antibióticos acima descritos. Após a seleção as culturas transfectadas foram expandidas e utilizadas para a indução da interferência de RNA (RNAi) pela adição de tetraciclina. O crescimento das culturas foi monitorado a cada 24 horas por contagem de células em câmara de *Newbauer* e alíquotas das culturas foram retiradas a cada dia para confirmação do efeito de RNAi por ensaios de *Western-blot*.

Paralelamente, células submetidas à RNAi, PCF 29-13 transfectadas com as construções pT7:177-*TbEIF4E1* a *E4*, foram incubadas na presença de metionina marcada com ^{35}S . As culturas transfectadas submetidas e não submetidas (controle) ao RNAi foram lavadas uma vez no mesmo meio, antes de serem ressuspensas a uma concentração de 1×10^7 células/ml no meio SDM-79 sem metionina e suplementado com 50 μCi / ml de metionina marcada com [^{35}S] e incubadas a 28°C durante duas horas. Alíquotas das células foram centrifugadas e extratos protéicos foram produzidos por lise celular em tampão Laemmli 2x e analisadas por SDS-PAGE e auto-radiografia. Paralelamente, alíquotas de 50 μl das culturas foram incubadas durante 5 minutos em solução de lise (5 μl SDS 10%, 2,5 μl NaOH 1M). Em seguida 5 μl das células lisadas foram impregnadas, em triplicata, em papéis de filtro e secas à temperatura ambiente. As amostras protéicas em papel de filtro foram precipitadas através da incubação em ácido tricloroacético 10%, durante 15 minutos em banho de gelo e em seguida incubadas com ácido tricloroacético 5% em banho de água fervente por 10 minutos. As amostras foram lavadas uma vez com metanol, uma vez com acetona e secas à temperatura ambiente. A radioatividade das amostras protéicas foi medida em contador de cintilação líquido LKB-Rackbeta 1209 (janela de 0005-0655, tempo de leitura de um minuto). O valor considerado para cada medição foi a média das triplicatas de cada uma das amostras das culturas. A estimativa de incorporação da metionina marcada foi feita pela diferença entre amostras de células do controle e induzidas à RNAi.

3.6. Localização subcelular das proteínas *TbEIF4E1* a 4.

Para analisar a localização intracelular dos homólogos ao *TbEIF4E* de *T. brucei*, células da forma procíclica foram cultivadas, transfectadas e selecionadas com as construções p2216-*TbEIF4E1* a 4, como descrito anteriormente. A indução das proteínas fusionadas a EYFP foi feita por adição de tetraciclina. Após 48h de indução alíquotas de 1×10^7 células foram lavadas com tampão PBS/10 mM glicose e incubadas a 4°C por 5 minutos. As células expressando as proteínas *TbEIF4E1-4* fusionadas à proteína EYFP foram então analisadas em microscópio confocal TCPS SP2 AOBS – Leica Microsystems®.

3.7. Imunoprecipitação das proteínas *TbEIF4E1* a 4.

Culturas de parasitos da forma procíclica de *T. brucei* transfectadas com as construções p2477- *TbEIF4E1*, E2 e E4 foram obtidas e induzidas com tetraciclina, como já descrito. Amostras com cerca de 1×10^9 células foram coletadas, centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C, e lavadas com 1 ml de tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH:7,4; 75 mM de acetato de potássio; 4 mM de acetato de magnésio e 2 mM de DTT). Em seguida, as células foram lisadas por 8 a 10 ciclos sucessivos de congelamento por um minuto em nitrogênio líquido e descongelamento por um minuto em banho-maria a 37°C. A lise das células foi confirmada por observação em microscópio óptico. Após a confirmação da lise, as células foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado em ensaios de imunoprecipitação.

As imunoprecipitações foram executadas por adição de 30 µl de resina agarose conjugada com anticorpos Anti-HA (Sigma®), previamente lavadas com PBS, e incubadas por duas horas a 4°C sob agitação. Após esse período o material foi centrifugado a 10.000 rpm por um minuto e a resina foi lavada quatro vezes com 1 mL de PBS. Ao final do processo as

proteínas imunoprecipitadas foram eluídas por ressuspensão da resina em 30 µl de tampão Laemmli e fracionadas em gel de poliacrilamida. Para coloração com prata, o gel foi fixado em 40% etanol, 10% ácido acético, por 1 hora; lavado três vezes com 30% etanol por 20 minutos cada lavagem; em seguida foi lavado em água por 20 minutos, sensibilizado com 0,02% de tiosulfato de sódio, lavado três vezes com água (20 segundos por lavagem) e corado com 0,2% nitrato de prata e 0,02% de formaldeído. Após mais três lavagens com água por 20 segundos, o gel foi revelado em solução de 3% de bicarbonato de sódio, 0,05% de formaldeído e 0,0005% de tiosulfato de sódio, seguido de lavagem rápida com água e incubação com solução de glicina 0,5% por 15 minutos para parar a reação. O gel foi então mantido em água.

Amostras dos imunoprecipitados foram também avaliadas através de ensaios de *Western-blot* usando os anticorpos anti-*TbEIF4E1*, *TbEIF4E3*, *TbEIF4E4*, *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4*, *TbEIF4G5* e *TbEIF4A1*, revelados por quimioluminescência e expostos ao filme Biomax-Light film (Kodak®).

4. Resultados

4.1. Quantificação da expressão das proteínas TbEIF4E1 A E4 em células procíclicas e sanguíneas de *T. brucei*.

A quantificação dos níveis de expressão de três homólogos de eIF4E de *L. major* revelou que existem diferenças significativas nos seus níveis na forma promastigota em crescimento exponencial (Dhalia *et al.*, 2005). Entretanto, não existem dados para expressão destes na forma amastigota ou em fase estacionária de crescimento, havendo ainda a necessidade de uma avaliação mais completa da expressão dos homólogos de eIF4E de tripanossomatídeos durante o seu ciclo de vida, se possível incluindo um segundo organismo para fins de comparação. Tendo em vista a possibilidade de cultivo das formas procíclica e sanguínea de *T. brucei* e disponibilidade dos anticorpos específicos para os homólogos de *T. brucei*, esta avaliação foi realizada uma análise da expressão, feita por *Western-blot* de amostras protéicas de culturas das duas fases do parasita. A análise da expressão das proteínas durante o ciclo de vida, e sua eventual comparação com os dados obtidos em *L. major* (Dhalia *et al.*, 2005), poderia fornecer informação de qual homólogo funcional estaria exercendo preferencialmente a função de proteína de ligação ao cap em cada estágio do parasita.

Nesse sentido, os eIF4Es de *T. brucei* recombinantes foram inicialmente produzidos, e quantificados por meio de curvas de diluições observadas em SDS-PAGE em comparação com diluições de albumina sérica bovina (BSA) de concentração conhecida (figura 29).

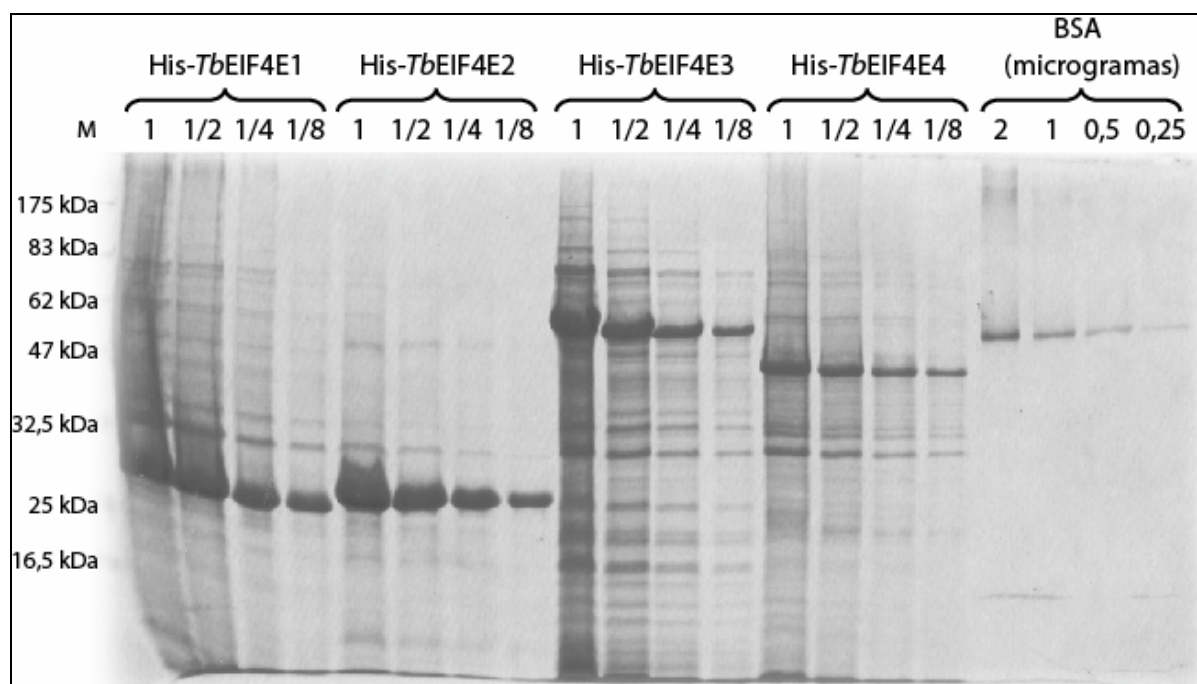


Figura 29. Expresssão das proteínas recombinantes *TbEIF4E1* a 4 para quantificação. As proteínas foram expressas em bactérias e fracionadas em SDS-PAGE 15%, juntamente com amostras de albumina sérica bovina (BSA) em concentrações conhecidas.

As amostras de proteínas quantificadas foram em seguida testadas para avaliação da especificidade dos anticorpos *TbEIF4E1* a 4 em ensaios de *Western-blot*. Os resultados obtidos indicaram que embora os anticorpos possuam reconhecimento cruzado entre as proteínas recombinantes em extratos bacterianos, se apresentaram bem específicos em extratos de *T. brucei* (figura 30).

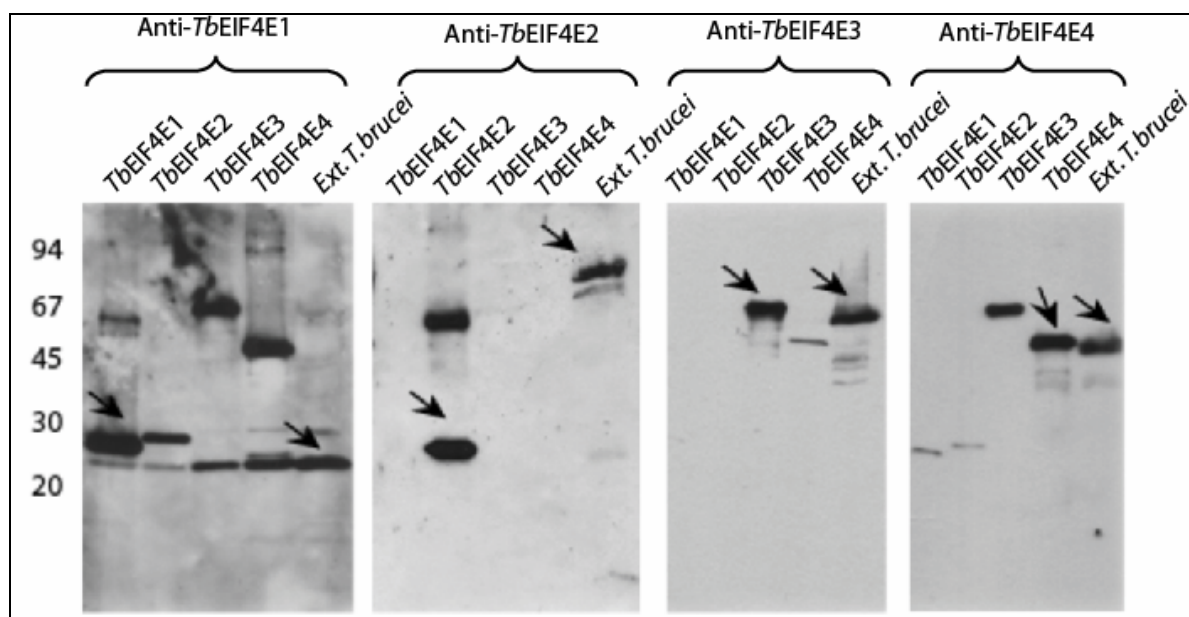


Figura 30. Análise da especificidade dos anticorpos *TbEIF4E1* a 4. As proteínas quantificadas foram diluídas na concentração de 5 ng e, juntamente com extratos totais de células das formas procíclica (Ext. *T. brucei*, 2×10^7 para *TbEIF4E1* e E2, 5×10^5 para *TbEIF4E3* e 5×10^6 para *TbEIF4E4*) e fracionadas em SDS-PAGE 15% e analisadas por *western-blot* utilizando os anticorpos específicos para cada isoforma. As setas indicam o reconhecimento das respectivas proteínas.

Após análise de especificidade dos anticorpos as proteínas quantificadas foram comparadas com amostras de extratos totais de *T. brucei*, para a quantificação destas proteínas nos extratos através de ensaios de *Western-blot* contra cada um dos seus respectivos anti-soros. Por meio da comparação dos resultados foi possível analisar quais destes estão expressos e em que quantidade, nas fases procíclica e sanguínea do ciclo de vida do parasito.

Os resultados obtidos demonstraram que as quatro proteínas são expressas constitutivamente com pouca variação de níveis entre as duas fases (PCF e BSF). No caso do *TbEIF4E1*, o primeiro analisado foi constatado que está presente em níveis relativamente baixos em ambas as formas do parasita, sendo estimado em cerca de $3-8 \times 10^3$ moléculas / célula na forma procíclica e $1,5-3 \times 10^3$ na forma sanguínea (figura 31). O *TbEIF4E2* também foi encontrado em níveis muito baixos, sendo a proteína menos abundante de todas as analisadas, com cerca de 10^3 moléculas por célula ou menos, em ambas as fases do parasita. Além dos níveis bem inferiores encontrados para a proteína *TbEIF4E2*, reconhecida pelo

anticorpo específico purificado, foi constatado que esta migra no gel com peso acima do predito (28,2 kDa) nos extratos protéicos de *T. brucei*, em torno de 80 kDa (figura 31). A proteína *TbEIF4E3* mostrou ser a mais abundante entre os quatro homólogos de eIF4E, tanto em células procíclicas quanto sanguíneas de *T. brucei*. Nas células procíclicas foi encontrada uma abundância de cerca de $5-10 \times 10^4$ moléculas/célula, já na forma sanguínea foi estimada em cerca de $2-4 \times 10^4$ moléculas/célula (figura 31). Foi constatado que a proteína *TbEIF4E4* foi a segunda mais abundante em células de *T. brucei*. Em extratos protéicos da forma procíclica, foram estimadas cerca de $2-4 \times 10^4$ moléculas /célula e em extratos protéicos da forma sanguínea $1-2 \times 10^4$ moléculas /célula (figura 31).

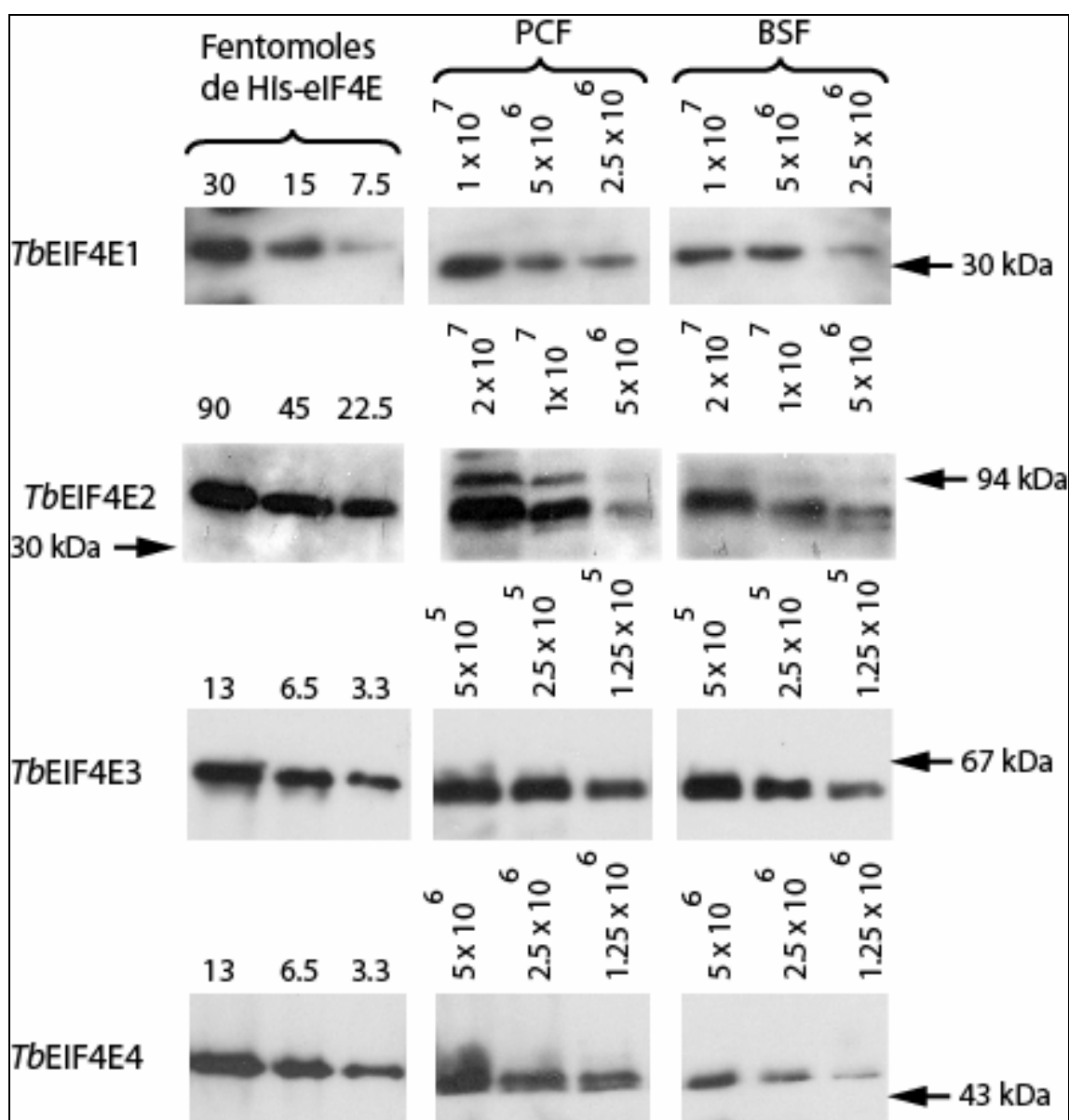


Figura 31. Análise da expressão das proteínas *TbEIF4E1* a 4 em extratos totais de *Trypanosoma brucei*. As proteínas quantificadas foram diluídas nas devidas concentrações e, juntamente com extratos totais de células das formas procíclica (PCF) e sanguínea (BSF) de *Trypanosoma brucei*, e fracionadas em SDS-PAGE 15% e analisadas por *western-blot* utilizando os anticorpos específicos para cada isoforma.

Para a maioria das proteínas, os níveis observados são ligeiramente reduzidos na forma sanguínea, o que é consistente com o volume menor da célula. Com exceção da *TbEIF4E4*, cujo ortólogo de *L. major* não foi estudado previamente, os valores observados para as proteínas do *T. brucei* são equivalentes aos obtidos para seus ortólogos de *L. major* (tabela 4).

Tabela 4: Sumário da quantificação dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de *Trypanosoma brucei*.

Homólogo <i>T. brucei</i>	N° de moléculas/célula			
	<i>T. brucei</i>		<i>L major</i> [#] (promastigota)	Levedura*
	PCF	BSF		
<i>Tb</i> EIF4E1	3-8x10 ³	1,5-5x10 ³	1 ± 0.3 x 10 ³	3.2-3.6 x 10 ⁵
<i>Tb</i> EIF4E2	~5x10 ³	~5x10 ³	3,2 ± 1.5 x 10 ³	
<i>Tb</i> EIF4E3	5-10x10 ⁴	2-4x10 ⁴	7,1 ± 3.4 x 10 ⁴	
<i>Tb</i> EIF4E4	2-4x10 ⁴	1-2x10 ⁴	ND	

Números baseados em Dhalia *et al.* (2005) para eIF4E em promastigotas de *Leishmania major*. * Números baseados em von der Haar (2002) para eIF4E de leveduras.

ND – Não Determinado experimentalmente.

4.2. Subclonagem dos homólogos ao eIF4E de *T. brucei* nos vetores p2T7:177, p2216 e p2477.

Os genes *TbEIF4E1-4* foram subclonados no vetor p2T7:177 para a realização de ensaios de RNAi viáveis. Para tal, as construções p2T7-*TbEIF4E1-4* foram digeridas com as enzimas *HindIII* e *BamHI*, os genes foram então purificados e utilizados para a clonagem no vetor p2T7:177 (para RNAi), p2216 (para expressão com a proteína YFP) e p2477 (para expressão com a proteína HA) em seguida as mini preparações de DNA feitas com estas construções foram digeridas com as mesmas enzimas para a confirmação da clonagem (figura 32).

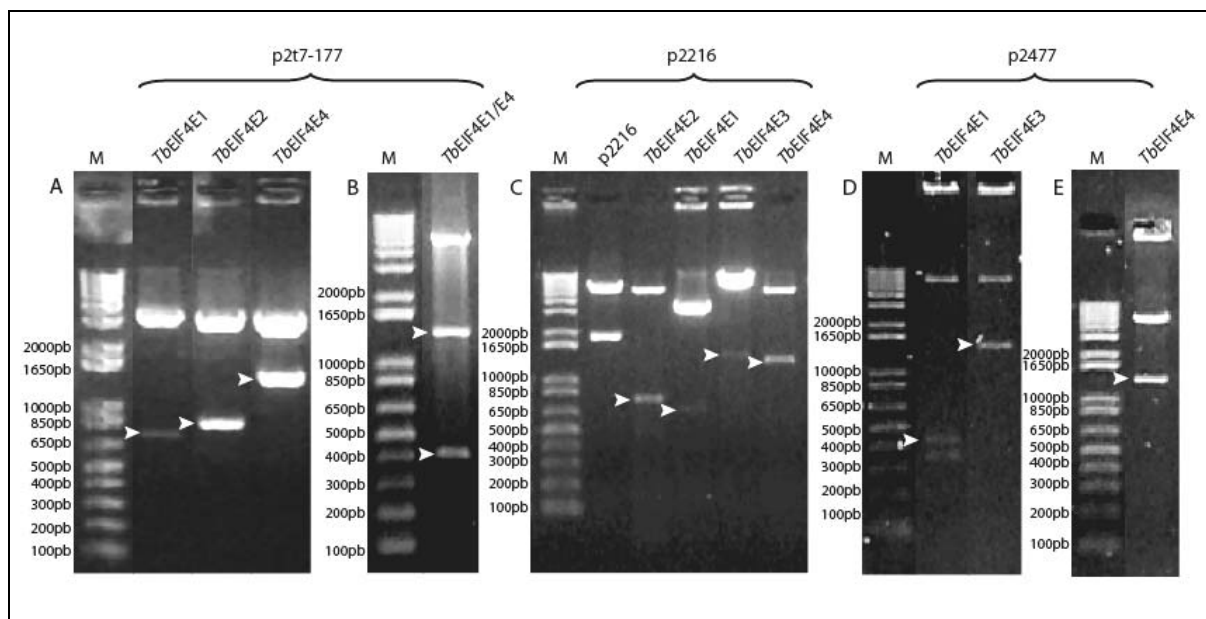


Figura 32. Clonagem dos genes *TbEIF4E1-4* nos vetores p2T7-177, p2216 e p2477. A - p2t7-177 (digeridos com *Hind III-Xho I*); B - p2t7-177 (*Hind III-Bam HI*); C - p2216 (*Hind III-Xho I*), D e E - p2477 (*Hind III-Bam HI**). (M) Marcador 1Kb plus (Invitrogen®). *O gene *TbEIF4E1* possui um sítio interno de clivagem para enzima *Bam HI*.

As construções p2T7:177-*TbEIF4E1-4*, p2216-*TbEIF4E1-4* e p2247-*TbEIF4E1-4* produzidas foram então digeridas com a enzima *Not I* (para linearização) e utilizadas para a transfecção de células PCF 29-13 para a indução da interferência de RNA, análises de localização e imunoprecipitação respectivamente.

4.3. Determinação da localização subcelular das proteínas *TbEIF4E1* a 4 após sua superexpressão fusionadas à proteína fluorescente (EYFP).

A localização celular de homólogos do fator eIF4E foi avaliada através da expressão dessas proteínas em fusão traducional com a proteína EYFP. As células da forma procíclica foram transfectadas e selecionadas e utilizadas para a produção de extratos protéicos que foram analisados em ensaios de *Western-blot* contra seus respectivos anticorpos, confirmando a expressão de cada uma delas fusionada à proteína EYFP (figura 33).

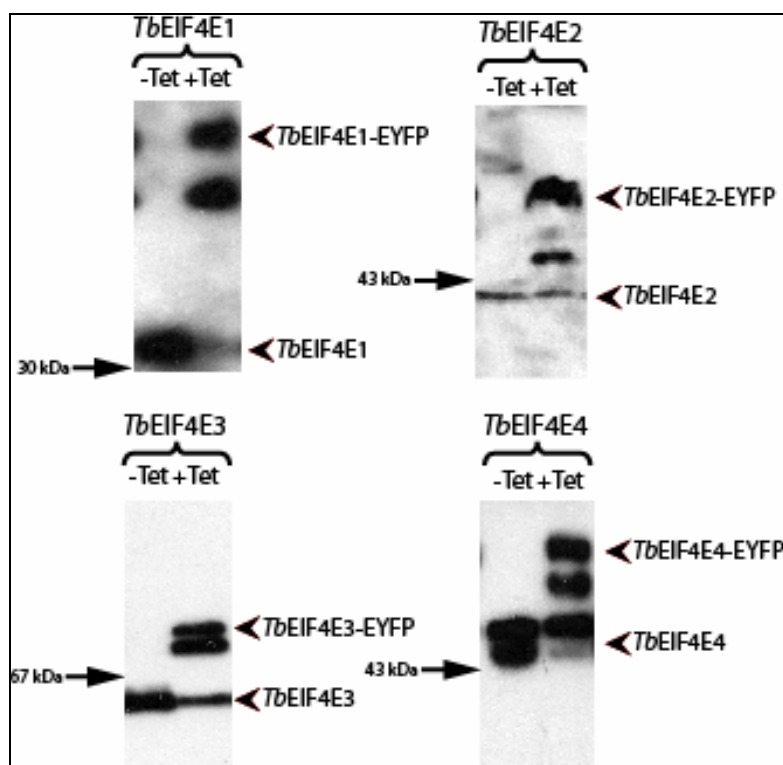


Figura 33. Análise da expressão das proteínas *TbEIF4E1-4* em fusão com a proteína EYFP em extratos totais de células de *T. brucei* transfectadas com as construções p2216-*TbEIF4E1-4* (amostras de 2×10^7 células para *TbEIF4E1* e E2, 5×10^5 para *TbEIF4E3* e 5×10^6 para *TbEIF4E4*), antes (-tet) e após 24 horas de indução com tetraciclina (+tet), foram analisados por *western-blot* utilizando os respectivos anticorpos, confirmando o reconhecimento das proteínas fusionadas a EYFP.

As células transfectadas com as construções *TbEIF4E1* a 4 em fusão à proteína EYFP foram utilizadas em ensaios de localização *in vivo* e revelaram que enquanto as proteínas *TbEIF4E1* e *TbEIF4E2* estão localizadas tanto no citoplasma quanto no núcleo, os *TbEIF4E3* e *TbEIF4E4* estão localizadas estritamente no citoplasma das células (figura 34).

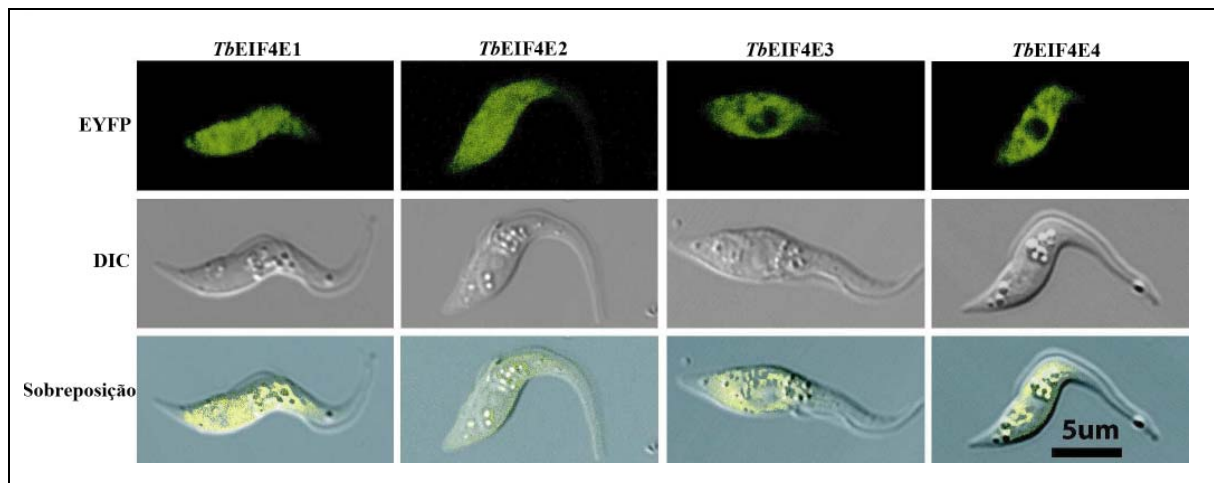


Figura 34. Localização celular das proteínas *TbEIF4E1-4*. Fotografias demonstrando a localização das proteínas *TbEIF4E1-4* em células transfectadas de *T. brucei*. EYFP: expressão das proteínas em fusão com a proteína YFP; DIC: Differential Interference Contrast, ou contraste de interferência diferencial; Sobreposição: da imagem da fluorescência com a do DIC.

Como a superexpressão pode às vezes afetar a localização das proteínas foram feitos experimentos de imunocitoquímica utilizando anticorpos contra as respectivas proteínas para a confirmação da localização das proteínas estudadas (executados pela MSc. Danielle Moura). O resultado obtido confirmou a localização das quatro proteínas estudadas (Freire *et al*, artigo submetido, em anexo).

4.4. Análise do efeito da depleção dos *TbEIF4E1* a 4, mediada por interferência de RNA (RNAi), na viabilidade celular do *T. brucei*.

Para o entendimento do papel de cada homólogo de eIF4E de *T. brucei* no metabolismo celular foram realizados experimentos de interferência de RNA (mínimo de cinco experimentos para cada construção), visando a análise do fenótipo celular em consequência da depleção induzida de cada proteína. As células procíclicas e sanguíneas foram transfectadas com as construções p2T7:177-*TbEIF4E1*, 2, 3 e 4 e tiveram seu crescimento avaliado diariamente, quando foram produzidos extratos protéicos com alíquotas das culturas controle (aqui referidas como -TET) e com a indução do RNAi pela adição de tetraciclina (+TET).

4.4.1 – RNAi de células procíclicas de *T. brucei* (PCF)

Para o *TbEIF4E1* foi observada uma pequena redução da taxa de crescimento celular após quatro dias da adição de tetraciclina, mas as células permaneceram viáveis e o seu número continuou a aumentar (figura 35).

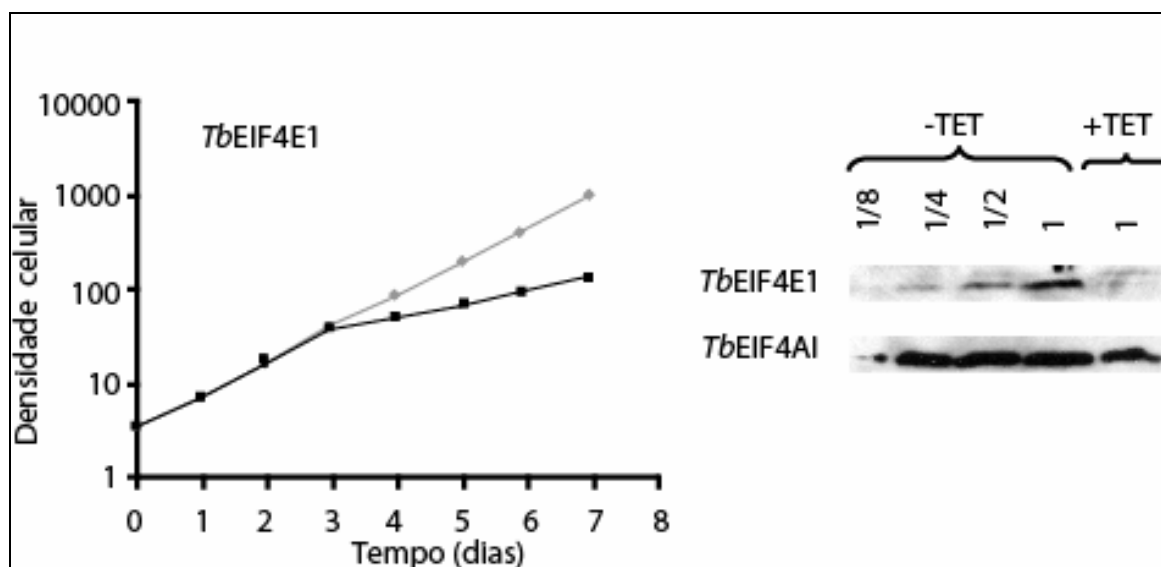


Figura 35. Crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E1*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e o controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E1* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1* (-Tet: curva de diluição da amostra do 1º dia do controle, +TET: amostra do 1º dia de células induzidas ao RNAi).

O fenótipo das células após indução do RNAi dos *TbEIF4E2* apresentou-se igual ao do controle, indicando que esta pode não ser essencial para o crescimento. A depleção das proteínas após dois a três dias e a permanência da expressão do *TbEIF4A1* foi confirmada por *western-blot* (figura 36).

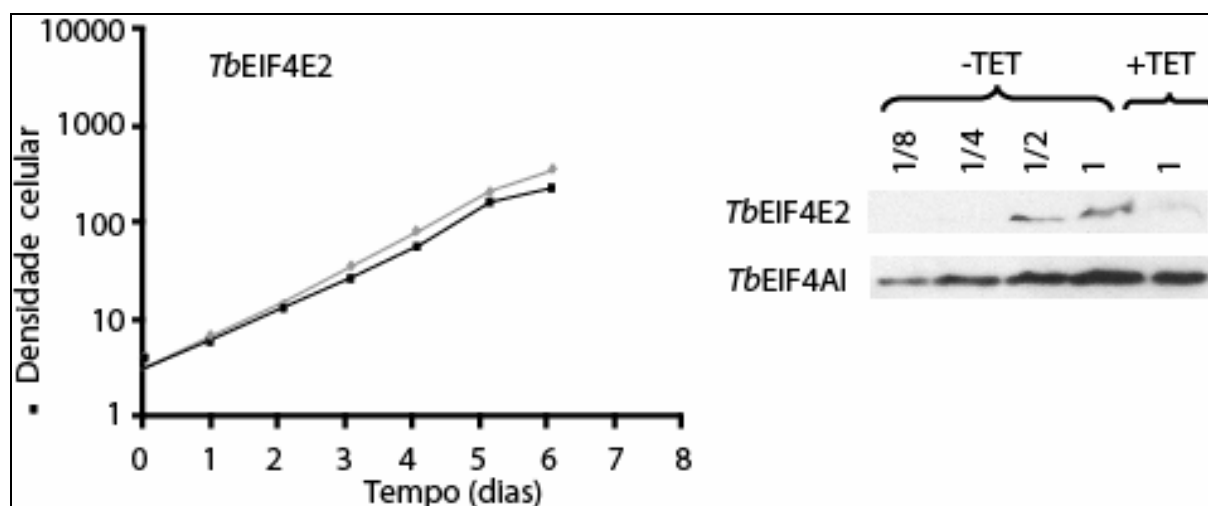


Figura 36. Gráfico do crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E2*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e o controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E2* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4AI*. (-Tet: curva de diluição da amostra do 1º dia do controle, +TET: amostra do 1º dia de células induzidas ao RNAi)..

A depleção do *TbEIF4E3* produziu um fenótipo muito distinto e esta proteína mostrou-se estritamente necessária para a viabilidade celular. A proliferação celular foi reduzida no período de 3 a 5 dias após a adição de tetraciclina, com a redução da densidade das células em cerca de cinco vezes durante este tempo, com subsequente parada de crescimento. A morte celular aconteceu após o sétimo dia da indução. O *western-blot* confirmou a redução drástica dos níveis de *TbEIF4E3* no prazo de 2 dias, enquanto o controle *TbEIF4AI* permaneceu inalterado. Estes resultados demonstram que apenas o *TbEIF4E3* é necessário para a viabilidade celular em células procíclicas de *T. brucei* (figura 37).

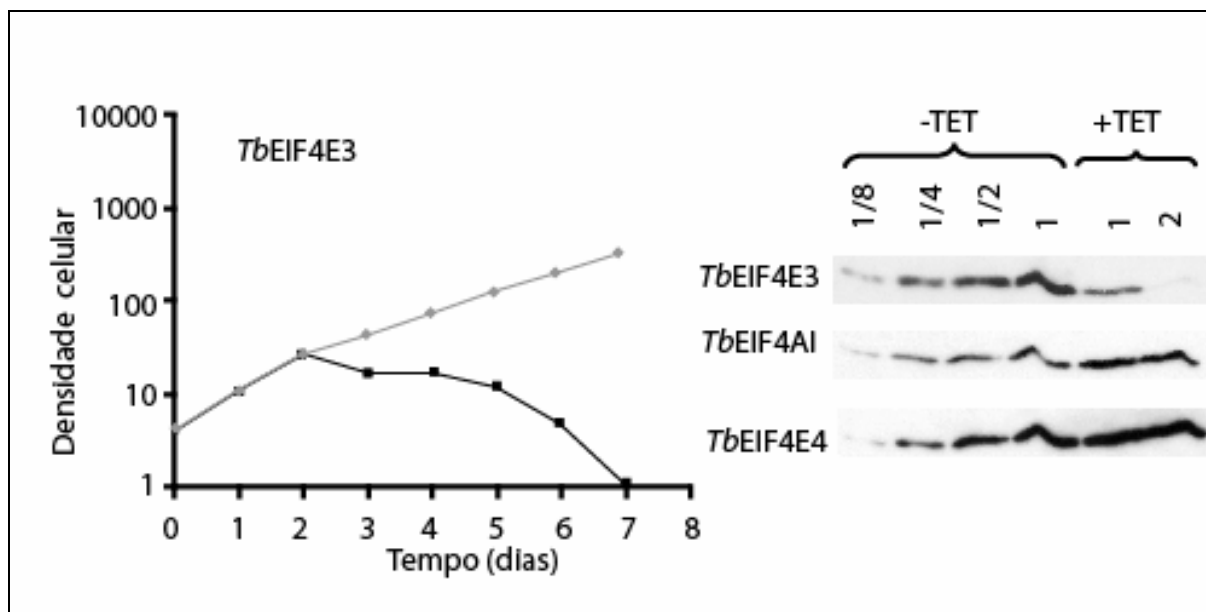


Figura 37. Gráfico do crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E3*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e o controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E3* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1* e do *TbEIF4E4*. (-Tet: curva de diluição da amostra do 1º dia do controle, +TET: amostra do 1º e 2º dias de células induzidas ao RNAi).

Finalmente, o fenótipo das células após indução do RNAi do *TbEIF4E4* apresentou-se igual ao controle, e assim como para o *TbEIF4E2*, esta proteína não parece ser essencial para o crescimento do parasita. A depleção das proteínas após dois a três dias e a permanência da expressão do *TbEIF4A1* foi confirmada por *western-blot* (figura 38).

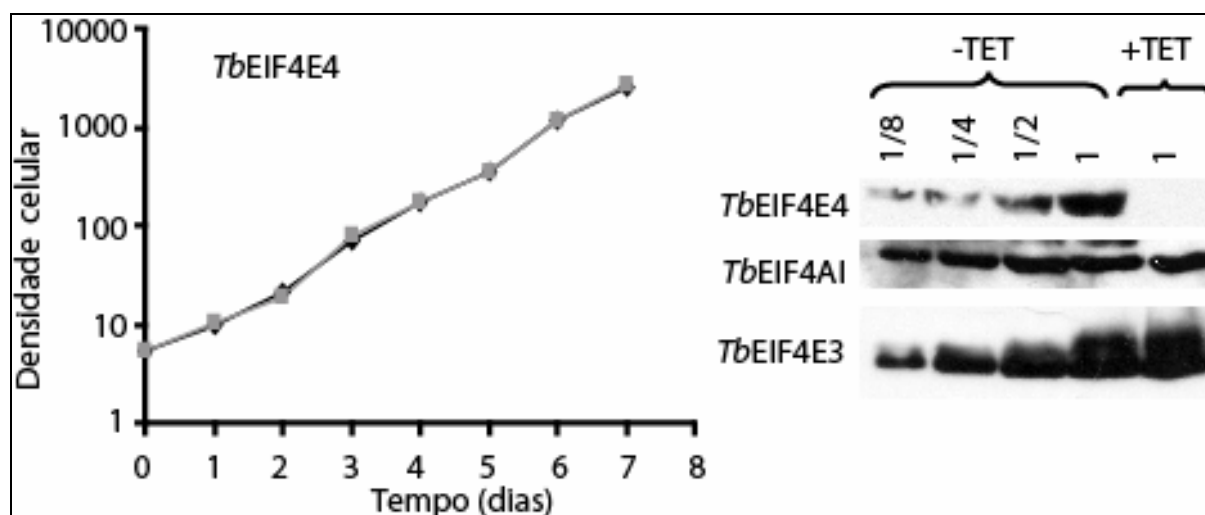


Figura 38. Gráfico do crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E4*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e o controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E4* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1* e do *TbEIF4E3*. (-Tet: curva de diluição da amostra do 1º dia do controle, +TET: amostra do 1º dia de células induzidas ao RNAi).

4.4.2 – RNAi duplo de *TbEIF4E1/E2* e *TbEIF4E1/E4* em células procíclicas de *T. brucei*.

Em seguida dois experimentos de RNAi duplo foram realizados para testar a redundância de homólogos de eIF4E selecionados: *TbEIF4E1/E2*, devido à semelhança estrutural e de localização na célula; e *TbEIF4E1/E4*, cujos ortólogos em *L. major* são capazes de interagir com o *TbEIF4G3* (Yoffe *et al.*, 2009).

A depleção simultânea dos *TbEIF4E1* e *TbEIF4E2* provocou a inibição da proliferação de células entre 3 e 4 dias após adição de tetraciclina, seguida de morte das mesmas no sexto dia (figura 39).

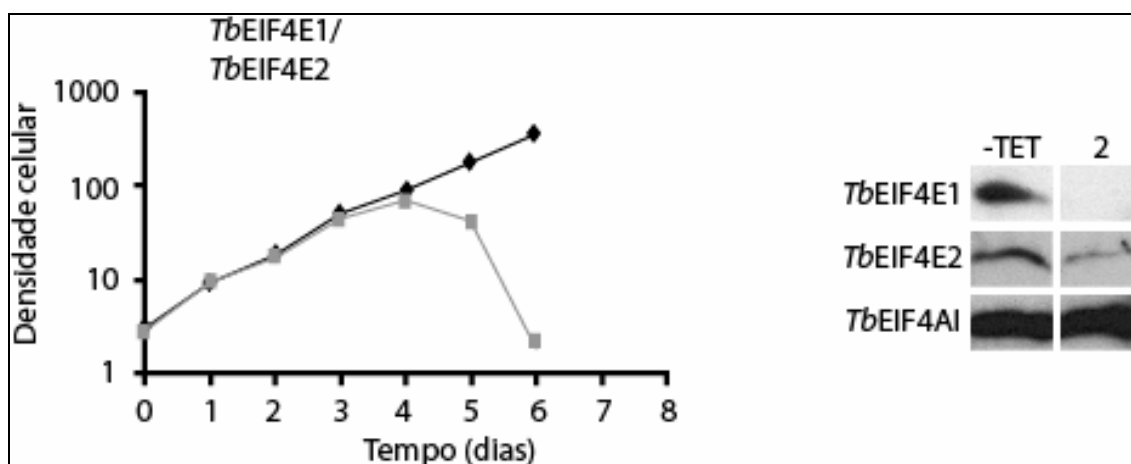


Figura 39. Gráfico do crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi duplo dos genes *TbEIF4E1/ TbEIF4E2*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e o controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência das proteínas *TbEIF4E1* e *TbEIF4E2* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1*. (-Tet: curva de diluição da amostra do 1º dia do controle, +TET: amostra do 2º dia de células induzidas ao RNAi).

Um fenótipo distinto foi observado para o RNAi duplo dos *TbEIF4E1* e *TbEIF4E4*. Neste, a proliferação celular apresentou um ritmo mais lento entre o 1º e 4º dias após adição de tetraciclina, seguida de interrupção completa do crescimento nos dias subseqüentes. Estas mesmas células se mantiveram viáveis e com mobilidade celular por até mais 30 dias sem quaisquer evidências de proliferação ou morte celular (dados não mostrados) (figura 40).

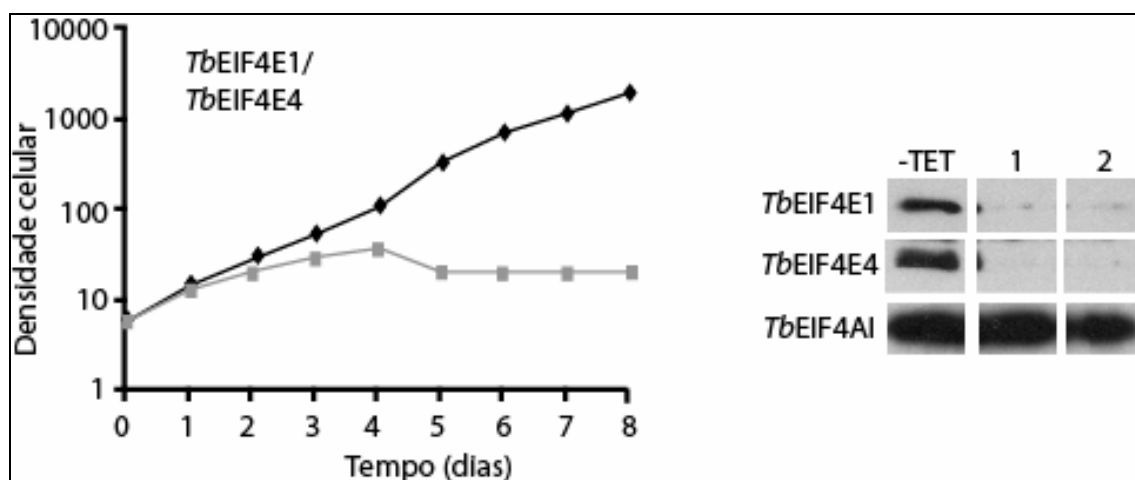


Figura 40. Gráfico do crescimento da cultura PCF submetida ao RNAi duplo dos genes *TbEIF4E1/ TbEIF4E4*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e o controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência das proteínas *TbEIF4E1* e *TbEIF4E4* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1*. (-Tet: curva de diluição da amostra do 1º dia do controle, +TET: amostras do 1º e 2º dias de células induzidas ao RNAi).

4.3.3 – Marcação metabólica com ³⁵S das células submetidas a RNAi

Para investigar se a interrupção no crescimento ou morte celular observados após o RNAi do *TbEIF4E3*, *TbEIF4E1/2* e *TbEIF4E1/4* foi devida a algum efeito no nível da síntese de proteínas ou a algum processo independente, foram avaliados os níveis protéicos nas respectivas culturas, após indução de RNAi por meio de marcação metabólica. Neste sentido, estas culturas foram incubadas na presença de metionina marcada com Met-³⁵S e amostras dos extratos celulares tiveram os níveis de incorporação da radioatividade em proteínas quantificados. A incorporação de metionina marcada foi assim monitorada e os resultados obtidos foram comparados com aqueles derivados de curvas de controle sem indução de RNAi por tetraciclina. Estes valores foram utilizados para calcular a taxa total de síntese de proteínas entre as duas curvas (com e sem tetraciclina) e estimar o efeito sobre a síntese de proteínas do RNAi das várias proteínas.

Conforme mostrado na tabela 5, três dias após a indução de RNAi, nenhum efeito sobre a síntese de proteínas foi observado para o RNAi *TbEIF4E1/2* enquanto que para os

TbEIF4E3 e *TbEIF4E1/4* houve significante declínio na tradução. No quarto dia cerca de 15% de inibição da tradução foi observado com o *TbEIF4E1/2*, mas a inibição foi substancialmente maior nas duas outras construções, em mais de 70%. Como as células do *TbEIF4E1/4* permanecem vivas por muitos dias, também foi feita uma nova marcação a fim de investigar os níveis de síntese protéica na fase sem crescimento ou proliferação da curva (oito dias após), quando foi constatado que a síntese de proteínas nas células havia praticamente cessado.

Tabela 5. Resultado da incorporação relativa de metionina radioativa em culturas de células submetidas ao RNAi comparas com culturas controle.

Incorporação relativa da metionina (^{35}S) (- TET/+TET)			
Dias após a indução com TET	3	4	8
<i>TbEIF4E3</i>	58%	36%	x
<i>TbEIF4E1/E2</i>	101%	85%	x
<i>TbEIF4E1/E4</i>	43%	28%	0%

Com o intuito de avaliar de forma qualitativa o perfil de síntese protéica nas condições de RNAi, extratos protéicos foram produzidos a partir das células submetidas ao procedimento de marcação com metionina com ^{35}S . Estes extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE e os perfis protéicos foram revelados por auto-radiografia e analisados em busca de diferenças no padrão de expressão entre células com e sem a indução de RNAi (figura 39).

Como observado, foram detectadas apenas diferenças quantitativas no perfil protéico de extratos das células transfectadas com as construções p2T7-177-*TbEIF4E3* e p2T7-177-*tbEIF4E1/E4*, com uma redução acentuada na síntese protéica geral. Nos demais experimentos não houve mudanças na síntese protéica geral e também não puderam ser identificadas proteínas específicas que sofressem redução nas células tratadas. No entanto, isso não significa que a ausência das proteínas estudadas não tem influência sobre a expressão de pequenas classes de proteínas cujo perfil não possa ser observado em gel convencional.

Técnicas mais específicas como análises em géis 2-D podem ajudar a trazer informações mais detalhadas sobre esta questão.

Os resultados de marcação metabólica demonstram que o RNAi das construções *TbEIF4E3* e *TbEIF4E1/4* afetaram diretamente a síntese de proteínas uma vez que houve uma inibição substancial da tradução que precede a interrupção do crescimento e morte celular apenas para o RNAi *TbEIF4E3*. Já para o RNAi do *TbEIF4E1/2* qualquer inibição da tradução é observada apenas no final da curva, muito próximo ao tempo da morte celular. Embora isso não exclua um papel direto na síntese de proteínas, neste último caso a inibição observada pode ser uma consequência indireta dos vários processos metabólicos associados com a morte celular induzida pelo RNAi.

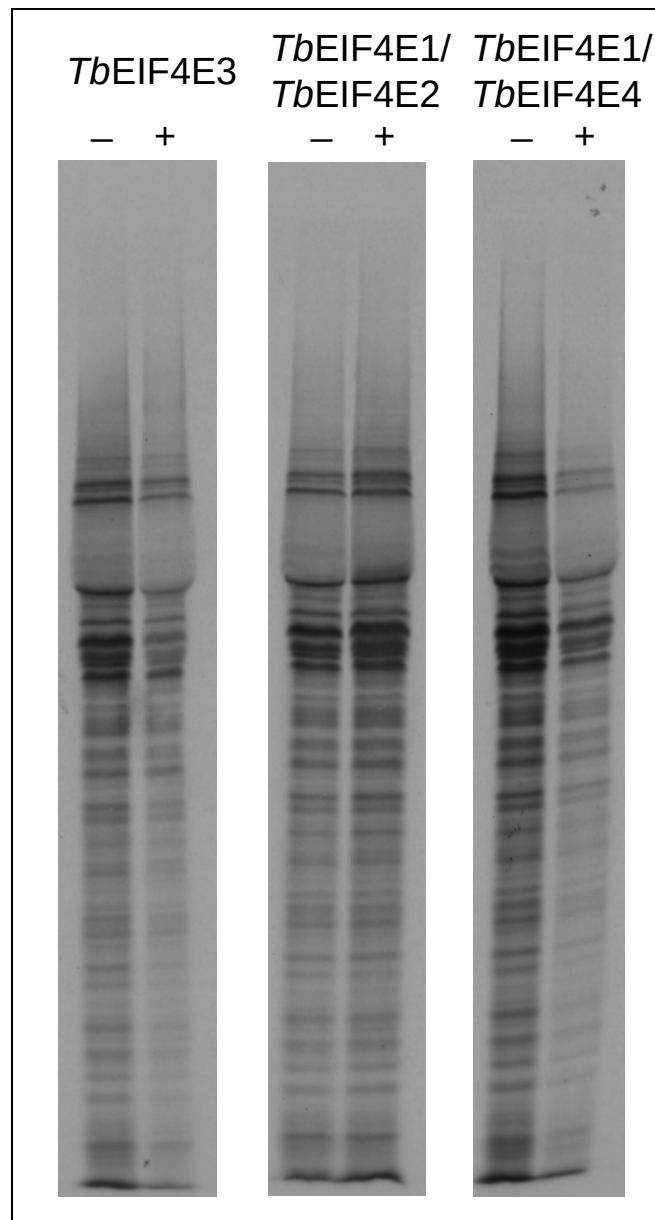


Figura 41. Auto-radiografia dos extratos protéicos das culturas de células de *T. brucei* submetidas ao RNAi e mantidas na presença de Met-³⁵S para marcação metabólica após 48h de indução do RNAi. (–) células controle não submetidas ao RNAi (quantidade equivalente à 5×10^5 células); (+) células submetidas ao RNAi (5×10^5 células).

4.4.4 – RNAi de células sanguíneas de *T. brucei* (BSF)

Os experimentos de RNAi foram então executados em células sanguíneas de *T. brucei*. Estas células se proliferam muito mais rápido que as procíclicas, multiplicando por 10 o seu número em cerca de 24h. Nessa situação os efeitos do RNAi de determinados genes são observados mais rapidamente.

Nos resultados observados para o *TbEIF4E1*, sua depleção causou a diminuição da proliferação celular a partir do primeiro dia, sem morte posterior da cultura, mas com redução significativa no crescimento (figura 42). Quanto ao *TbEIF4E2*, nenhum efeito significativo foi observado no crescimento celular, após a indução do processo de RNAi (figura 43). Já a depleção de *TbEIF4E3* levou a uma interrupção da proliferação antes de um dia da indução seguida por morte celular em três dias (figura 44) e, finalmente, o RNAi do *TbEIF4E4* causou interrupção da proliferação entre um e dois dias após a indução, culminando em morte da cultura em três dias (figura 45). Avaliação por *Western-blot* das amostras selecionadas confirmou a inibição eficaz da síntese das proteínas alvo em cada RNAi correspondente, sem qualquer redução substancial no controle *TbEIF4AI*.

Os resultados obtidos destacam o *TbEIF4E3* como proteína essencial para a sobrevivência dos diferentes estágios da vida do parasita, enquanto o *TbEIF4E4* só é estritamente necessário para a proliferação e sobrevivência da fase sanguínea. O *TbEIF4E1*, por sua vez parece ter algum papel para o crescimento ótimo das células sanguíneas e finalmente o *TbEIF4E2* não mostrou nenhuma contribuição para o crescimento celular em cultura.

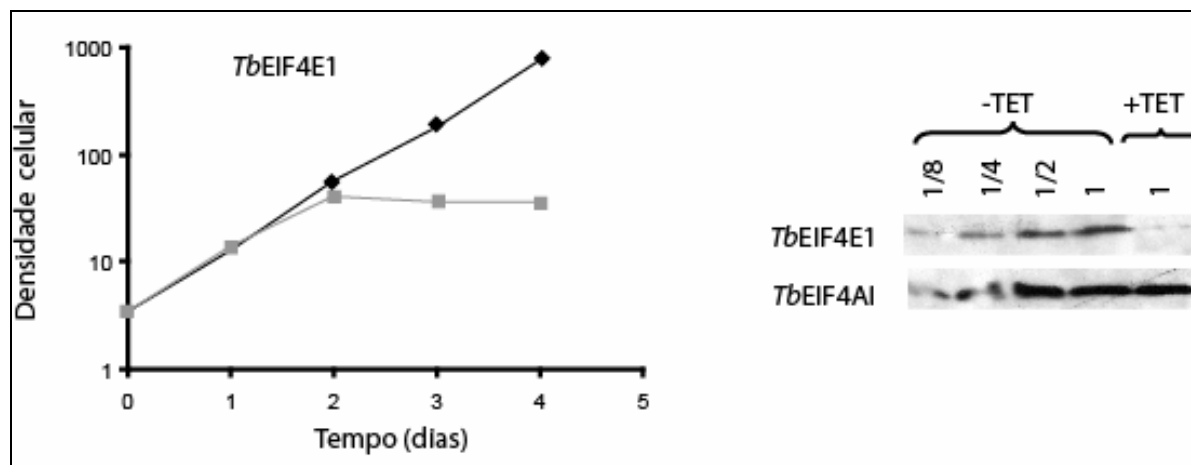


Figura 42. Gráfico do crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E1*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E4* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1*.

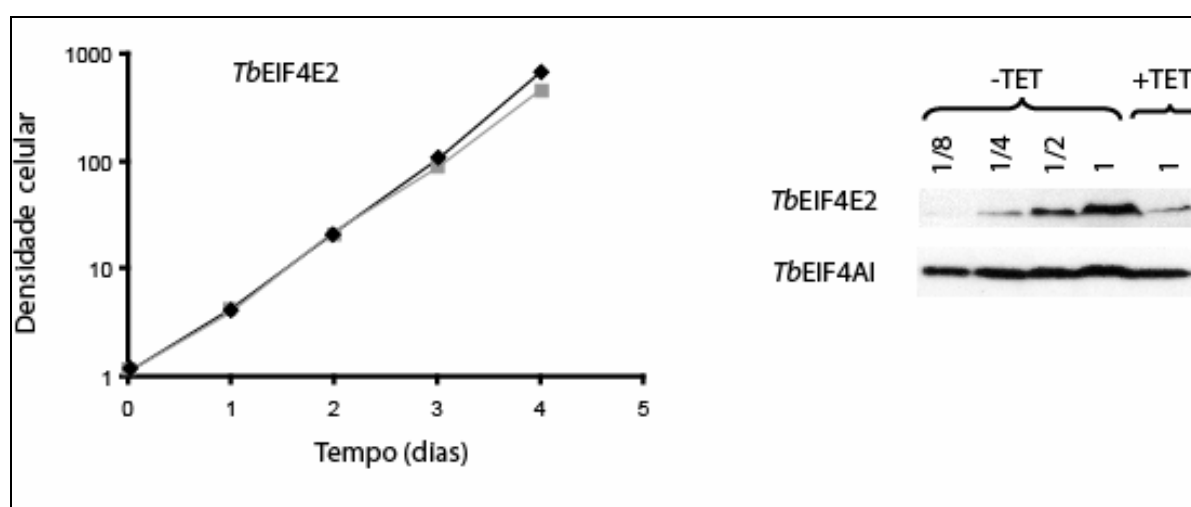


Figura 43. Gráfico do crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E2*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E2* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1*.

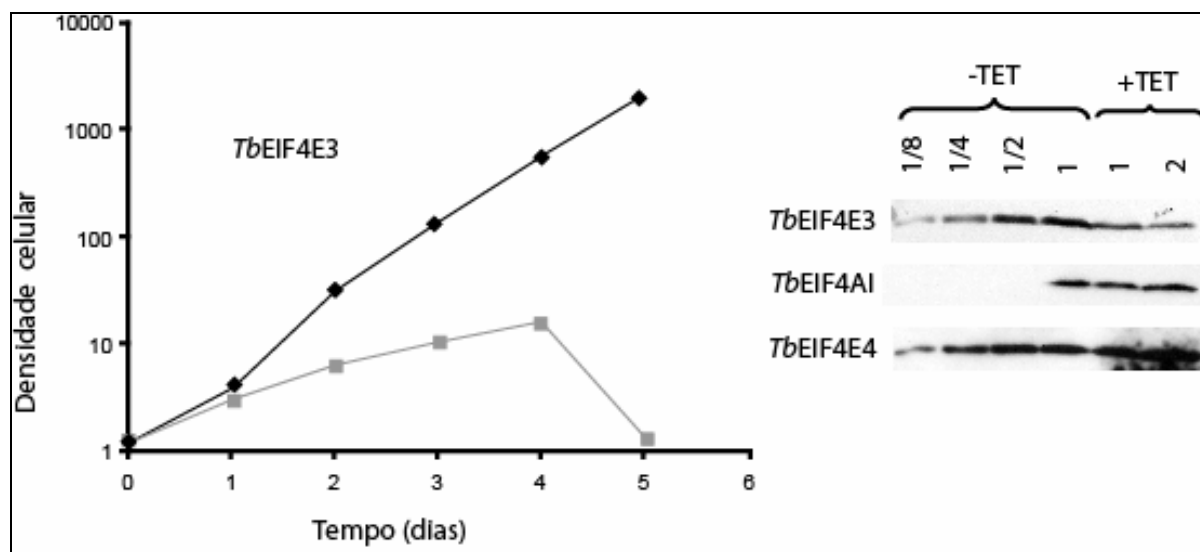


Figura 44. Gráfico do crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E3*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E3* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1* e do *TbEIF4E4*.

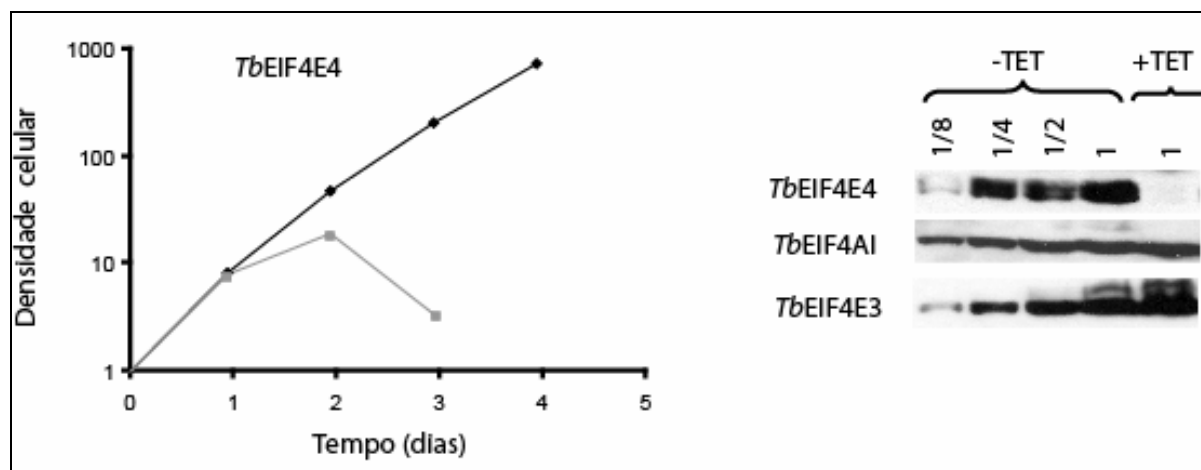


Figura 45. Gráfico do crescimento da cultura BSF submetida ao RNAi do gene *TbEIF4E4*. O crescimento de células induzidas ao RNAi está representado em cinza e controle em preto. Ao lado encontra-se o *western-blot* demonstrando a ausência da proteína *TbEIF4E3* após o tratamento e permanência da proteína controle *TbEIF4A1* e do *TbEIF4E3*.

4.5. Imunoprecipitação das proteínas *TbEIF4E1*, 3 e 4 para a identificação de complexos protéicos.

A interação do eIF4E com o eIF4G é extremamente necessária para a formação do complexo eIF4F e para a iniciação da tradução. Para investigar as interações protéicas em que os homólogos de eIF4E de *T. brucei* estão envolvidos, os genes *TbEIF4E1*, 3 e 4 foram clonados em um vetor que possibilita a expressão das respectivas proteínas em fusão traducional com o peptídeo HA. Extratos protéicos de células procíclicas transfectadas com estas construções foram inicialmente utilizados em ensaios de *western-blot* para confirmar a expressão de cada uma das proteínas de fusão. Nesse sentido estes extratos foram fracionados em gel, transferidos para membranas e usados em ensaios com anticorpo comercial disponível contra o peptídeo HA, assim como com os anticorpos purificados contra os *TbEIF4E1*, E3 e E4 (figura 46). Como pode ser observado na figura, para cada caso a proteína de fusão pode ser diferenciada da proteína nativa endógena pelo seu maior peso molecular.

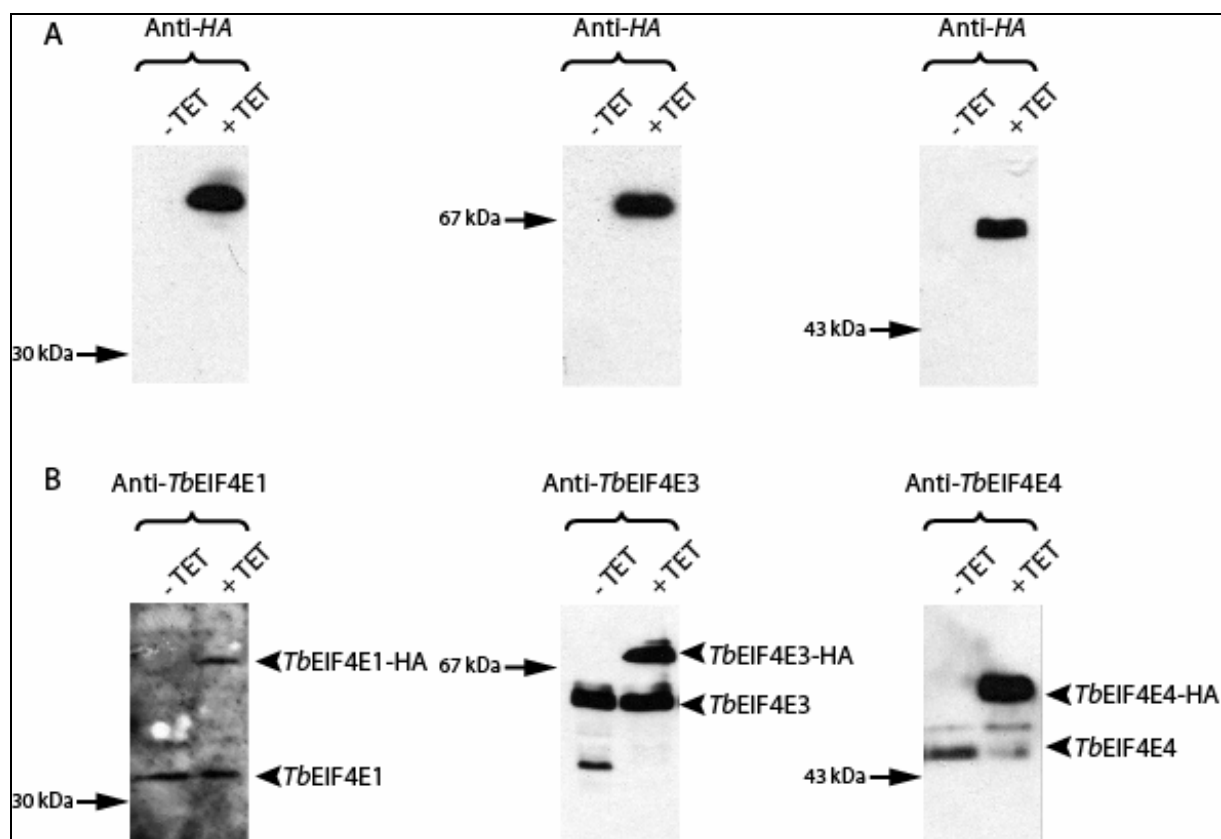


Figura 46. Expressão das proteínas *TbEIF4E1*, *E3* e *E4* em fusão com o peptídeo HA. Extratos de células transfectadas com as construções *TbEIF4E1*-HA, *TbEIF4E3*-HA e *TbEIF4E4*-HA foram induzidas com tetraciclina e a expressão das proteínas de fusão avaliadas por *western-blot* utilizando (A) anticorpo anti-HA e (B) anticorpos anti-*TbEIF4E1*, anti-*TbEIF4E3* ou anti-*TbEIF4E4*.

Para verificar a solubilidade das proteínas superexpressas, células transfectadas de *T. brucei* foram crescidas em maior escala, lisadas e submetidas à centrifugação para separar as frações solúveis (lisados) dos respectivos sedimentos. Estas amostras foram submetidas ao *western-blot* com anticorpos anti-HA para confirmação da presença das proteínas nos lisados (figura 47). Com o resultado obtido pode-se constatar que as proteínas *TbEIF4E1*, *E3* e *E4* em fusão com o peptídeo HA não se encontravam totalmente na fração solúvel do lisado e que a eficiência na obtenção destas girou em torno de 50% do total. No entanto a quantidade obtida foi suficiente para os ensaios de imunoprecipitação subsequentes com a resina agarose conjugada ao anticorpo anti-HA.

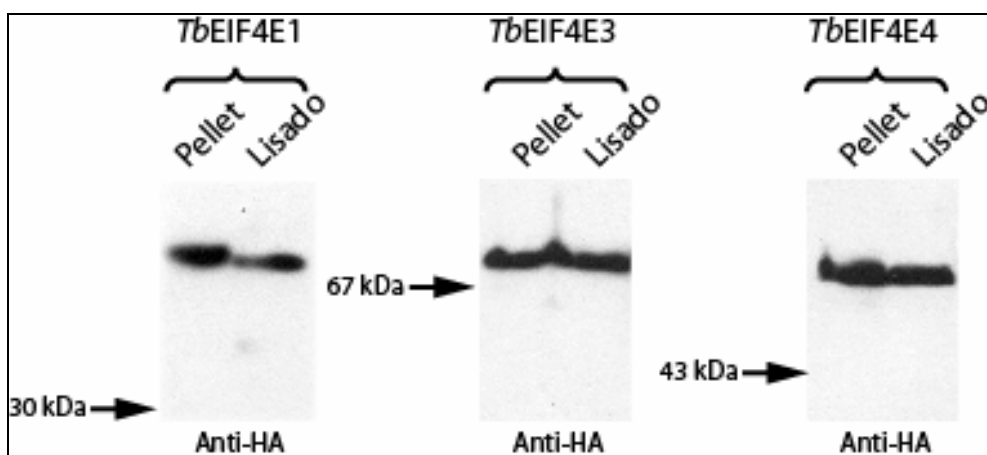


Figura 47. Avaliação por *Western-blot* dos lisados de células induzidas para a produção das proteínas *TbEIF4E1*, *E3* e *E4* em fusão com o peptídeo HA.

Para os ensaios de imunoprecipitação, para cada uma das proteínas analisadas, *TbEIF4E1*-HA, *E3*-HA e *E4*-HA, a eficiência desta foi primeiramente confirmada por *Western-blot* com os anticorpos anti-HA e também com seus respectivos anticorpos anti-*TbEIF4E*. Este procedimento não foi capaz de esgotar as proteínas dos lisados, permanecendo uma fração significativa no sobrenadante (figura 48).

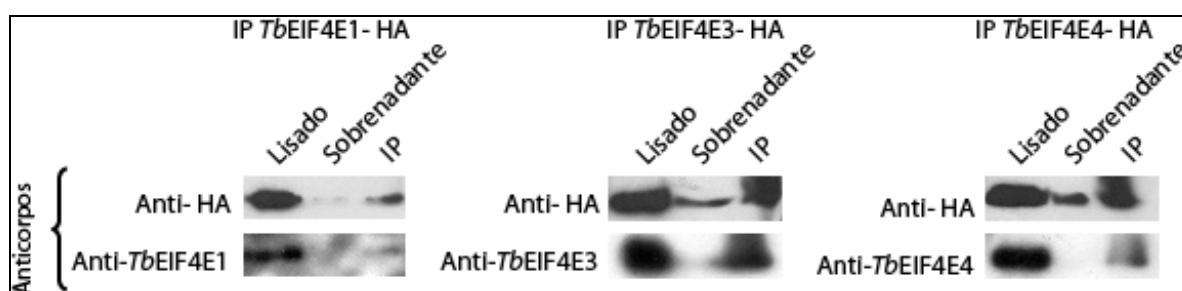


Figura 48. *Western-blot* dos ensaios de imunoprecipitação (IP), constatando a purificação das proteínas *TbEIF4E1*-HA, *E3*-HA e *E4*-HA pela ligação à resina Anti HA-agarose (IP).

Para a identificação preliminar de proteínas que possam estar se associando especificamente com os homólogos *TbEIF4E1*, E3 e E4, alíquotas dos imunoprecipitados das proteínas *TbEIF4E1*-HA, E3-HA e E4-HA foram fracionadas em gel SDS-PAGE e coradas com prata. Os perfis analisados demonstraram a presença de proteínas específicas em cada um dos imunoprecipitados (figura 49).

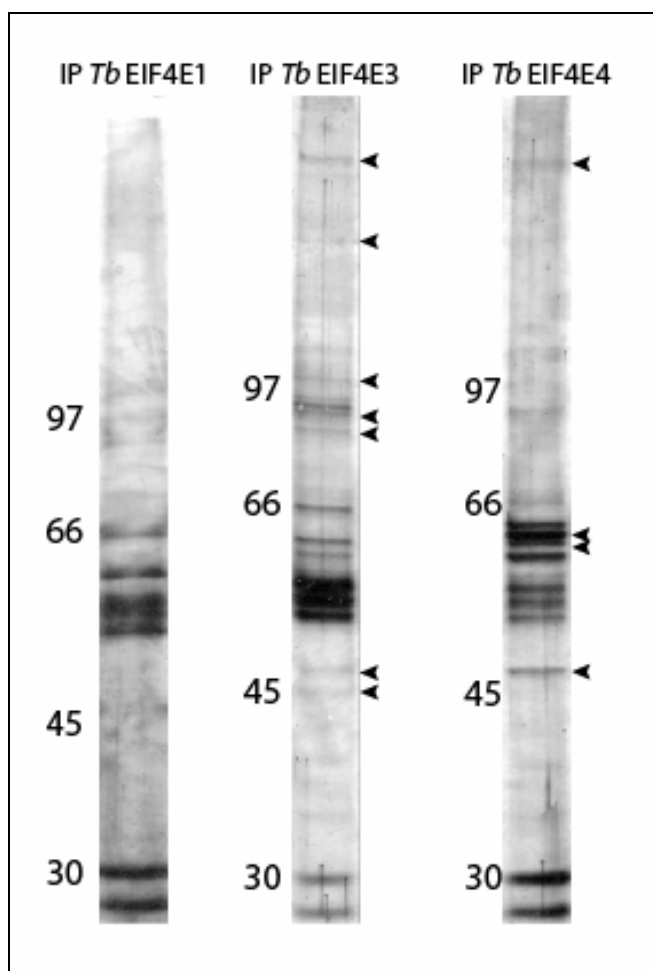


Figura 49. Gel SDS-PAGE corado com prata das imunoprecipitações *TbEIF4E1*-HA, E3-HA e E4-HA, demonstrando a presença de proteínas específicas associadas com homólogos do eIF4E de *T. brucei* (indicadas por setas negras).

Para se avaliar a capacidade de ligação das três proteínas a homólogos de eIF4G, cada uma das amostras foi testada em ensaios de *western-blot* contra os anticorpos contra três homólogos de eIF4G de *T. brucei*, os *TbEIF4G3* a *G5* (homólogos de eIF4G mais abundantes e com melhor reconhecimento de anticorpo), e também contra o *TbEIF4A1* (figura 50).

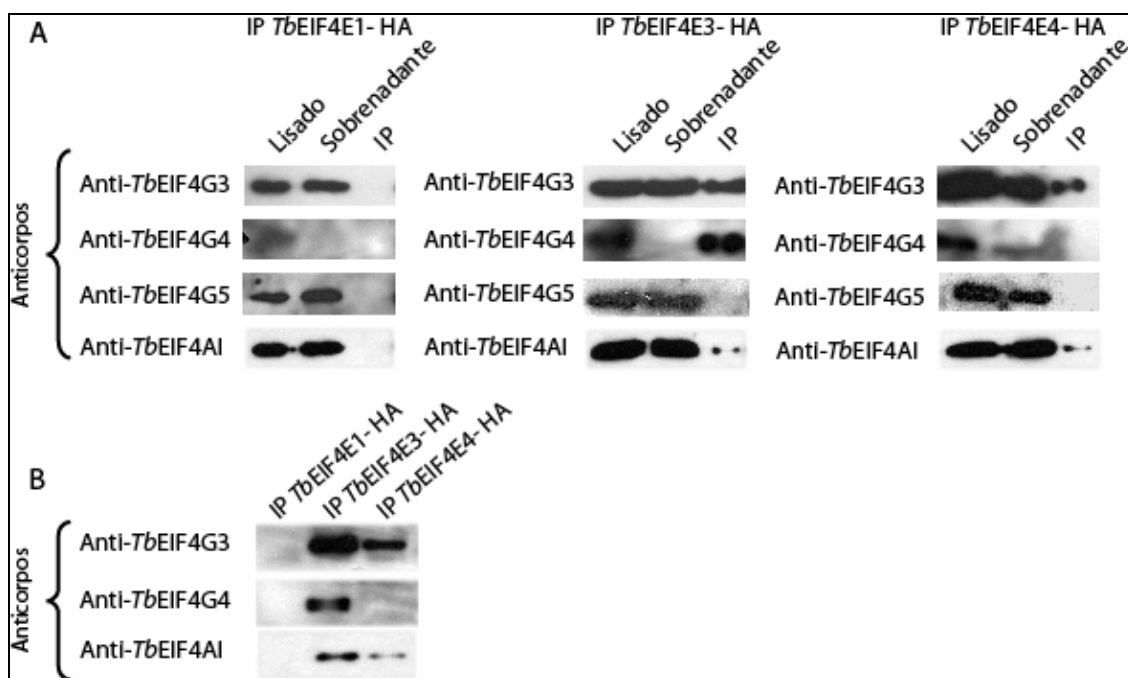


Figura 50. *Western-blot* dos ensaios de imunoprecipitação (IP) *TbEIF4E1*, *TbEIF4E3* e *TbEIF4E4*. A - Extratos citoplasmáticos de células de *T. brucei* transfectadas foram incubados com resina anti-HA agarose precipitando imunocomplexos, bem como as proteínas não-ligadas (sobrenadante), foram então utilizados em *Western-blot* com os anticorpos anti-HA, anti-*TbEIF4E1*, E3 e E4, os anticorpos *TbEIF4G3*, G4 e G5 ou *TbEIF4A1*. B - Ensaio confirmativo dos complexos, apenas com alíquotas dos imunoprecipitados *TbEIF4E1*-HA, E3 e E4.

Os resultados obtidos mostram que o *TbEIF4E1*-HA não se ligou aos homólogos *TbEIF4G3* a G5. Já o *TbEIF4E3* surpreendentemente mostrou se ligar tanto ao *TbEIF4G3* quanto ao *TbEIF4G4*, diferente do reportado em *L. major* por Reis, C.R.S. (2009) e Yoffe *et al* (2009), que sugerem que o *LmEIF4E3* se liga especificamente ao *LmEIF4G4*. De fato, ensaios de imunoprecipitação feitos com anticorpo anti-*TbEIF4E3* e com *TbEIF4G3*-HA não detectaram a ligação entre *TbEIF4E3* e *TbEIF4G3* (Freire *et al*, artigo submetido, em anexo). Finalmente, o *TbEIF4E4*-HA demonstrou se ligar especificamente ao *TbEIF4G3*, confirmando o resultado obtido por Reis, C.R.S. (2009). A presença da proteína *TbEIF4A1* foi detectada apenas nos imunoprecipitados *TbEIF4E3* e E4.

5. Discussão

Nos tripanossomatídeos digenéticos mudanças entre hospedeiros vertebrados e invertebrados remetem à necessidade de uma rápida adaptação às diferentes condições do ambiente onde se encontram, mediante mudanças nos perfis de expressão gênica por mecanismos baseados principalmente em eventos pós-transcricionais pouco compreendidos (Haile e Papadopoulou, 2007). Dentre estes mecanismos podemos destacar o controle da síntese protéica, cujo estudo perdurou por anos de forma negligenciada e que só recentemente tem despertado atenção (Clayton, 2002).

O processo de síntese protéica, por ser responsável pela produção de moléculas fundamentais, constitui um dos eventos essenciais para a sobrevivência de todos os seres vivos. Representa o passo final para a via de expressão gênica e tem sua regulação mediada especialmente em nível do reconhecimento de mRNAs maduros, função desempenhada pelo eIF4E com o auxílio de uma série de outros fatores da tradução (Gebauer e Hentze, 2004; Rhoads, 2009).

Atualmente sabe-se que existem centenas de proteínas homólogas do eIF4E em diversos organismos (Joshi *et al.*, 2005), compondo a família protéica eIF4E. Enquanto o eIF4E “verdadeiro”, descoberto há mais de 30 anos em células de mamíferos, atua no controle da tradução, homólogos distintos participam em processos diversos, relacionados ou não a síntese de proteínas (Rhoads, 2009). Além disso, a idéia canônica da existência de um único complexo eIF4F controlando a expressão de todas as proteínas veio abaixo com a descoberta de vários complexos eIF4F e complexos alternativos em diversos organismos, que são capazes de controlar a tradução de grupos de mRNAs em tecidos específicos ou em momentos específicos do desenvolvimento (revisado por Rhoads, 2009). Nos tripanossomatídeos a multiplicidade de fatores de iniciação identificados e possuidores de características próprias remetem à possibilidade de uma organização diferente do complexo

de iniciação da tradução (Dhalia *et al.*, 2005; Yoffe *et al.*, 2009). Diante disso, o presente trabalho visou contribuir para compreensão do mecanismo de iniciação da tradução em tripanossomatídeos avaliando as propriedades individuais de quatro homólogos ao eIF4E de *T. brucei*. Os dados obtidos revelaram semelhanças importantes e diferenças marcantes das características destes homólogos, quando comparados aos seus ortólogos em *L. major*.

Em geral, os dados apresentados excluem grandes diferenças na expressão dos quatro homólogos eIF4E entre duas fases do ciclo de *T. brucei*, mas demonstraram uma clara diferença na expressão total entre os homólogos. Os ensaios quantitativos dos homólogos de eIF4E de *T. brucei* revelaram que o TbEIF4E3 é o mais abundante tanto em células da forma procíclica e quanto da forma sanguínea. O TbEIF4E1 e TbEIF4E2 foram detectados em pequenas quantidades, tanto na fase do inseto (como encontrado em *L. major*) quanto na sanguínea. O TbEIF4E4 também foi encontrado em abundância nas duas fases do ciclo de vida do parasita. Os valores encontrados estão de acordo com o constatado para cada um dos homólogos estudados em *L. major* (Dhalia *et al.*, 2005) e estão um pouco abaixo dos correspondentes aos encontrados em levedura (von der Haar *et al.*, 2002). No entanto, em levedura, boa parte do eIF4E está ligada à proteína p20 (um inibidor da tradução), diminuindo assim a quantidade de eIF4E disponível para a tradução (von der Haar *et al.*, 2002).

A localização subcelular dos homólogos estudados indica que pelo menos o TbEIF4E3 e o TbEIF4E4 provavelmente não atuam no núcleo. Em contraste, TbEIF4E1 e 2 localizam-se no núcleo e no citoplasma. Em mamíferos, a importação nuclear de eIF4E é mediada pelo transportador do eIF4E, eIF4E-T (Dostie *et al.*, 2000a), e recentemente foi reportado que a 4E-BP1 atua na retenção do eIF4E no núcleo (Rong *et al.*, 2008). Em tripanossomatídeos, seqüências codificando eIF4E-T ou de eIF4E-BP1 não são claramente encontradas no genoma, sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na localização nuclear dos TbEIF4E1 e TbEIF4E2. Estes resultados de localização estão de acordo com as experiências relatadas para as quatro proteínas (Kramer *et al.*, 2008). Nos mamíferos, o eIF4E-1 também é

encontrado no núcleo, em locais onde são encontrados fatores de *splicing* (Dostie *et al.*, 2000b). Este padrão de localização foi visto para superexpressão dos *TbEIF4E1* e *E2*, que estão espalhados por toda a célula. Os perfis de localização *TbEIF4E3* e *E4* não são compatíveis com as funções no processamento de mRNA ou de exportação do núcleo, reforçando o possível papel destas proteínas na tradução. *TbEIF4E1* e *2*, permanecem como possíveis candidatos para desempenhar as funções nucleares atribuídas ao em outros organismos.

Com o resultado observado nos experimentos de RNAi, é indicado que pelo menos um dos eIF4E de *T. brucei*, o *TbEIF4E3*, seja estritamente necessário para a sobrevivência dos parasitos em ambas as formas, característica também compartilhada por verdadeiros eIF4E em outros organismos, podendo indicar que este homólogo de eIF4E seja o mais provável candidato envolvido na tradução neste organismo. No entanto, a queda de crescimento apresentada nos homólogos *TbEIF4E1* e *E4* pode indicar um importante papel destes na manutenção normal das células da fase sanguínea. As análises de marcação metabólica confirmam a importância do *TbEIF4E3* para a sobrevivência de células procíclicas, uma vez que a depleção desta proteína provocou um decréscimo na taxa de tradução em poucos dias e os *TbEIF4E1*, *TbEIF4E2* e *TbEIF4E4* não demonstraram grandes alterações. No entanto, a depleção dupla dos *TbEIF4E1/ TbEIF4E4* provocou a inibição total da tradução, ao contrário da depleção individual das duas proteínas. Isto pode ser devido a uma atividade complementar na ligação do *TbEIF4G3*, pois em *L. major*, tanto EIF4E1 quanto E4 ligam-se ao cap4, interagem fisicamente com EIF4G3 e as três proteínas co-migram com polissomos em gradientes de sacarose, com forte implicação destas proteínas na tradução (Yoffe *et al.* 2006; Yoffe *et al.* 2009). Em *Leishmania* o EIF4G3 também liga-se eficientemente ao homólogo eIF4A envolvidos na tradução (Dhalia *et al.*, 2005; Dhalia *et al.*, 2006) e em *T. brucei* EIF4G3 atua na síntese de proteínas, uma vez que a sua depleção inibe rapidamente a tradução (Moura, 2007). As contribuições individuais destas duas proteínas para o processo

de iniciação da tradução ainda precisam ser esclarecidas, os resultados do RNAi duplo *TbEIF4E1/E4* pode ser explicado se o *TbEIF4E1* possa substituir funcionalmente o *TbEIF4E4* quando este estiver ausente ou vice versa.

É também digno de nota que o RNAi duplo *TbEIF4E1/ TbEIF4E2* causou rápida morte celular sem qualquer ação sobre a taxa de tradução, indicando que ambos podem participar de outros processos, novamente dando indícios de um provável transporte de mRNAs quando relacionada a sua localização diferente do *TbEIF4E3* e *TbEIF4E4*. Talvez a deleção dupla bloqueie uma via de transporte de mRNAs específicos que provoca interrupção de processos relacionados à duplicação das células, sem interferir na tradução global, mas para confirmar tal ação são necessários ensaios que identifiquem quais mRNAs podem seletivamente ser recrutados por essas proteínas.

Dentre os fatores analisados, o EIF4E2 parece ser o menos conservado dos quatro homólogos de eIF4E estudados. Apesar de a proteína *TbEIF4E2* ligar-se ao cap monometilado (Freire, 2005), a proteína *LmEIF4E2* não liga (Dhalia *et al.*, 2005) e foi demonstrado que tem uma ligação preferencial para o cap4 (Yoffe *et al.*, 2006). Essa diferença talvez possa ser explicada pela existência de duas inserções ao longo da metade C-terminal do *LmEIF4E2*, mas inexistentes nos seus ortólogos de *T. brucei* e *T. cruzi* (Dhalia, *et al.*, 2005). Essas inserções não são encontradas nas seqüências de humano ou de levedura e sua presença, bem como as diferenças na ligação ao cap, podem implicar em um desvio da função original no EIF4E2 de *Leishmania*.

Foram demonstradas diferenças entre os resultados obtidos anteriormente para *L. major* e os obtidos neste trabalho em *T. brucei*. Isso pode ser devido à presença de uma mutação na região de ligação do *LmEIF4E3* ao *LmEIF4G3*. No *LmEIF4G4* uma possível região de ligação para o *LmEIF4E3* é composta pelos resíduos TLXXIL e é conservada também no *TbEIF4G4*, composta pelos resíduos SVXXLL, com substituição de aminoácidos S/T e I/L, mas preservação das propriedades. A mesma região é também conservada no

TbEIF4G3, composta pelos resíduos TIXLL, mas não no *LmEIF4G3* onde há uma mudança no último aminoácido hidrofóbico apolar (Leu) para um hidrofílico básico (Arg), formando a sequência TVXXIR. No entanto, estudos de mutagênese são necessários para se comprovar a influência dessa diferença.

A associação dos *TbEIF4E1*, *TbEIF4E3* e *TbEIF4E4* com os *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* e *TbEIF4G5* foi avaliada e, os resultados demonstram uma diferença marcante entre os complexos de *Leishmania* e *Trypanosoma*. Enquanto em *L. major* foram reportadas apenas as ligações *LmEIF4E4-LmEIF4G3* e *LmEIF4E1-LmEIF4G3* (Yoffe *et al.*, 2009), os dados obtidos em *T. brucei* indicam que a ligação *TbEIF4E3-TbEIF4G3* compõe um novo complexo eIF4F. Os dados obtidos também apontam claramente a inexistência de ligação entre o *TbEIF4G5* e os homólogos ao eIF4E de *T. brucei* analisados.

As semelhanças observadas entre *TbEIF4E3* e 4 em nível de sequência, sua localização celular, abundância e sua capacidade de se ligar a parceiros eIF4G são consistentes com a existência de conjuntos distintos eIF4F. Até agora, a existência de dois complexos com eIF4E e eIF4G distintos e dentro do mesmo organismo, foi relatada somente em plantas (Browning *et al.*, 1992). Estes dois complexos podem co-existir e diferem em sua capacidade de traduzir diferentes classes de mRNAs (Gallie e Browning, 2001; Mayberry *et al.*, 2009). Assim, mRNAs individuais ou classes de mRNAs podem responder à abundância relativa de um fator de iniciação da tradução específico afetando a quantidade final de proteínas traduzidas. É provável que complexos de iniciação, formados por proteínas específicas, permitam a tradução eficiente de mRNAs nas diferentes variedades de processos celulares. Diante dos resultados obtidos, existe a possibilidade de que algo semelhante possa acontecer com as proteínas dos tripanossomatídeos.

O EIF4E3, o mais abundante dos homólogos eIF4E em ambas as espécies de *L. major* e *T. brucei*, é o único a ser estritamente necessário para a sobrevivência de ambos os estágios de desenvolvimento de *T. brucei*. No entanto, tanto os ortólogos de *L. major* quanto de *T. brucei*

não possuem qualquer afinidade significativa pelo *cap* de mamíferos (Dhalia *et al.*, 2005; Freire, 2005) e a proteína de *L. major* mostrou limitada capacidade de ligar-se a uma estrutura *cap4* (Yoffe *et al.*, 2006). O *LmEIF4E3* também parece não se associar a polissomos (Yoffe *et al.*, 2006), mas isso não exclui necessariamente um papel na tradução, pois a maior parte do *eIF4E* de mamíferos não está ligado aos ribossomos (Rau *et al.*, 1996). Os presentes resultados indicam que ambas as proteínas *EIF4E3* e *4* podem participar na síntese protéica; porém as distintas afinidades pelo *cap* podem indicar reconhecimento de mRNAs diferentes. É possível que *EIF4E3* só possa se ligar a mRNAs quando ligado ao parceiro homólogo de *eIF4G* ou quando associado a alguma outra proteína de ligação ao RNA. Em mamíferos, o *eIF4E-2* (também chamado de *4EHP*), está envolvido na repressão seletiva de mRNAs (Cho *et al.*, 2005; Lasko *et al.* 2005, Cho *et al.*, 2006).

Finalmente, diante dos resultados mostrados propõe-se a existência de pelo menos três complexos em *T. brucei*, implicados diretamente na tradução e formados pelas subunidades: (1) *TbEIF4E3-TbEIF4G4-TbEIF4AI*; (2) *TbEIF4E3- TbEIF4G3-TbEIF4AI* e (3) *TbEIF4E4-TbEIF4G3-TbEIF4AI*. A existência de vários complexos possíveis indica que estes parasitas possuem uma maquinaria complexa de iniciação da síntese protéica, com características próprias. Estudos adicionais do papel funcional destes fatores permitirão relacioná-los a mecanismos específicos de regulação da expressão gênica neste parasita.

6. Conclusões

1. As proteínas *TbEIF4E1* a 4 podem ser divididas em duas classes, uma não envolvida na tradução, formada por *TbEIF4E1* e E2 e outra envolvida na tradução formada por *TbEIF4E3* e E4.
2. As proteínas *TbEIF4E3* e 4 demonstraram indícios de atuar na tradução como participantes de complexos eIF4F;
3. A proteína *TbEIF4E3* demonstrou ser a mais importante para tradução;
4. Os resultados obtidos não indicam os *TbEIF4E1* e 2 como participantes do processo de tradução;
5. Existem pelo menos três complexos formados por homólogos ao eIF4E e ao eIF4G em *T. brucei*: (1) *TbEIF4E3* - *TbEIF4G4* - *TbEIF4AI*; (2) *TbEIF4E3* - *TbEIF4G3* - *TbEIF4AI* e (3) *TbEIF4E4* - *TbEIF4G3* - *TbEIF4AI*.

7. Referências Bibliográficas

- Alexander, J., Satoskar, A.R. and Russell, D.G. (1999). *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.* 112(18): 2993-3002.
- Alonso, G., Guevara, P. and Ramirez, J.L. (1992). Trypanosomatidae códon usage and GC distribution. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 87:517-523.
- Altmann, M., Schmitz, N., Berret, C. and Trachsel, H. (1997). A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J.* 16:1114-1121.
- Arhin, G.K., Li, H., Ullu, E. and Tschudi, C. (2006). A protein related to the vaccinia virus cap-specific methyltransferase VP39 is involved in cap 4 modification in *Trypanosoma brucei*. *RNA.* 12(1):53-62.
- Arhin, G.K., Ullu, E. and Tschudi, C. (2006). 2'-O-methylation of position 2 of the trypanosome spliced leader cap 4 is mediated by a 48 kDa protein related to vaccinia virus VP39. *Mol Biochem. Parasitol.* 147(1):137-139.
- Ashford, R.W. (2000). The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasit.* 30:1269-1281.
- Bailey, M.S. and Lockwood, D.N. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 25(2):203-211.
- Baker, J.R. (1994). The origins of parasitism in the protists. *Int. J. Parasit.* 24:1131-1137.
- Bangs, J.D., Carin, P.F., Hashizume, T., McCloskey, J.A. and Noothroyd, J.C. (1992). Mass spectrometry of mRNA Cap 4 from Trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J. Biol. Chem.* 267(14):9805-9815.

Barhoumi, M., Tanner, N.K., Banroques, J., Linder, P. and Guizani, I. (2006). *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *FEBS J.* 273(22):5086-5100.

Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J. and Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* 362(9394):1469-1480.

Bates, E.J., 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.

Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. for Parasitol.* 37:1097–1106.

Batista, J.A., 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.

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.

Blackshear, P.J., Stumpo, D.J., Carballo, E. and Lawrence Jr, J.C. (1997). Disruption of the gene encoding the mitogen-regulated translational modulator PHAS-I in mice. *J. Biol. Chem.* 272:31510- 31514.

Bonneau, A.M. and Sonenberg, N. (1987). Involvement of the 24-kDa cap binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J. Biol. Chem.* 262:11134-11139.

Boothroyd, J.C. and Cross, G.A. (1982). Transcripts coding for variant surfaceglycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene.* 20:281–289.

Borst, P. and Sabatini, R. (2008). Base J: discovery, biosynthesis, and possible functions. *Annu. Rev. Microbiol.* 62:235-251.

- Borst, P., van der Ploeg, M., van Hoek, J.F.M., Tas, J. and James, J. (1982). On the DNA content of trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6:13.
- Boucher, N., Wu, Y., Dumas, C., Dube, M., Sereno, D., Breton, M. and Papadopoulou, B. (2002). A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'- untranslated region element. *J. Biol. Chem.* 277(22):19511-19520.
- 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., Browning, K.S., Lax, S.R. and Ravel, J.M. (1987). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J. Biol. Chem.* 262:11228–11232.
- Browning, K.S., Webster, C., Roberts, J.K. and Ravel, J.M. (1992). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J. Biol. Chem.* 267:10096–10100.
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F. and Burri, C. (2010) Human African trypanosomiasis. *Lancet.* 375(9709):148-159.
- Campbell, D.A., Suyama, Y. and Simpson, L. (1989). Genomic organization of nuclear tRNA^{Gly} and tRNA^{Leu} genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol* 37:257–262.
- Campbell, D.A., Thomas, S. and Sturm, N.R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Inf.* 5(13):1231-1240.
- Cavalier-Smith, T. (1981). Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems.* 14(3-4):461-481.
- Cavalier-Smith, T. (2002). The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52(2):297-354.
- Cavalier-Smith, T. (2009a). Predation and eukaryote cell origins: a coevolutionary perspective. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41(2):307-322.
- Cavalier-Smith, T. (2009b). Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett.* [Epub ahead of print]

Clayton, C. and Shapira, M. (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.

Cordingley, J.S. (1985). Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 17:321– 330.

Cougot, N., van Dijk, E., Babajko, S. and Séraphin, B. (2004). ‘Cap-tabolism’. *Trends Biochem. Sci.* 29(8):436-444.

Courtin, D., Berthier, D., Thevenon, S., Dayo, G.K., Garcia, A. and Bucheton, B. (2008). Host genetics in African trypanosomiasis. *Infect Genet. Evol.* 8(3):229-238.

Cowling, V.H. (2009). Regulation of mRNA cap methylation. *Biochem. J.* 425(2):295-302.

Culjkovic, B., Topisirovic, I. and Borden, K.L. (2007). Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle.* 6(1):65-9.

Culjkovic, B., Topisirovic, I., Skrabanek, L., Ruiz-Gutierrez, M. and Borden, K.L. (2005). eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J. Cell Biol.* 169(2):245-56.

De Benedetti, A. and Harris, A.L. (1999). eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31(1):59-72.

De Benedetti, A. and Rhoads, R.E. (1990). Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 8212–8216.

De Lange, T., Berkvens, T.M., Veerman, H.J., Frasch, A.C., Barry, J.D. and Borst, P. (1984). Comparison of the genes coding for the common 5' terminal sequence of messenger RNAs in three trypanosome species. *Nucleic Acids Res.* *12(11)*:4431-4443.

De Lange, T., Kooter, J.M., Michels, P.A. and Borst, P. (1983). Telomere conversion in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.* *11(23)*:8149-8165.

de Melo Neto, O.P., Standart, N. and Martins de Sá, C. (1995). Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* *23*:2198-2205.

de Souza, W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kin. Biol. Dis.* *1*:3.

Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin. Derm.* *14*:417-423.

Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and perspectives. *Comp. Immun. Microbiol. Infec. Dis.* *27*:305-318.

Dhalia, R. Caracterização da iniciação da síntese protéica em tripanosomatídeos: análise funcional de polipeptídeos homólogos às subunidades do complexo eIF4F de iniciação da tradução. (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)) UNB, Brasília. 2005.

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.

Di Noia, J.M., D'Orso, I., Sanchez, D.O. and Frasch, A.C. (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J. Biol. Chem.* *275(14)*:10218-10227.

D'Orso, I. and Frasch, A.C. (2001a). Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 276(19):15783-15793.

D'Orso, I. and Frasch, A.C. (2001b). TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 276(37):34801-34809.

Dostie, J., Ferraiuolo, M., Pause, A., Adam, S.A. and Sonenberg, N. (2000a). A novel shuttling protein 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *EMBO J.* 19:3142–3156.

Dostie, J., Lejbkiewicz, F. and Sonenberg, N. (2000b). Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J. Cell. Biol.* 148:239–247.

Douris, V., Telford, M.J. and Averof, M. (2009). Evidence for multiple independent origins of trans-splicing in Metazoa. *Mol Biol Evol.* [Epub ahead of print].

Duncan, R., Milburn, S.C. and Hershey, J.W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of hela cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. *J. Biol. Chem.* 262:380-388.

El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E. and Donelson, J.E. (2000). The African trypanosome genome. *Int. J. Parasitol.* 30:329- 345.

El-Sayed, N.M., 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. (2005a). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science.* 309(5733):404-409.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Bartholomeu, D.C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A.N., Ghedin, E., Worthey, E.A., Delcher, A.L., Blandin, G., Westenberger, S.J., Caler, E., Cerqueira, G.C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Aslund, L., Attipoe, P., Bontempi, E., Bringaud, F., Burton, P., Cadag, E., Campbell, D.A., Carrington, M., Crabtree, J., Darban, H., da Silveira, J.F., de Jong, P., Edwards, K., Englund, P.T., Fazelina, G., Feldblyum, T., Ferella, M., Frasch, A.C., Gull, K., Horn, D., Hou, L., Huang, Y., Kindlund, E., Klingbeil, M., Kluge, S., Koo, H., Lacerda, D., Levin, M.J., Lorenzi, H., Louie, T., Machado, C.R., McCulloch, R., McKenna, A., Mizuno, Y., Mottram, J.C., Nelson, S., Ochaya, S., Osoegawa, K., Pai, G., Parsons, M., Pentony, M., Pettersson, U., Pop, M., Ramirez, J.L., Rinta, J., Robertson, L., Salzberg, S.L., Sanchez, D.O., Seyler, A., Sharma, R., Shetty, J., Simpson, A.J., Sisk, E., Tammi, M.T., Tarleton, R., Teixeira, S., Van Aken, S., Vogt, C., Ward, P.N., Wickstead, B., Wortman, J., White, O., Fraser, C.M., Stuart, K.D., Andersson, B. (2005b). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 309,409-415.

El-Sayed, N.M., Myler, P.J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., Caler, E., Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. and Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8(1):9-22.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. and Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):9-22.

Fernandes, A.P., Nelson, K. and Beverley, S.M. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on age and origins of parasitism. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 90:11608-11612.

Ferraiuolo, M.A., Lee, C.-S., Ler, L.W., Hsu, J.L., Costa-Mattioli, M., Luo, M.-J., Reed, R. and Sonenberg, N. (2004). A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 101(12):4118-4123

Freire, E. R. (2005). Caracterização funcional de homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de tripanosomatídeos. (Dissertação de Mestrado em Genética). Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Gebauer, F. and Hentze, M.W. (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Mol. Cell. Biol.* 5:827-835.

Ghedin, E., Bringaud, F., Peterson, J., Myler, P., Berriman, M., Ivens, A., Andersson, B., Bontempi, E., Eisen, J., Angiuoli, S., Wanless, D., von Arxa, A., Murphye, L., Lennard, N., Salzberg, S., Adamsa, M.D., White, O., Hall, N., Stuart, K., Fraser, C.M. and El-Sayed, N.M.A. (2004). Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 134:183–191.

Ginger, M.L. (2005). Trypanosomatid biology and euglenozoan evolution: new insights and shifting paradigms revealed through genome sequencing. *Protist.* 156:377-392.

Gingras, A.C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:913-63.

Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:913-963.

Goodfellow, I.G. and Roberts, L.O. (2008). Eukaryotic initiation factor 4E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:2675-2680.

Goss, D.J., Carberry, S.E., Dover, T.E., Merrick, W.C. and Rhoads, R.E. (1990). Fluorescence study of the binding of m7GpppG and rabbit globin mRNA to protein synthesis initiation factors 4A, 4E, and 4F. *Biochem.* 29:5008-5012.

Gossage, S.M., Rogers, M.E. and Bates, P.A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in the sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.* 33:1027-1034.

Graff, J.R., Konicek, B.W., Carter, J.H. and Marcusson, E.G. (2008). Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res.* 68(3):631-634.

Graff, J.R., Konicek, B.W., Vincent, T.M., Lynch, R.L., Monteith, D., Weir, S.N., Schwier, P., Capen, A., Goode, R.L., Dowless, M.S., Chen, Y., Zhang, H., Sissons, S., Cox, K., McNulty, A.M., Parsons, S.H., Wang, T., Sams, L., Geeganage, S., Douglass, L.E., Neubauer, B.L., Dean, N.M., Blanchard, K., Shou, J., Stancato, L.F., Carter, J.H. and Marcusson, E.G. (2007). Therapeutic suppression of translation initiation factor eIF4E expression reduces tumor growth without toxicity. *J. Clin. Invest.* 117(9):2638-48.

Grams, J., Morris, J.C., Drew, M.E., Wang, Z., Englund, P.T. and Hajduk, S.L. (2002). A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. *J. Biol. Chem.* 277(19):16952-16959.

Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A., McCarthy, J.E.G. and Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115:739-750.

Gull, K. (1999). The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:629-655.

Haghighat, A., Svitkin, Y., Novoa, I., Kuechler, E., Skern, T. and Sonenberg, N. (1996). The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J. Virol.* 70:8444-8450.

Haile, S. and Papadopoulou, B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:569-577.

Hall, M.P. and Ho, C.K. (2006). Functional characterization of a 48 kDa *Trypanosoma brucei* cap 2 RNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 34(19):5594-602.

Hammarton, T.C., Monnerat, S. and Mottram, J.C. (2007). Cytokinesis in trypanosomatids. *Curr. Opin. Microbiol.* 10(6):520-7.

Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F.R. and Michels, P.A.M. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kin. Biol. Dis.* 2:11.

Heitman, J. (2006). Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. *Curr. Biol.* 16(17):711-725.

Hernandez, G., Altmann, M., Sierra, J.M., Urlaub, H., del Corral, R.D., Schwartz, P. and Rivera-Pomar, R. (2005). Functional analysis of seven encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 122:529-543.

Hershey, J.W.B. and Merrick, W.C. (2000). Translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Press, pp. 33-75.

Hooker, L., Sully, R., Handa, B., Ono, N., Koyano, H. and Klumpp, K. (2003). Quantitative analysis of influenza virus RNP interaction with RNA cap structures and comparison to human cap binding protein eIF4E. *Biochemistry* 42(20):6234-6240.

Hotchkiss, T.L., Nerantzakis, G.E., Dills, S.C., Shang, L. and Read, L.K. (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.

Irmer, H. and Clayton, C. (2001). Degradation of the unstable EP1 mRNA in *Trypanosoma brucei* involves initial destruction of the 3'-untranslated region. *Nucleic Acids Res.* 29(22):4707-4715.

Ivens, A.C., 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., Bianchetin, 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 Gaudenzi, 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., Müller-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., Schäfer, 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.

Jäger, A.V., De Gaudenzi, J.G., Cassola, A., D'Orso, I. and Frasch, A.C. (2007) mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104(7):2035-2042.

Jankowska-Anyszka, M., Lamphear, B.J., Aamodt, E.J., Harrington, T., Darzynkiewicz, E., Stolarski, R. and Rhoads, R.E. (1998). Multiple Isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures. *J. Biol. Chem.* 273(17):10538– 10542.

Jones, R.M., Branda, J., Johnston, K.A., Polymenis, M., Gadd, M., Rustgi, A., Callanan, L. and Schmidt, E.V. (1996). An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol. Cell. Biol.* 16:4754-4764.

Joshi, B., Cai, A.L., Keiper, B.D., Minich, W.B., Mendez, R., Beach, C.M., Stepinski, J., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. and Rhoads, R.E. (1995). Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J. Biol. Chem.* 270:14597–14603.

Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* 271:2189-2203.

Joshi, B., Lee, K., Maeder, D.L., and Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol.* 5: 48.

Keiper, B.D., Gan, W. and Rhoads, R.E. (1999). Protein synthesis factor 4G. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:37-41.

Keiper, B.D., Lamphear, B.J., Deshpande, A.M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E.J., Blumenthal, T. and Rhoads, R.E. (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 275: 10590-10596.

Kelly, S., Reed, J., Kramer, S., Ellis, L., Webb, H., Sunter, J., Salje, J., Marinsek, N., Gull, K., Wickstead, B. and Carrington, M. (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(1):103-9.

Kissinger, J.C. (2006). A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends Parasitol.* 22:240-243.

Kleijn, M., Scheper, G.C., Voorma, H.O. and Thomas, A.A.M. (1998). Regulation of translation initiation factors by signal transduction. *Eur. J. Biochem.* 253:531–544.

Knauf, U., Tschopp, C. and Gram, H. (2001). Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol. Cell Biol.* 21:5500-5511.

Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Webb, H., Hoheisel, J.D., Clayton, C. and Carrington, M. (2008). 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.* 121(18):3002-3014.

Kowalska, J., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Ziemniak, M., Darzynkiewicz, E. and Jemielity, J. (2009). Phosphorothioate analogs of m7GTP are enzymatically stable inhibitors of cap-dependent translation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19(7):1921-1925.

Leander, B.S., Esson, H.J., Breglia, S.A. (2007). Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *Bioessays.* 29(10):987-1000.

LeBowitz, J.H., 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.

Lewdorowicz, M., Yoffe, Y., Zuberek, J., Jemielity, J., Stepinski, J., Kierzek, R., Stolarski, R., Shapira, M. and Darzynkiewicz, E. (2004). Chemical synthesis and binding activity of the Trypanosomatid cap-4 structure. *RNA* 10(9):1-10.

Li, S., Sonenberg, N., Gingras, A.-C., Peterson, M., Avdulov, S., Polunovsky, V.A. and Bitterman, P.B. (2002). Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites

on translational repressor 4EBP1 governs its proapoptotic potency. *Mol. Cell Biol.* 22:2852–2861.

Liang, X.-H., Haritan, A., Uliel, S. and Michaeli, S. (2003). Trans and Cis Splicing in Tripanosomatids: Mechanisms, Factors, and Regulation. *Euk .Cell.* 2(5):830-840.

Liu, B., Liu, Y., Motyka, S.A., Agbo, E.E., Englund, P.T. (2005) Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol.* 21(8):363-9.

Lukes, J., Leander, B.S. and Keeling, P.J. (2009). Cascades of convergent evolution: the corresponding evolutionary histories of euglenozoans and dinoflagellates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (1):9963-9970.

Lundkvist, G.B., Kristensson, K. and Bentivoglio, M. (2004). Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology* 19:198-206.

Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M.J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M.J., Schmidt, E.V. (2005). hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol.* 25(15):6436-6453.

Macdonald, P. (2001). Diversity in translational regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13(3):326-331.

Mair, G., Shi, H., Li, H., Djikeng, A., Aviles, H.O., Bishop, J.R., Falcone, F.H., Gavrilescu, C., Montgomery, J.L., Santori, M.I., Stern, L.S., Wang, Z., Ullu, E. and Tschudi, C. (2000). A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6(2): 163-169.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N. and Burley, S.K. (1999). Cap dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell.* 3(6):707-716.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.-C., Sonenberg, N. and Burley, S.K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* (6):951-961.

Maslov, D.A., Podlipaev, S.A. and Lukes, J. (2001). Phylogeny of Kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96(3):397-402.

Matthews, K.R.(2005). The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J. Cell . Sci.* 118(2):283-290.

Mayberry, L.K., Allen, M.L., Dennis, M.D., and Browning, K.S. (2009). Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. *Plant Physiol.* 150: 1844-1854.

Mayer, M.G., Floeter-Winter, L.M. (2005). Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100(5):501-13.

McKean, P.G. (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). The initiation factor 4E. *The Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31:31-35.

Michels, P.A.M., Hannaert, V. and Bringaud, F. (2000). Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol. Today* 16:482-489.

Milhausen, M., Nelson, R.G., Sather, S., Selkirk, M., Agabian, N. (1984). Identification of a small RNA containing the trypanosome spliced leader: a donor of shared 5' sequences of trypanosomatid mRNAs? *Cell* 38(3):721-9.

Minich, W.B., Balasta, M.L., Goss, D.J. and Rhoads, R.E. (1994). Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(16):7668-7672.

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(5):1185-1197.

Miyoshi, H., Dwyer, D.S., Keiper, B.D., Jankowska-Anyszka, M., Darzynkiewicz, E. and Rhoads, R.E. (2002). Discrimination between mono- and trimethylated cap structures by two isoforms of *Caenorhabditis elegans* eIF4E. EMBO J. 21(17): 4680-4690.

Moerke, N.J., Aktas, H., Chen, H., Cantel, S., Reibarkh, M.Y., Fahmy, A., Gross, J.D., Degterev, A., Yuan, J., Chorev, M., Halperin, J.A. and Wagner, G. (2007). Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. Cell. 128(2):257-67.

Moreira, D., López-García, P. and Vickerman, K. (2004). An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(Pt 5):1861-1875.

Moura, D.M.N. 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. 2007.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G. (2005). Advances in leishmaniasis. Lancet. 366: 1561–1577.

Myler, P.J. (2008). Searching the Tritryp genomes for drug targets. Adv. Exp. Med. Biol. 625:133-140.

Myler, P.J. and Stuart, K.D. (2000). Recent developments from the *Leishmania* genome project. Curr. Opin. Microbiol. 3:412–416.

Myler, P.J., Sisk, E., McDonagh, P.D., Martinez-Calvillo, S., Schnauffer, A., Sunkin, S.M., Yan, S., Madhubala, R., Ivens, A. and Stuart, K. (2000). Genomic organization and gene function in *Leishmania*. Biochem. Soc. Trans. 28(5):527-531.

Nakamura, Y., Hashimoto, T., Kamaishi, T., Adachi, J., Nakamura, F., Okamoto, K. and Hasegawa, M. (1996). Phylogenetic position of kinetoplastid protozoa inferred from the protein phylogenies of elongation factors 1 alpha and 2. *J. Biochem.* *119*:70-79.

Navarro, M., Peñate, X. and Landeira, D. (2007). Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* *15*(6):263-270.

Neuber, H. (2008). Leishmaniasis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* *6*(9):754-765.

Niedswiecka, A., Marcotrigiano, J., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Wyslouch-Cieczyska, A., Dadlez, M., Gingras, A.-C., Mak, P., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., Burley, S.K. and Stolarski, R. (2002). Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5'cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4EBP1 proteins. *J. Mol. Biol.* *319*: 615–635.

Noireau, F., Diosque, P. and Jansen, A.M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* *40*(2):26.

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.

Orphanides, G. and Reinberg, D. (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* *108*:439–451.

Othumpangat, S., Kashon, M. and Joseph, P. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E is a cellular target for toxicity and death due to exposure to cadmium chloride. *J. Biol. Chem.* *280*(26):25162-25169.

Palenchar, J.B. and Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* *146*:135-141.

Parsons, M., Nelson, R.G., Watkins, K.P. and Agabian, N. (1984). Trypanosome mRNAs share a common 5' spliced leader sequence. *Cell* *38*(1):309-316.

Pause, A., Belsham, G.J., Gingras, A.C., Donze, O., Lin, T.A., Lawrence, J.C. and Sonenberg, N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-767.

Pays, E. (2005). Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol.* 21(11):517-20.

Pestova, T.V. and Hellen, C.U. (2000). The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol. Life. Sci.* 57:651– 674.

Pestova, T.V. and Hellen, C.U. (2003). Coupled folding during translation initiation. *Cell* 115:650-652.

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. (2005a). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309:404-409.

Piccioni, F., Zappavigna, V. and Verrotti, A.C. (2005). A cup full of functions. *RNA Biol.* 2(4):125-128.

Podlipaev, S.A. (2000). Insect trypanosomatids: the need to know more. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 95(4):517-522.

Poulin, F., Gingras, A.-C., Olsen, H., Chevalier, S. and Sonenberg, N. (1998). 4EBP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J. Biol. Chem.* 273: 14002-14007.

Preiss, T. and Hentze, M.W. (2004). Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays* 25:1201-1211.

Prévôt, D., Darlix, J.-L. and Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell.* 95:141-156.

Ptushkina, M., Berthelot, K., von der Haar, 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.

Ptushkina, M., von der Haar, T., Vasilescu, S., Frank, R., Birkenhäger, R. and MacCarthy, J.E.G. (1998). Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20. *EMBO J.* 17(16): 4798-4808.

Punukollu, G., Gowda, R.M., Khan, I.A., Navarro, V.S., Vasavada, B.C. (2007). Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *Int. J. Cardiol.* 115(3):279-283.

Raught, B. and Gingras, A.-C. (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 31:43-57.

Reddy, R., Singh, R. and Shimba, S. (1992). Methylated Cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions. *Pharmac. Ther.* 54:249-267.

Reis, C.R.S. 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. 2009.

Rhoads, R.E. (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J. Biol. Chem.* 284:16711-16715.

Robalino, J., Joshi, B., Fahrenkrug, S.C., Jagus, R. (2004). Two zebrafish eIF4E family members are functionally divergent and are differentially expressed. *J. Biol. Chem.*, 279:10532-10541.

Rong, L., Livingstone, M., Sukarieh, R., Petroulakis, E., Gingras, A.C., Crosby, K., Smith, B., Polakiewicz, R.D., Pelletier, J., Ferraiuolo, M.A. and Sonenberg N. (2008). Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA* 14(7):1318-1327.

Rosenwald, I.B., Rhoads, D.B., Callanan, L.D., Isselbacher, K.J. and Schmidt, E.V. (1993). Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6175-6178.

Rottman, F., Shatkin, A.J. and Peary, R.P. (1974). Sequences containing methylated nucleotides at the 5' termini of messenger RNAs: possible implications for processing. *Cell*. 3: 197-199.

Ruan, J.P., Shen, S., Ullu, E. and Tschudi, C. (2007) Evidence for a capping enzyme with specificity for the trypanosome spliced leader RNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156(2):246-54.

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

Scheper, G.C. and Proud, C.G. (2002). Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* 269(22); 5350-5359.

Schmidt, E.V. (2004). The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* 23(18):3217-21.

Sharma, U. and Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* 45(4):255-272.

Shatkin, A.J. (1976). Capping of eukaryotic mRNAs. *Cell*. 9: 645-653.

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. *Prot. Sci.* 12:1925- 1933.

Siegel, T.N., Tan, K.S. and Cross, G.A. (2005). Systematic study of sequence motifs for RNA trans splicing in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 25(21):9586-9594.

Simpson, A.G. (2003). Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *Int. J. of System. and Evol. Microb.* 53:1759–1777.

Simpson, A.G. and Roger, A.J. (2002). Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Curr. Biol.* 12(20):691-693.

Simpson, A.G., Gill, E.E., Callahan, H.A., Litaker, R.W. and Roger, A.J. (2004) Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist.* 155(4):407-422.

Simpson, A.G., Lukes, J., Roger, A.J. (2002). The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Mol. Biol. Evol.* 19(12):2071-8083.

Simpson, A.G., Stevens, J.R. and Lukes J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22(4):168-174.

Skeiky, Y.A., Kennedy, M., Kaufman, D., Borges, M.M., Guderian, J.A., Scholler, J.K., Owendale, P.J., Picha, K.S., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Campos-Neto, A., Reed, S.G. (1998). LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J. Immunol.* 161(11):6171-9179.

Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 136(4):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.

Stevens, J.R., Noyes, H.A., Schofield, C.J. and Gibson, W. (2001). The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol.* 1(2):143-50.

Stiles, J.K., Hicok, P.I., Shah, P.H. and Meade, J.C. (1999). Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Annu. Trop. Med. Parasitol.* 93(8):781-807.

Stoecklin, G., Mayo, T. and Anderson, P. (2006). ARE-mRNA degradation requires the 5'-3' decay pathway. *EMBO Rep.* 7(1):72-77.

Strudwick, S. and Borden, K.L.B. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 70:10-22.

Stuart, K. and Panigrahi, A.K. (2002). RNA editing: complexity and complications. *Mol. Microbiol.* 45(3):591-596.

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest.* 118(4):1301-1310.

Takagi, Y., Sindkar, S., Ekonomidis, D., Hall, M.P. and Ho, C.K. (2007). *Trypanosoma brucei* encodes a bifunctional capping enzyme essential for cap 4 formation on the spliced leader RNA. *J. Biol. Chem.* 282(22):15995-6005.

Taylor, J.E. and Rudenko, G. (2006). Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet.* 22(11):614-620.

Thomas, S., Green, A., Sturm, N.R., Campbell, D.A. and Myler, P.J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics.* 10:152.

Tomoo, K., Shen, X., Okabe, K., Nozoe, Y., Fukuhara, S., Morino, S., Ishida, T., Taniguchi, T., Hasegawa, H., Terashima, A., Sasaki, M., Katsuya, Y., Kitamura, K., Miyoshi, H., Ishikawa, M. and Miura, K. (2002). Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P (3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible region. *Biochem. J.* 262:539-544.

Tree of Life Web project. <http://tolweb.org/Leishmania/98022>

Vasilescu, S., Ptushkina, M., Linz, B., Muller, P.P. and McCarthy, J.E. (1996). Mutants of eukaryotic initiation factor eIF-4E with altered mRNA cap binding specificity reprogram mRNA selection by ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271:7030-7037.

Vaughan, S. and Gull, K. (2008). The structural mechanics of cell division in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Trans.* 36(3):421-424.

von der Haar, T., Ball, P.D. and MacCarthy, J.E.G. (2000). Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-cap by domains of eIF4G. *J. Biol. Chem.* 275(39): 30551-30555.

von der Haar, T., Gross, J.D., Wagner, G. and McCarthy, J.E.G. (2004). The mRNA cap binding eIF4E in post-transcriptional control gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11(6): 503-511.

Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125(1-2):211-216.

Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C. and Cross, G.A. (1999). A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99(1):89-101.

WHO/TDR (2003) World Health Organization/Tropical Diseases Research. <http://www.who.int/tdrold/diseases/leish/leish.htm>.

WHO/TDR (2003) World Health Organization/Tropical Diseases Research. <http://www.who.int/tdrold/diseases/chagas/lifecycle.htm>.

WHO/TDR (2003) World Health Organization/Tropical Diseases Research. <http://www.who.int/tdrold/diseases/trypl/lifecycle.htm>.

Yanagiya, A., Svitkin, Y.V., Shibata, S., Mikami, S., Imataka, H., and Sonenberg, N. (2009). Yoffe, Y., Leger, M., Zinoviev, A., Zuberek, J., Darzynkiewicz, E., Wagner, G., and Shapira, M. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res.* 37:3243-3253.

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.

Zamudio, J.R., Mittra, B., Campbell, D.A., Sturm, N.R. (2009). Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation. *Mol. Microbiol.* 72(5):1100-1110.

Zamudio, J.R., Mittra, B., Foldynová-Trantírková, S., Zeiner, G.M., Lukes, J., Bujnicki, J.M., Sturm, N.R., Campbell, D.A. (2007). The 2'-O-ribose methyltransferase for cap 1 of spliced leader RNA and U1 small nuclear RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 27(17):6084-6092.

Zamudio, J.R., Mittra, B., Zeiner, G.M., Feder, M., Bujnicki, J.M., Sturm, N.R. and Campbell D.A. (2006). Complete cap 4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot. Cell* 5(6):905-915.

Zeiner, G.M., Sturm, N.R. and Campbell, D.A. (2003). The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *J. Biol. Chem.* 278(40):38269-38275.

8. Anexos

8.1. Artigo científico

Os resultados obtidos neste trabalho serão submetidos à revista *Eukaryotic cell* no artigo intitulado “THE FOUR TRYPANOSOMATID eIF4E HOMOLOGUES FALL INTO TWO DISTINCT GROUPS, WITH FUNCTIONS IN TRANSLATION AND OTHER CRITICAL PROCESSES”. O manuscrito e as instruções para submissão encontram-se anexados a seguir.

THE FOUR TRYPANOSOMATID eIF4E HOMOLOGUES FALL INTO TWO DISTINCT GROUPS, WITH FUNCTIONS IN TRANSLATION AND OTHER CRITICAL PROCESSES

Freire, E. R.¹, Dhalia, R.¹, Moura D. M. N.¹, da Costa Lima, T.D.¹, Lima, R. P.¹, Reis, C. R.¹, Hughes, K.², Kramer, S.², Figueiredo, R. C. B. Q.¹, Standart, N.², Carrington, M.², and de Melo Neto, O. P.¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Moraes Rego s/n, Campus UFPE, Recife PE 50670-420.

²Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge UK CB2 1GA

Keywords: translation, eIF4AE, eIF4G, Trypanosomatid, *Leishmania*

Corresponding author: Osvaldo P. de Melo Neto

e-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br

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 functional analysis 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 localise to both the nucleus and cytoplasm, *TbEIF4E3* and 4 are strictly cytoplasmic and are also more abundant. *TbEIF4E3*, the only one incapable of binding to 7-methyl-GTP Sepharose, was the only one confirmed to be essential for viability of the insect procyclic form in an RNAi assay. In contrast, *TbEIF4E1*, 3 and 4 were 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 preceding cessation of growth. 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.

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 (**Johnson et al., 1987; Martinez-Calvillo et al., 2003**) and processing to monocistronic mRNAs occurs through coupled *trans*-splicing and polyadenylation (**reviewed in (Liang et al., 2003)**). 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, followed by four methylated nucleotides in the spliced-leader sequence, the cap4 structure (**Bangs et al., 1992**). 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 (Clayton, 2002; Clayton and Shapira, 2007; Haile and Papadopolou, 2007)**). 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 (**Marintchev and Wagner, 2004**). A major player in this process in eukaryotes, and also a major target for translation control, is eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), the 7-methyl-guanosine 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 (von der Haar et al., 2004; Culjkovic et al., 2007; Sonenberg, 2008; Goodfellow and Roberts, 2008)**). In translation it is part of the heterotrimeric complex eIF4F, which also includes the RNA helicase eIF4A and the large scaffolding protein eIF4G (**Gingras et al., 1999**). 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 eIF4G, which can then mediate interactions with other translation factors (**Hershey and Merrick, 2000; Preiss and Hentze, 2003**). Despite its well described function in translation in the cytoplasm, substantial levels of eIF4E localize to the nucleus (**reviewed in (Strudwick and Borden, 2002)**), where it

promotes the nuclear export of selected mRNAs (Culjkovic et al., 2006; Culjkovic et al., 2007; Topisirovic et al., 2009).

The structure of eIF4E bound to 7-methyl-GDP (Marcotrigiano et al., 1997; Matsuo et al., 1997) 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) while W73 is involved in the interaction with eIF4G (Marcotrigiano et al., 1997; Gingras et al., 1999; von der Haar et al., 2004). 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 (Sonenberg and Gingras, 1998; Raught and Gingras, 1999; Scheper and Proud, 2002; Lasko and Sonenberg, 2007).

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* only one eIF4E homologue, essential for viability, is found (Altmann et al., 1987). More usually, multiple forms of this protein are present in any specific organism (reviewed by (Rhoads, 2009)). 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 (Lasko et al., 2005; Cho et al., 2006); and eIF4E-3, which binds both cap and eIF4G but has a restricted, tissue specific, expression pattern (Joshi et al., 2004). 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 (Joshi et al., 2005).

In trypanosomatids, the initial description of a single putative eIF4E homologue (Yoffe et al., 2004) was followed by the identification of four homologues in genome sequences from *L. major*, all of which are also conserved in *Trypanosoma* species (Dhalia et al., 2005). The four *Leishmania* eIF4E homologues (*LmEIF4E1* through 4, *LeishIF4E1* 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 (Dhalia et al., 2005; Yoffe et al., 2006).

Here we describe work focused on the four *T. 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 characterised. The effect of depletion, through RNAi, on cellular growth and translation was determined and the interaction between putative eIF4E/eIF4G homologues was also analysed. The results presented allow the separation of the four proteins into two distinct functional groups. The first comprises *TbEIF4E1* and 2, which localise 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.

MATERIALS AND METHODS

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 previously described (**Dhalia et al., 2005**). Relevant trypanosomatid GeneDB accessions: *TbEIF4E1* – **Tb11.18.0004**; *TbEIF4E2* – **Tb10.61.0210**; *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).

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 (**Dhalia et al., 2006**). 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 (**Dhalia et al., 2006; Kelly et al., 2007**), p2477 (**Kelly et al., 2007**) or p2T7-177 (**Wickstead et al., 2002**). 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*₁₋₂₂₈ 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*H I and cloned into the dephosphorylated *Bam*H I site of the p2T7-177-*TbEIF4E1* construct. For the double *TbEIF4E1/4* construct, first the p2T7-177-*TbEIF4E1* was digested with *Bam*H I, which cuts internally to the *TbEIFE1* gene and at its 3' end at the site introduced after the original PCR reaction, releasing a ~360bp fragment consisting of the second half of the target gene. This fragment was then cloned into the linearised *Bam*H I 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*.

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 (**Wirtz et al., 1999**), were performed as previously described (**Dhalia et al., 2006**). 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 (**Wirtz et al., 1999**), grown in the presence of 5 µg/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 µg/ml for procyclic and 0.5 µg/ml for bloodstream cells). For the RNAi experiments, and induction of eYFP and HA-tagged fusion proteins, 1 µg/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 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{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.

RNA and protein analysis

RNA extraction and Northern blots were performed using standard methods (Carrington et al., 1987; Webb et al., 2005; Dhalia et al., 2006). 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-blotting was generally carried out using as secondary antibodies peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG. Exceptions were those assays analyzing some of the native immunoprecipitated complexes, when peroxidase conjugated protein-A was used instead, and when using the monoclonal mouse anti-HA antibody which required anti-mice IgG.

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 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 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 SPII-AOBS confocal microscope.

Co-precipitation (pull-down) assays

Pull-down assays were essentially performed as described previously (Dhalia et al., 2005) 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 [³⁵S]-labelled *TbEIF4E1* through 4, obtained after transcription and translation of the full-length genes cloned in the pGEM3zf+ plasmid.

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) 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 or eIF4G 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.

RESULTS

Sequence analysis and cap binding assays for the *T. brucei* eIF4E homologues

The four trypanosomatid eIF4E 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 very small segments of limited homology which seem to be conserved between the EIF4E3 and 4 sequences. These elements are highlighted in the alignment shown in Figure 1 which compares the four eIF4E sequences from both *T. brucei* and *L. major* with representative eIF4E homologues from different eukaryotic lineages, including metazoans, plants, fungi and unrelated protozoans. Of the eight conserved

tryptophan residues typical of eIF4E sequences, most are either conserved in the various trypanosomatid eIF4E 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. Noteworthy residue substitutions in the trypanosomatid sequences are D104, next to the near universally conserved W102E103, involved in cap binding and conserved in all sequences shown but which is replaced by a histidine in EIF4E2 and 3, and V69E70, implicated in binding to eIF4G but which is missing in the EIF4E4 homologues. Two further eIF4E homologues conserved in trypanosomatids (EIF4E5 and 6) are found in genomic sequences from different species and have not been studied so far (GeneDB accessions for *T. brucei* homologues: *TbEIF4E5* – **Tb10.70.2180**; *TbEIF4E6* – **Tb927.7.1670**). These proteins are small in size, in general less than 200 residues long, and more closely related to each other than the other trypanosomatid eIF4E homologues. They are much more divergent from known eIF4E sequences than the first four sequences and will not be discussed further in this work.

To begin the functional study of *TbEIF4E1* through 4, their genes were first cloned downstream of a T7 RNA polymerase promoter and a crude cap binding assay carried out with the respective four [³⁵S]-labelled proteins, produced after *in vitro* transcription and translation. This assay assesses the ability of the various proteins to bind specifically to 7-methyl GTP sepharose beads and has been previously used with three of the *L. major* eIF4E homologues (*LmEIF4E1* through 3) (Dhalia et al., 2005). *TbEIF4E1*, 2 and 4 were all found to be able to bind, and were specifically eluted with cap analogue, whilst *TbEIF4E3* did not show any binding (Supplementary Figure 1). In the *Leishmania* proteins, neither *LmEIF4E2* nor *LmEIF4E3* bound to the beads under the same circumstances. *LmEIF4E1* and *LmEIF4E4*, not previously evaluated in this assay but included in the Supplementary Figure, both bound efficiently. The sole difference in binding properties between the two organisms then lies with the EIF4E2 orthologues, presumably a consequence of differences observed in their sequences, since the *LmEIF4E2* includes a very long insertion found near its C-terminus which is absent from its *Trypanosoma* counterpart (indicated in Figure 1). And neither the *T. brucei* nor the *L. major* EIF4E3 homologues showed any significant binding to the mammalian cap.

Expression analysis in *T. brucei* bloodstream and procyclic forms

The four *T. brucei* eIF4E homologues were expressed as His-tagged recombinant proteins in *Escherichia coli* and used to raise specific polyclonal antisera in rabbits. Northern

and Western blots were then carried out to assay for expression of each protein using RNA and protein samples collected from exponentially growing procyclic and bloodstream cells, the two experimentally amenable stages of the *T. brucei* life cycle. All four proteins were constitutively expressed with little variation in levels between the two stages (Supplementary Figure 2). Western blotting was used to produce an estimate of the copy number of each protein (summarized in Table I). *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 present at levels above 1×10^4 molecules per cell. In contrast, both *TbEIF4E1* and 2 are present at levels much lower, with *TbEIF4E2* being the least abundant of all. For most proteins the levels observed are slightly reduced in bloodstream, 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 I and (Dhalia et al., 2005)), presumably a reflection of conserved function. Overall, the results highlight the constitutive nature of expression of the various eIF4E homologues, in both procyclic and bloodstream forms, and reinforce differences in expression levels previously observed for the *L. major* proteins, with EIF4E3, and also EIF4E4, being present at significantly higher levels than EIF4E1 and 2.

Subcellular localisation

Immunocytochemistry localization experiments were carried out for *TbEIF4E1* through *TbEIF4E4* 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 (Figure 2A and Supplementary Figure 3). In contrast, *TbEIF4E1* and 2 differed in that they can be clearly detected both in the cytoplasm as well as in the nucleus in the majority of cells (they are absent from the nucleus in a small fraction of cells – data not shown). The localization pattern of the four proteins is similar in that they are mostly uniformly diffused throughout the cytoplasm (*TbEIF4E3* and 4) or the cytoplasm and nucleus (*TbEIF4E1* and 2). These results were confirmed in over-expression experiments using EIF4E-enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) fusions in transgenic procyclic *T. brucei* cells (Figure 2B). *TbEIF4E3* and 4 again were found confined to the cytoplasm, whilst *TbEIF4E1* and 2 were found in the cytoplasm and in the nucleus. These results are in good agreement with previously reported experiments performed for all four proteins (Kramer et al., 2008). In mammals, at least, nuclear eIF4E localize to speckles which are also the sites where splicing factors are found (Dostie et al., 2000). This localization pattern differs from what was seen

for the endogenous or even the over-expressed *TbEIF4E1* and 2 which are spread throughout the nucleoplasm. So far the localization profiles are not compatible with roles for *TbEIF4E3* and 4 in mRNA processing or export within the nucleus, reinforcing a possible role in translation for these proteins. *TbEIF4E1* and 2, remain as a possible candidate for performing the nuclear functions attributed to eIF4E homologues in other organisms.

Knockdown through RNA interference in procyclic cells

The requirement for the various eIF4E homologues for cellular viability was then investigated in *T. brucei* procyclic forms by knockdown of their expression through RNA interference. First, the four open reading frames were subcloned into the p2T7-177 vector (**Wickstead et al., 2002**) followed by transfection of the resulting constructs into both procyclic and bloodstream cells and subsequent addition of tetracycline to the various cell lines for RNAi induction. Representative growth curves of the various knockdowns for procyclic cells are shown in Figure 3. Below each curve are Western-blot experiments analysing the depletion of the proteins being targeted as well as showing the constant levels of an endogenous loading control, the *T. brucei* homologue of eIF4AI, *TbEIF4AI*. The phenotype of cells after RNAi ablation of *TbEIF4E1*, 2 and 4 (Figures 3A, 3B and 3D) was similar and no significant impact on cell survival was observed after knockdown of any of 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 confirmed major depletions of the respective proteins within two to three days of RNAi induction, with no effect observed on the levels of the *TbEIF4AI* control. Knockdown of *TbEIF4E3* produced a very distinct phenotype, since proliferation stopped two days after RNAi induction, followed by subsequent cell death (Figure 3C). Western-blotting over a time course after addition of tetracycline confirmed substantial reduction in levels of *TbEIF4E3* within 48 hours of tetracycline addition whilst the control, *TbEIF4AI* remaining unaffected. For both *TbEIF4E3* and 4 knock-downs western-blots 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 knock-down of *TbEIF4E3* was observed, knock-down of *TbEIF4E4* seemed to provoke a slight increase on the levels of *TbEIF4E3* (Figures 3C and 3D). These results then are consistent with *TbEIF4E3* being required for cellular viability in *T. brucei* procyclic cells. For the remaining homologues, the lack of a phenotype after knockdown does not rule out a minor requirement for them in levels below the threshold produced after RNAi. Nevertheless, considering the efficiency of the

RNAi procedure (up to 90% or more of depletion for *TbEIF4E1* and 4, at least) any requirement for the other homologues are well below the levels originally detected within the cells.

Two double RNAi experiments were 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 (Yoffe et al., 2009). When the simultaneous knockdown of *TbEIF4E1* and 2 was performed, cells ceased proliferation and died (Figure 3E), with cellular proliferation stopping within four days of tetracycline induction. A distinct phenotype was observed by the simultaneous knockdown of *TbEIF4E1* and 4 (Figure 3F). Although cellular proliferation stopped after RNAi induction, at about the same timeframe than the *TbEIF4E1/2* RNAi, cell death did not occur for more than 15 days onwards (data after day 7 not shown). The procyclic RNAi results are in agreement then with *TbEIF4E1* having possibly redundant but non-overlapping functions with both *TbEIF4E1/2*, with depletion of *TbEIF4E1/2* preventing cell survival whilst lack of *TbEIF4E1/4* mainly impairs cellular proliferation.

Metabolic labelling of selected procyclic cultures after RNAi

To investigate if the no-growth or cellular death phenotypes observed after the knockdown 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 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 Figure 4A 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. At four days, some inhibition of translation is observed with the *TbEIF4E1/2* construct but this inhibition is substantially greater in the other two constructs with more than 70% inhibition for *TbEIF4E1/4*. Since in the later curve the cells did not die, we also decided to investigate protein synthesis levels when the cells had already remained in the no-growth/no-proliferation stage for several days (at eight days after tetracycline addition). At this stage virtually no protein synthesis remained in the cell and no incorporation of labeled methionine was detected after two hours of

incubation. We then went on to investigate if any qualitative changes in protein synthesis was observed after the RNAi of these three constructs Figure 4B. At least in a unidimensional gel, no substantial changes in the profile of proteins synthesised were detected even in conditions of severe protein inhibition (such as after the *TbEIF4E1/4* RNAi). These results then are consistent with both *TbEIF4E3* and *TbEIF4E1/4* knockdowns directly affecting protein synthesis since substantial translation inhibition preceded cessation of growth (for both the *TbEIF4E1/4* and *TbEIF4E3* RNAi) and cellular death (for the *TbEIF4E3* RNAi only). 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 also be an indirect consequence of the various metabolic processes associated with cell death induced by the RNAi.

Knockdown in bloodstream cells

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 (Figure 5C). Knockdown of *TbEIF4E1* or 4 also caused the cells to stop growing between 24 and 48 hours after induction (Figures 5A and 5D). Cell death ensued for the *TbEIF4E4* RNAi cells, whilst the cells 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 (Figure 5B), as seen for procyclic cells. Western-blotting of selected samples confirmed the efficient depletion of the four proteins within their corresponding knockdown experiments, without any substantial reductions in the control *TbEIF4AI*. As observed for procyclic cells, knock-down of *TbEIF4E4* also seemed to provoke a slight increase on the levels of *TbEIF4E3*. Overall, the RNAi results are compatible with *TbEIF4E3* being essential for survival in the different parasite life stages, whilst *TbEIF4E1* and 4 are required for the proliferation and survival, respectively, of at least the bloodstream stage. Differences in the translation machinery between procyclic and bloodstream cells can be implied by the distinct RNAi phenotypes observed for *TbEIF4E1* and 4 between these two life stages. However the differential sensibilities of the two stages to the knockdowns might also just be a consequence of their different metabolic rates, with bloodstream cells, which grow much faster, being more sensitive to changes in translation rate or efficiency.

Interactions between eIF4E and eIF4G homologues

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 EIF4AI (Dhalia et al., 2005) as well as to orthologues of TbEIF4E1 and 4 (Yoffe et al., 2009), 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 analyse binding to the four [³⁵S]-labeled *T. brucei* eIF4E homologues. GST-TbEIF4G3 specifically bound to labeled TbEIF4E4, whilst GST-TbEIF4G4 bound to TbEIF4E3 (Figure 6A). Very weak binding was observed for both TbEIF4E1 and 2 with the two eIF4G homologues and also between TbEIF4E3 and GST-TbEIF4G3, but none of the labeled proteins bound to the GST control or the beads.

To investigate if the same interactions occurred *in vivo* we first opted to use the antibodies available against TbEIF4E3 and 4 in immunoprecipitation reactions (antibodies against TbEIF4E1 and 2 did not work well with this approach). Both sets of antibodies were then used to immunoprecipitate the native proteins plus any binding partners from *T. brucei* cytoplasmic extracts. First, the presence of the native proteins, TbEIF4E3 and 4, in the immunoprecipitates was assessed by western blotting with the corresponding anti-sera, which also confirmed their depletion from the reaction supernatant (Figure 6B and C). The same samples were then re-probed with antibodies raised against recombinant His-tagged TbEIF4G3 and 4. For TbEIF4E3, both TbEIF4G3 and 4 co-precipitated with this protein and the beads, however whilst all TbEIF4G4 was found in the beads and depleted from the supernatant, substantial levels of TbEIF4G3 remained in the supernatant (Figure 6B). In contrast, for TbEIF4E4, only TbEIF4G3 was found in the immunoprecipitate, but a significant fraction remained in the non-precipitated supernatant, whilst all TbEIF4G4 was found in the supernatant (Figure 6C).

In order to compare the binding of TbEIF4E1, 3 and 4 with the same eIF4G homologues *in vivo* under equivalent conditions, we opted to express HA-tagged versions of

these proteins in transfected *T. brucei* cells followed by immunoprecipitation of the resulting cellular extracts with anti-HA antibody and western blotting (Figure 6D). *TbEIF4G3* co-precipitated with both HA-tagged *TbEIF4E3* and 4, although substantial amounts of the protein remained in the supernatant in both assays, but did not co-precipitate with *TbEIF4E1*. In contrast, *TbEIF4G4* only co-precipitated with *TbEIF4E3*. In another independent *in vivo* assay, HA-tagged versions of *TbEIF4G3* and 4 were expressed in transfected cells followed by new immunoprecipitations with anti-HA antibody. As shown in Figure 6E, *TbEIF4E4* co-precipitated with HA-tagged *TbEIF4G3* whilst *TbEIF4E3* co-precipitated with tagged *TbEIF4G4*. In both assays, however, substantial levels of the co-precipitated proteins remained in the supernatant. Very little *TbEIF4E3* came down with HA-tagged *TbEIF4G3* (only weakly detectable when a greater quantity of the IP is loaded on the gel – not shown) but this maybe a consequence of the poor yield of the HA-*TbEIF4G3* in relation to the endogenous protein (which does not come down with the beads). For all other HA-tagged proteins their yields were equivalent to or superior to those observed for the endogenous proteins (see Supplementary Figure 4). Neither *TbEIF4E1* nor *TbEIF4E2* (weakly detected in the blots) seemed to come down with either eIF4G homologue, although it is still possible that minor amounts of either protein could be co-precipitated and remain undetected through the western-blot procedure. The 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.

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 (**Hernandez and Vazquez-Pianzola, 2005; Rhoads, 2009**). 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 at least one of their *Leishmania* orthologues (eIF4E1 – **(Yoffe et al., 2006)**). Overall the data presented rule out large differences in expression for the four eIF4E homologues between two stages of the *T. brucei*

cycle which is consistent with the different homologues acting on different aspects of mRNA metabolism or on different mRNA populations. However, it is still possible that certain homologues could be preferentially up-regulated during other stages of the parasite life cycle not analysed here.

The subcellular localization indicates that at least *TbEIF4E3* and 4 probably do not function in the nucleus. In contrast, *TbEIF4E1* and 2 may have nuclear functions. The RNAi data implicates both *TbEIF4E1* and 2 as having relevant and possibly redundant roles for cellular survival, which could be associated with their nuclear localization. Nevertheless, 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, and 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 the *TbEIF4E2* protein binds to the 7-methyl-GTP Sepharose in a manner very similar to the *TbEIF4E1* and 4, the *Leishmania* *LmEIF4E2* protein does not bind (**Dhalia et al., 2005**) and it has been shown to have a clear preferential binding to the methylated cap 4 structure (**Yoffe et al., 2006**). 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 the three proteins co-migrate with polysomes in sucrose gradients, strongly implicating these proteins in translation (**Yoffe et al., 2006; Yoffe et al., 2009**). *Leishmania* EIF4G3 also binds efficiently to the eIF4A homologue involved in translation (**Dhalia et al., 2005; Dhalia et al., 2006**) and *T. brucei* EIF4G3 acts in protein synthesis, since its depletion rapidly blocks translation (**Reis et al., manuscript in prep.**). Both *TbEIF4E1* and 4 are required for growth of the bloodstream cells. 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 later in protein synthesis. However, contrary to a previously reported interaction (**Yoffe et al., 2009**), neither *in vitro* (with *L. major* and *T. brucei*) nor *in vivo* (*T. brucei* only) assays detected any relevant interaction between EIF4G3 and EIF4E1 (this work and unpublished data), and this discrepancy remains unresolved.

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

the existence of two 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 (**Browning et al., 1992**). These two complexes can co-exist and differ in their ability to translate different classes of mRNAs (**Gallie and Browning, 2001; Mayberry et al., 2009**), 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 (**Nett et al., 2009**) and *TbEIF4E4* migrates in gel 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 **Figure 1**).

EIF4E3, the most abundant of the eIF4E homologues in both *Trypanosoma* and *Leishmania* species, is the only one confirmed to be strictly required for survival in both procyclic and bloodstream stages of the *T. brucei* life cycle. Indeed, the ability of *TbEIF4E3* to bind both *TbEIF4G3* and *TbEIF4G4* might not only explains why procyclic cells can survive after knockdown of *TbEIF4E4*, since presumably it can be replaced by *TbEIF4E3* to some extent, but also highlights the major role performed by this protein for parasite survival. Nevertheless, when compared with EIF4E4, its binds much less efficiently to either the mammalian cap (this work, (**Dhalia et al., 2005**) or the trypanosomatid cap4 (**Yoffe et al., 2006**). Neither *L. major* EIF4E3 (**Yoffe et al., 2006**) nor its *T. brucei* orthologue (Supplementary Figure 5) seem to associate with polysomes but this does not necessarily exclude a role in translation since the majority of mammalian eIF4E is not bound to ribosomes either (**Rau et al., 1996**). 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 (**Cho et al., 2005; Lasko et al., 2005; Cho et al., 2006**). This protein binds very weakly to the cap (**Zuberek et al., 2007**), 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 some selectivity in mRNA binding with a direct consequence on their translation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially funded with grants provided from the Brazilian funding agencies FACEPE and CNPq. ERF, RD, DMNM, TDCL, RPL and CRSR received studentships from CAPES and FACEPE. Technical assistance to grow the *Leishmania* and *Trypanosoma* cells was provided by B. S. Lima. 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. 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.

FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1: Cap binding assays. (A) Autoradiography of the cap binding chromatography performed with the four ³⁵S-labelled *T. brucei* eIF4E homologues, the *Leishmania* LmEIF4E4 and the *Xenopus leavis* eIF4E homologue as positive control. All labeled proteins were synthesized after *in vitro* transcription of their respective genes cloned, in the pGEM3zf+ vector, with T7 RNA polymerase followed by translation with the nuclease treated Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega). These assays were performed essentially as described previously (Dhalia et al., 2005), with non-specific binding removed by washes with 0.1 mM GTP and specific elution achieved with 50 µM cap analogue. Aliquots of the various washes were ran 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. (B) Specificity of the antibodies produced against the four EIF4E homologues. The four sera were produced against the four recombinant proteins, all containing a 6xHis tag plus a thrombin recognition site in their N-terminus. Since these proteins were insoluble they had to be purified as inclusion bodies prior to gel fractionation and excision of the corresponding proteins which were then used for the immunization. Equal loads of the four fusions (~5 ng) were loaded on the same gel and compared with whole *T. brucei* extract from procyclic cells (for the TbEIF4E1 and 2 blots the load was equivalent to 10⁷ cells; for TbEIF4E3 – 5x10⁵ cells; and for TbEIF4E4 – 5x10⁶ cells). The proteins samples were then transferred to Immobilon-P membranes followed by incubation with the affinity purified specific antisera and goat anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase, and detection by ECL. The cross-reactions observed for different sera to the various recombinant proteins

are due to their common N-terminus added by the plasmid vector. For *TbEIF4E1*, 3 and 4, single bands of the expected molecular weights were detected in the parasite extracts. In contrast, for *TbEIF4E2*, no band matching the molecular weight of the recombinant protein could be observed, however, a slower migrating band was observed compatible with a protein product post-translationally modified. As shown in Figure 3 and 5, this band disappears following addition of tetracycline and RNAi induction, as expected, and its identification as *TbEIF4E2* was also corroborated by the overexpression fusion with eYFP (not shown) which also migrates with a molecular weight higher than expected, a feature not observed for the remaining homologues.

Supplementary Figure 2: Expression analysis of *TbEIF4E1* through 4 in procyclic and bloodstream procyclic cells. (A) Northern Blot showing the different expression levels of the four eIF4E homologues of *T. brucei*. Total RNA from both bloodstream (B) and procyclic (P) *T. brucei* forms was separated on denaturing gels and used in Northern blot assays to detect the expression of *TbEIF4E1* through 4. One of the blots was overprobed with tubulin (ubiquitously expressed) and EP procyclin (expressed in procyclics only) as controls. The migration of RNA size markers is indicated on the left in kb. For *TbEIF4E2* a longer exposure was performed to visualize its mRNA. Messages coding for all four proteins were detected at equivalent levels for both cell stages. (B) Quantitation and expression analysis of *TbEIF4E1*, 3 and 4 proteins in procyclic/bloodstreams forms. Recombinant His tagged *TbEIF4E1*, 2, 3 and 4 were quantitated, diluted to defined concentrations (in femtomoles) and run on SDS-PAGE gels with whole parasite extract obtained from known number of cells from both procyclic and bloodstream forms.

Supplementary Figure 3: Lower magnification images of the indirect immunofluorescence assays. The images shown are representative of experiments performed as described for Figure 2, but showing several cells.

Supplementary Figure 4: Expression profile of HA-tagged proteins. Total protein extracts from transfected *T. brucei* cells expressing Ha-tagged *TbEIF4E1*, *TbEIF4E3*, *TbEIF4E4*, *TbEIF4G3* and *TbEIF4G4* (+TET), as well as extracts from control transfected cells prior to tetracycline mediated induction (-TET), were ran on SDS-PAGE gels, transferred to PVDF membranes and blotted with antibodies directed against the corresponding native proteins. The arrows highlight the bands corresponding to the native and HA-tagged proteins.

Supplementary Figure 5: Polysome migration profile on sucrose gradients of selected *T. brucei* eIF4E homologues. Cytoplasmic extracts from *T. brucei* cells, prepared in the presence of cycloheximide (A), puromycin (B) or EDTA (C) were loaded on sucrose gradients and the resulting fractions collected from the top (left) and blotted with antibodies directed against TbEIF4E3, TbEIF4E4 and TbEIF4A1.

Figure 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, while 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 (Nett et al., 2009) indicated by the symbol ▼. The third box highlight the unique insertion observed in LmEIF4E2. * indicates the conserved tryptophan residues. Large arrows indicates non-tryptophan residues required for the interaction with the cap structure (based on (Marcotrigiano et al., 1997)). Thin arrows indicate conserved non-tryptophan residues shown to be involved in eIF4G binding (Marcotrigiano et al., 1999). 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*) – XP_001710318.

Figure 2: Subcellular localisation of TbEIF4E1 through 4 in *T. brucei* procyclic forms. (A) Subcellular localisation 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 localisation 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.

Figure 3: 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 per 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 *TbEIF4A1*. 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.

Figure 4: Metabolic labelling 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 ^{35}S 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 ran on an SDS-PAGE gel followed by autoradiography.

Figure 5: 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-*TbEIF4* and 3 antibodies, respectively. All procedures were done as described for Fig. 3.

Figure 6: Analysis of the interactions between *TbEIF4E3/TbEIF4E4* and *TbEIF4G3/TbEIF4G4*. (A) Pull-down assay using GST-tagged *TbEIF4G3* and 4 and ³⁵S-labelled *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 panels: 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 *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 reaction (Input). (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-blots with the *TbEIF4E4*, *TbEIF4G3* or *TbEIF4G4* 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 levels of the non-bound supernatant and the input extract, were assayed for the presence of the HA-tagged proteins and *TbEIF4G3* and 4. (E) IP of HA-tagged eIF4G homologues. Same as D, but analyzing the samples from

the IP of HA-tagged *TbEIF4G3* and 4 (left and right panels, respectively) with the anti-HA serum and antibodies directed against the four eIF4E homologues.

Table I: 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	¹ <i>L. major</i> promastigotes
EIF4E1	3-8 x 10 ³	1.5-5 x 10 ³	2-4 x 10 ³
EIF4E2	~1 x 10 ³	~1 x 10 ³	~1 x 10 ³
EIF4E3	5-10 x 10 ⁴	2-4 x 10 ⁴	4-10 x 10 ⁴
EIF4E4	2-4 x 10 ⁴	1-2 x 10 ⁴	ND

1 – Based on Dhalia et al., 2005.

Supplementary TABLE I – Primers and vectors used for the amplification and cloning reactions. All amplified fragments were first cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and sequenced prior to being used in the various subcloning reactions into the different plasmid vectors and using the restriction sites listed below.

Protein	Vectors	Cloning sites	Oligonucleotide
<i>TbEIF4E1</i> ^{1,2}	pET15b		5' primer – AAGCTTCCGCCACCATGCAGACCTTACTGAGAC
			3' primer – GGATCCAGAACCCAATTGATACAAGGG TGG
<i>TbEIF4E2</i> ¹	p2216	Hind III / BamH I	5' primer – AAGCTTCCGCCACCATGGAAGCGAATCATGTTTC
			3' primer – GGATCCAGAACCGCCTTGCTAGCGCCA TGG
<i>TbEIF4E3</i> ^{1,2}	p2T7-177		5' primer – AAGCTTCCGCCACCATGAATCCAGAAGCGGAG
			3' primer – GGATCCAGAACCAAGCGTGAAGTCGGGTGTTATC
<i>TbEIF4E4</i> ¹			5' primer – AAGCTTCCGCCACCATGCAAAATTTACGTGCTG
			3' primer – GGATCCAGAACCCCAAAGCCGACGATTGCC
<i>TbEIF4G3</i>	p2477	Hind III / BamH I	5' primer – AAGCTTCCGCCACCATGCACGTCTACACCATCG
	pGEX4T3	Hind III / Not I ³	3' primer – GGATCCAGTCAAGGTCCCCTTCCC
<i>TbEIF4G4</i>	p2477	Hind III / BamH I	5' primer – AAGCTTCCGCCACCATGCTGTTCAAACCTCGTG
			3' primer – GGATCCCGCATATATAACTGAGAGTTC
<i>TbEIF4G4</i>	pGEX4T3	BamH I / Not I ⁴	5' primer – TCTGGATCCCCCGCCACCATGCTGTTCAAACCTCGTGG
			3' primer – GGATCCCGCATATATAACTGAGAGTTC (same as above)

<i>TbEIF4G3</i> ₁₋₂₂₈	pET21a	BamH I / Xho I ⁵	5' primer – TCTGGATCCCCCGCCACCATGCACGTCTACACCATCG 3' primer – TTCCTCGAGAGTCAAGGTCCCCTTCCC
<i>TbEIF4G4</i> ₁₋₃₁₉	pET21a	BamH I / Xho I	5' primer – TCTGGATCCCCCGCCACCATGCTGTTCAAACCTCGTGG 3' primer – CCCCTCGAGCTGCTGAGATTGAATATCC

1 – These same fragments were also subcloned into the *EcoR* I and *BamH* I sites of the pGEM3zf+ vector after being recovered from the pGEM-T Easy derived plasmids through digestion with *EcoR* I and *BamH* I.

2 – Partial *BamH* I digestions for *TbEIF4E1* and 3 for the various subclonings.

3 – *TbEIF4G3* was first recovered from the pGEM-T easy derived plasmid by digestion with *Hind* III (partial digestion) and *Not* I and subcloned into the same sites of the vector pET21a. The *TbEIF4G3* fragment was then recovered from the resulting plasmid by digestion with *BamH* I (partial digestion) and *Not* I and subcloned into the same sites of pGEX4T3.

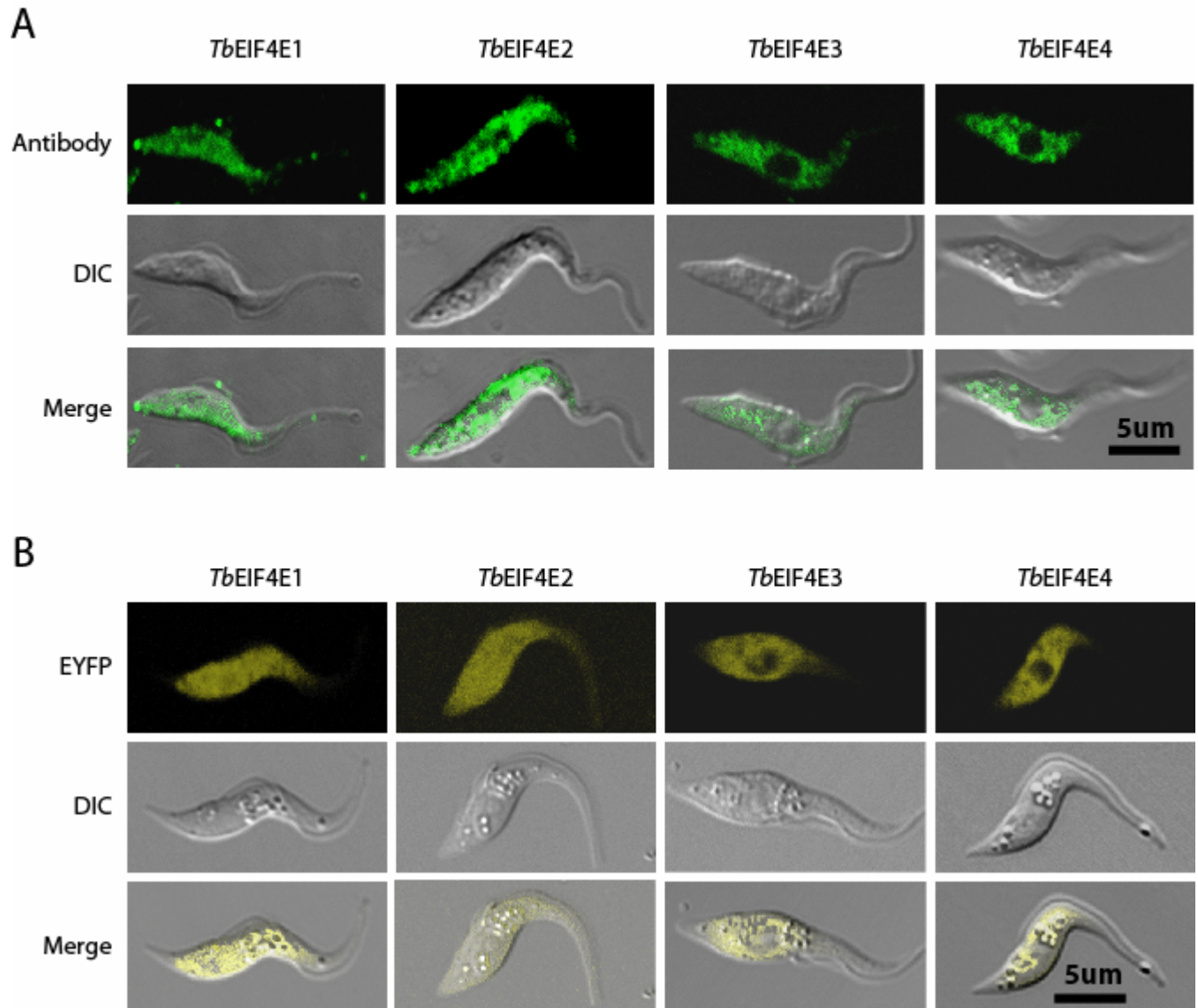
4 – The *TbEIF4G4* sequence was amplified flanked by sites for *BamH* I in both ends and the resulting fragment recovered from the pGEM-T Easy derived plasmids by digestion with *BamH* I (partial digestion) and *Not* I and subcloned into the same sites of the vector pGEX4T3.

5 – The full length *TbEIF4G3* gene was first amplified and subsequently digested with *BamH* I and *Xho* I (internal site) and the *TbEIF4G3*₁₋₂₂₈ fragment, coding for the N-terminal third of the protein (~700 bp), cloned into the *BamH* I/*Xho* I sites of pET21a.

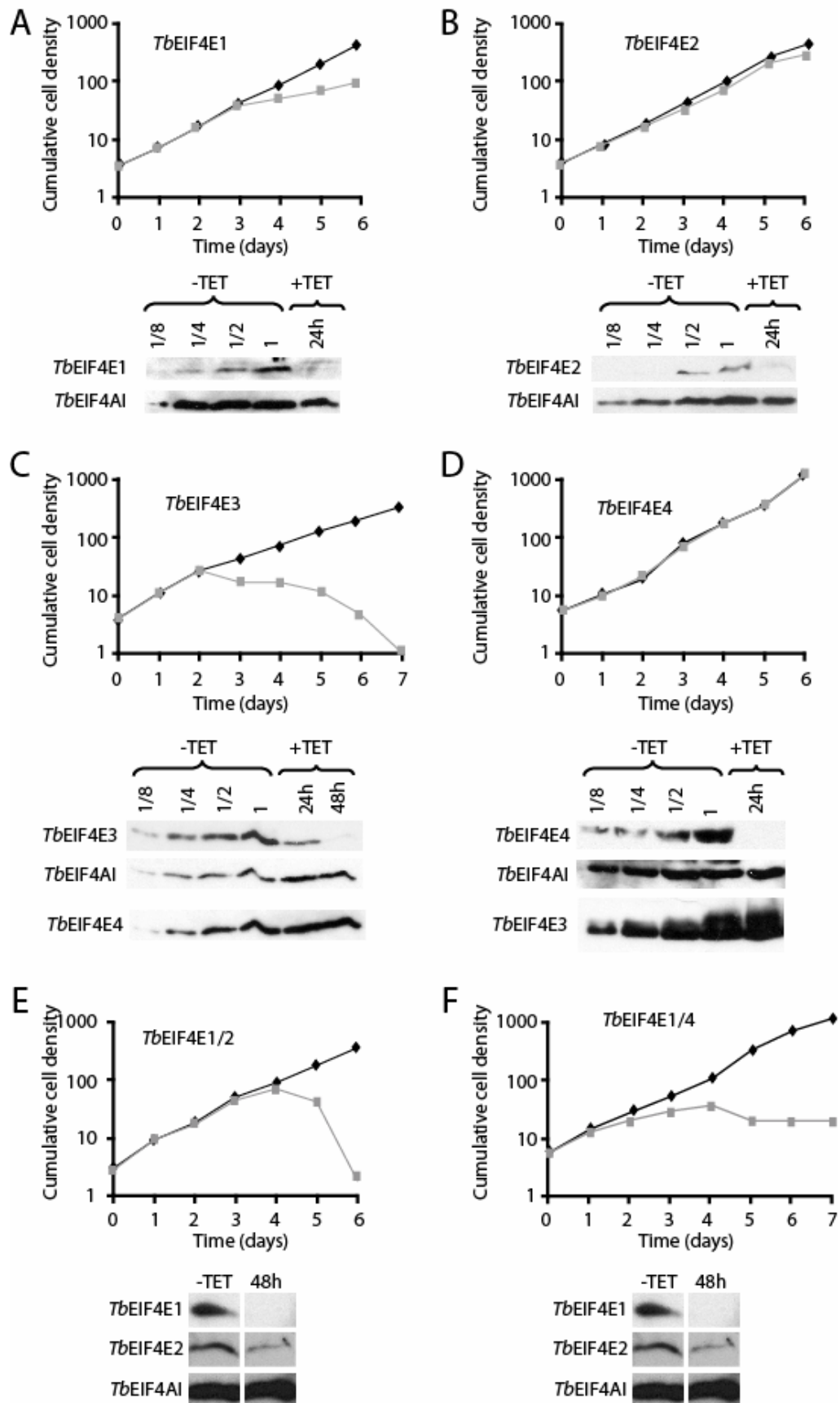
Freire et al., 2010 - Figure 1

<i>TbeIF4E3</i>	1	MNPEAE EFVVKGNRTP	105 Aas	- P rich	PLSLSATPYT	PTNPKISSKF	PATPEAQRGP	69 Aas
<i>LmeIF4E3</i>	1	MNPSAA AYIYQSDAK	21 Aas		KLSAAAEPFV	PGGPKQMSAT	STHVPDKATT	54 Aas
<i>TbeIF4E4</i>	1	MQN.LRADAV EYTPSWQKRS	92 Aas	- P rich	HMSPNVSVYV	P..RGAAAGS	LMPLPTSTAD	87 Aas
<i>LmeIF4E4</i>	1	MSTPLDVRRA EYSESAFVATM	118 Aas	- P rich	HMNPNAATEFM	EGRRNGPDGG	LEALPTSTAD	75 Aas
↓ ↓ ↓								
<i>HseIF4E-1</i>	1	MATVEPETTP	25 Aas		KHPLQNRNAL	WEFFK.	5 Aas	TWQANLRLIS KFDITVEDFWA LYNHIQLSSN
<i>SceIF4E</i>	1	MSVEEVSKKF	25 Aas		KHPLNTKNTL	WYTKP	6 Aas	SWSDLLRPVT SFQTVVEEFA IIQNIPEPHE
<i>AteIF4E</i>	1	MAVEDTPKSV	48 Aas		SHPLHESWTF	WEDNP	7 Aas	SWGSSLRPVF TFSTVEEFWS LYNNMKHPSK
<i>PfeIF4E</i>	1	MKYLLFRPNK	19 Aas		PLLIQYNVVI	WEQVS	8 Aas	NYKDYTRPLA KFNSVOKETQ LWNRLPQPSD
<i>GleIF4E</i>	1	ME.....			DIITDDEWTL	FFSNQ	10 Aas	DFMDNIHPIM TTDSLKAFEN CYQFLRRPNV
<i>TbeIF4E1</i>	1	MMAESSAKEM	27 Aas		RHLINRPNWL	WYDSV	6 Aas	QWELSLIEVM TVRTVEDEFA MLHYCKPQHV
<i>LmeIF4E1</i>	1	MSAPSSVPPH	4 Aas		LHKIQRAWTL	WYDSP	6 Aas	NWEMSLVPIM TVHSEVEEFV MLRYMKPLHA
<i>TbeIF4E2</i>	1	MOTLLRPRPG	11 Aas		CTQLWGVNEM	WCVLP	30 Aas	TWLDQVRSIG LFDSAEGFWG IITCTLNPSQ
<i>LmeIF4E2</i>	1	MDPNTCAPAS	7 Aas		LTLIWTWTEM	WCDMP	11 Aas	NWLEQVKSIG LFDSAEGFWG IFNCTILPSQ
<i>TbeIF4E3</i>	221	MLPSLFQVEV	8 Aas		PVRENTVNAL	YADEH	8 Aas	AYH..PVLVH LVGDVECFWR LWRHLPPST
<i>LmeIF4E3</i>	122	KLPKLFQCHN	8 Aas		AIFPLHASNDL	YADDH	16 Aas	SFE..PIFVS NVGDVESFWR LWRYPAPSA
<i>TbeIF4E4</i>	227	KPSFPTLTDP	2 Aas		DMRFQDPNCL	FYLPV	9 Aas	TYD..PTLVE RMDCSISSEWK VNNIPEPTR
<i>LmeIF4E4</i>	244	QPSPLALAPS	8 Aas		EMMDDDLWCL	FYLPV	9 Aas	DYN..PTLVE RVDSILTFR LWRVNNIAPSE
↓ ↓ ↓								
<i>HseIF4E-1</i>	85	IMPGC.....			DVSLFKDGE	PMWEDEKNKR	GGR..WLITLN	KQQRSDDD RFLETLCL
<i>SceIF4E</i>	87	IPLKS.....			DYEVFRNDVR	PMWEDEANAK	GGR..WSFQLR	GKGAD..ID ELWLRTLLAV
<i>AteIF4E</i>	111	LAHGA.....			DFYCFKHIE	PMWEDPICAN	GGR..WTMTFP	KEKS...D KSLYTLTAL
<i>PfeIF4E</i>	83	ILAQRSMTRF	SEDGIFRIVD	ALMIFRDNIO	PMWEDPANSG	GGR..FEYKIL	PKDYPYSQID	EFNNNLVLAI
<i>GleIF4E</i>	58	IDCNQ.....			GMEFFKKGIR	PAFEDPAHVK	CIRIKIMIAS	GYAS MVWEYLLMMI
<i>TbeIF4E1</i>	89	IRVSA.....			QYHFFREGVK	PMWEDPNKKA	GGR..LWVSLDD	20 Aas ADADKKPEID TVNENVLAL
<i>LmeIF4E1</i>	66	LRTSS.....			QYHFFQEGVK	PMWEDPANKK	GGR..LWVNLDI	20 Aas SAAEAKTDD KAVENVLMAT
<i>TbeIF4E2</i>	97	LPPGF.....			NYLFRNRNIA	PMWEHEANRR	GGR..WVMRFR	17 Aas AAAGQLPVD RAHEALCVAM
<i>LmeIF4E2</i>	74	LPPNG.....			SYLFRKHIA	PMWEHEANRR	GGR..WVVPF	5 Aas RSEGLQPV D EAVQTLCLSA
<i>TbeIF4E3</i>	290	ILPAF.....			TYHWRFRDIR	PMWEHTRNKN	GGTITFVIFD	3 Aas PGLNNKQTM DAFMAMMAC
<i>LmeIF4E3</i>	199	LPTVY.....			TSWFRKDIK	PMWEHPRNKK	GGTISIVVFD	3 Aas SGLSDKQVLD DVFAMLVGA
<i>TbeIF4E4</i>	291	MCAG.....			TLYLFRCGIN	PMWEDLRNRD	GGIVRAKVR	PQVVD DAVLHLLCRT
<i>LmeIF4E4</i>	314	LQLS.....			TLYLFRCGID	PMWEDPANRD	GGIVKVKAT	AAQVD EAVELLCRT
↓ ↓ ↓								
<i>HseIF4E-1</i>	138	I..GESFDDYS	DDV	CGAVVNVRAK	GD.....	KIAIW	TTECENREAV	THIGRVYKER LGLPPK...
<i>SceIF4E</i>	138	I..GETIDEDD	SQI	NGVVLSTIRKG	GN.....	KFALW	TK..SEDKEPL	LRIGGKFKQV LKLTDD...
<i>AteIF4E</i>	160	I..GEQFDHG	DEI	CGAVVNRIRG	QE.....	RISIV	TKNASNEAAQ	VSIGKQWKEF LDYN....
<i>PfeIF4E</i>	152	I..GCSLKHYD	LI	TGRLRLVDKLS	TRYG.....	YIRIEIW	YTTITDESVK	NYLRKDLEEH MCNRIDGS...
<i>GleIF4E</i>	107	FRGL.LDECP	KV	TGLEFRRGKV	VAN.....	EFIAIW	MRDKTDEDQK	NLLAILKREF NLQD.....
<i>TbeIF4E1</i>	164	V..GEYLDYG	VEGEHI	MGVVLTKRKY	CN.....	RIALW	LKDASDSDAV	AAAEKQLVKE AGLLPAT...
<i>LmeIF4E1</i>	141	V..GEYLDYD	KKTPTPEPFV	TGIVMSKRRY	HN.....	RLAVW	VSDASATDKI	EALKKALTKE ASLAPIA...
<i>TbeIF4E2</i>	168	I..GEQLPGDE	TEI	CGAVVRRRAER	R.....	RDWKLSLW	TRTAADRCTQ	ERIGFFVKDL LHLE.....
<i>LmeIF4E2</i>	132	I..GELFPGDE	EEI	CGVTVSRGRQ	RTLPSGHATS	ALSEWKLCLW	TRSADNRGSQ	IRIAEYIRKQ LHLQPPSKEA
<i>TbeIF4E3</i>	348	S..GESLAEST	TNL	NGVMLKVRQN	KPT.....	TLQIW	TASSDELKLR	SLARSLRLL EKVIGPK...
<i>LmeIF4E3</i>	257	V..GESFHECS	TTL	NGIMLKVRSN	KPV.....	TLQLW	TAHSEVGKLK	AFANSVRDTL TKIMGAK...
<i>TbeIF4E4</i>	339	V..GESWSRSV	R.....NSV	NGIALKVRA	AAF.....	MLEVW	VTEQT....S	ELMSDISELL HKFLGDA...
<i>LmeIF4E4</i>	362	I..GDSWSPSV	R.....ETV	NGVVLKVR	E RAY.....	WLELW	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	IHED.AKKLD	9 Aas	235			
<i>PfeIF4E</i>	212	TIFPPRVKSL	SHIHR		227			
<i>GleIF4E</i>	160	TSM	FHIQP		168			
<i>TbeIF4E1</i>	221	KPIFT	AGASKA		233			
<i>LmeIF4E1</i>	203	SMVET	KAGEAS		214			
<i>TbeIF4E2</i>	222	DGSLQYF	SHRELMOASE	12 Aas	251			
<i>LmeIF4E2</i>	204	30 Aas	SGIPSAMTYV	ABRDLMEAKQ	28 Aas	281		
<i>TbeIF4E3</i>	404	PLQKLEYF	SHORTQV...	23 Aas	442			
<i>LmeIF4E3</i>	313	TLQKLEYF	SHHQQA...	21 Aas	349			
<i>TbeIF4E4</i>	391	FOVPYI	PHSVAQERAA	20 Aas	427			
<i>LmeIF4E4</i>	414	FATTYL	THAMMQRERS	18 Aas	447			

Freire et al - 2010 - Figure 2



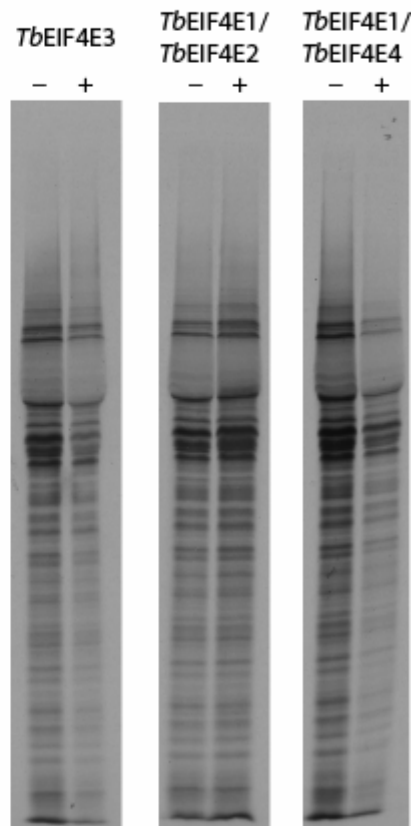
Freire et al - 2010 - Figure 3

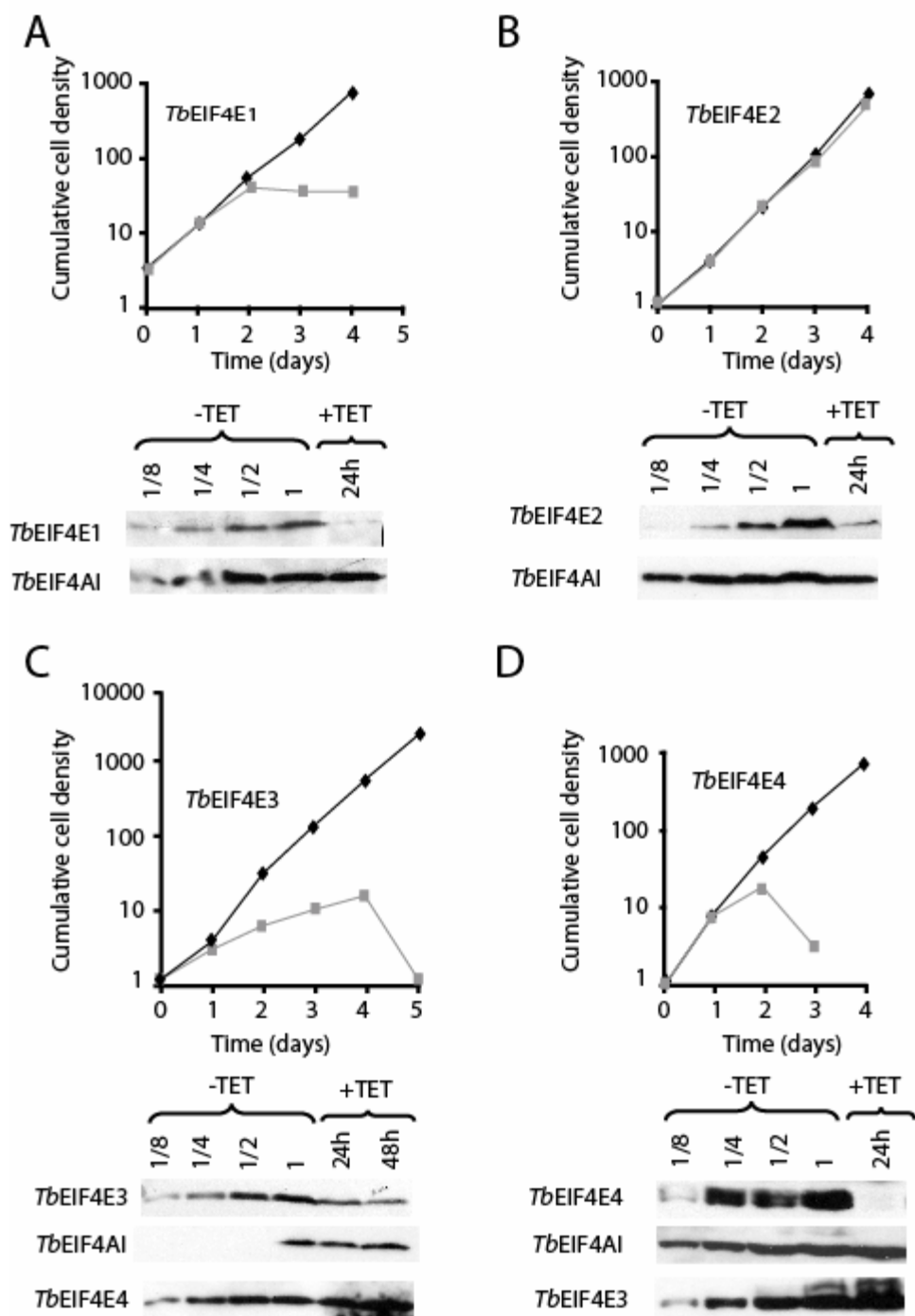


A

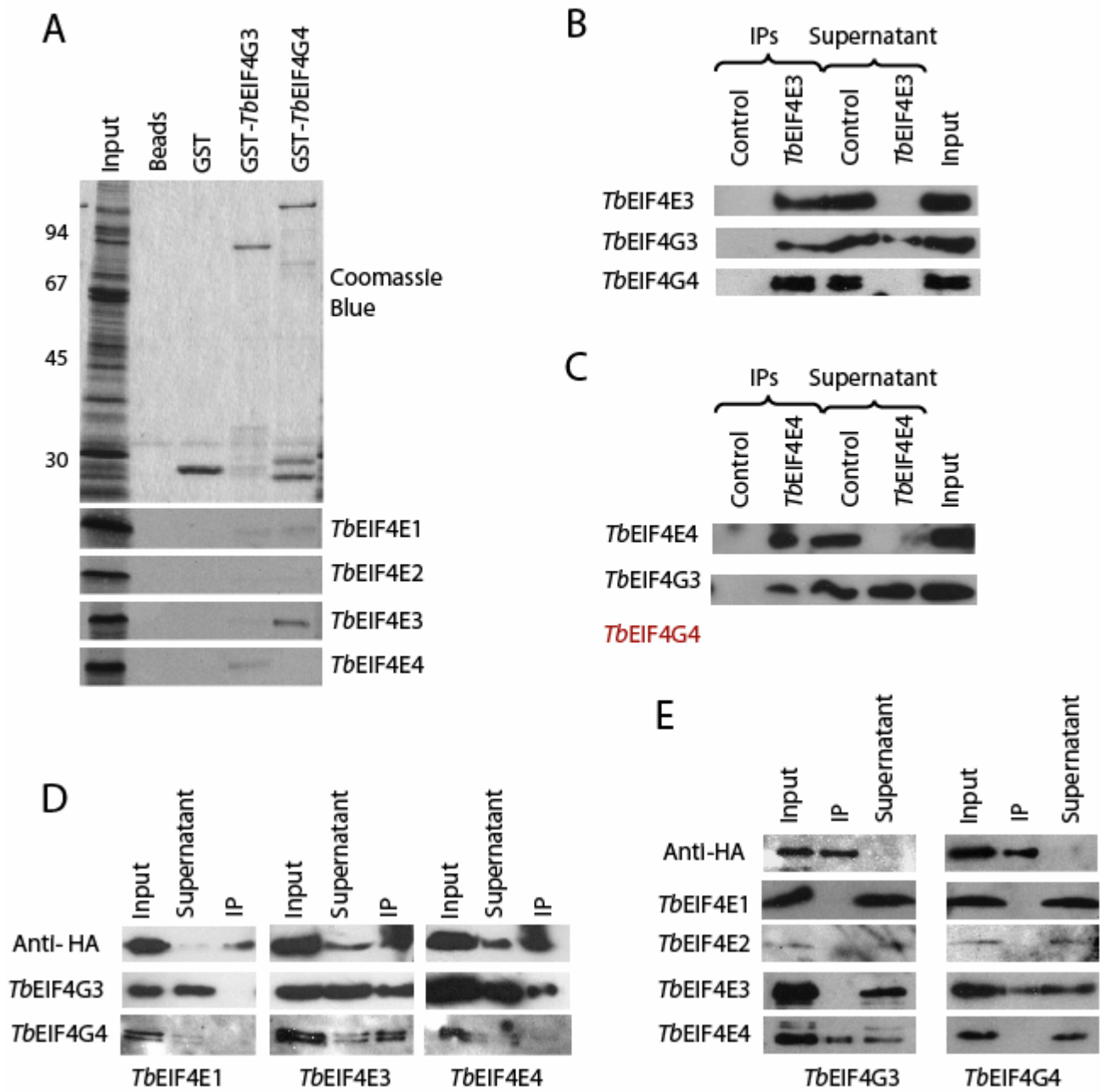
Relative [³⁵ S]-methionine incorporation +TET/-TET			
Days after TET addition	3	4	8
E3	58%	36%	X
E1/E2	101%	85%	X
E1/E4	43%	28%	0%

B

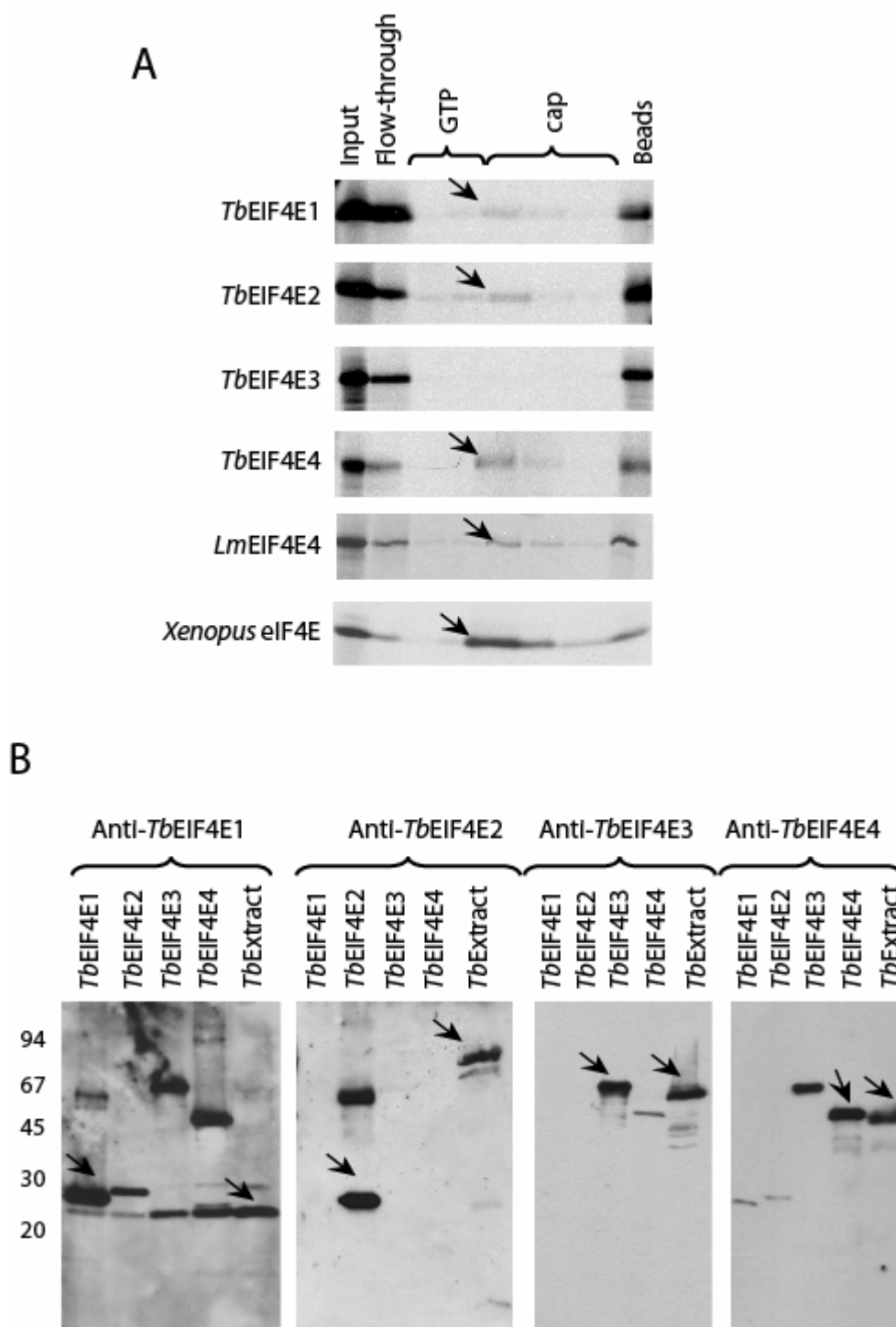


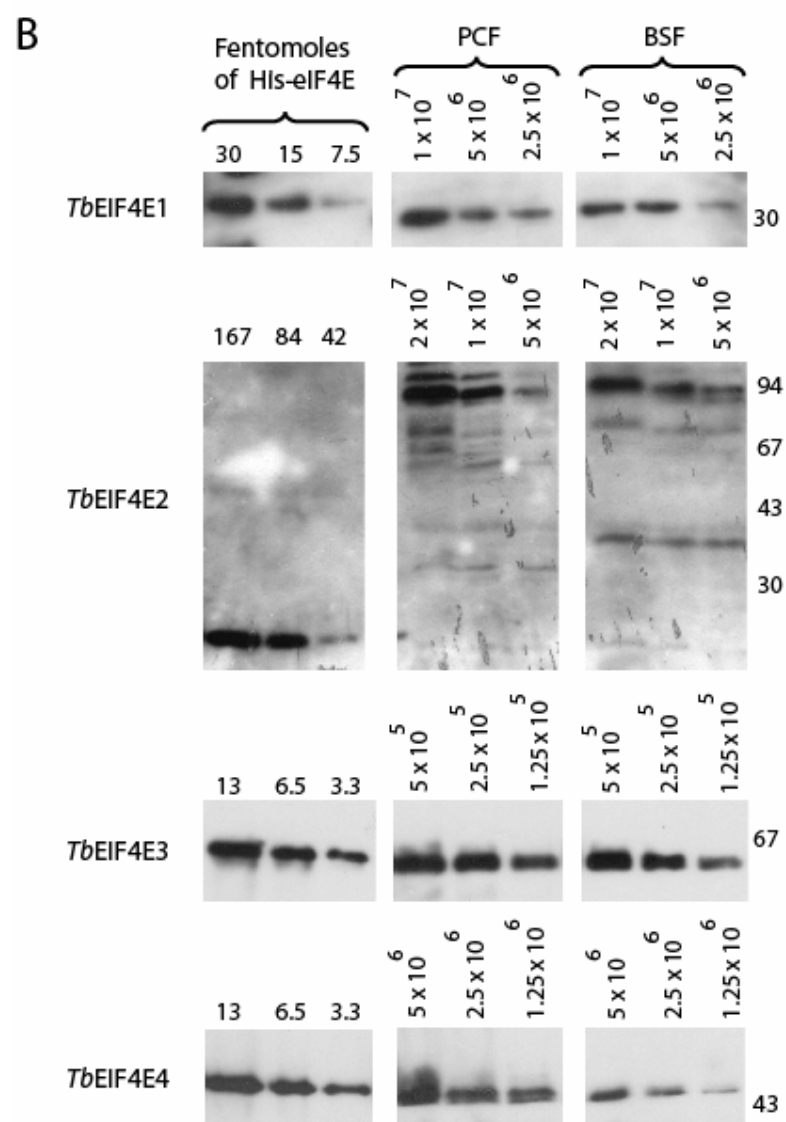
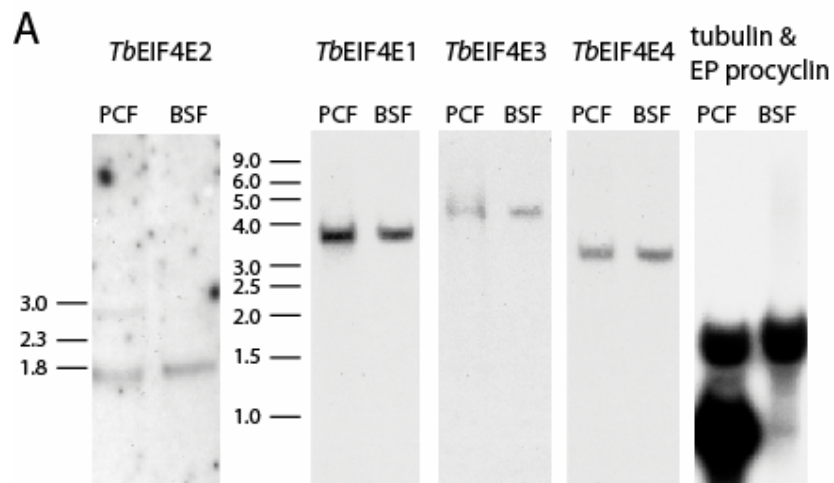


Freire et al., 2010 - Figure 6



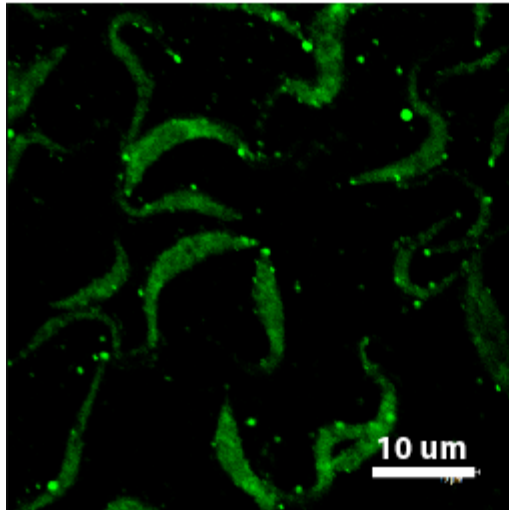
Freire et al - 2010 - Supplementary Figure 1



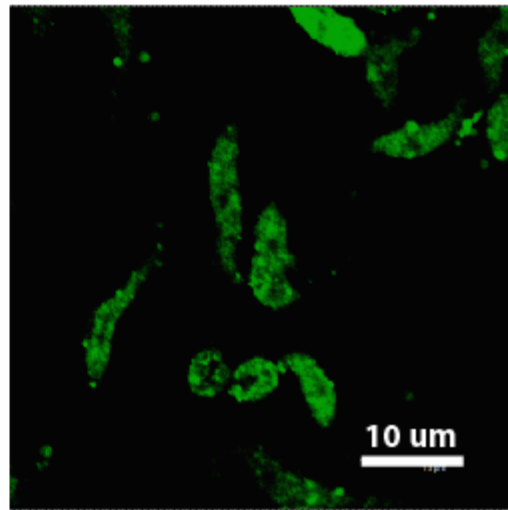


Freire et al - 2010 - Supplementary Figure 3

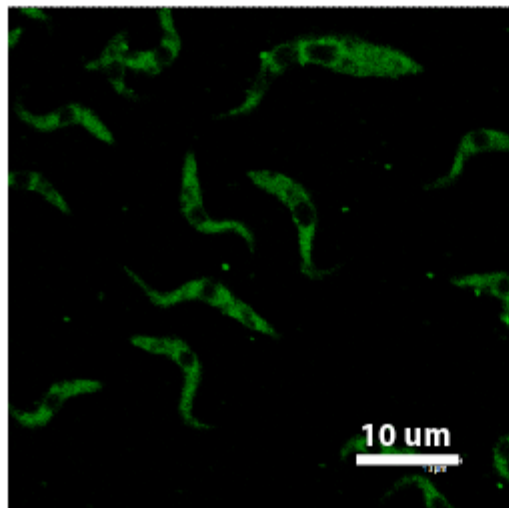
TbEIF4E1



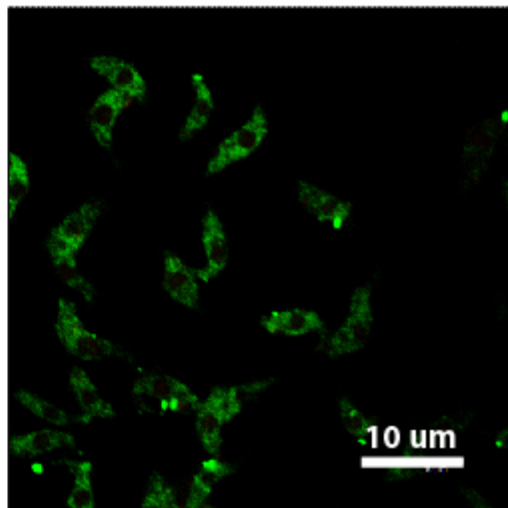
TbEIF4E2



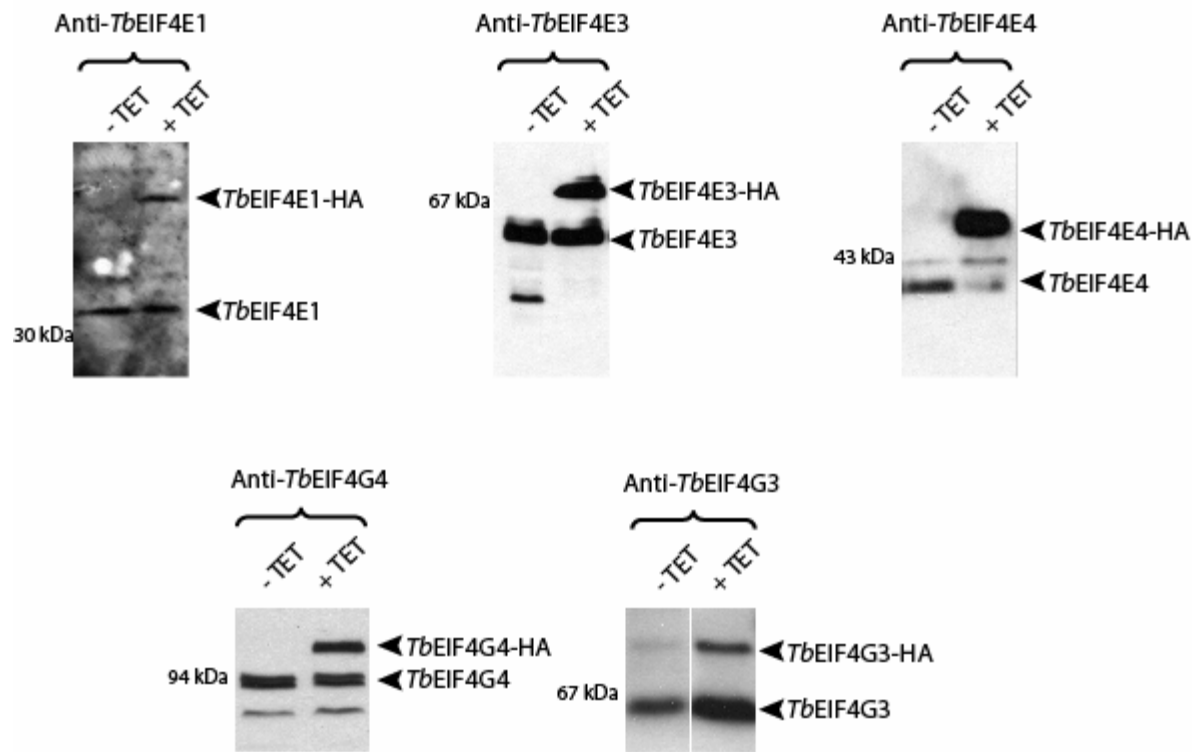
TbEIF4E3

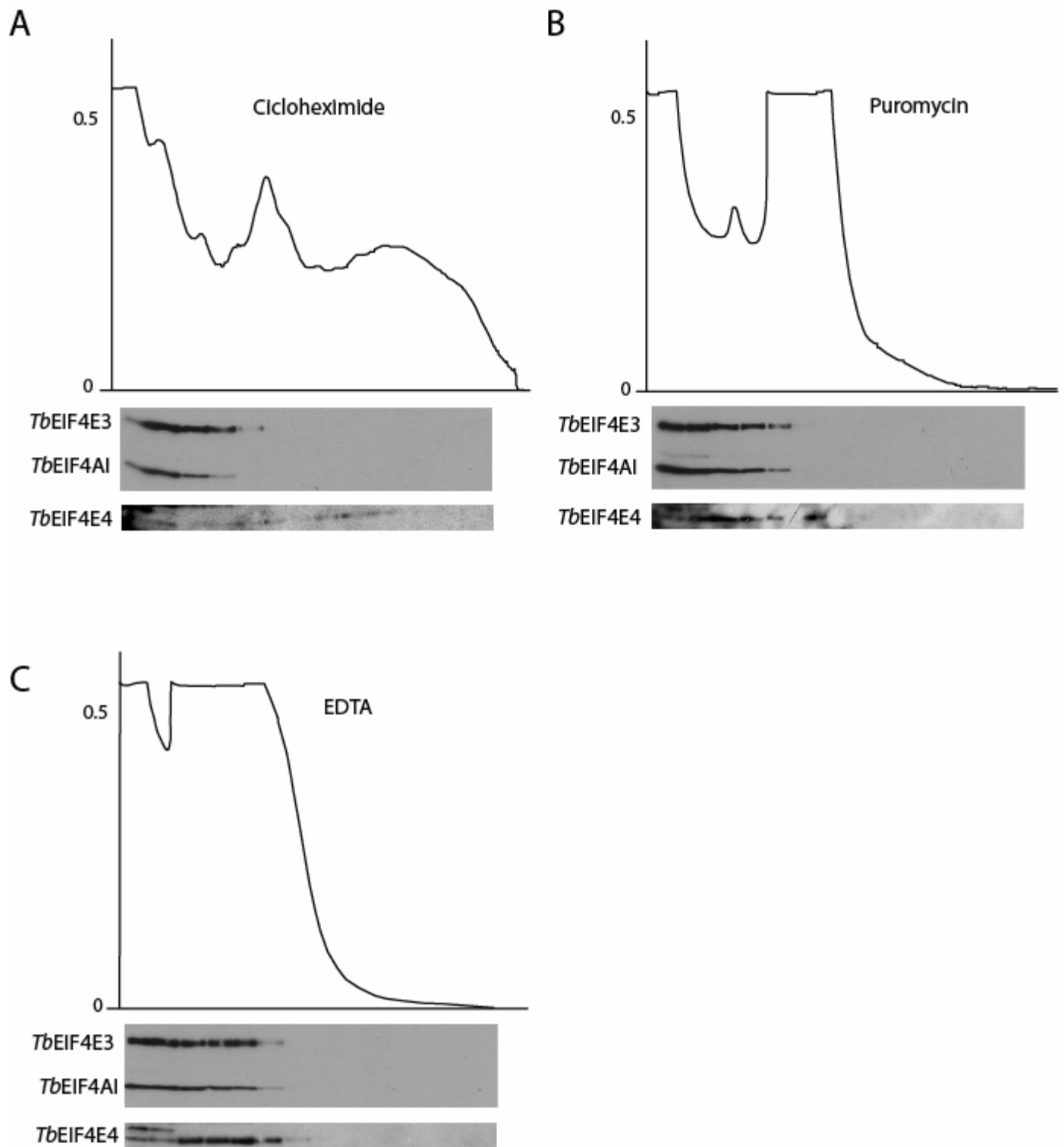


TbEIF4E4



Freire et al - 2010 - Supplementary Figure 4





Reference List

- Altmann,M., Handschin,C., and Trachsel,H. (1987). mRNA cap-binding protein: cloning of the gene encoding protein synthesis initiation factor eIF-4E from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 7, 998-1003.
- Bangs,J.D., 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.
- Browning,K.S., Webster,C., Roberts,J.K., and Ravel,J.M. (1992). Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J. Biol. Chem.* 267, 10096-10100.
- Carrington,M., Roditi,I., and Williams,R.O. (1987). The structure and transcription of an element interspersed between tandem arrays of mini-exon donor RNA genes in *Trypanosoma brucei*. *Nucleic Acids Res.* 15, 10179-10198.
- Cho,P.F., Gamberi,C., Cho-Park,Y.A., Cho-Park,I.B., Lasko,P., and Sonenberg,N. (2006). Cap-dependent translational inhibition establishes two opposing morphogen gradients in *Drosophila* embryos. *Curr. Biol.* 16, 2035-2041.
- Cho,P.F., Poulin,F., Cho-Park,Y.A., Cho-Park,I.B., Chicoine,J.D., Lasko,P., and Sonenberg,N. (2005). A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 121, 411-423.
- Clayton,C. and Shapira,M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.*
- Clayton,C.E. (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21, 1881-1888.
- Culjkovic,B., Topisirovic,I., and Borden,K.L. (2007). Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 6, 65-69.
- Culjkovic,B., Topisirovic,I., Skrabanek,L., Ruiz-Gutierrez,M., and Borden,K.L. (2006). eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *J. Cell Biol.* 175, 415-426.
- 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.
- Dostie,J., Lejbkowitz,F., and Sonenberg,N. (2000). Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *J. Cell Biol.* 148, 239-247.

Gallie,D.R. and Browning,K.S. (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 36951-36960.

Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913-963.

Goodfellow,I.G. and Roberts,L.O. (2008). Eukaryotic initiation factor 4E. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2675-2680.

Haile,S. and Papadopoulou,B. (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 569-577.

Hernandez,G. and Vazquez-Pianzola,P. (2005). Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech. Dev.* 122, 865-876.

Hershey,J.W.B. and Merrick,W.C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational control of gene expression.*, N.Sonenberg, J.W.B.Hershey, and M.B.Mathews, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 33-88.

Johnson,P.J., Kooter,J.M., and Borst,P. (1987). Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* 51, 273-281.

Joshi,B., Cameron,A., and Jagus,R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur. J. Biochem.* 271, 2189-2203.

Joshi,B., Lee,K., Maeder,D.L., and Jagus,R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC. Evol. Biol.* 5, 48.

Kelly,S., Reed,J., Kramer,S., Ellis,L., Webb,H., Sunter,J., Salje,J., Marinsek,N., Gull,K., Wickstead,B., and Carrington,M. (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.

Kramer,S., Queiroz,R., Ellis,L., Webb,H., Hoheisel,J.D., Clayton,C., and Carrington,M. (2008). 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.* 121, 3002-3014.

Lasko,P., Cho,P., Poulin,F., and Sonenberg,N. (2005). Contrasting mechanisms of regulating translation of specific *Drosophila* germline mRNAs at the level of 5'-cap structure binding. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 1544-1546.

Lasko,P. and Sonenberg,N. (2007). Coordinated transcriptional and translational control in metabolic homeostasis in flies. *Genes Dev.* 21, 235-237.

Liang,X.H., Haritan,A., Uliel,S., and Michaeli,S. (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot. Cell* 2, 830-840.

Marcotrigiano,J., Gingras,A.C., Sonenberg,N., and Burley,S.K. (1997). Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89, 951-961.

- Marcotrigiano,J., Gingras,A.C., Sonenberg,N., and Burley,S.K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol. Cell* 3, 707-716.
- Marintchev,A. and Wagner,G. (2004). Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q. Rev. Biophys.* 37, 197-284.
- Martinez-Calvillo,S., Yan,S., Nguyen,D., Fox,M., Stuart,K., and Myler,P.J. (2003). Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol. Cell* 11, 1291-1299.
- Matsuo,H., Li,H., McGuire,A.M., Fletcher,C.M., Gingras,A.C., Sonenberg,N., and Wagner,G. (1997). Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Biol.* 4, 717-724.
- Mayberry,L.K., Allen,M.L., Dennis,M.D., and Browning,K.S. (2009). Evidence for Variation in the Optimal Translation Initiation Complex: Plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F Differentially Promote Translation of mRNAs. *Plant Physiol* 150, 1844-1854.
- Nett,I.R., Martin,D.M., Miranda-Saavedra,D., Lamont,D., Barber,J.D., Mehlert,A., and Ferguson,M.A. (2009). The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol. Cell Proteomics*. 8, 1527-1538.
- Preiss,T. and Hentze,M.W. (2003). Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* 25, 1201-1211.
- Rau,M., Ohlmann,T., Morley,S.J., and Pain,V.M. (1996). A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 271, 8983-8990.
- Raught,B. and Gingras,A.C. (1999). eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 31, 43-57.
- Rhoads,R.E. (2009). eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J. Biol. Chem.* 284, 16711-16715.
- Scheper,G.C. and Proud,C.G. (2002). Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* 269, 5350-5359.
- Sonenberg,N. (2008). eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem. Cell Biol.* 86, 178-183.
- Sonenberg,N. and Gingras,A.C. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 268-275.
- Strudwick,S. and Borden,K.L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 70, 10-22.
- Topisirovic,I., Siddiqui,N., Lapointe,V.L., Trost,M., Thibault,P., Bangeranye,C., Pinol-Roma,S., and Borden,K.L. (2009). Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *EMBO J.* 28, 1087-1098.

- von der Haar,T., Gross,J.D., Wagner,G., and McCarthy,J.E. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 503-511.
- Webb,H., Burns,R., Ellis,L., Kimblin,N., and Carrington,M. (2005). Developmentally regulated instability of the GPI-PLC mRNA is dependent on a short-lived protein factor. *Nucleic Acids Res.* *33*, 1503-1512.
- Wickstead,B., Ersfeld,K., and Gull,K. (2002). Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *125*, 211-216.
- Wirtz,E., Leal,S., Ochatt,C., and Cross,G.A. (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.
- Yoffe,Y., Leger,M., Zinoviev,A., Zuberek,J., Darzynkiewicz,E., Wagner,G., and Shapira,M. (2009). Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res.* *37*, 3243-3253.
- 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.
- Zuberek,J., Kubacka,D., Jablonowska,A., Jemielity,J., Stepinski,J., Sonenberg,N., and Darzynkiewicz,E. (2007). Weak binding affinity of human 4EHP for mRNA cap analogs. *RNA.* *13*, 691-697.

EUKARYOTIC CELL

2010 INSTRUCTIONS TO AUTHORS*

SCOPE

Eukaryotic Cell (EC) publishes reports of basic research on eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, algae, protozoa, and social amoebae. Topics include but are not limited to basic biology; molecular and cellular biology; mechanisms, and control, of developmental pathways; structure and form inherent in basic biological processes; cellular architecture; metabolic physiology; comparative genomics, biochemistry, and evolution; ecology; and population dynamics.

The journal will consider manuscripts reporting results from the use of genome-, transcriptome-, or proteome-wide screening approaches when the experiments address a specific question or working hypothesis and when the results are used to illuminate mechanisms of gene regulation or interactions of signal transduction pathways via additional experiments. Studies that only catalog differences and similarities between genotypes or responses to stimuli are not likely to be reviewed favorably.

In addition, EC will consider manuscripts dealing with the viruses of these organisms and their organelles and with interactions with other living systems, where the focus is clearly on the eukaryotic cell.

Questions about these guidelines may be directed to the editor in chief.

ASM publishes a number of different journals covering various aspects of microbiology. Each journal has a prescribed scope that must be considered in determining the most appropriate journal for each manuscript. If transfer to another ASM journal is recommended by an editor, the corresponding author will be contacted.

Note that a manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals.

EDITORIAL POLICY

Use of Microbiological Information

The Council Policy Committee (CPC) of the American Society for Microbiology affirms the long-standing position of the Society that microbiologists will work for the proper and beneficent application of science and will call to the attention of the public or the appropriate authorities misuses of microbiology or of information derived from microbiology. ASM members are obligated to discourage any use of microbiology contrary to the

welfare of humankind, including the use of microbes as biological weapons. Bioterrorism violates the fundamental principles expressed in the Code of Ethics of the Society and is abhorrent to ASM and its members.

ASM recognizes that there are valid concerns regarding the publication of information in scientific journals that could be put to inappropriate use as described in the CPC resolution mentioned above. Members of the ASM Publications Board will evaluate the rare manuscript that might raise such issues during the review process. However, as indicated elsewhere in these Instructions, research articles must contain sufficient detail, and material/information must be made available, to permit the work to be repeated by others. Supply of materials should be in accordance with laws and regulations governing the shipment, transfer, possession, and use of biological materials and must be for legitimate, bona fide research needs. Links to, and information regarding, these laws and regulations can be found at <http://www.asm.org/> under the Public Policy tab. We ask that authors pay particular attention to the NSAR Select Agent/Toxin list on the CDC website <http://www.selectagents.gov/index.html> and the NSABB criteria for identifying dual use research of concern in the report “Proposed Framework for the Oversight of Dual Use Life Sciences Research: Strategies for Minimizing the Potential Misuse of Research Information” on the Office of Biotechnology Activities website <http://oba.od.nih.gov/biosecurity/> (p. 17–22).

Ethical Guidelines

Authors are expected to adhere to the highest ethical standards. The following sections of these Instructions include detailed information about ASM’s ethical standards. Failure to comply with the policies described in these Instructions may result in a letter of reprimand, a suspension of publishing privileges in ASM journals, and/or notification of the authors’ institutions. Authors employed by companies whose policies do not permit them to comply with the ASM policies may be sanctioned as individuals and/or ASM may refuse to consider manuscripts having authors from such companies. The ASM Publications Board wishes to clarify the following in particular.

Plagiarism. Misappropriating another person’s intellectual property constitutes plagiarism. This includes copying sentences or paragraphs verbatim (or almost verbatim) from someone else’s work, even if the original work is cited in the references. The NIH ORI publication “Avoiding Plagiarism, Self-Plagiarism, and Other Questionable Writing Practices: a Guide to Ethical Writing” (<http://ori.dhhs.gov/education/products/plagiarism/>) can help authors identify questionable writing practices.

*Instructions to Authors are published annually in the January issue. A separate html version, which is updated throughout the year, is at <http://ec.asm.org/misc/ifaora.dtl>.

Plagiarism is not limited to the text; it can involve any part of the manuscript, including figures and tables, in which material is copied from another publication without permission and attribution. An author may not reuse his or her own previously published work without attribution; this is considered self-plagiarism.

Primary publication. Manuscripts submitted to the journal must represent reports of original research, and the original data must be available for review by the editor if necessary.

By submission of a manuscript to the journal, the authors guarantee that they have the authority to publish the work and that the manuscript, or one with substantially the same content, was not published previously, is not being considered or published elsewhere, and was not rejected on scientific grounds by another ASM journal. It is incumbent upon the author to acknowledge any prior publication, including his/her own articles, of the data contained in a manuscript submitted to an ASM journal. A copy of the relevant work should be submitted with the paper as supplemental material. Whether the material constitutes the substance of a paper and therefore renders the manuscript unacceptable for publication is an editorial decision.

In brief, a paper is not acceptable for submission to an ASM journal if it, or its substance, has been published/posted in:

- A serial, periodical, or book
- A conference report or symposium proceedings
- A technical bulletin or company white paper
- A nonpersonal website
- Any other retrievable source

The following do not preclude submission to, or publication by, an ASM journal, as long as the posted data do not constitute the substance of a submission:

- Posting a method/protocol on a nonpersonal website
- Posting a limited amount of original data on a personal/university/corporate website or websites of small collaborative groups working on a problem
- Posting of unpublished sequence data on the Internet (the URL where the sequence is posted should be included in the text)
- Preliminary disclosures of research findings as meeting posters, webcast as meeting presentations, or published in abstract form as adjuncts to a meeting, e.g., part of a program
- Posting of theses and dissertations on a personal/university-hosted website

Availability of materials. By publishing in the journal, the authors agree that, subject to requirements or limitations imposed by laws or governmental regulations of the United States, any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a

timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for non-commercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Permissions. The corresponding author is responsible for obtaining permission from both the original author and the original publisher (i.e., the copyright owner) to reproduce or modify figures and tables and to reproduce text (in whole or in part) from previous publications.

Permission(s) must be obtained no later than the modification stage. The original signed permission(s) must be identified as to the relevant item in the ASM manuscript (e.g., "permissions for Fig. 1 in EC000123-10") and submitted to the ASM production editor on request. In addition, a statement indicating that the material is being reprinted with permission must be included in the relevant figure legend or table footnote of the manuscript. Reprinted text must be enclosed in quotation marks, and the permission statement must be included as running text or indicated parenthetically.

It is expected that the authors will provide written assurance that permission to cite unpublished data or personal communications has been granted. For supplemental material intended for posting by ASM (see "[Supplemental Material](#)"), if the authors of the EC manuscript are not also the owners of the supplemental material, the corresponding author must send to ASM signed permission from the copyright owner that allows posting of the material, as a supplement to the article, by ASM. The corresponding author is also responsible for incorporating in the supplemental material any copyright notices required by the owner.

Authorship. All authors of a manuscript must have agreed to its submission and are responsible for its content (initial submission and any subsequent versions), including appropriate citations and acknowledgments, and must also have agreed that the corresponding author has the authority to act on their behalf in all matters pertaining to publication of the manuscript. The corre-

sponding author is responsible for obtaining such agreements and for informing the coauthors of the manuscript's status throughout the submission, review, and publication process. Submitting a paper before all coauthors have read and approved it is considered an ethical violation, as is failure to credit someone who qualifies as a coauthor; however, ASM does not itself investigate or attempt to resolve authorship disputes.

An author is one who made a substantial contribution to the overall design and execution of the experiments; therefore, **ASM considers all authors responsible for the entire paper.** Individuals who provided assistance, e.g., supplied strains or reagents or critiqued the paper, need not be listed as authors but may be recognized in the Acknowledgments section.

A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members only may be given in a footnote linked to the study group name in the byline or as a separate paragraph in the Acknowledgments section.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

All authors must agree to the order in which their names are listed in the byline. Statements regarding equal contributions by two or more authors (e.g., X.J. and Y.S. contributed equally to ...) are permitted as footnotes to bylines and must be agreed to by all of the authors. Other statements of attribution may be included in the Acknowledgments section.

A change in authorship (order of listing, addition or deletion of a name, or corresponding author designation) after submission of the manuscript will be implemented only after receipt of signed statements of agreement from all parties involved.

Disputes about authorship may delay or prevent review and/or publication of the manuscript. Should the individuals involved be unable to reach an accord, review and/or publication of the manuscript can proceed only after the matter is investigated and resolved by the authors' institution(s) and an official report of such and signed statements of agreement are provided to ASM.

Conflict of interest. All authors are expected to disclose, in the manuscript submittal letter, any commercial affiliations as well as consultancies, stock or equity interests, and patent-licensing arrangements that could be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. (Inclusion of a company name in the author address lines of the manuscript does not constitute disclosure.) Details of the disclosure to the

editor will remain confidential. However, it is the responsibility of authors to provide, in the Acknowledgments section, a general statement disclosing financial or other relationships that are relevant to the study. Examples of potentially conflicting interests that should be disclosed include relationships that might detract from an author's objectivity in presentation of study results and interests whose value would be enhanced by the results presented. All funding sources for the project, institutional and corporate, should be credited in the Acknowledgments section, as described below. In addition, if a manuscript concerns a commercial product, the manufacturer's name must be indicated in the Materials and Methods section or elsewhere in the text, as appropriate, in an obvious manner.

Copyright

To maintain and protect the Society's ownership and rights and to continue to afford scientists the opportunity to publish in high-quality journals, ASM requires the corresponding author to sign a copyright transfer agreement on behalf of all the authors on acceptance. Unless this agreement is executed (without changes and/or addenda), ASM will not publish the article.

In the copyright transfer agreement signed by an author, ASM grants to that author (and coauthors) the right to republish discrete portions of his/her (their) article in any other publication (print, CD-ROM, and other electronic forms) of which he/she is (they are) the author(s) or editor(s), on the condition that appropriate credit is given to the original ASM publication. This republication right also extends to posting on a host computer to which there is access via the Internet. Except as indicated below, significant portions of the article may not be reprinted/posted without ASM's prior written permission, however, as this would constitute duplicate publication.

Authors may post their own published articles on their personal or university-hosted (but not corporate, government, or similar) websites without ASM's prior written permission provided that appropriate credit is given (i.e., the copyright lines shown at the top of the first page).

The copyright transfer agreement asks that authors who were U.S. government employees and who wrote the article as part of their employment duties be identified. This is because works authored solely by such U.S. government employees are not subject to copyright protection, so there is no copyright to be transferred. The other provisions of the copyright transfer agreement, such as author representations of originality and authority to enter into the agreement, apply to U.S. government employee-authors as well as to other authors.

ASM also requires that copyright transfer agreements be signed for cover artwork/photographs.

Copyright for supplemental material (see "[Supplemental Material](#)") remains with the author, but a license permitting the posting by ASM will be sent, along with the article copyright transfer agreement, to the corre-

sponding author for signing at the acceptance stage. If the author of the article is not also the copyright owner of the supplemental material, the corresponding author must send to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to the article, by ASM. The corresponding author is also responsible for incorporating into the supplemental material any copyright notices required by the owner.

Funding Agency Repositories

The National Institutes of Health (NIH) requests that its grantee and intramural authors provide copies of their accepted manuscripts to PubMed Central (PMC) for posting in the PMC Public Access Repository. However, EC authors are automatically in compliance with this policy and need take no action themselves. For the past several years, ASM has deposited in PubMed Central all publications from all ASM journals. Further, ASM policy is that all primary research articles are made available to everyone, free, 6 months after publication through PubMed Central, HighWire, and international PubMed Central-like repositories. By having initiated these policies, ASM is in full compliance with NIH policy. For more information, see <http://publicaccess.nih.gov/>. ASM also allows EC authors whose work was supported by similar funding agencies that have public access requirements like those of the NIH (e.g., the Wellcome Trust) to post their accepted manuscripts in publicly accessible electronic repositories maintained by those funding agencies. If a funding agency does not itself maintain such a site, then ASM allows the author to fulfill that requirement by depositing the manuscript (not the typeset article) in an appropriate institutional or subject-based open repository established by a government or noncommercial entity.

Since ASM makes the final, typeset articles from its primary-research journals available free of charge on the ASM Journals and PMC websites 6 months after final publication, ASM recommends that when submitting the accepted manuscript to PMC or a similar public access site, the author specify that the **posting release date for the manuscript be no earlier than 6 months after publication of the typeset article by ASM.**

Use of Human Subjects or Animals in Research

The use of human subjects or other animals for research purposes is regulated by the federal government and individual institutions. Manuscripts containing information related to human or animal use should clearly state that the research has complied with all relevant federal guidelines and institutional policies. Copies of these guidelines and policy statements must be available for review by the editor if necessary.

Patient Identification

When isolates are derived from patients in clinical studies, do not identify them by using the patients' ini-

tials, even as part of a strain designation. Change the initials to numerals or use randomly chosen letters. Do not give hospital unit numbers; if a designation is needed, use only the last two digits of the unit. (Note: established designations of some viruses and cell lines, although they consist of initials, are acceptable [e.g., JC virus, BK virus, and HeLa cells].)

Nucleotide and Amino Acid Sequences

Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. The accession numbers should be included in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Notes. If conclusions in a manuscript are based on the analysis of sequences and a GenBank/EMBL/DDBJ accession number is not provided at the time of the review, authors should provide the sequence data as supplemental material.

It is expected that, when previously published sequence accession numbers are cited in a manuscript, the original citations (e.g., journal articles) will be included in the References section when possible and reasonable.

Authors are also expected to do elementary searches and comparisons of nucleotide and amino acid sequences against the sequences in standard databases (e.g., GenBank) immediately before manuscripts are submitted and again at the proof stage.

Analyses should specify the database, and the date of each analysis should be indicated as, e.g., January 2010. If relevant, the version of the software used should be specified.

See "[Presentation of Nucleic Acid Sequences](#)" for nucleic acid sequence formatting instructions.

The URLs of the databases mentioned above are as follows: DNA Data Bank of Japan (DDBJ), <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>; EMBL Nucleotide Sequence Database (EMBL), <http://www.ebi.ac.uk/embl/>; and GenBank, National Center for Biotechnology Information (GenBank), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Proper Use of Locus Tags as Systematic Identifiers for Genes

To comply with recommendations from the International Nucleotide Sequence Database (INSDB) Collaborators and to avoid conflicts in gene identification, researchers should implement the following two fundamental guidelines as standards for utilization of locus tags in genome analysis, annotation, submission, reporting, and publication. (i) Locus tag prefixes are systematic gene identifiers for all of the replicons of a genome and as such should be associated with a single genome project submission. (ii) New genome projects must be

registered with INSD, and new locus tag prefixes must be assigned in cooperation with INSD to ensure that they conform to the agreed-upon criteria. Locus tag prefixes that are currently in use may be searched at the NCBI locus tag database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lltp.cgi>).

Structural Determinations

Coordinates for new structures of macromolecules determined by X-ray crystallography or cryo-electron microscopy must be deposited in the Protein Data Bank and assigned identification codes must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the coordinates will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send coordinates with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Notes.

The URLs for coordinate deposition are <http://rcsb-deposit.rutgers.edu/> and <http://pdbdep.protein.osaka-u.ac.jp/top.html.en>.

Microarray Data

The entire set of supporting microarray data must be deposited in the appropriate public database (e.g., GEO, ArrayExpress, or CIBEX) and the assigned accession number(s) must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send the relevant data with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Notes.

The URLs of the databases mentioned above are as follows: Gene Expression Omnibus (GEO), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo/>; ArrayExpress, <http://www.ebi.ac.uk/microarray-as/ae/>; and Center for Information Biology Gene Expression Database (CIBEX), <http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp>.

Culture Deposition

EC expects authors to deposit important strains in publicly accessible culture collections and to refer to the collections and strain numbers in the text. Since the authenticity of subcultures of culture collection specimens that are distributed by individuals cannot be ensured, authors should indicate laboratory strain designations and donor sources as well as original culture collection identification numbers.

MycoBank

New scientific names of fungi along with key nomenclatural and descriptive material must be deposited in MycoBank (<http://www.MycoBank.org>) and the assigned accession number(s) must be included in the manuscript no later than the modification stage of the review process. It is expected that the data will be released to the public no later than the publication (online posting) date of the accepted manuscript. Authors are encouraged to send the relevant data with their original submission, however, so that reviewers can examine them along with the manuscript. The accession number(s) should be listed in a separate paragraph at the end of the Materials and Methods section for full-length papers or at the end of the text for Notes.

Supplemental Material

Supplemental material intended for posting by ASM should be restricted primarily to large or complex data sets or results that cannot readily be displayed in printed form because of space or technical limitations. Such material may include data from microarray, structural, biochemical, or video imaging analyses. In such cases, the manuscript submitted for review should include a distillation of the results so that the principal conclusions are fully supported without referral to the supplemental material.

Supplemental material intended for posting by ASM must be uploaded as a separate Supplemental Material file(s) in Rapid Review and will be reviewed along with the manuscript. The maximum size permitted for an individual file is 25 MB. If your file exceeds this size, you must use a file compression utility (e.g., WinZip or Stuffit) to reduce the size below 25 MB. The decision to publish (i.e., post online only) the material with the article if it is accepted will be made by the editor. ASM will post no more than 10 individual supplemental files. It is possible that a manuscript will be accepted but that the supplemental material will not be.

If the software required for users to view/use the supplemental material is not embedded in the file, ASM strongly urges you to use generally available/easily accessed programs or shareware if your data cannot be conveyed with the common applications.

Unlike the manuscript, supplemental material will not be edited by the ASM Journals staff and proofs will not be made available. References related to supplemental material only should not be listed in the References section of an article; instead, include them with the supplemental material hosted by ASM or posted on a personal/institutional website.

Supplemental material will always remain associated with its article and is not subject to any modifications after publication.

Material that has been published previously (print or online) is not acceptable for posting as supplemental material. Instead, the appropriate reference(s) to the

original publication should be made in the manuscript text.

Copyright for the supplemental material remains with the author, but a license permitting the posting by ASM will be sent, along with the article copyright transfer agreement, to the corresponding author for signing. If you are not the copyright owner, you must provide to ASM signed permission from the owner that allows posting of the material, as a supplement to your article, by ASM. You are responsible for including in the supplemental material any copyright notices required by the owner.

See also “[Publication Fees](#).”

Warranties and Exclusions

Articles published in this journal represent the opinions of the authors and do not necessarily represent the opinions of ASM. ASM does not warrant the fitness or suitability, for any purpose, of any methodology, kit, product, or device described or identified in an article. The use of trade names is for identification purposes only and does not constitute endorsement by ASM.

SUBMISSION, REVIEW, AND PUBLICATION PROCESSES

Submission Process

All submissions to EC must be made electronically via the Rapid Review online submission and peer review system at the following URL: <https://www.rapidreview.com/ASM2/CALogon.jsp>. E-mailed submissions are not accepted. First-time users must create an Author account, which may be used for submitting to all ASM journals.

Review Process

All manuscripts are considered to be confidential and are reviewed by the editors, members of the editorial board, or qualified ad hoc reviewers. To expedite the review process, authors must recommend at least three reviewers who have expertise in the field, who are not members of their institution(s), who have not recently been associated with their laboratory(ies), and who could not otherwise be considered to pose a conflict of interest regarding the submitted manuscript. At least one recommended reviewer must be a member of the journal's editorial board. Please provide, where indicated on the submission form, contact information for suggested reviewers who are not editorial board members.

Copies of in-press and submitted manuscripts that are important for judgment of the present manuscript should be included as supplemental material to facilitate the review.

When a manuscript is submitted to the journal, it is given a control number (e.g., EC000147-10 version 1)

and assigned to one of the editors. (**Always refer to this control number in communications with the editor and the Journals Department.**) It is the responsibility of the corresponding author to inform the coauthors of the manuscript's status throughout the submission, review, and publication processes. The reviewers operate under strict guidelines set forth in “Guidelines for Reviewers” (<http://www.journals.asm.org/misc/reviewguide.dtl>) and are expected to complete their reviews expeditiously.

The corresponding author is notified, generally within 4 to 6 weeks after submission, of the editor's decision to accept, reject, or require modification. When modification is requested, the corresponding author must either submit the modified version within 2 months or withdraw the manuscript. A point-by-point response to the reviews must be provided in the designated section of the submission form for the revised manuscript, and a compare copy of the manuscript (without figures) should be included as supplemental material if the editor requested one.

Manuscripts that have been rejected, or withdrawn after being returned for modification, may be resubmitted to the same ASM journal if the major criticisms have been addressed. A manuscript rejected by one ASM journal on scientific grounds or on the basis of its general suitability for publication is considered rejected by all other ASM journals; however, a manuscript rejected solely on the basis of scope may be “resubmitted” to a more appropriate ASM journal. **A manuscript is considered a resubmission no matter how much (or little) it differs from the rejected or withdrawn manuscript and regardless of how much time has passed.**

For all resubmissions (to the same or a different journal, irrespective of the extent of the revisions, and irrespective of the amount of time between rejection and resubmission), the cover letter must state that the manuscript is a resubmission, and the former manuscript control number must be provided in the appropriate field on the submission form. A point-by-point response to the review(s) and a compare copy of the revised manuscript showing all changes must be included as supplemental material (the Rebuttal section appears in the submission form only if the manuscript is a modification). Manuscripts resubmitted to the same journal are normally handled by the original editor.

Rejected manuscripts may be resubmitted only once unless permission has been obtained from the original editor or from the editor in chief.

Notification of Acceptance

When an editor has decided that a manuscript is acceptable for publication on the basis of scientific merit, the author and the Journals Department are notified. A PDF version of the accepted manuscript is posted online as soon as possible (see “[EC Accepts](#)”).

The text files undergo an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type, and the illustrations are examined. If all files have been prepared according to the criteria set forth in

these Instructions and those in Rapid Review, the acceptance procedure will be completed successfully. If there are problems that would cause extensive corrections to be made at the copyediting stage or if the files are not acceptable for production, ASM Journals staff will contact the corresponding author. Once all the material intended for publication has been determined to be adequate, the manuscript is scheduled for the next available issue and an acceptance letter indicating the month of publication, approximate page proof dates, and table of contents section is mailed to the corresponding author; a copyright transfer agreement is also included, as is a license to permit posting of supplemental material (if applicable). The editorial staff of the ASM Journals Department completes the editing of the manuscript to bring it into conformity with prescribed standards.

EC Accepts

For its primary-research journals, ASM posts online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This feature is called “[journal acronym] Accepts” (e.g., EC Accepts) and is accessible from the Journals website. The manuscripts are published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset articles are published. They are posted “as is” (i.e., as submitted by the authors at the modification stage) and do not reflect ASM editorial changes. No corrections/changes to the PDF manuscripts are accepted. Accordingly, there likely will be differences between the EC Accepts manuscripts and the final, typeset articles. The manuscripts remain listed on the EC Accepts page until the final, typeset articles are posted. At that point, the manuscripts are removed from the EC Accepts page. The manuscripts are under subscription access control until 6 months after the typeset articles are posted, when free access is provided to everyone (subject to the applicable ASM license terms and conditions). Supplemental material intended, and accepted, for publication is not posted until publication of the final, typeset article.

Instructions on how to cite such manuscripts may be found in “References.”

Page Proofs

Page proofs, together with a query sheet and instructions for handling proofs, will be made available to the corresponding author electronically via a PDF file that can be accessed through a unique password. Since corresponding authors will be notified of the availability of their PDF proofs, instructed how to access information about page charges, reprints, and color figure charges (if applicable), and assigned their unique password via e-mail, an e-mail address must be supplied in the correspondent footnote. Failure to do so may result in a delay in publication. **The PDF page proofs must be printed out, and corrections must be**

written on the hard copy. Queries must be answered on the query page or on a separate sheet of paper, and any changes related to the queries must be indicated on the proofs. Note that the copy editor does not query at every instance where a change has been made. Queries are written only to request necessary information or clarification of an unclear passage or to draw attention to edits that may have altered the sense. It is the author’s responsibility to read the entire text, tables, and figure legends, not just items queried. As soon as the page proofs are corrected and signed by the person who proofread them (within 48 h), **they should be mailed or sent by a courier service** such as FedEx, **not** faxed or sent as an e-mail attachment, to the ASM Journals Department, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904.

The proof stage is not the time to make extensive corrections, additions, or deletions. Figures as they appear in the proofs are for validation of content and placement, not quality of reproduction or color accuracy. Print output of figures in the PDF page proofs will be of lower quality than the same figures viewed on a monitor. Please avoid making changes to figures based on the quality of color or reproduction in proof.

Important new information that has become available between acceptance of the manuscript and receipt of the proofs may be inserted as an addendum in proof with the permission of the editor. If references to unpublished data or personal communications are added, it is expected that written assurance granting permission for the citation will be included. Limit changes to correction of spelling errors, incorrect data, and grammatical errors and updated information for references to articles that have been submitted or are in press. If URLs have been provided in the article, recheck the sites to ensure that the addresses are still accurate and the material that you expect the reader to find is indeed there.

Questions about late proofs and problems in the proofs should be directed to the ASM Journals Department (e-mail, nlin@asmusa.org; telephone, 202-942-9231). Questions about accessing or viewing your PDF proofs should be directed to Katie Gay of Cadmus Communications at 804-261-3155 or gayk@cadmus.com.

PDF Files

A corresponding author who has included an e-mail address in his/her “corresponding author” footnote will have limited access (10 downloads, total) to the PDF file of his/her published article. An e-mail alert will automatically be sent to him/her on the day the issue is posted. It will provide a URL, which will be required to obtain access, and instructions. An article may be viewed, printed, or stored, provided that it is for the author’s own use.

Should coauthors or colleagues be interested in viewing the paper for their own use, the corresponding author may provide them with the URL; a copy of the article may not be forwarded electronically. However, they must be made aware of the terms and conditions of

the ASM copyright. (For details, go to <http://www.journals.asm.org/misc/terms.dtl>.) Note that each such download will count toward the corresponding author's total of 10. After 10 downloads, access will be denied and can be obtained only through a subscription to the journal (either individual or institutional) or after the standard access control has been lifted (i.e., 6 months after publication).

Publication Fees

Page charges. Authors whose research was supported by grants, special funds (including departmental and institutional), or contracts (including governmental) or whose research was done as part of their official duties (government or corporate, etc.) are required to pay page charges (based on the number of typeset pages, including illustrations, in the article).

For a **corresponding author who is an ASM member**, page charges are currently \$65 per page for the first eight pages and \$125 per page for each page in excess of eight (subject to change without notice). To obtain the member rate, the corresponding author must be an ASM member.

For a **nonmember corresponding author**, page charges are currently \$75 per page for the first eight pages and \$250 for each page in excess of eight (subject to change without notice). A corresponding author who is not an ASM member may join ASM to obtain the member rate.

If the research was not supported by any of the means described above, a request to waive the charges may be sent to the Journals Department, ASM, 1752 N St., N.W., Washington, DC 20036-2904, USA (fax, 202-942-9355; e-mail, aluckey@asmusa.org). The request must include the manuscript control number assigned by ASM and indicate how the work was supported.

Minireviews and Commentaries are not subject to page charges.

Color charges. The cost of publishing in color must be borne by the author.

For a corresponding author who is an ASM member, color charges are currently \$45 per color figure (subject to change without notice).

For a nonmember corresponding author, color charges are currently \$75 per color figure (subject to change without notice). A corresponding author who is not an ASM member may join ASM to obtain the member rate.

Minireviews and Commentaries are not subject to color charges.

Reprints. Reprints (in multiples of 100) may be purchased by all coauthors. In the proof notification e-mail, the corresponding author will be instructed how to access information about reprints.

The corresponding authors of Minireviews and Commentaries may receive 100 free reprints of their contribution; additional reprints (in multiples of 100) may be

purchased if desired. As for regular articles, the corresponding author will be instructed, in the proof notification e-mail, how to access information about reprints.

Supplemental material fee. Authors are charged a flat fee for posting supplemental material as an adjunct to their published article. For 2010, the fee is \$190. (Exceptions: No fee is charged for supplemental material associated with Minireviews or Commentaries.)

Optional open access fee. Author-paid optional open access (OOA) is now available for all article types. The 2010 fee is \$2,000. This fee is in addition to any page charges, color charges, or supplemental material charges and permits immediate public access to both the preliminary "Accepts" version and the copyedited, typeset version published in the online journal. This option is in addition to the open access already provided through NIH's PubMed Central repository; all primary research published in ASM journals is freely available through PubMed Central 6 months after publication.

ORGANIZATION AND FORMAT

Editorial Style

The editorial style of ASM journals conforms to the *ASM Style Manual for Journals* (American Society for Microbiology, 2010, in-house document) and *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 6th ed. (Greenwood Press, Westport, CT, 2006), as interpreted and modified by the editors and the ASM Journals Department.

The editors and the Journals Department reserve the privilege of editing manuscripts to conform with the stylistic conventions set forth in the aforesaid publications and in these Instructions.

On receipt at ASM, an accepted manuscript undergoes an automated preediting, cleanup, and tagging process specific to the particular article type. To optimize this process, manuscripts must be supplied in the correct format and with the appropriate sections and headings.

Type every portion of the manuscript double-spaced (a minimum of 6 mm between lines), including figure legends, table footnotes, and References, and number all pages in sequence, including the abstract, figure legends, and tables. Place the last two items after the References section. Manuscript pages should have line numbers; manuscripts without line numbers may be editorially rejected by the editor, with a suggestion of resubmission after line numbers are added. The font size should be no smaller than 12 points. It is recommended that the following sets of characters be easily distinguishable in the manuscript: the numeral zero (0) and the letter "oh" (O); the numeral one (1), the letter "el" (l), and the letter "eye" (I); and a multiplication sign (×) and the letter "ex" (x). Do not create symbols as graphics or use special fonts that are external to your word processing program; use the "insert symbol" function. Set

the page size to 8½ by 11 inches (ca. 21.6 by 28 cm). Italicize any words that should appear in italics, and indicate paragraph lead-ins in boldface type.

Authors who are unsure of proper English usage should have their manuscripts checked by someone proficient in the English language.

Manuscripts may be editorially rejected, without review, on the basis of poor English or lack of conformity to the standards set forth in these Instructions.

Full-Length Papers

Full-length papers should include the elements described in this section.

Title, running title, and byline. Each manuscript should present the results of an independent, cohesive study; thus, numbered series titles are not allowed. Avoid the main title/subtitle arrangement, complete sentences, and unnecessary articles. On the title page, include the title, the running title (not to exceed 54 characters and spaces), the name of each author, the address(es) of the institution(s) at which the work was performed, each author's affiliation, and a footnote indicating the present address of any author no longer at the institution where the work was performed. Place an asterisk after the name of the author to whom inquiries regarding the paper should be directed (see "[Correspondent footnote](#)," below).

Study group in byline. A study group, surveillance team, working group, consortium, or the like (e.g., the Active Bacterial Core Surveillance Team) may be listed as a coauthor in the byline if its contributing members satisfy the requirements for authorship and accountability as described in these Instructions. The names (and institutional affiliations if desired) of the contributing members only may be given in a footnote keyed to the study group name in the byline or a separate paragraph in Acknowledgments.

If the contributing members of the group associated with the work do not fulfill the criteria of substantial contribution to and responsibility for the paper, the group may not be listed in the author byline. Instead, it and the names of its contributing members may be listed in the Acknowledgments section.

Correspondent footnote. The complete mailing address, a single telephone number, a single fax number, and a single e-mail address for the corresponding author should be included on the title page of the manuscript. This information will be published in the article as a footnote to facilitate communication, and the e-mail address will be used to notify the corresponding author of the availability of proofs and, later, of the PDF file of the published article.

Abstract. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper

without presenting extensive experimental details. Avoid abbreviations and references, and do not include diagrams. When it is essential to include a reference, use the same format as shown for the References section but omit the article title. Because the abstract will be published separately by abstracting services, it must be complete and understandable without reference to the text.

Introduction. The introduction should supply sufficient background information to allow the reader to understand and evaluate the results of the present study without referring to previous publications on the topic. The introduction should also provide the hypothesis that was addressed and the rationale for the present study. Use only those references required to provide the most salient background rather than an exhaustive review of the topic.

Materials and Methods. The Materials and Methods section should include sufficient technical information to allow the experiments to be repeated. When centrifugation conditions are critical, give enough information to enable another investigator to repeat the procedure: make of centrifuge, model of rotor, temperature, time at maximum speed, and centrifugal force ($\times g$ rather than revolutions per minute). For commonly used materials and methods (e.g., media and protein concentration determinations), a simple reference is sufficient. If several alternative methods are commonly used, it is helpful to identify the method briefly as well as to cite the reference. For example, it is preferable to state "cells were broken by ultrasonic treatment as previously described (9)" rather than to state "cells were broken as previously described (9)." This allows the reader to assess the method without constant reference to previous publications. Describe new methods completely and give sources of unusual chemicals, equipment, or microbial strains. When large numbers of microbial strains or mutants are used in a study, include tables identifying the immediate sources (i.e., sources from whom the strains were obtained) and properties of the strains, mutants, bacteriophages, and plasmids, etc.

A method or strain, etc., used in only one of several experiments reported in the paper may be described in the Results section or very briefly (one or two sentences) in a table footnote or figure legend. It is expected that the sources from whom the strains were obtained will be identified.

Results. The Results section should include the results of the experiments. Reserve extensive interpretation of the results for the Discussion section. Present the results as concisely as possible in one of the following: text, table(s), or figure(s). Avoid extensive use of graphs to present data that might be more concisely presented in the text or tables. For example, except in unusual cases, double-reciprocal plots used to determine apparent K_m values should not be presented as graphs; instead, the values should be stated in the text. Similarly,

graphs illustrating other methods commonly used to derive kinetic or physical constants (e.g., reduced-viscosity plots and plots used to determine sedimentation velocity) need not be shown except in unusual circumstances. Limit photographs (particularly photomicrographs and electron micrographs) to those that are absolutely necessary to show the experimental findings. Number figures and tables in the order in which they are cited in the text, and be sure to cite all figures and tables.

Discussion. The Discussion should provide an interpretation of the results in relation to previously published work and to the experimental system at hand and should not contain extensive repetition of the Results section or reiteration of the introduction. In short papers, the Results and Discussion sections may be combined.

Acknowledgments. The source of any financial support received for the work being published must be indicated in the Acknowledgments section. (It will be assumed that the absence of such an acknowledgment is a statement by the authors that no support was received.) The usual format is as follows: "This work was supported by Public Health Service grant CA-01234 from the National Cancer Institute."

Recognition of personal assistance should be given as a separate paragraph, as should any statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the paper or of a product mentioned therein.

Appendixes. Appendixes that contain additional material to aid the reader are permitted. Titles, authors, and reference sections that are distinct from those of the primary article are not allowed. If it is not feasible to list the author(s) of the appendix in the byline or the Acknowledgments section of the primary article, rewrite the appendix so that it can be considered for publication as an independent article, either full-length or Note style. Equations, tables, and figures should be labeled with the letter "A" preceding the numeral to distinguish them from those cited in the main body of the text.

References. (i) References listed in the References section. The References section must include all journal articles (both print and online), books and book chapters (both print and online), patents, theses and dissertations, published conference proceedings, meeting abstracts from published abstract books or journal supplements, letters (to the editor), and company publications, as well as in-press journal articles, book chapters, and books (publication title must be given). As we use the citation-name reference style, arrange the citations in **alphabetical order** (letter by letter, ignoring spaces and punctuation) by first-author surname and **number consecutively**. Provide the names of all the authors for each reference. All listed references must be cited parenthetically by number in the text. Since title and byline information that is downloaded from

PubMed does not always show accents, italics, or special characters, authors should refer to the PDF files or hard-copy versions of the articles and incorporate the necessary corrections in the submitted manuscript. Abbreviate journal names according to the PubMed Journals Database (National Library of Medicine, National Institutes of Health; available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>), the primary source for ASM style.

Follow the styles shown in the examples below for print references.

1. Alexander, T. W., L. J. Yanke, E. Topp, M. E. Olson, R. R. Read, D. W. Morck, and T. A. McAllister. 2008. Effect of subtherapeutic administration of antibiotics on the prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria in feedlot cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:4405–4416.
2. Cox, C. S., B. R. Brown, and J. C. Smith. *J. Gen. Genet.*, in press.* {Article title is optional; journal title is mandatory.}
3. da Costa, M. S., M. F. Nobre, and F. A. Rainey. 2001. Genus I. Thermus Brock and Freeze 1969, 295,^{AL} emend. Nobre, Trüper and da Costa 1996b, 605, p. 404–414. In D. R. Boone, R. W. Castenholz, and G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol. 1. Springer, New York, NY.
4. Elder, B. L., and S. E. Sharp. 2003. Cumitech 39, Competency assessment in the clinical laboratory. Coordinating ed., S. E. Sharp. ASM Press, Washington, DC.
5. Falagas, M. E., and S. K. Kasiakou. 2006. Use of international units when dosing colistin will help decrease confusion related to various formulations of the drug around the world. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:2274–2275. (Letter.) {“Letter” or “Letter to the editor” is allowed but not required at the end of such an entry.}
6. Fitzgerald, G., and D. Shaw. In A. E. Waters (ed.), *Clinical microbiology*, in press. EFH Publishing Co., Boston, MA.* {Chapter title is optional.}
7. Forman, M. S., and A. Valsamakis. 2003. Specimen collection, transport, and processing: virology, p. 1227–1241. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, J. H. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, DC.
8. Garcia, C. O., S. Paira, R. Burgos, J. Molina, J. F. Molina, and C. Calvo. 1996. Detection of salmonella DNA in synovial membrane and synovial fluid from Latin American patients. *Arthritis Rheum.* **39**(Suppl.): S185. {Meeting abstract published in journal supplement.}
9. Green, P. N., D. Hood, and C. S. Dow. 1984. Taxonomic status of some methylotrophic bacteria, p. 251–254. In R. L. Crawford and R. S. Hanson (ed.), *Microbial growth on C₁ compounds*. Proceedings of the 4th International Symposium. American Society for Microbiology, Washington, DC.
10. Odell, J. C. April 1970. Process for batch culturing. U.S. patent 484,363,770. {Include the name of the

patented item/process if possible; the patent number is mandatory.}

11. **O'Malley, D. R.** 1998. Ph.D. thesis. University of California, Los Angeles, CA. *{Title is optional.}*
12. **Rotimi, V. O., N. O. Salako, E. M. Mohaddas, and L. P. Philip.** 2005. Abstr. 45th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother., abstr. D-1658. *{Abstract title is optional.}*
13. **Smith, D., C. Johnson, M. Maier, and J. J. Maurer.** 2005. Distribution of fimbrial, phage and plasmid associated virulence genes among poultry *Salmonella enterica* serovars, abstr. P-038, p. 445. Abstr. 105th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC. *{Abstract title is optional.}*
14. **Stratagene.** 2006. Yeast DNA isolation system: instruction manual. Stratagene, La Jolla, CA. *{Use the company name as the author if none is provided for a company publication.}*

*A reference to an in-press ASM publication should state the control number (e.g., EC000577-10) if it is a journal article or the name of the publication if it is a book.

Online references must provide essentially the same information that print references do. For online journal articles, posting or revision dates may replace the year of publication, and a DOI or URL may be provided in addition to or in lieu of volume and page numbers. Some examples follow.

1. **Charlier, D., and N. Glansdorff.** September 2004, posting date. Chapter 3.6.1.10, Biosynthesis of arginine and polyamines. In R. Curtiss III et al. (ed.), *EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC. <http://www.ecosal.org/>. *{Note that each chapter has its own posting date.}*
2. **Dionne, M. S., and D. S. Schneider.** 2002. Screening the fruitfly immune system. *Genome Biol.* **3**:REVIEWS1010. <http://genomebiology.com/2002/3/4/reviews/1010>.
3. **Smith, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman.** 2001. Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:2250–2255. doi:10.1073/pnas.041593698.
4. **Winnick, S., D. O. Lucas, A. L. Hartman, and D. Toll.** 2005. How do you improve compliance? *Pediatrics* **115**:e718–e724.

Note: a posting or accession date is required for any online reference that is periodically updated or changed.

(ii) References cited in the text. References to unpublished data, manuscripts submitted for publication, unpublished conference presentations (e.g., a report or poster that has not appeared in published conference proceedings), personal communications, patent applications and patents pending, computer software, data-

bases, and websites (home pages) should be made parenthetically in the text as follows.

... similar results (R. B. Layton and C. C. Weathers, unpublished data).

... system was used (J. L. McInerney, A. F. Holden, and P. N. Brighton, submitted for publication).

... as described previously (M. G. Gordon and F. L. Rattner, presented at the Fourth Symposium on Food Microbiology, Overton, IL, 13 to 15 June 1989). *{For nonpublished abstracts and posters, etc.}*

... this new process (V. R. Smoll, 20 June 1999, Australian Patent Office). *{For non-U.S. patent applications, give the date of publication of the application.}*

... available in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

... using ABC software (version 2.2; Department of Microbiology, State University [<http://www.state.micro.edu>]).

URLs for companies that produce any of the products mentioned in your study or for products being sold may NOT be included in the article. However, company URLs that permit access to scientific data related to the study or to shareware used in the study are permitted.

(iii) References related to supplemental material. References that are related only to supplemental material hosted by ASM or posted on a personal/institutional website should not be listed in the References section of an article; include them with the supplemental material itself.

(iv) Referencing ASM accepts (publish-ahead-of-print) manuscripts. Citations of ASM Accepts manuscripts should look like the following example.

Wang, G. G., M. P. Pasillas, and M. P. Kamps. 15 May 2006. Persistent transactivation by Meis1 replaces Hox function in myeloid leukemogenesis models: evidence for co-occupancy of Meis1-Pbx and Hox-Pbx complexes on promoters of leukemia-associated genes. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.00586-06.

Other journals may use different styles for their publish-ahead-of-print manuscripts, but citation entries must include the following information: author name(s), posting date, title, journal title, and volume and page numbers and/or DOI. The following is an example:

Zhou, F. X., H. J. Merianos, A. T. Brunger, and D. M. Engelman. 13 February 2001, posting date. Polar residues drive association of polyleucine

transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
doi:10.1073/pnas.041593698.

Notes

The Note format is intended for the presentation of brief observations that do not warrant full-length papers. Submit Notes in the same way as full-length papers. They receive the same review, they are not published more rapidly than full-length papers, and they are not considered preliminary communications.

Each Note must have an abstract of no more than 50 words. Do not use section headings in the body of the Note; combine methods, results, and discussion in a single section. Paragraph lead-ins are permissible. The text should be kept to a minimum and if possible should not exceed 1,000 words; the number of figures and tables should also be kept to a minimum. Materials and methods should be described in the text, not in the figure legends or table footnotes. Present acknowledgments as in full-length papers, but do not use a heading. The References section is identical to that of full-length papers.

Minireviews

Minireviews are brief (**limit of six printed pages exclusive of references**) biographical profiles, historical perspectives, or summaries of developments in fast-moving areas. They must be based on published articles; they may address any subject within the scope of the journal.

Minireviews may be either solicited or proffered by authors responding to a recognized need. Irrespective of origin, Minireviews are subject to review and should be submitted via Rapid Review. The cover letter should state whether the article was solicited and by whom.

Minireviews must have abstracts. Limit the abstract to 250 words or fewer and concisely summarize the basic content of the paper without presenting extensive experimental details. The body of the Minireview may have section headings and/or paragraph lead-ins.

Author biographies. At the editor's invitation, corresponding authors of Minireviews may submit brief biographical sketches (limit, 150 words) of each contributing author to be published at the end of the article. If the editor asks you to submit a modified manuscript, you should submit biographical text and photos with your modification.

Commentaries

Commentaries are communications written in response to invitations issued by the editors and concern relevant topics in eukaryotic microbiology that are not necessarily covered by Minireviews. They should raise issues of interest to the scholarly community, initiate or focus discussion, and propose needed position or consensus statements by leadership groups in research and

education. Reviews of the literature, methods and other how-to papers, and responses targeted at a specific published paper are not appropriate. Commentaries are subject to review.

The length may not exceed four printed pages, and the format is like that of a Minireview (see above).

Errata

The Erratum section provides a means of correcting errors that occurred during the writing, typing, editing, or publication (e.g., a misspelling, a dropped word or line, or mislabeling in a figure) of a published article. Submit Errata via Rapid Review (see "[Submission, Review, and Publication Processes](#)"). In the Abstract section of the submission form (a required field), put "Not Applicable." Upload the text of your Erratum as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting.

Authors' Corrections

The Author's Correction section provides a means of correcting errors of omission (e.g., author names or citations) and errors of a scientific nature that do not alter the overall basic results or conclusions of a published article (e.g., an incorrect unit of measurement or order of magnitude used throughout, contamination of one of numerous cultures, or misidentification of a mutant strain, causing erroneous data for only a portion [non-critical] of the study). Note that the addition of new data is not permitted.

For corrections of a scientific nature or issues involving authorship, including contributions and use or ownership of data and/or materials, all disputing parties must agree, in writing, to publication of the Correction. For omission of an author's name, letters must be signed by the authors of the article and the author whose name was omitted. The editor who handled the article will be consulted if necessary.

Submit an Author's Correction via Rapid Review (see "[Submission, Review, and Publication Processes](#)"). In the submission form, select Erratum as the manuscript type; there is no separate selection in Rapid Review for an Author's Correction, but your Correction will be published as such if appropriate. In the Abstract section of the submission form (a required field), put "Not Applicable." Upload the text of your Author's Correction as a Microsoft Word file. Please see a recent issue for correct formatting. Signed letters of agreement must be supplied as supplemental material (scanned PDF files).

Retractions

Retractions are reserved for major errors or breaches of ethics that, for example, may call into question the source of the data or the validity of the results and conclusions of an article. Submit Retractions via Rapid Review (see "[Submission, Review, and Publication Pro-](#)

cesses"). In the Abstract section of the submission form (a required field), put "Not Applicable." Upload the text of your Retraction as a Microsoft Word file. Letters of agreement signed by all of the authors must be supplied as supplemental material (scanned PDF files). The Retraction will be assigned to the editor in chief of the journal, and the editor who handled the paper and the chairman of the ASM Publications Board will be consulted. If all parties agree to the publication and content of the Retraction, it will be sent to the Journals Department for publication.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

Illustrations

Image manipulation. Computer-generated images may be processed only minimally. Processing (e.g., changing contrast, brightness, or color balance) is acceptable only if applied to all parts of the image, as well as to the controls, equally, and descriptions of all such adjustments and the tools used (both hardware and software) must be provided in the manuscript. Unprocessed data and files must be retained by the authors and be provided to the editor on request.

File types and formats. Illustrations may be continuous-tone images, line drawings, or composites. Color graphics may be submitted, but the cost of printing in color must be borne by the author. Suggestions about how to reduce costs and ensure accurate color reproduction are given below.

On initial submission, illustrations should be supplied as PDF files, with the legend on the same page, to assist review. At the modification stage, production quality digital files must be provided, along with text files for the legends. The legends are copyedited and typeset for final publication, not included as part of the figure itself. All graphics submitted with modified manuscripts must be bitmap, grayscale, or in the RGB (preferred) or CMYK color mode. See "[Color illustrations](#)." Halftone images (those with various densities or shades) must be grayscale, not bitmap. EC accepts TIFF or EPS files but discourages PowerPoint for either black-and-white or color images.

For instructions on creating acceptable EPS and TIFF files, refer to the Cadmus digital art website, <http://art.cadmus.com/da/index.jsp>. PowerPoint requires users to pay close attention to the fonts used in their images (see the section on fonts below). If instructions for fonts are not followed exactly, images prepared for publication are subject to missing characters, improperly converted characters, or shifting/obscuring of elements or text in the figure. For proper font use in PowerPoint images, refer to the Cadmus digital art website, http://art.cadmus.com/da/instructions/ppt_disclaimer.jsp.

We strongly recommend that before returning their modified manuscripts, authors check the acceptabil-

ity of their digital images for production by running their files through Rapid Inspector, a tool provided at the following URL: <http://rapidinspector.cadmus.com/RapidInspector/zmw/index.jsp>. Rapid Inspector is an easy-to-use, Web-based application that identifies file characteristics that may render the image unusable for production.

If you require additional information, please send an e-mail inquiry to digitalart@cadmus.com.

Minimum resolution. It is extremely important that a high enough file resolution is used. All separate images that you import into a figure file must be at the correct resolution before they are placed. (For instance, placing a 72-dpi image in a 300-dpi EPS file will not result in the placed image meeting the minimum requirements for file resolution.) Note, however, that the higher the resolution, the larger the file and the longer the upload time. Publication quality will not be improved by using a resolution higher than the minimum. Minimum resolutions are as follows:

300 dpi for grayscale and color
600 dpi for combination art (lettering and images)
1,200 dpi for line art

Size. All graphics should be submitted at their intended publication size so that no reduction or enlargement is necessary. Resolution must be at the required level at the submitted size. Include only the significant portion of an illustration. White space must be cropped from the image, and excess space between panel labels and the image must be eliminated.

Maximum width for a 1-column figure: $3\frac{5}{16}$ inches (ca. 8.4 cm)
Maximum width for a 2-column figure: $6\frac{7}{8}$ inches (ca. 17.4 cm)
Minimum width for a 2-column figure: $4\frac{1}{4}$ inches (10.8 cm)
Maximum height: $9\frac{1}{16}$ inches (23.0 cm)

Contrast. Illustrations must contain sufficient contrast to be viewed easily on a monitor or on the printed page.

Labeling and assembly. All final lettering and labeling must be incorporated into the figures. On initial submission, illustrations should be provided as PDF files, with the legend beneath each image, to assist review. At the modification stage, production quality digital figure files must be provided, along with text files for the legends. Put the figure number well outside the boundaries of the image itself. (Numbering may need to be changed at the copyediting stage.) Each figure must be uploaded as a separate file, and any multipanel figures must be assembled into one file; i.e., rather than uploading a separate file for each panel in a figure, assemble all panels in one piece and supply them as one file.

Fonts. To avoid font problems, set all type in one of the following fonts: Arial, Helvetica, Times Roman, European PI, Mathematical PI, or Symbol. Courier may be used but should be limited to nucleotide or amino acid sequences, where a nonproportional (monospace) font is required. All fonts other than these must be converted to paths (or outlines) in the application with which they were created.

Compression. Images created with Macintosh applications may be compressed with Stuffit. Images created with Windows applications may be compressed with WinZip or PKZIP.

Color illustrations. Color costs must be borne by the author. See “[Publication Fees](#).” All figures submitted in color will be processed as color. Adherence to the following guidelines will help to minimize costs and to ensure color reproduction that is as accurate as possible.

The online version is considered the version of record for EC and all other ASM journals. To maximize online reproduction, color illustrations should be supplied in the RGB color mode, as either (i) RGB TIFF images with a resolution of at least 300 pixels per inch (raster files, consisting of pixels) or (ii) Illustrator-compatible EPS files with RGB color elements (vector files, consisting of lines, fonts, fills, and images). CMYK files are also accepted. Other than in color space, CMYK files must meet the same production criteria as RGB files. The RGB color space is the native color space of computer monitors and of most of the equipment and software used to capture scientific data, and it can display a wider range of colors (especially bright fluorescent hues) than the CMYK (cyan, magenta, yellow, black) color space used by print devices that put ink (or toner) on paper. For reprints, ASM’s print provider will automatically create CMYK versions of color illustrations from the supplied RGB versions. Color in the reprints may not match that in the online journal of record because of the smaller range of colors capable of being reproduced by CMYK color. For additional information on RGB versus CMYK color, refer to the Cadmus digital art site, http://art.cadmus.com/da/guidelines_rgb.jsp.

Drawings

Submit graphs, charts, complicated chemical or mathematical formulas, diagrams, and other drawings as finished products not requiring additional artwork or typesetting. All elements, including letters, numbers, and symbols, must be easily readable, and both axes of a graph must be labeled.

When creating line art, please use the following guidelines:

(i) **All art must be submitted at its intended publication size.** For acceptable dimensions, see “[Size](#),” above.

(ii) **Avoid using screens (i.e., shading) in line art.** It can be difficult and time-consuming to reproduce these images without moiré patterns. Various pattern backgrounds are preferable to screens as long as the fill patterns are not imported from another application. If you must use images containing screens,

(a) Generate the image at line screens of 85 lines per inch or lower.

(b) When applying multiple shades of gray, differentiate the gray levels by at least 20%.

(c) Never use levels of gray below 5% or above 95% as they are likely to fade out or become totally black when output.

(iii) Use thick, solid lines that are no finer than 1 point in thickness.

(iv) No type should be smaller than 6 points at the final publication size.

(v) Avoid layering type directly over shaded or textured areas.

(vi) Avoid the use of reversed type (white lettering on a black background).

(vii) Avoid heavy letters, which tend to close up, and unusual symbols, which the printer may not be able to reproduce in the legend.

(viii) If colors are used, avoid using similar shades of the same color and avoid very light colors.

In figure ordinate and abscissa scales (as well as table column headings), avoid the ambiguous use of numbers with exponents. Usually, it is preferable to use the appropriate *Système International d’Unités* (SI) symbols (μ for 10^{-6} , m for 10^{-3} , k for 10^3 , and M for 10^6 , etc.). A complete listing of SI symbols can be found in the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) publication *Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry* (RSC Publishing, Cambridge, United Kingdom, 2007); an abbreviated list is available at <http://old.iupac.org/reports/1993/homann/index.html>. Thus, representation of 20,000 cpm on a figure ordinate should be made by the number 20 accompanied by the label kcpm.

Where powers of 10 must be used, the journal requires that the exponent power be associated with the number shown. In representing 20,000 cells per ml, the numeral on the ordinate would be “2” and the label would be “ 10^4 cells per ml” (not “cells per ml $\times 10^{-4}$ ”). Likewise, an enzyme activity of 0.06 U/ml would be shown as 6 accompanied by the label 10^{-2} U/ml. The preferred designation would be 60 mU/ml (milliunits per milliliter).

TABLE 2. Specific activity of β -galactosidase produced from an integrated *YlFBP1* promoter-*lacZ* fusion in *Y. lipolytica* grown in different carbon sources^a

Strain and relevant genotype	Sp act (mU/mg protein) of β -galactosidase							
	Glucose		Glycerol		Ethanol		Acetate	
	YNB	YP	YNB	YP	YNB	YP	YNB	YP
RJM007 <i>YlFBP1</i>	36 $\pm$ 5	14 $\pm$ 4	47 $\pm$ 4	12 $\pm$ 1	83 $\pm$ 6	36 $\pm$ 3	70 $\pm$ 5	23 $\pm$ 5
RJM008 <i>Ylfbp1::URA3</i>	97 $\pm$ 13	33 $\pm$ 2	94 $\pm$ 15	23 $\pm$ 5	297 $\pm$ 15	182 $\pm$ 6	372 $\pm$ 13	189 $\pm$ 10

^a *Y. lipolytica* strains RJM007 and RJM008, wild type and *Ylfbp1::URA3*, respectively, bearing a fusion of the *YlFBP1* promoter to *E. coli lacZ* integrated into the chromosomal *YILEU2* locus (see Materials and Methods) were cultured in minimal or rich medium with the indicated carbon sources, and β -galactosidase was assayed as described in Materials and Methods. Results are the mean values $\pm$ the standard errors of the means of the results from four independent cultures.

Presentation of Nucleic Acid Sequences

Long nucleic acid sequences must be presented as figures in the following format to conserve space. Print the sequence in lines of approximately 100 to 120 nucleotides in a nonproportional (monospace) font that is easily legible when published with a line length of 6 inches (ca. 15.2 cm). If possible, lines of nucleic acid sequence should be further subdivided into blocks of 10 or 20 nucleotides by spaces within the sequence or by marks above it. Uppercase and lowercase letters may be used to designate the exon-intron structure or transcribed regions, etc., if the lowercase letters remain legible at a 6-inch (ca. 15.2-cm) line length. Number the sequence line by line; place numerals, representing the first base of each line, to the left of the lines. Minimize spacing between lines of sequence, leaving room only for annotation of the sequence. Annotation may include boldface, underlining, brackets, and boxes, etc. Encoded amino acid sequences may be presented, if necessary, immediately above or below the first nucleotide of each codon, by using the single-letter amino acid symbols. Comparisons of multiple nucleic acid sequences should conform as nearly as possible to the same format.

Figure Legends

On initial submission, to assist review, the legend should be incorporated in the image file and appear beneath the figure. At the modification stage, figure legends must be provided as text files separate from the image file.

Legends should provide enough information so that the figure is understandable without frequent reference to the text. However, detailed experimental methods must be described in the Materials and Methods section, not in a figure legend. A method that is unique to one of several experiments may be reported in a legend only if the discussion is very brief (one or two sentences). Define all symbols used in the figure and define all abbreviations that are not used in the text.

Tables

Tables that contain artwork, chemical structures, or shading must be submitted as illustrations in an acceptable format at the modification stage. The preferred format for regular tables is Microsoft Word; however, WordPerfect and Acrobat PDF are also acceptable.

Note that a straight Excel file is not currently an acceptable format. Excel files must be either embedded in a Word or WordPerfect document or converted to PDF before being uploaded. **If your modified manuscript contains PDF tables, select “for reviewing purposes only” at the beginning of the file upload process.**

Tables should be formatted as follows. Arrange the data so that **columns of like material read down, not across**. The headings should be sufficiently clear so that the meaning of the data is understandable without reference to the text. See the “[Abbreviations](#)” section of these Instructions for those that should be used in tables. Explanatory footnotes are acceptable, but more-extensive table “legends” are not. Footnotes should not include detailed descriptions of the experiment. Tables must include enough information to warrant table format; those with fewer than six pieces of data will be incorporated into the text by the copy editor. Table 2 from Eukaryot. Cell 7:1742–1749, 2008, is an example of a well-constructed table.

Cover Photographs and Drawings

EC publishes photographs and drawings on the front cover. Invitations are issued to authors whose manuscripts are returned for modification or whose manuscripts have been accepted for publication in EC; material should be related to the work presented in the EC manuscript. Unsolicited photos will also be considered. No material submitted for consideration will be returned to the author. Authors will be notified only if their cover art is selected. Copyright for the chosen material must be transferred to ASM. A short description of the cover material will be included. Technical specifications for submission are available from the cover editor, C. C. Wang (ccwang@cgl.ucsf.edu).

NOMENCLATURE

Chemical and Biochemical Nomenclature

The recognized authority for the names of chemical compounds is *Chemical Abstracts* (CAS; <http://www.cas.org/>) and its indexes. *The Merck Index*, 14th ed. (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006), is also an excellent source. For guidelines to the use of biochemical terminology, consult *Biochemical Nomenclature and Related*

Documents (Portland Press, London, United Kingdom, 1992), available at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bibliog/white.html>, and the instructions to authors of the *Journal of Biological Chemistry* and the *Archives of Biochemistry and Biophysics* (first issues of each year).

Do not express molecular weight in daltons; molecular weight is a unitless ratio. Molecular mass is expressed in daltons.

For enzymes, use the recommended (trivial) name assigned by the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (IUB) as described in *Enzyme Nomenclature* (Academic Press, Inc., New York, NY, 1992) and at <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>. If a nonrecommended name is used, place the proper (trivial) name in parentheses at first use in the abstract and text. Use the EC number when one has been assigned. Authors of papers describing enzymological studies should review the standards of the STRENDa Commission for information required for adequate description of experimental conditions and for reporting enzyme activity data (<http://www.strenda.org/documents.html>).

Nomenclature of Mice

For mouse strain and genetic nomenclature, ASM encourages authors to refer to the guidelines set forth by the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, available on the Mouse Genome Database home page at <http://www.informatics.jax.org/> and in *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, 3rd ed. (M. F. Lyon et al., ed., Oxford University Press, Oxford, England, 1996).

Nomenclature of Microorganisms

Binary names, consisting of a generic name and a specific epithet (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*), must be used for all microorganisms. Names of categories at or above the genus level may be used alone, but specific and subspecific epithets may not. A specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper. Thereafter, the generic name should be abbreviated to the initial capital letter (e.g., *S. cerevisiae*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper. Names of all taxa (kingdoms, phyla, classes, orders, families, genera, species, and subspecies) are printed in italics and should be italicized in the manuscript; strain designations and numbers are not.

The spelling of bacterial names should follow the *Approved Lists of Bacterial Names (Amended) & Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes* (V. B. D. Skerman et al., ed., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1989) and the validation lists and notification lists published in the *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (formerly the *International Journal of Systematic Bacteriology*) since January 1989. In addition, two sites on the World Wide Web list current approved bacterial names: Bacterial Nomenclature Up-

to-Date (http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14) and List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>).

Since the classification of fungi is far from complete, it is the responsibility of the author to determine the accepted binomial for a given organism. Sources for these names include *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 4th ed. (C. P. Kurtzman and J. W. Fell, ed., Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 1998) and *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th ed. (P. M. Kirk, P. F. Cannon, J. C. David, and J. A. Stalpers, ed., CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, United Kingdom, 2001); see also <http://www.speciesfungorum.org/Names/Fundic.asp>.

Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and reported on the ICTV Virus Taxonomy website (<http://www.ictvonline.org/index.asp>). In addition, the recommendations of the ICTV regarding the use of species names should generally be followed: when the entire species is discussed as a taxonomic entity, the species name, as with other taxa, is italic and has the first letter and any proper nouns capitalized (e.g., *Tobacco mosaic virus*, *Murray Valley encephalitis virus*). When the behavior or manipulation of individual viruses is discussed, the vernacular (e.g., tobacco mosaic virus, Murray Valley encephalitis virus) should be used. If desired, synonyms may be added parenthetically when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names may also be used.

Microbial strains, viruses, and plasmids should be given individual designations consisting of letters and serial numbers. It is generally advisable to include a worker's initials or a descriptive symbol of locale or laboratory, etc., in the designation. Each new strain, mutant, isolate, or derivative should be given a new (serial) designation. This designation should be distinct from those of the genotype and phenotype, and genotypic and phenotypic symbols should not be included.

Genetic Nomenclature

To facilitate accurate communication, **it is important that standard genetic nomenclature be used whenever possible and that deviations or proposals for new naming systems be endorsed by an appropriate authoritative body.** Review and/or publication of submitted manuscripts that contain new or nonstandard nomenclature may be delayed by the editor or the Journals Department so that they may be reviewed by the Genetics and Genomics Committee of the ASM Publications Board.

Before submission of manuscripts, authors may direct questions on genetic nomenclature to the committee's chairman: Maria Costanzo (maria@genome.stanford.edu). Such a consultation should be mentioned in the manuscript submission letter.

Eukaryotes. The nomenclature used for the genetics of lower eukaryotic microorganisms has not been as well formalized as that for bacteria and bacteriophages. Gen-

erally, authors should conform to current practices in identifying mutants and their genotypes. For organisms not mentioned below, it is advisable to consult the *Handbook of Microbiology*, 2nd ed. (A. I. Laskin and H. A. Lechevalier, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 1988) or the *Handbook of Genetics*, vol. 1, *Bacteria, Bacteriophages, and Fungi* (R. C. King, ed., Plenum Publishing Corp., New York, NY, 1974).

Gene names may begin with prefixes to indicate the genus and species from which the gene is derived only when needed for clarity when discussing genes with the same name from two different organisms (e.g., *ScURA3* versus *CaURA3*); the prefixes are not considered part of the gene name proper and are not italicized.

The genetic nomenclature of *Dictyostelium* is summarized in the *Trends in Genetics* "Genetic Nomenclature Guide" (p. S.5–S.6; Elsevier Science Ltd., Cambridge, United Kingdom, 1998; out of print). The most recent modifications can be found at <http://dictybase.org/>.

For *Saccharomyces cerevisiae*, a gene name should always be indicated in italics and, for the wild-type locus (or dominant alleles), capital letters (e.g., *URA3*). Loss-of-function (hypomorphic) or altered-function (neomorphic) alleles of the same locus should always be indicated in italics and lowercase letters (e.g., *ura3Δ*). The product of a gene (i.e., a protein) should be indicated in roman type with an initial capital letter (e.g., *Ura3*). There is generally no need to add the suffix "p" to the symbol for a protein; however, in rare instances where it may be deemed necessary to indicate unambiguously that the symbol refers to a protein, the "p" suffix may be added (e.g., *Ura3p*). For the most recent information on *S. cerevisiae* gene names, consult the *Saccharomyces* Genome Database (SGD) at <http://www.yeastgenome.org/>. Details on the format of *S. cerevisiae* locus and allele designations are provided in the SGD and are also described by Cherry (*Trends Genet.* **March**:11–12, 1995) (available for download as a PDF file at SGD, http://www.yeastgenome.org/sgdpub/Saccharomyces_cerevisiae.pdf). **Authors should use standard *S. cerevisiae* gene names, as listed in the SGD, in their submitted manuscripts and register new gene names with the SGD no later than the modification stage.**

The most recent information for *Neurospora crassa* can be found in *The Neurospora Compendium: Chromosomal Loci* (D. R. Perkins et al., Academic Press, San Diego, CA, 2001), and that for *Aspergillus* spp. can be found at <http://www.fgsc.net/nomenclature.htm>. The 1998 *Trends in Genetics* "Genetic Nomenclature Guide" (Elsevier Science Ltd., Cambridge, United Kingdom; out of print) contains nomenclature guidelines for several eukaryotic microbes: *Schizosaccharomyces pombe* (p. S.7–S.9), *Chlamydomonas reinhardtii* (p. S.18–S.19), *Neurospora crassa* (p. S.14–S.15), and *Aspergillus nidulans* (p. S.12–S.13). In addition, for *S. pombe*, the websites http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/SP_Name_FAQ.shtml and <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/plasmids.html> may be helpful, and for *C. reinhardtii*, use <http://www.chlamy.org/chlamydb.html>.

For *Trypanosoma* and *Leishmania*, consult the article by Clayton et al. (*Mol. Biochem. Parasitol.* **97**:221–224, 1998).

For the most recent information on *Candida albicans*, consult the *Candida* Genome Database (CGD) at <http://www.candidagenome.org>. Details on the format of *C. albicans* gene nomenclature are described at <http://www.candidagenome.org/Nomenclature.shtml>. **Authors should use standard *C. albicans* gene names, as listed in the CGD, in their submitted manuscripts and should register new gene names with the CGD no later than the modification stage.**

Prokaryotes. The genetic properties of prokaryotes are described in terms of phenotypes and genotypes. The phenotype describes the observable properties of an organism. The genotype refers to the genetic constitution of an organism, usually in reference to some standard wild type. Use the recommendations of Demerec et al. (*Genetics* **54**:61–76, 1966) as a guide to the use of these terms. If your manuscript contains genetic nomenclature, please refer to the Instructions to Authors in the January issue of the *Journal of Bacteriology*.

Viruses. In most cases, viruses have no phenotype, since they have no metabolism outside host cells. Therefore, distinctions between phenotype and genotype are not made. Superscripts are used to indicate hybrid genomes. Genetic symbols may be one, two, or three letters. For example, a mutant strain of lambda may be designated *cI857 int2 red114 Aam11*; this strain carries mutations in genes *cI*, *int*, and *red* and an amber-suppressible (*am*) mutation in gene *A*. Host DNA insertions into viruses should be delineated by square brackets, and the genetic symbols and designations for such inserted DNA should conform to those used for the host genome.

Conventions for naming genes. It is recommended that (entirely) new genes be given names that are mnemonics of their function, avoiding names that are already assigned and earlier or alternative gene names, irrespective of the organism for which such assignments have been made. Similarly, it is recommended that, whenever possible, orthologous genes present in different organisms receive the same name. When homology is not apparent or the function of a new gene has not been established, the GenBank locus tag may be used to designate the gene; it should not be italicized.

Locus tags. Locus tags are systematic, unique identifiers that are assigned to each gene in GenBank. All genes mentioned in a manuscript should be traceable to their sequences by the reader, and locus tags may be used for this purpose in manuscripts to identify uncharacterized genes. Authors should check GenBank to make sure that they are using the correct, up-to-date format for locus tags (e.g., uppercase versus lowercase letters and presence or absence of an underscore, etc.). Locus tag formats vary between different organisms and also may be updated for a given organism, so it is im-

portant to check GenBank at the time of manuscript preparation.

“Homology” versus “similarity.” For use of terms that describe relationships between genes, consult the articles by Theissen (*Nature* **415**:741, 2002) and Fitch (*Trends Genet.* **16**:227–231, 2000). “Homology” implies a relationship between genes that have a common evolutionary origin; partial homology is not recognized. When sequence comparisons are discussed, it is more appropriate to use the term “percent sequence similarity” or “percent sequence identity,” as appropriate.

“Mutant” versus “mutation.” Keep in mind the distinction between a mutation (an alteration of the primary sequence of the genetic material) and a mutant (a strain carrying one or more mutations). One may speak about the mapping of a mutation, but one cannot map a mutant. Likewise, a mutant has no genetic locus, only a phenotype.

Transposable elements, plasmids, and restriction enzymes. Nomenclature of transposable elements (insertion sequences, transposons, and phage Mu, etc.) should follow the recommendations of Campbell et al. (*Gene* **5**:197–206, 1979), with the modifications referred to in the Instructions to Authors in the *Journal of Bacteriology*.

The system of designating transposon insertions at sites where there are no known loci, e.g., *zef-123::Tn5*, has been described by Chumley et al. (*Genetics* **91**:639–655, 1979). Use the nomenclature recommendations of Novick et al. (*Bacteriol. Rev.* **40**:168–189, 1976) for plasmids and plasmid-specified activities, of Low (*Bacteriol. Rev.* **36**:587–607, 1972) for F' factors, and of Roberts et al. (*Nucleic Acids Res.* **31**:1805–1812, 2003) for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes. The nomenclature for recombinant DNA molecules constructed *in vitro* follows the nomenclature for insertions in general. DNA inserted into recombinant DNA molecules should be described by using the gene symbols and conventions for the organism from which the DNA was obtained.

ABBREVIATIONS AND CONVENTIONS

Verb Tense

ASM strongly recommends that for clarity you use the **past** tense to narrate particular events in the past, including the procedures, observations, and data of the study that you are reporting. Use the present tense for your own general conclusions, the conclusions of previous researchers, and generally accepted facts. Thus, most of the abstract, Materials and Methods, and Results will be in the past tense, and most of the introduction and some of the Discussion will be in the present tense.

Be aware that it may be necessary to vary the tense in

a single sentence. For example, it is correct to say “White (30) demonstrated that XYZ cells *grow* at pH 6.8,” “Figure 2 shows that ABC cells failed to grow at room temperature,” and “Air *was* removed from the chamber and the mice *died*, which *proves* that mice *require* air.” In reporting statistics and calculations, it is correct to say “The values for the ABC cells *are* statistically significant, indicating that the drug *inhibited* . . .”

For an in-depth discussion of tense in scientific writing, see p. 191–193 in *How To Write and Publish a Scientific Paper*, 6th ed.

Abbreviations

General. Abbreviations should be used as an aid to the reader, rather than as a convenience for the author, and therefore their **use should be limited**. Abbreviations other than those recommended by the IUPAC-IUB (*Biochemical Nomenclature and Related Documents*, 1992) should be used only when a case can be made for necessity, such as in tables and figures.

It is often possible to use pronouns or to paraphrase a long word after its first use (e.g., “the drug” or “the substrate”). Standard chemical symbols and trivial names or their symbols (folate, Ala, and Leu, etc.) may also be used.

Define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., “cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM).” Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

Not requiring introduction. In addition to abbreviations for Système International d'Unités (SI) units of measurement, other common units (e.g., bp, kb, and Da), and chemical symbols for the elements, the following should be used without definition in the title, abstract, text, figure legends, and tables: DNA (deoxyribonucleic acid); cDNA (complementary DNA); RNA (ribonucleic acid); cRNA (complementary RNA); RNase (ribonuclease); DNase (deoxyribonuclease); rRNA (ribosomal RNA); mRNA (messenger RNA); tRNA (transfer RNA); AMP, ADP, ATP, dAMP, ddATP, and GTP, etc. (for the respective 5' phosphates of adenosine and other nucleosides) (add 2', 3', or 5'-when needed for contrast); ATPase and dGTPase, etc. (adenosine triphosphatase and deoxyguanosine triphosphatase, etc.); NAD (nicotinamide adenine dinucleotide); NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide, oxidized); NADH (nicotinamide adenine dinucleotide, reduced); NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate); NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced); NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, oxidized); poly(A) and poly(dT), etc. (polyadenylic acid and polydeoxythymidylic acid, etc.); oligo(dT), etc. (oligodeoxythymidylic acid, etc.); UV (ultraviolet); PFU (plaque-forming units); CFU (colony-forming units); MIC (minimal inhibitory concentration); Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane]; DEAE (diethylaminoethyl); EDTA (ethyl-

enediaminetetraacetic acid); EGTA [ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid]; HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid); PCR (polymerase chain reaction); and AIDS (acquired immunodeficiency syndrome). Abbreviations for cell lines (e.g., HeLa) also need not be defined.

The following abbreviations should be used without definition in tables:

amt (amount)	SE (standard error)
approx (approximately)	SEM (standard error of the mean)
avg (average)	
concn (concentration)	sp act (specific activity)
diam (diameter)	sp gr (specific gravity)
exptl (experimental)	temp (temperature)
expt (experiment)	tr (trace)
ht (height)	vol (volume)
mo (month)	vs (versus)
mol wt (molecular weight)	wk (week)
no. (number)	wt (weight)
prepn (preparation)	yr (year)
SD (standard deviation)	

Reporting Numerical Data

Standard metric units are used for reporting length, weight, and volume. For these units and for molarity, use the prefixes m, μ , n, and p for 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , and 10^{-12} , respectively. Likewise, use the prefix k for 10^3 . Avoid compound prefixes such as m μ or $\mu\mu$. Use $\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$ in place of the ambiguous ppm. Units of temperature are presented as follows: 37°C or 324 K.

When fractions are used to express units such as enzymatic activities, it is preferable to use whole units, such as “g” or “min,” in the denominator instead of fractional or multiple units, such as μg or 10 min. For example, “pmol/min” is preferable to “nmol/10 min,” and “ $\mu\text{mol/g}$ ” is preferable to “nmol/ μg .” It is also preferable that an unambig-

uous form such as exponential notation be used; for example, “ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ” is preferable to “ $\mu\text{mol/g/min}$.” Always report numerical data in the appropriate SI units.

For a review of some common errors associated with statistical analyses and reports, plus guidelines on how to avoid them, see the article by Olsen (Infect. Immun. **71**:6689–6692, 2003).

For a review of basic statistical considerations for virology experiments, see the article by Richardson and Overbaugh (J. Virol. **79**:669–676, 2005).

Isotopically Labeled Compounds

For simple molecules, isotopic labeling is indicated in the chemical formula (e.g., $^{14}\text{CO}_2$, $^3\text{H}_2\text{O}$, and $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$). Brackets are not used when the isotopic symbol is attached to the name of a compound that in its natural state does not contain the element (e.g., ^{32}S -ATP) or to a word which is not a specific chemical name (e.g., ^{131}I -labeled protein, ^{14}C -amino acids, and ^3H -ligands).

For specific chemicals, the symbol for the isotope introduced is placed in square brackets directly preceding the part of the name that describes the labeled entity. Note that configuration symbols and modifiers precede the isotopic symbol. The following examples illustrate correct usage:

^{14}C urea	UDP- $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucose
L- $[\text{methyl-}^{14}\text{C}]$ methionine	<i>E. coli</i> $[\text{P-}^{32}\text{P}]$ DNA
$[2,3\text{-}^3\text{H}]$ serine	fructose 1,6- $[1\text{-}^{32}\text{P}]$ bisphosphate
$[\alpha\text{-}^{14}\text{C}]$ lysine	
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP	

EC follows the same conventions for isotopic labeling as the *Journal of Biological Chemistry*, and more-detailed information can be found in the instructions to authors of that journal (first issue of each year).