

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

TESE DE DOUTORADO

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE DOIS HOMÓLOGOS DO
FATOR eIF4G NA INICIAÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA DE
*Trypanosoma brucei***

DANIELLE MARIA NASCIMENTO MOURA

RECIFE

2011

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

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

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE DOIS HOMÓLOGOS DO
FATOR eIF4G NA INICIAÇÃO DA SÍNTESE PROTEICA DE
*Trypanosoma brucei***

DANIELLE MARIA NASCIMENTO MOURA

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

Orientador: Dr. Osvaldo
Pompílio de Melo Neto

**RECIFE
2011**



Serviço Público Federal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária
50.732-970, Recife – PE.
Fone/Fax: (81) 21268522

Ata da 15ª sessão de Defesa Pública de Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, realizada no dia 16 de agosto de 2011 pela Danielle Maria Nascimento Moura.

Às quatorze horas do dia 16 de agosto de 2011, na Sala 1 do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, foi efetuada em ato público a Defesa de Tese de Doutorado intitulada “Análise da Participação de dois Homólogos do Fator Eif4g na Iniciação da Síntese Protéica de *Trypanosoma brucei*.”, desenvolvida pela aluna **Danielle Maria Nascimento Moura**. Inicialmente o **Dr. Tercílio Calsa Junior**, vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, abriu a sessão e informou que a Banca Examinadora desta defesa de Tese de Doutorado seria composta pelos seguintes membros: **Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres** (Departamento de Entomologia – CPqAM/ FIOCRUZ - PE), **Dra. Fabíola Barbieri Holetz** (IBMP – ICC/ FIOCRUZ - PR), **Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza** (Departamento de Genética da UFRPE), **Dr. Ederson Akio Kido** (Departamento de Genética da UFPE), **Dra. Maria Raquel Moura Coimbra** (Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE). Logo após, o vice-coordenador **Tercílio Calsa Junior** entregou a presidência dos trabalhos para o orientador **Osvaldo Pompílio de Melo Neto**, que convidou a candidata a apresentar seu trabalho em cerca de 50 minutos. Após a apresentação, o presidente dos trabalhos convidou os membros da Banca Examinadora para comporem a mesa e iniciou a sessão de arguição na seguinte ordem: **Constância Flávia Junqueira Ayres** (membro externo), **Fabíola Barbieri Holetz** (membro externo), **Paulo Roberto Eleutério de Souza** (membro externo), **Ederson Akio Kido** (membro interno) e **Maria Raquel Moura Coimbra** (membro interno). Finalizadas as arguições, todas em forma de diálogo e tendo, a aluna, respondido a todas as questões formuladas, a Banca Examinadora deliberou em sessão secreta, tendo atribuído à doutoranda a menção final “Aprovada” por unanimidade. O resultado foi apresentado pelo presidente dos trabalhos **Osvaldo Pompílio de Melo Neto** que anunciou que a aluna **Danielle Maria Nascimento Moura** faz jus doravante ao título de **DOUTORA EM GENÉTICA** pela Universidade Federal de Pernambuco. A sessão foi encerrada às 17h30min e, para constar, eu, **Tercílio Calsa Junior**, lavrei e assinei a presente ata, assinada também pelo orientador e pelos membros da Banca Examinadora. Recife, 16 de agosto de 2011.

Banca Examinadora:

Dra. Constância Flávia Junqueira Ayres

Dra. Fabíola Barbieri Holetz

Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Dr. Ederson Akio Kido

Dra. Maria Raquel Moura Coimbra



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Coordenador
SIAPE 3226717
CPF: 592.367.284-72
UFPE Programa de Pós-Graduação em Genética

Orientador:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Vice-coordenador do Programa:

Dr. Tercílio Calsa Junior

Secretário do Programa:

Dr. Tercílio Calsa Junior

 UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Coordenador
SIAPE 3226717
CPF: 592.367.284-72
UFPE Programa de Pós-Graduação em Genética

À memória de Rosendo Lino de Souza, meu avô.
Aos meus queridos pais, avó e irmã.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, pela confiança e por toda a orientação.

Ao Dr. Mark Carrington, Dr^a. Nancy Standart e os demais integrantes do MClab da Universidade de Cambridge – Jack Sunter, Susanne Kramer, Angela Schwede, Bridget Chukualim, Elizabeth Boulden, Jenny Reed, Sandra Moya e Olga Tkachenko - que me proporcionaram uma grande oportunidade de crescimento profissional.

Aos que me ajudaram durante a estada em Cambridge: Marcos Barbosa, Reinaldo Amaral, Chris Boone e Nathalie Palmer.

Aos integrantes do Departamento de Microbiologia e demais departamentos do CPqAM – funcionários e estagiários - por toda colaboração e apoio.

Às instituições CPqAM/FIOCRUZ, UFPE, CAPES, FACEPE e CNPq, pelo suporte financeiro e acadêmico.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

E agradeço especialmente à minha família, pelo apoio incondicional e pelo incentivo durante todos esses anos e aos amigos de hoje e sempre, pelo companheirismo.

Se o desafio era grande, as motivações e incentivos eram maiores ainda...

“My strength lies solely in my tenacity”.

Louis Pasteur

RESUMO

Os tripanossomatídeos são protozoários parasitas que incluem patógenos humanos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* e que apresentam como característica marcante a presença de mecanismos moleculares diferenciados, como a regulação da expressão gênica basicamente pós-transcricional. Nestes organismos a tradução pode desempenhar um papel importante para esta regulação, principalmente durante a etapa de iniciação, quando ocorrem interações controladas por fatores protéicos que permitem o recrutamento do ribossomo para a ligação aos mRNAs a serem traduzidos. De fato, indícios obtidos até o momento sugerem que a iniciação da síntese proteica nestes parasitas pode incluir processos diferenciados daqueles observados em outros organismos. Nos eucariotos em geral, o complexo de iniciação da tradução eIF4F desempenha várias funções relacionadas ao recrutamento do ribossomo ao mRNA e é formado por um componente central – o fator eIF4G, além de seus parceiros eIF4E e eIF4A. Em *L. major*, cinco homólogos do fator eIF4G foram identificados (*LmEIF4G1-5*), todos conservados em *T. brucei* (*TbEIF4G1-5*). Em trabalhos anteriores, dois destes homólogos (*LmEIF4G3* e *LmEIF4G4*) apresentaram propriedades compatíveis com uma atuação na tradução. Neste trabalho, seus ortólogos de *T. brucei*, *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, foram selecionados com o intuito de continuar a sua caracterização funcional utilizando agora técnicas *in vivo*. Em um primeiro momento, reações de imunofluorescência confirmaram a localização citoplasmática das duas proteínas. Em seguida, em ensaios de depleção por RNAi, ambas se mostraram essenciais à viabilidade do parasita, embora apenas no caso do *TbEIF4G3* tenha se observado uma diminuição significativa da tradução imediatamente após sua depleção. Ensaio de imunoprecipitação confirmaram interações específicas com homólogos do eIF4E (*TbEIF4G3* com *TbEIF4E4* e *TbEIF4G4* com *TbEIF4E3*) e ainda a interação entre *TbEIF4G3* e um homólogo da proteína de ligação à cauda poli-A (*TbPABP1*). Para ambos os homólogos, células procíclicas expressando proteínas com mutações em motivos putativos de ligação ao eIF4E apresentaram pequena redução no crescimento. Já em relação ao motivo de ligação ao eIF4A, modificações em sua sequência no *TbEIF4G3* levaram a uma forte redução no crescimento de células em cultura, mas nenhum efeito foi observado em mutações equivalentes no *TbEIF4G4*. Para investigar mais diretamente o papel destas proteínas na tradução, ensaios com mRNAs-repórteres foram desenvolvidos, mas os dados preliminares não se mostraram úteis na identificação da função individual das proteínas avaliadas. Entretanto, vários vetores de transfecção e uma nova linhagem celular com expressão constitutiva da enzima-repórter luciferase foram obtidos e poderão ser usados na otimização dos ensaios e investigação da atuação dos homólogos selecionados em trabalhos futuros. Em resumo, os resultados confirmam a existência de dois complexos eIF4F distintos, mediados por motivos de interação eIF4G/eIF4E diferenciados, e ressaltam o papel crítico do *TbEIF4G3* na manutenção da viabilidade e da síntese proteica em *T. brucei*.

Palavras-chave: tradução, eIF4G, tripanossomatídeos.

ABSTRACT

The trypanosomatids are parasitic protozoan which include human pathogens belonging to the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* and are characterized by unique molecular mechanisms such as regulation of their gene expression, achieved mainly at the post-transcriptional level. In these organisms, translation of mRNAs into proteins may play a major role in this regulation, mainly during its initiation stage, when interactions mediated by protein factors are crucial for the recruitment of ribosomes to the mRNAs. In fact, the data obtained so far suggests that translation initiation in these parasites must include differentiated processes compared to those observed in other organisms. In eukaryotes, the protein eIF4G acts as a central component of the eIF4F complex, interacting with its partners, eIF4E and eIF4A, and performs many functions in translation initiation related to ribosome recruitment to the mRNA. In *L. major*, five eIF4G homologues have been identified (*LmEIF4G1-5*), all conserved in *T. brucei* (*TbEIF4G1-5*). Previously, two of these proteins (*LmEIF4G3* and *LmEIF4G4*) displayed properties compatible with a role in translation. Here, their orthologues from *T. brucei*, *TbEIF4G3* and *TbEIF4G4*, were selected with the aim of continuing their functional characterization, now using *in vivo* techniques. First, immunofluorescence assays were carried out and confirmed the cytoplasmic localization of both proteins. Subsequently, protein depletion through RNAi was performed and the two proteins were seen to be required for cellular viability, although only for *TbEIF4G3* the depletion led to an abrupt and major halt in translation. Immunoprecipitation assays confirmed specific interactions with eIF4E homologues (*TbEIF4G3* with *TbEIF4E4* and *TbEIF4G4* with *TbEIF4E3*) and also an interaction between *TbEIF4G3* and a homologue of the poly-A binding protein (*TbPAPB1*). For both homologues, procyclic cells expressing proteins with mutations in putative motifs for the eIF4G/eIF4E interactions showed minor growth impairment. In contrast, regarding an eIF4A interacting motif, modifications in its sequence in *TbEIF4G3* led to an important decrease in cell growth of cultures expressing the mutant protein, but no effect was observed upon expression of an equivalent mutant *TbEIF4G4*. To access the role of these proteins in translation in a direct manner, assays using reporter mRNAs were performed, but in preliminary experiments those were not useful to identify individual functions for the selected proteins. However several transfection vectors and a new cell line with constitutive expression of reporter luciferase were generated and they can be used to optimize the assays and to investigate the role of the selected homologues in future studies. To sum up, our findings corroborate the existence of at least two different eIF4F-like complexes, mediated by distinct binding sites for the eIF4G/eIF4E interactions, and reinforce the role of *TbEIF4G3* in maintaining viability and protein synthesis in *T. brucei*.

Key words: translation, eIF4G, trypanosomatids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida dos tripanossomatídeos <i>Trypanosoma cruzi</i> , <i>Leishmania sp.</i> e <i>Trypanosoma brucei</i>	14
Figura 2. Formas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i> visualizadas por microscopia eletrônica de varredura	16
Figura 3. Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos	20
Figura 4. Esquema do eIF4GI humano, proteína protótipo da família eIF4G, e seus principais sítios de ligação a outras proteínas	25
Figura 5. Motivos presentes no eIF4GI, eIF4GII e em outras proteínas da família eIF4G	29
Figura 6. Representação das vias de controle pós-transcricional da expressão gênica nos tripanossomatídeos	32
Figura 7. Esquema dos homólogos ao eIF4G de <i>Trypanosoma brucei</i> e seus principais domínios	36
Figura 8. Alinhamento múltiplo comparando as sequências dos homólogos <i>TbEIF4G3</i> e <i>TbEIF4G4</i> com seus ortólogos de <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania major</i>	38
Figura 9. Esquema representativo do ensaio de ancoramento (<i>tethering</i>) para a proteína eIF4G de humanos.....	43
Figura 10. Esquema representando a obtenção das sequências sintéticas boxB e NpepTY	47
Figura 11. Esquema das modificações realizadas no vetor p3927 para a obtenção da série de plasmídeos efetores pD	49
Figura 12. Esquema das modificações realizadas nos vetores da série pLew usados para a obtenção das linhagens de <i>Trypanosoma brucei</i> com expressão constitutiva de luciferase.....	51
Figura 13. Esquema das modificações realizadas no vetor p3605 para a obtenção da série de plasmídeos repórteres para expressão do mRNA bicistrônico.....	52
Figura 14. Localização subcelular das proteínas <i>TbEIF4G3</i> e <i>TbEIF4G4</i> de <i>Trypanosoma brucei</i> , por imunofluorescência	61
Figura 15. Perfil de crescimento e marcação metabólica de células de <i>Trypanosoma brucei</i> após indução de RNAi dos homólogos <i>TbEIF4G3</i> e <i>TbEIF4G4</i>	63
Figura 16. Expressão das proteínas HA- <i>TbEIF4G3</i> e HA- <i>TbEIF4G4</i> em <i>Trypanosoma brucei</i>	65
Figura 17. Avaliação da interação entre as proteínas homólogas eIF4G e eIF4E de <i>Trypanosoma brucei</i>	66

Figura 18. Avaliação da interação entre as proteínas homólogas eIF4G e PABP de <i>Trypanosoma brucei</i>	67
Figura 19. Identificação dos possíveis motivos envolvidos nas interações eIF4G/eIF4E e eIF4G/eIF4A em <i>Trypanosoma brucei</i>	68
Figura 20. Efeito da expressão de mutantes do TbEIF4G3 no crescimento de <i>Trypanosoma brucei</i>	70
Figura 21. Efeito da expressão de mutantes do TbEIF4G4 no crescimento de <i>Trypanosoma brucei</i>	71
Figura 22. Efeito da expressão de mutantes de homólogos do eIF4G no perfil de interação com as demais subunidades do complexo eIF4F de <i>Trypanosoma brucei</i>	72
Figura 23. Clonagem do gene de resistência à puromicina (PAC).....	74
Figura 24. Linhagens de <i>Trypanosoma brucei</i> com expressão constitutiva de luciferase.....	76
Figura 25. Sequências codificadoras para o NpepTY e sequência boxB.....	78
Figura 26. Plasmídeos efetores	79
Figura 27. Repórter traducional bicistrônico	80
Figura 28. Análise da expressão do mRNA repórter bicistrônico	81
Figura 29. Análise da integridade do mRNA bicistrônico por <i>Northern blot</i>	81
Figura 30. Análise da expressão das proteínas efetoras por <i>Western blot</i>	82
Figura 31. Análise das proteínas fluorescentes por citometria de fluxo	83
Figura 32. Sequência intergênica boxB otimizada	84
Figura 33. Análise das diferentes linhagens de <i>Trypanosoma brucei</i> expressando o mRNA-repórter bicistrônico	84
Figura 34. Análise da expressão das proteínas efetoras.....	85
Figura 35. Análise das proteínas fluorescentes por citometria de fluxo	86
Figura 36. Interação λ N-(1-22)/boxB	88
Figura 37. Localização subcelular dos homólogos TbEIF4E1 a 4.....	90
Figura 38. Marcação metabólica dos homólogos da PABP de <i>Trypanosoma brucei</i> após indução de RNAi	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos utilizados na obtenção das sequências sintéticas boxB e do peptídeo λ N-(1-22) em fusão à etiqueta TY (NpepTY)	48
Tabela 2. Relação dos plasmídeos efetores utilizados no ensaio de ancoramento	50
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de mutagênese sítio-dirigida	54
Tabela 4. Valores de incorporação de metionina radioativa na marcação metabólica	64
Tabela 5. Lista de vetores produzidos e/ou modificados ao longo do trabalho, juntamente com a descrição das suas principais características	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Aminoácidos

ATP – Adenosina Trifosfato

AREs – Regiões ricas em repetições dos nucleotídeos AU (*AU-rich elements*)

AUG – Códon de iniciação da tradução

BLAST – Ferramenta de comparação de sequências por alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA – Albumina sérica bovina

BSF – Forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* (*bloodstream form*)

EJC – Complexo de Junção entre Éxons (*Exon Junction Complex*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

ECL– Detecção por quimioluminescência (*Enhanced Chemiluminescence*)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

eIF – Fator de iniciação da tradução eucariótico (*Eukaryotic Initiation factor*)

FLAG – Peptídeo sintético apresentando sequência de aminoácidos DYKDDDDK

GTP – Guanosina Trifosfato

HA - Peptídeo YPYDVPDYA, correspondente aos aminoácidos 98-106 da hemaglutinina do vírus Influenza A

kDa – kiloDalton

LB – Meio Luria Bertani

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

Met - Metionina

MAP– Proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*)

Mnk1 - Proteína quinase de integração de sinal das MAP quinases (*MAP-kinase signal integrating kinases*)

ORF – Quadro aberto de leitura (*Open Reading Frame*)

PABC – Domínio C-terminal da PABP (*PABP C-terminal Domain*)

PABP – Proteína de ligação à cauda poli-A (*Poly-A binding protein*)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCF – Forma procíclica de *Trypanosoma brucei* (*procyclic form*)

PCR – Reação em Cadeia da Ppolimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

RNApol – RNA polimerase

RNase – Ribonuclease

RRMs – Motivos de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif*)

SDM-79 – meio de cultura de tripanossomas

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)

SL – Sequência *spliced leader* ou mini-éxon

SOC – meio de cultura para recuperação de bactérias *E. coli*

SSC – Tampão salino de citrato-de sódio

tag – Etiqueta de purificação

TBS - Solução salina tamponada com tris (*Tris Buffered Saline*)

TE – Tampão Tris-EDTA

TriTryps – designação dada ao grupo de espécies *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, representantes dos tripanossomatídeos, após a conclusão do sequenciamento de seus genomas.

tRNA – Ácido ribonucleico transportador

TY – Peptídeo EVHTNQDPLD do elemento Ty1 de *Sacharomyces cerevisiae*

UTR – Região não traduzida (*Untranslated Region*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

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

ZPFM – Tampão para transfecção (*Zimmerman post-fusion medium*)

AMINOÁCIDOS				
A Alanina	G Glicina	M Metionina	S Serina	
C Cisteína	H Histidina	N Asparagina	T Treonina	
D Ac. aspártico	I Isoleucina	P Prolina	V Valina	
E Ac. glutâmico	K Lisina	Q Glutamina	W Triptofano	
F Fenilalanina	L Leucina	R Arginina	Y Tirosina	

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Tripanossomatídeos e suas enfermidades	13
2.1.1 <i>Leishmania sp.</i> e as leishmanioses.....	14
2.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	15
2.1.3 <i>Trypanosoma brucei</i> e a doença do sono	16
2.2 Características da biologia celular dos tripanossomatídeos	17
2.3 Iniciação da tradução em eucariotos: mecanismos e atuação na regulação da expressão gênica.....	18
2.3.1 O complexo eIF4F de iniciação da tradução e PABP.....	20
2.3.1.1 A proteína de ligação à cauda poliA (PABP).....	21
2.3.1.2 Subunidade eIF4E.....	22
2.3.1.3 Subunidade eIF4A.....	23
2.3.1.4 Subunidade eIF4G	24
2.3.2 eIF4G: domínios e funções	24
2.3.3 Família eIF4G	28
2.4 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos	30
2.5 Complexo eIF4F e PABP em tripanossomatídeos	32
2.5.1 PABPs.....	33
2.5.2 EIF4As	34
2.5.3 EIF4Es.....	35
2.5.4 EIF4Gs.....	36
2.6 <i>Trypanosoma brucei</i> como modelo experimental para estudos de genética reversa.....	39
2.6.1 Repórteres traductionais para avaliação da função de homólogos de fatores de iniciação da tradução em <i>T. brucei</i>	41

2.6.1.1 Repórter traducional monocistrônico	41
2.6.1.2 Repórter traducional bicistrônico (baseado na técnica de <i>tethering</i>)	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Construção dos plasmídeos	45
4.1.1 Subclonagens dos genes <i>TbEIF4G3</i> e <i>TbEIF4G4</i>	45
4.1.2 PCR e clonagem dos genes <i>PAC</i> , <i>eGFP</i> , <i>sTomato</i> , <i>luciferase</i> e da região intergênica da proteína paraflagelar de <i>T. brucei</i> (PFR).....	45
4.1.3 Obtenção de sequências nucleotídicas sintéticas	46
4.1.4 Construção dos plasmídeos efetores.....	49
4.1.5 Construção do plasmídeo-repórter codificando um mRNA monocistrônico	50
4.1.6 Construção do plasmídeo-repórter codificando um mRNA bicistrônico	51
4.2 Mutagênese sítio-dirigida	53
4.3 Cultivo e transfecção de células de <i>T. brucei</i>	53
4.4 Extração de RNA.....	55
4.5 RT-PCR.....	55
4.6 <i>Northern blot</i>	56
4.7 Citometria de fluxo	56
4.8 Imunofluorescência	56
4.9 Interferência de RNA e superexpressão dos homólogos <i>TbEIF4G3</i> e 4	57
4.10 Obtenção de lisados celulares.....	57
4.11 Marcação metabólica com S^{35}	58
4.12 Imunoprecipitação	58

4.13 Western blot	59
4.14 Dosagem de luciferase	59
5. RESULTADOS	60
5.1 Localização subcelular	61
5.2 Análise do perfil de síntese proteica em células de <i>T. brucei</i> submetidas a depleção dos homólogos de eIF4G	62
5.3 Análise da formação de complexos proteicos <i>in vivo</i> entre homólogos do eIF4G e outras proteínas.....	64
5.3.1 Interações EIF4G/EIG4E e EIF4G/EIF4A	65
5.3.2 Interações EIF4G/PABPs	67
5.4 Efeito da expressão de <i>TbEIF4Gs</i> mutantes no crescimento de <i>T. brucei</i>	67
5.5 Perfil de interação das proteínas mutantes com os homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F	72
5.6 Repórter traducional monocistrônico	73
5.6.1 Remoção do(s) operador(es) de tetraciclina (TetO) da região promotora para a expressão do gene da luciferase	73
5.6.2 Alteração de sítios internos de <i>NcoI</i> e <i>StuI</i> nos vetores <i>pLew20ΔtetO</i> e <i>pLew82ΔtetO</i>	74
5.6.3 Alteração da marca de resistência.....	74
5.6.4 Análise das linhagens obtidas	75
5.7 Repórter traducional bicistrônico	77
5.7.1 Obtenção das sequências sintéticas do peptídeo λN-(1-22) e boxB	77
5.7.2 Construção dos plasmídeos efetores.....	79
5.7.3 Construção de um vetor para produção de mRNAs bicistrônicos (plasmídeo repórter)	80
5.7.4 Ensaio de ancoramento e análise de expressão das proteínas fluorescentes por citometria de fluxo	82
5.7.5 Otimização das condições do ensaio de ancoramento	83

5.7.6 Confirmação da interação λ N-(1-22)/boxB	87
5.8 Resultados complementares	89
5.8.1 Localização subcelular dos <i>Tb</i> EIF4Es por imunofluorescência.....	89
5.8.2 RNAi das <i>Tb</i> PABPs e análise do perfil de síntese proteica por marcação metabólica.....	90
6. DISCUSSÃO	92
7. CONCLUSÕES	99
8. REFERÊNCIAS	100
9. ANEXOS	115
Anexo A	116
Anexo B	118
Anexo C	130

1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos, representados principalmente pelos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, são parasitas flagelados reconhecidos não apenas pelo impacto mundial das doenças que causam, mas também por apresentarem características biológicas e moleculares importantes, que os distinguem dos demais eucariotos. Nestes organismos, a formação dos mRNAs maduros ocorre através de um processamento diferenciado denominado *trans-splicing* e o controle da expressão gênica é quase que exclusivamente pós-transcricional, ocorrendo através do controle da estabilidade dos mRNAs e por eventos regulatórios que atuam durante a biossíntese proteica, também conhecida por tradução. Este é o processo pelo qual a informação contida na molécula de RNA é utilizada para a síntese de proteínas e pode ser dividido em iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A iniciação da tradução é a etapa mais complexa e o principal alvo de mecanismos de regulação, pois é nesse momento que ocorre o reconhecimento dos mRNAs a serem traduzidos pelo ribossomo, sendo um evento altamente controlado e regido por dezenas de fatores de iniciação da tradução (eIFs – *eukaryotic initiation factors*). A iniciação da tradução é bem caracterizada em leveduras, plantas e vertebrados, onde esse processo tem início com a formação e ligação do complexo heterotrimérico eIF4F (formado pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G) ao *cap* presente na região 5' do mRNA, direcionando-o para o ribossomo. Neste processo, a subunidade eIF4G atua como uma proteína organizadora do complexo, pois, devido a vários sítios de ligação presentes em sua estrutura, ela é responsável por interagir com as demais subunidades do complexo eIF4F, bem como com outros fatores de iniciação e com o próprio mRNA.

Trabalhos envolvendo a etapa de iniciação da tradução e seus mecanismos de controle em tripanossomatídeos têm mostrado que esse processo apresenta diferenças importantes em relação ao que já foi observado em outros eucariotos. Múltiplos homólogos a fatores de iniciação da tradução foram identificados nestes parasitas, mas ainda não foi possível elucidar a função específica de todos eles. Dentre os cinco homólogos do eIF4G identificados nas espécies *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* (TriTryps), dois deles (EIF4G3 e EIF4G4) destacam-se por apresentar capacidade de ligação tanto *in vitro* quanto *in vivo* aos homólogos das subunidades eIF4A e eIF4E e por apresentar

homologia de sequência entre si, além de apresentarem o domínio central típico dos eIF4Gs. A falta de ensaios específicos que permitam confirmar sua real função constitui, entretanto, o principal entrave para sua caracterização. Este trabalho teve como objetivo principal a utilização de ferramentas já estabelecidas de manipulação genética de *T. brucei* voltadas à identificação de diferentes propriedades funcionais destas duas proteínas, assim como o desenvolvimento de novos ensaios *in vivo* com o foco na avaliação direta da sua atuação na biossíntese proteica dos tripanossomatídeos. Estas abordagens incluíram ensaios de caracterização proteica mais gerais, tais como localização subcelular por imunofluorescência, identificação da formação de complexos proteicos por imunoprecipitação, avaliação do fenótipo de células expressando proteínas mutantes, bem como ensaios mais específicos para avaliação do papel direto destes homólogos na biossíntese proteica dos tripanossomatídeos, através da utilização de mRNAs-repórteres. Os dados obtidos, além de confirmar propriedades já sugeridas pelas abordagens prévias *in vitro*, reafirmam a importância de ambas as proteínas para a viabilidade celular e destacam o papel do EIF4G3 na síntese proteica. Já os novos ensaios desenvolvidos com mRNAs-repórteres mostraram que estes precisam ser otimizados para que possam ser usados de forma eficiente na avaliação funcional destas e outras proteínas nas etapas iniciais da tradução nos tripanossomatídeos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tripanossomatídeos e suas enfermidades

A família Trypanosomatidae é formada por nove gêneros de parasitas obrigatórios, com destaque para os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (SIMPSON *et al.*, 2006). Estes protozoários apresentam uma organização genômica, estruturas celulares e processos biológicos semelhantes. Contudo, destacam-se por apresentarem mudanças morfológicas significantes durante seu ciclo de vida, visto que habitam dois nichos biológicos diferentes e são transmitidos aos humanos por diferentes insetos vetores. As principais doenças humanas causadas por estes protozoários são as diversas formas de leishmaniose, a tripanossomíase americana (doença de Chagas) e a tripanossomíase africana (doença do sono), causadas pelas várias espécies do gênero *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente (STUART *et al.*, 2008). As enfermidades causadas pelos tripanossomatídeos têm sido classificadas como doenças tropicais negligenciadas, não existem vacinas efetivas e os tratamentos quimioterápicos disponíveis são deficientes devido à toxicidade e à resistência gerada às drogas utilizadas atualmente (WHO, 2011a).

Apesar dos diferentes tripanossomatídeos causadores de enfermidades humanas apresentarem características comuns, incluindo a presença de estruturas subcelulares como o cinetoplasto e os glicossomos, cada espécie (ou grupo de espécies próximas) possui insetos vetores diferentes e apresentam particularidades ao longo de seu ciclo de vida (Figura 1). Possuem ainda sítios-alvo diferentes e patogênese distinta nos hospedeiros vertebrados (EL-SAYED *et al.*, 2005a).

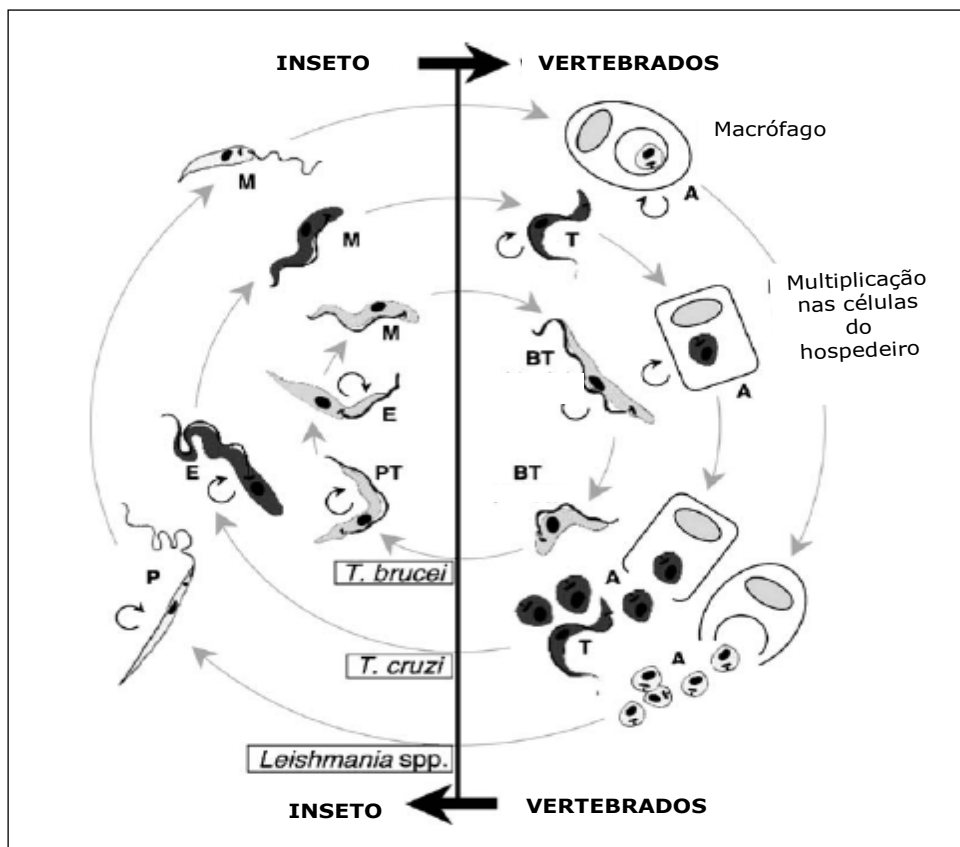


Figura 1. Ciclo de vida dos tripanossomatídeos *Leishmania* sp., *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. A ilustração mostra a presença de diferentes formas celulares durante a transição entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado. A, amastigota; BT, tripomastigota sanguíneo; E, epimastigota; M, tripomastigota metacíclico; P, promastigota; PT, tripomastigota procíclico; T, tripomastigota. Modificado a partir de Bringauid *et al.* (2006).

2.1.1 *Leishmania* sp. e as leishmanioses

O gênero *Leishmania* é representado por mais de 20 espécies que são transmitidas ao homem pela picada de aproximadamente 30 espécies de vetores (CHAPPUIS *et al.*, 2007), que são compostos por fêmeas de insetos dípteros hematófagos do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e pelo gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (SANTOS *et al.*, 2008). Estes protozoários são os agentes etiológicos das doenças conhecidas como leishmanioses, um grave problema de saúde pública. De maneira geral, as leishmanioses podem ser divididas em dois grandes grupos: Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Visceral (LV). A LC representa a maioria dos casos de leishmaniose registrados, geralmente não é fatal, limita-se à pele e pode evoluir para a cura espontânea. Concomitantemente com a LC pode se estabelecer

uma forma mais severa de leishmaniose que atinge também as mucosas, sendo denominada assim de Leishmaniose Mucosa Cutânea (LMC). A LMC é caracterizada por lesões não cicatrizantes que podem deformar os indivíduos infectados, é potencialmente fatal, e tem como principal agente etiológico a *L. braziliensis*. A LV é uma doença sistêmica crônica caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, astenia, fraqueza e, se não for tratada, leva à morte dos indivíduos parasitados (REITHINGER *et al.*, 2007). Um dos principais agentes etiológicos da LV é a *L. infantum/chagasi*. A incidência anual das leishmanioses é de 1,5 a 2 milhões de casos, sendo registradas mais de 51.000 mortes por ano. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco, com uma prevalência atual estimada em torno de 12 milhões de casos (REITHINGER *et al.*, 2007; REITHINGER, 2008). As leishmanioses são encontradas em 88 países, sendo 90% dos casos de LC notificados no Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Brasil e 90% dos casos de LV estão distribuídos em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2011b).

2.1.2 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

Do ponto de vista médico, o gênero *Trypanosoma* pode ser representado pelas espécies *T. cruzi* e *T. brucei*, responsáveis, respectivamente, por duas parasitoses de grande impacto para saúde humana: a doença de Chagas (Tripanossomíase Americana) e a doença do sono (Tripanossomíase Africana). O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, que afeta 18 países (distribuídos pela América do Sul, América Central e México) e é responsável por uma prevalência de infecção de aproximadamente 11 milhões de pessoas, com uma média de 700 mil novos casos e 14.000 mortes anuais (STUART *et al.*, 2008). A doença de Chagas, de acordo com as manifestações clínicas, pode ser classificada em duas fases: a aguda e a crônica. Na fase aguda, muitas pessoas desconhecem que estão infectadas pelo *T. cruzi* e desenvolvem sintomas inespecíficos, como febre e inflamação nos linfonodos e, ocasionalmente, reação inflamatória no sítio da picada ou inchaço no olho. Após anos ou décadas, aproximadamente 30% dos pacientes desenvolvem a fase crônica da doença, que se manifesta principalmente por complicações cardíacas e/ou gastrintestinais e os casos não tratados podem levar à morte devido ao severo grau de debilitação que a patologia conduz (TARLETON *et al.*, 2007; STUART *et al.*, 2008).

Estes parasitas são transmitidos ao homem principalmente por insetos vetores hemípteros da subfamília *Triatominae*, vulgarmente conhecidos como barbeiros.

2.1.3 *Trypanosoma brucei* e a doença do sono

A espécie *T. brucei* (Figura 2) compreende três subespécies morfologicamente idênticas: *T. b. rhodesiense*, *T. b. gambiense* e *T. b. brucei*, das quais as duas primeiras causam doença em humanos e a terceira, é um patógeno de gado e animais selvagens (FÈVRE *et al.*, 2008).

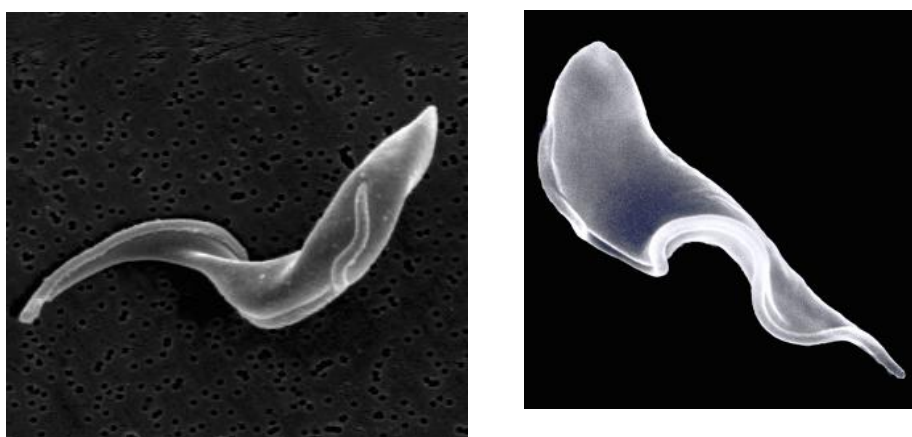


Figura 2. Formas celulares de *Trypanosoma brucei* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. À esquerda, a forma procíclica, presente no inseto vetor. À direita, a forma sanguínea, que se desenvolve livremente na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados. Fonte: International Health Wellcome Trust, 2005.

A doença do sono é encontrada em 36 países da África SubSaariana, restrita aos locais onde é encontrado o inseto vetor, e se apresenta sob duas formas: a aguda, causada pela subespécie *T. brucei rhodesiense*, concentrada nas regiões leste e sudeste; e a forma crônica, causada pelo *T. brucei gambiense*, presente nas regiões central e oeste da África (KENNEDY, 2008). Durante o ciclo de infecção, os tripanossomas são transmitidos de um hospedeiro mamífero a outro pela mosca tsé-tsé, do gênero *Glossina*. Tanto machos quanto fêmeas são capazes de realizar o repasto sanguíneo e levar à transmissão. Existem cerca de 30 espécies e subespécies de *Glossina*, e estas são separadas em três grupos, de acordo com as preferências de *habitats* e na habilidade de transmitir *T. b. rhodesiense* ou *T. b. gambiense* (BRUN *et al.*, 2010).

A tripanossomíase africana é fatal se não for tratada e apresenta-se em dois estágios. O primeiro, hemolinfático, é acompanhado de sintomas inespecíficos, como febre, dor de cabeça, perda de peso, fraqueza, entre outros. O segundo estágio, encefálico, é caracterizado pela invasão do parasita no sistema nervoso central e é acompanhado por severos sintomas neurológicos, incluindo distúrbios mentais e do sono (KENNEDY, 2008). Estudos sonográficos mostraram que a doença causa irregularidades no ritmo circadiano e fragmentação do padrão de sono, além de afetar a liberação de vários hormônios regulados pelo ritmo circadiano (BUGUET *et al.*, 2001). Atualmente existem 70 milhões de pessoas vivendo em área de risco, com incidência de 40 mil novos casos por ano e taxa de mortalidade estimada em 50.000 mortes anuais, além de contribuir para 1,5 milhão de anos de vida perdidos por incapacidade (DALYs - *disability adjusted life years*) (FÈVRE *et al.*, 2008; HOTEZ e KAMATH, 2009).

Animais domésticos e selvagens também podem ser infectados com *T. b. brucei* e, apesar de não desenvolverem a doença, eles têm um importante papel epidemiológico, pois servem como reservatórios, para a infecção das moscas tsé-tsé. *Trypanosoma brucei brucei* apesar de não ser infectivo para humanos, é responsável pela tripanossomíase animal, também chamada nagana, levando a perdas econômicas importantes (BRUN *et al.*, 2010).

2.2 Características da biologia celular dos tripanossomatídeos

Por representarem uma ramificação primária na árvore de evolução dos eucariotos, os organismos da família Trypanosomatidae apresentam várias características bioquímicas, genéticas e morfológicas bem peculiares. Eles apresentam uma importante edição de RNAs mitocondriais por inserções/deleções de uridinas (STUART *et al.*, 2005), possuem organelas diferenciadas, como os glicossomos e cinetoplasto, além de apresentarem o uso extensivo do ancoramento de proteínas de membrana utilizando glucosil fosfatidil inositol (GPI) (CAMPBELL *et al.*, 2003). Os tripanossomatídeos são diploides e seus genomas são organizados em grandes agrupamentos (*clusters*) contendo genes codificadores de proteínas. Os genomas de *L. major* e *T. cruzi* apresentam 36 e ~28 pares de cromossomos, respectivamente. Enquanto que o *T. brucei* apresenta 11 pares de cromossomos, contendo ainda aproximadamente 100 minicromossomos (30 a 150 Kb) e cerca de 5 cromossomos

intermediários (200 a 900 Kb), configurando um total de informação genética de 35 Mb por genoma haploide (revisto por DANIELS *et al.*, 2010).

Estes parasitas apresentam uma maturação diferenciada dos RNAs mensageiros, onde seus genes são transcritos inicialmente em unidades policistrônicas que podem variar de 50 a 2000 Kb. Contudo, os sítios de iniciação e de terminação da transcrição para a maioria dos policistrons continuam incertos (revisto por DANIELS *et al.*, 2010). Posteriormente, os RNAs policistrônicos sofrem um processamento diferenciado denominado *trans-splicing* que, acoplado à etapa de poliadenilação, formam mRNAs maduros monocistrônicos com uma única região codificadora (CAMPBELL *et al.*, 2003, BAYELE, 2009). Apenas dois exemplos de genes com íntrons que sofrem *cis-splicing* foram descritos em *T. brucei* e outros dois genes foram identificados com uma possível presença de íntrons, no entanto, análises de sequenciamento de RNAs mostram que aparentemente estes não são processados. Em contraste, o *trans-splicing* ocorre para todos os mRNAs maduros, e os dois processos parecem requerer a atuação do spliceossomo (IVENS *et al.*, 2005; DANIELS *et al.*, 2010). A transcrição global nos tripanossomatídeos ocorre de forma basal e até o momento não foi identificada nenhuma evidência de regulação diferencial de mRNAs individuais ou de grupos de mRNAs transcritos pela RNAPol II. Além disso, a escassez de promotores clássicos para a RNAPol II e o fato de que o genoma codifica poucos fatores transcricionais leva à observação de que o controle da expressão gênica nestes organismos ocorre pós-transcricionalmente, nos níveis de controle da estabilidade dos mRNAs e da sua tradução em proteínas (CLAYTON e SHAPIRA, 2007).

2.3 Iniciação da tradução em eucariotos: mecanismos e atuação na regulação da expressão gênica

Comparado à regulação transcricional, o controle da expressão gênica durante a tradução é responsável por mudanças rápidas, reversíveis e espaciais nas concentrações celulares das proteínas (JACKSON *et al.*, 2010). O processo de tradução pode ser dividido em: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A maior parte dos mecanismos de controle desse processo ocorre na etapa de iniciação, onde o códon AUG inicial é identificado e reconhecido pelo tRNA iniciador (Met-tRNA_i). Em eucariotos, o códon inicial é usualmente identificado durante

um processo de varredura (*scanning*), onde a subunidade menor ribossomal 40S carregada com o tRNA^{Met}_i (complexo pré-iniciação) se liga ao mRNA, na sua porção 5' UTR (5' *untranslated region*), e promove a busca pelo AUG inicial (SONENBERG e HINNEBUSCH, 2009).

A iniciação da tradução compreende o processo de montagem das partículas ribossomais 80S funcionais, onde o códon inicial do mRNA é pareado com o anticódon do tRNA no sítio P ribossomal. Esta fase requer no mínimo nove fatores de iniciação da tradução (eIFs) e compreende algumas etapas que envolvem a formação do complexo de iniciação 43S e a união do complexo 43S com a subunidade 60S (JACKSON *et al.*, 2010):

1- formação do complexo pré-iniciação 43S: por ser um processo cíclico, as partículas ribossomais que participam da etapa da iniciação são derivadas de um processo de reciclagem dos complexos ribossomais pós-terminação. E na dissociação desses complexos, atuam os fatores eIF3, eIF1 e eIF1A, os quais permaneceriam ligados à subunidade menor 40S, prevenindo sua reassociação com a subunidade 60S. O complexo 43S é então formado pela união subsequente da subunidade 40S com eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}_i;

2- ligação do complexo 43S ao mRNA: apesar do complexo 43S ser intrinsecamente capaz de se ligar às regiões 5'UTR não-estruturadas de alguns mRNAs, na maioria dos casos esse processo é facilitado pela ação cooperativa do complexo eIF4F (composto de três subunidades - eIF4E, eIF4A e o eIF4G) (Figura 3) juntamente com os fatores eIF4B ou eIF4H, que desfazem as estruturas secundárias presentes na 5' UTR e preparam essa região para a ligação do ribossomo. O recrutamento do complexo 43S ao mRNA é resultado de uma cadeia de interações entre *cap*-eIF4E-eIF4G-eIF3-43S, formando o complexo 48S;

3 – varredura da 5' UTR do mRNA pelo ribossomo: após a formação do complexo 48S, a subunidade menor ribossomal faz uma varredura na porção do mRNA situada entre o *cap* e o códon de iniciação da tradução. Esta etapa consiste de dois processos relacionados: a eliminação das estruturas secundárias da 5'UTR e o movimento da subunidade ribossomal ao longo desta. Nesta etapa são requeridos ATP, eIF4A, eIF4G e eIF4B, porém o mecanismo pelo qual esses fatores auxiliam o processo de varredura permanece desconhecido;

4 – reconhecimento do códon de iniciação pelo ribossomo: essa etapa é fundamental para assegurar a fidelidade da iniciação, prevenindo pareamentos errôneos do tRNAi na 5'UTR e é dependente de sequências específicas presentes no mRNA e é assistida pelos fatores eIF1 e eIF1A;

5 – formação da partícula ribossomal completa: a união da subunidade ribossomal maior 60S é seguida da dissociação do eIF1, eIF1A, eIF3 e do eIF2-GDP residual, num processo mediado pelo eIF5B.

2.3.1 O complexo eIF4F de iniciação da tradução e PABP

O complexo eIF4F é o principal responsável pelo recrutamento da subunidade 40S ribossomal à extremidade 5' dos mRNAs. Este complexo trimérico é formado pelas seguintes subunidades: **eIF4E**, também conhecida como proteína de ligação ao *cap*; **eIF4A**, com funções de RNA helicase e ATPase, e a subunidade **eIF4G**, responsável pela interação com o eIF4E, eIF4A, eIF3 e com a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP), através de vários sítios de ligação presentes em sua estrutura. A PABP, apesar de não ser considerada um fator de iniciação da tradução clássico, tem um papel de destaque na iniciação da tradução, através da sua ligação ao mRNA e sua interação com o eIF4G (JACKSON *et al.*, 2010).

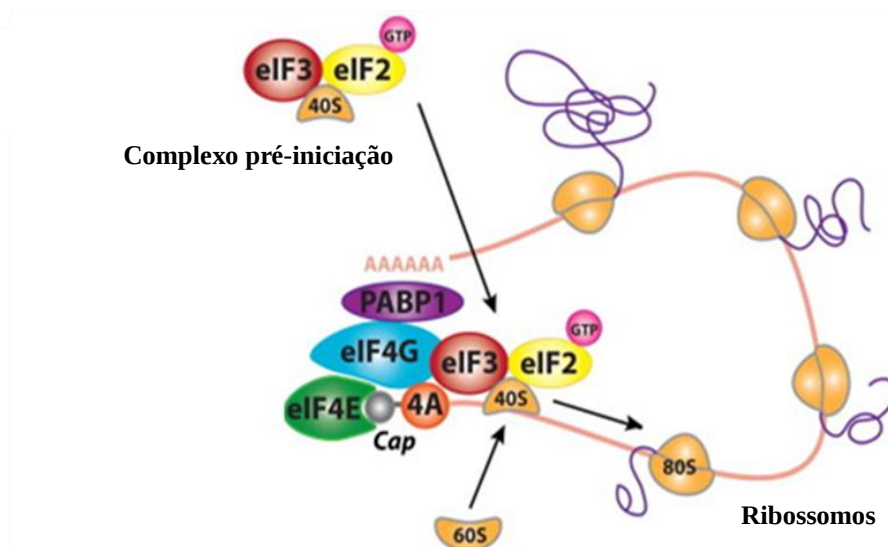


Figura 3. Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos. Representação do reconhecimento do *cap* e da ligação das subunidades do complexo eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G) a um mRNA maduro, como parte do processo de recrutamento do complexo ribossomal. Modificado a partir de Yángüez e Nieto (2011).

2.3.1.1 A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP)

A PABP atua como um fator auxiliar durante a síntese proteica, ligando-se especificamente à cauda poli-A presente na região 3' dos mRNAs eucarióticos e ainda participando de vários processos celulares relacionados aos mRNAs, tais como biossíntese, processamento, transporte e degradação (CHEKANOVA e BELOSTOSKY, 2003; CHANG *et al.*, 2004; DUNN *et al.*, 2005; BRUNE *et al.*, 2005; WOODS *et al.*, 2005; HOSODA *et al.*, 2006). A estrutura da PABP é altamente conservada em diferentes organismos (KUHN e WAHLE, 2004) e se caracteriza por uma região N-terminal que apresenta quatro RRM's (*RNA recognition motifs*), uma região intermediária rica em prolina/glutamina e uma região C-terminal contendo um domínio chamado PABC. Os dois primeiros RRM's são suficientes para a ligação específica à cauda poli-A (KUHN e PIELER, 1996) e têm sido relacionados à interação entre PABP e eIF4G (KESSLER e SACHS, 1998; IMATAKA *et al.*, 1998; CHENG e GALLIE, 2007). A interação PABP/eIF4G parece reforçar a iniciação da tradução e a estabilidade do mRNA, permitindo uma verificação da integridade do mRNA que precederia a sua tradução (SVITKIN e SONENBERG, 2006; AMRANI *et al.*, 2008). Já os RRM's 3 e 4 não tem especificidade por poli-A e podem mediar o reconhecimento de sequências não poli-A (SLADIC *et al.*, 2004; KHAHAM *et al.*, 2007).

A região C-terminal da PABP não se liga a RNA e contém um domínio conservado denominado PABC. Este domínio parece ser responsável pela ligação da PABP ao fator de terminação da tradução eRF3 e às proteínas regulatórias Paip1 e Paip2 (KOZLOV *et al.*, 2001; ALBRECHT e LENGAUER, 2004). A Paip1 é uma proteína que se liga à PABP e estimula a tradução, provavelmente por se ligar também ao fator eIF3, estabilizando a ligação PABP-eIF4G, tornando mais eficiente a circularização dos mRNAs (CRAIG *et al.*, 1998; MARTINEAU *et al.*, 2008). Já o impedimento da circularização dos mRNAs, pela ligação de proteínas inibitórias como a Paip2 à PABP, parece constituir um mecanismo de regulação negativa da tradução (KHALEGHPOUR *et al.*, 2001). Estas proteínas regulatórias possuem dois sítios distintos, dos quais um deles se liga ao domínio PABC (KOZLOV *et al.*, 2001). A interação do eRF3 com o PABC resulta na circularização da extremidade 3' UTR dos mRNAs, facilitando a reciclagem de ribossomos da extremidade 3' para a 5' para iniciar um novo ciclo de tradução (UCHIDA *et al.*, 2002; SONENBERG e DEVER, 2003; HOSODA *et al.*, 2003). Conectando os RRM's ao domínio PABC, existe uma região rica

em prolina e glutamina na PABP, que é importante para a multimerização de moléculas de PABP na cauda poli-A (MELO *et al.*, 2003).

2.3.1.2 Subunidade eIF4E

O eIF4E é a proteína responsável pelo reconhecimento do *cap* (m⁷GTP), presente nos mRNAs eucarióticos - etapa crítica para se dar início ao processo de tradução (SONENBERG, 2008). A família eIF4E de proteínas pode ser encontrada em diversos organismos, desde protozoários a humanos, normalmente com múltiplos homólogos por espécie, sendo pelo menos um dos homólogos envolvido com tradução e os demais relacionados a outras funções celulares (JOSHI *et al.*, 2005; RHOADS, 2009).

A estrutura do eIF4E quando ligada ao *cap*, assemelha-se a uma luva de *baseball* com o *cap* ligado à superfície côncava. O reconhecimento específico acontece pelo empacotamento da guanosina metilada entre os anéis aromáticos de dois triptófanos conservados (W56 e W102, em camundongo) num processo conhecido como empacotamento π - π (π - π *stacking*). Em seguida, ocorre uma estabilização mediada pelo radical metil do *cap*, que aumenta de quatro a seis vezes a afinidade de interação com o eIF4E (MATSUO *et al.*, 1997; MARCOTRIGIANO *et al.*, 1997).

Os parceiros mais importantes do eIF4E são os fatores eIF4G e as proteínas 4E-BPs (*4E binding proteins* – proteínas de ligação ao eIF4E), que se associam ao eIF4E através de sua região convexa, oposta ao sítio de ligação ao *cap*. Alguns resíduos de aminoácidos encontrados no eIF4E humano são importantes para ligação ao eIF4G e 4E-BPs: H37, P38, V69, W73, L131, E132 e L135. Destes, os aminoácidos V69 e W73 são encontrados dentro de uma sequência bastante conservada nos eIF4Es, (S/T)VXXFW (MARCOTRIGIANO *et al.*, 1997; JOSHI *et al.*, 2005), e a substituição do W73 por um aminoácido não aromático abole a interação do eIF4E com eIF4G e 4E-BPs (PYRONNET *et al.*, 1999; PTUSHKINA *et al.*, 1999).

A atividade da proteína eIF4E pode ser regulada, em mamíferos, através da fosforilação da serina 209 (S209) pelas quinases Mnk1e Mnk2 (GINGRAS *et al.*, 1999). As Mnks interagem com o eIF4G, através de seu domínio C-terminal, que funciona como sítio de ancoragem para as quinases ficarem próximas ao seu substrato principal, o eIF4E. Portanto o eIF4G parece modular a fosforilação do eIF4E (GINGRAS *et al.*, 1999; PYRONNET *et al.*, 1999; PARRA-PALAU *et al.*, 2003). A fosforilação do eIF4E

aumenta a sua afinidade pelo *cap* (SCHEPER and PROUD, 2002), mas não resulta em aumento da atividade traducional (GOODFELLOW and ROBERTS, 2008). Um segundo mecanismo de regulação da atividade do eIF4E é mediado pelas proteínas 4E-BPs que competem com o eIF4G pela interação com o eIF4E e assim funcionam como inibidores da tradução. Em mamíferos, foram identificadas três 4E-BPs e suas funções são reguladas por fosforilação. Quando hipofosforiladas, as 4E-BPs sequestram o eIF4E, inibindo a tradução, enquanto a hiperfosforilação impede sua ligação ao eIF4E e esse, livre, pode ser utilizado no processo de iniciação da tradução (GINGRAS *et al.*, 1999).

2.3.1.3 Subunidade eIF4A

O fator de iniciação da tradução eIF4A é considerado um protótipo da família de proteínas DEAD-box, um grupo de RNA helicases caracterizado por apresentar nove motivos (I, Ia, Ib/Ic, II, III, IV, V, VI e Q), dos quais o mais conservado é o domínio II, conhecido como DEAD, pela presença da sequência consenso L-D-E-A-D-X-X-L (LINDER, 2003). As RNAs helicases são encontradas desde procariotos até organismos eucariotos mais complexos e estão envolvidas em vários processos celulares, tais como: transcrição, processamento de mRNAs, síntese de ribossomos, transporte e degradação de mRNAs e tradução (LUKING *et al.*, 1998; LINDER, 2003). O eIF4A é uma RNA helicase dependente de ATP que remove estruturas secundárias da região 5' UTR dos mRNAs. Na iniciação da tradução, sua atividade facilita tanto a ligação do complexo 43S ao mRNA como o deslocamento da subunidade menor ribossomal ao longo da 5'UTR até a identificação do códon de iniciação da tradução durante o processo de varredura (GINGRAS *et al.*, 1999).

Em mamíferos, três isoformas do eIF4A podem ser encontradas: eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII (WEINSTEIN *et al.*, 1997). O eIF4AI e eIF4AII, em humanos, apresentam uma alta homologia entre si (90% de identidade) e são funcionalmente equivalentes na tradução (NIELSEN e TRACHSEL, 1998; GINGRAS *et al.*, 1999). Em contraste, o grau de identidade entre eIF4AI e eIF4AIII é relativamente menor (66% de identidade) e são consideradas funcionalmente distintas. O eIF4AIII não pode substituir o eIF4AI na ligação da subunidade menor ribossomal ao mRNA, é capaz de inibir a tradução *in vitro* (LI *et al.*, 1999) e sua localização é nuclear, atuando como ancoradouro para formação do Complexo de Junção entre Éxons (EJC) (HOLZMANN *et al.*, 2000). O EJC é um

complexo de proteínas que se liga nos mRNAs processados por *splicing*, numa região de 20 a 24 nucleotídeos a montante das junções entre os éxons (LE *et al.*, 2000). O EJC participa de eventos centrais no metabolismo dos mRNAs como na exportação do núcleo para o citoplasma, na degradação de mRNAs terminados precocemente ou processados de forma errônea e na tradução citoplasmática (LE *et al.*, 2003; TANGE *et al.*, 2004; LEJEUNE e MAQUAT, 2005).

A estrutura da molécula do eIF4A se assemelha a um halter, onde os domínios N-terminal e C-terminal são interligados por uma sequência flexível (CARUTHERS *et al.*, 2000). Ambos os domínios estão envolvidos na ligação a RNA e a ATP. O eIF4A, como outras RNA helicases, alterna sua estrutura entre dois estados: “fechado” e “aberto”. No estado “fechado”, apresenta uma conformação ativa, onde os dois domínios formam uma superfície que permite a ligação do eIF4A ao RNA e à molécula de ATP de uma forma cooperativa (LORSCH e HERSCHLAG, 1998). A atividade de helicase do eIF4A livre é baixa, mas é estimulada quando a proteína se liga ao eIF4G (dentro do complexo eIF4F) e quando outros fatores (eIF4B ou eIF4H) estão associados (MARINTCHEV e WAGNER, 2004; MARINTCHEV *et al.*, 2009).

2.3.1.4 Subunidade eIF4G

O fator de iniciação da tradução eIF4G é uma proteína de alto peso molecular cujo papel crucial é coordenar a formação do complexo eIF4F para, juntamente com a PABP, recrutar a subunidade menor ribossomal para a tradução. Por ser o foco principal deste trabalho, esta proteína será descrita em maior detalhe no próximo tópico.

2.3.2 eIF4G: domínios e funções

No seu papel central durante a iniciação da tradução, o eIF4G interage com o eIF3, eIF4A, eIF4E, PABP, com a própria molécula de RNA e com outras proteínas (PRÈVÔT *et al.*, 2003). O protótipo humano desta proteína, denominado eIF4GI, possui aproximadamente 1600 aminoácidos e se divide em três regiões (N-terminal, central e C-terminal), de acordo com um padrão de clivagem gerado por proteases virais (Figura 4). (LAMPHEAR *et al.*, 1995; revisto por PRÈVÔT *et al.*, 2003)

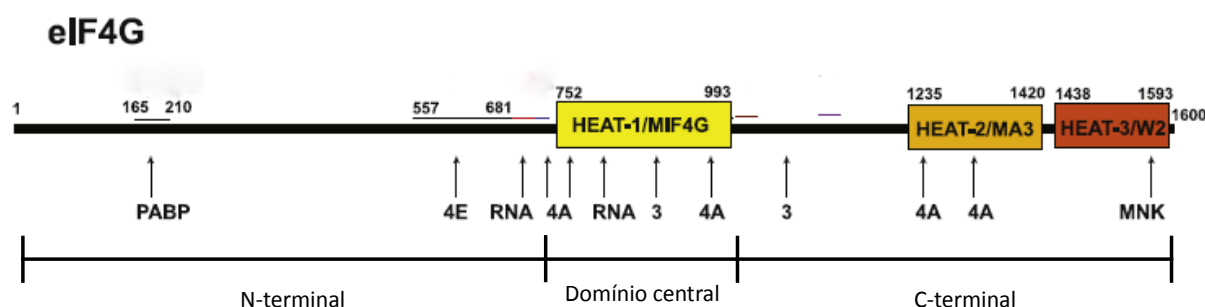


Figura 4. Esquema do eIF4GI humano, proteína protótipo da família eIF4G, e seus principais sítios de ligação a outras proteínas. O eIF4GI possui na sua região N-terminal os sítios de ligação à PABP e ao eIF4E (4E). Na região central desta proteína, encontra-se o domínio central de ligação ao eIF4A (4A), além de uma região de ligação a RNA (RNA) e do sítio de ligação ao eIF3 (3). Já na sua porção C-terminal, encontram-se um segundo sítio de ligação ao eIF4A (apenas em mamíferos) e o sítio de ligação à quinase Mnk1. Nota-se ainda a presença de três domínios HEAT ao longo da estrutura: HEAT-1/MIF4G, HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2 (MARINTCHEV *et al.*, 2009).

Estudos em mamíferos e leveduras mostram que a região N-terminal possui sítios de ligação ao eIF4E (conservado) e a PABP (não conservado) (PRÈVÔT *et al.*, 2003). A região central é crítica para formação do complexo de iniciação da tradução, visto que esse segmento possui sítios para ligação ao eIF3 e ao eIF4A (IMATAKA e SONENBERG, 1997; MARCOTRIGIANO *et al.*, 2001). Já a região C-terminal possui um segundo sítio para ligação ao eIF4A (este domínio não se faz presente nos homólogos de leveduras) e parece desempenhar um papel modulatório durante a síntese proteica (MORINO *et al.*, 2000), além de possuir um sítio para ligação à quinase Mnk1 (PRÈVÔT *et al.*, 2003). Embora ainda não tenha sido possível obter a modelagem completa da proteína, as estruturas tridimensionais dos principais domínios do eIF4GI foram desvendadas por cristalografia de raios-X (BELLSOLELL *et al.*, 2006).

Ensaio utilizando proteases virais e cromatografia de afinidade mostraram que o fragmento N-terminal do eIF4GI, obtido após clivagem da proteína completa, continuava retido à resina m⁷GTP-sefarose, indicando que o eIF4E continuava ligado a ele. A confirmação veio com estudos de interação entre mutantes com deleções do eIF4GI e o eIF4E (MADER *et al.*, 1995; PRÈVÔT *et al.*, 2003). Este mesmo estudo levou à caracterização de uma região de 49 aminoácidos, contendo um motivo YDREFLL, possível sítio de ligação ao eIF4E, presente no eIF4G de humanos, leveduras, plantas e coelhos, onde essa sequência identificada apresentava um alto grau de conservação entre essas espécies. Com base numa análise mais extensa de

sequências de eIF4G de diferentes organismos chegou-se ao consenso Y-X-X-X-X-L-Φ (onde Φ representa um aminoácido hidrofóbico) como o motivo responsável pela interação eIF4G/eIF4E (MARCOTRIGIANO *et al.*, 1999). Outras abordagens, usando proteínas recombinantes de fatores de iniciação, revelaram que a interação eIF4G/eIF4E aumenta sensivelmente a afinidade do eIF4E pela estrutura *cap*. Isto pode ser explicado pelo fato do eIF4G se ligar diretamente ao mRNA, favorecendo a estabilização do complexo eIF4G-eIF4E-*cap* (VON DER HAAR *et al.*, 2000). Recentemente, em mamíferos, foi mostrado que o eIF4G aumenta fortemente a interação do eIF4E pelo *cap* por ancorar o eIF4E ao mRNA via RRM do eIF4G (YANAGIYA *et al.*, 2009).

O domínio de ligação entre a PABP e os dois homólogos do eIF4G de leveduras está situado numa região de 114 aminoácidos presentes na porção N-terminal (TARUN, Jr. E SACHS, 1996). A interação direta entre a PABP e o eIF4G também foi descrita em plantas (LE *et al.*, 1997) e em mamíferos (IMATAKA *et al.*, 1998). O principal sítio de ligação à PABP em mamíferos está presente tanto no eIF4GI quanto no eIF4GII, mas não exibe nenhuma homologia com o domínio de interação encontrado em leveduras, mostrando assim que esse sítio pode não ser tão conservado entre as espécies (IMATAKA E SONENBERG, 1997; PRÈVÔT *et al.*, 2003).

Durante a análise da estrutura do domínio central presente no eIF4G de mamíferos foi encontrado um tipo de domínio HEAT, caracterizado pela presença de cinco pares de α-hélices antiparalelas repetidas (MARCOTRIGIANO *et al.*, 2001). A denominação HEAT tem sua origem nas quatro proteínas nas quais este tipo de domínio foi encontrado: Huntingtina – proteína envolvida na doença neurológica de Huntington, fator de alongamento (*Elongation*) da tradução 3 (EF-3), subunidade A da proteína Fosfatase 2 (PP2A) e a proteína sensível à rapamicina mTor/FRAP, todas envolvidas em processos celulares de transdução de sinal e ciclo celular (ANDRADE e BORK, 1995; GINGRAS *et al.*, 1999; HONG e SARGE, 1999; CHAKRABURTTY, 2001). Esse domínio HEAT é geralmente encontrado em proteínas envolvidas na montagem de complexos multiprotéicos (HE *et al.*, 2003; PRÈVÔT *et al.*, 2003). A estrutura do eIF4GI humano na realidade é composta por três domínios HEAT: o primeiro, localizado na região central, denominado de HEAT-1/MIF4G (MIF4G – *middle portion of eIF4G*) (Ponting, 2000); e os outros dois, presentes na região C-terminal, são HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2. O HEAT-2 e o HEAT-3 são formados por cinco e quatro

repetições de α -hélices antiparalelas, respectivamente, sendo essas repetições atípicas quando comparadas ao HEAT-1 (BELSOLELL *et al.*, 2006).

Inicialmente, um sítio de ligação ao eIF4A foi encontrado na porção C-terminal do eIF4G de mamíferos (LAMPHEAR *et al.*, 1995). Alguns anos mais tarde, um segundo sítio independente foi localizado na região central da proteína (IMATAKA e SONENBERG, 1997). Em ensaios funcionais, foi visto que a presença de uma mutação pontual no sítio de ligação ao eIF4A, presente no domínio central, impedia a tradução; enquanto que uma mutação semelhante no sítio da região C-terminal, apenas diminuía a eficiência da tradução em seis vezes frente ao eIF4GI selvagem (MORINO *et al.*, 2000). Dessa forma, foi demonstrado que o sítio de ligação presente na região C-terminal não era essencial para a tradução, mas que sua presença desempenhava um papel apenas modulatório (DE GREGORIO *et al.*, 1999; MORINO *et al.*, 2000). As posições exatas desses sítios foram mapeadas, estando o sítio do domínio central entre os resíduos de aminoácidos 672-970 e no C-terminal entre os resíduos 1201-1411 (MORINO *et al.*, 2000; KORNEEVA *et al.*, 2001). Um motivo formado pelos aminoácidos LNK mostrou-se conservado em várias espécies e a mudança do aminoácido equivalente a leucina (L729A), no modelo humano, reduz a interação do eIF4G com o eIF4A (IMATAKA *et al.*, 1997). O eIF4G se liga à região amino terminal do eIF4A entre os resíduos de aminoácidos 147 e 177, região onde está presente o domínio Ic do eIF4A e a estabilização do mRNA pelo eIF4G aparentemente ocorre através das interações com o domínio Ic e/ou III, facilitando a atividade helicase do eIF4A (KORNEEVA *et al.*, 2005).

Um outro sítio de ligação importante presente no eIF4G é aquele que permite sua interação com o fator eIF3. O fator eIF3 é o maior fator de iniciação da tradução em mamíferos, sendo composto por 13 subunidades nomeadas de eIF3a-m. O principal papel do eIF3 é fazer a conexão entre a subunidade menor ribossomal e o mRNA, através da ligação específica entre sua subunidade eIF3e e o eIF4G (LEFEBVRE *et al.*, 2006). Este sítio está localizado entre os resíduos de aminoácidos 975-1065, no domínio central do eIF4G, região esta que não estaria sobreposta ao sítio de ligação ao eIF4A (KORNEEVA *et al.*, 2001).

O fator eIF4G envolvido com a iniciação da tradução apresenta-se como duas isoformas em mamíferos, leveduras e plantas. Em leveduras e mamíferos, as duas isoformas exibem conservação moderada entre as sequências (53% e 46% de identidade, respectivamente). Em humanos, ambas as isoformas (eIF4GI e eIF4GII)

aparentemente desempenham a mesma função, considerando que uma pode substituir a outra em diferentes ensaios de tradução (PRÈVÔT *et al.*, 2003). Entretanto, foi observado que durante a diferenciação do megacariócito, o eIF4GII é recrutado seletivamente para a formação do complexo eIF4F, indicando que estas proteínas podem estar relacionadas a diferentes situações (CARON *et al.*, 2004).

Ainda em mamíferos, foi demonstrado que diferentes isoformas podem ser geradas a partir da expressão do gene eIF4GI, através da tradução diferencial do seu mRNA pelo uso de diferentes códonos AUG de iniciação e/ou pelo processamento alternativo de seu transcrito por *cis-splicing* (BYRD *et al.*, 2002; BRADLEY *et al.*, 2002; BYRD *et al.*, 2005). Desta forma, cinco isoformas do eIF4GI de diferentes tamanhos, com base no encurtamento da região N-terminal, são co-expressas em células de mamíferos. A isoforma eIF4GI_f (proteína completa), apesar de ser expressa em baixos níveis, é capaz de promover mais eficientemente a tradução de mRNAs celulares em relação às demais isoformas expressas em quantidades bem maiores (COLDWELL e MORLEY, 2006).

Em plantas, duas isoformas do eIF4G distintas são expressas e conhecidas como eIF4G e eIFiso4G (GALLIE e BROWNING *et al.*, 2001) e, diferentemente de mamíferos e leveduras, ligam-se respectivamente a dois diferentes homólogos do eIF4E, formando os complexos eIF4F (eIF4E/eIF4G) e eIFiso4F (eIFiso4E/eIFiso4G). O eIF4G e o eIFiso4G diferem em tamanho (165 e 86 kDa, respectivamente) e apresentam apenas 30% de identidade (GALLIE e BROWNING, 2001), enquanto que as isoformas presentes em leveduras e mamíferos são mais conservadas (GOYER *et al.*, 1993; GRADl *et al.*, 1998). Apesar destas diferenças importantes, ambas possuem domínios para interação com o eIF4A, eIF3 e PABP (BROWNING, 1996). Entretanto, foi mostrado recentemente que estes dois complexos (eIF4F e eIFiso4F) estão envolvidos na tradução de mRNAs particulares, ou classes de mRNAs, sugerindo que a tradução diferencial pode requerer complexos com isoformas específicas de fatores de iniciação da tradução (MAYBERRY *et al.*, 2009).

2.3.3 Família eIF4G

A família eIF4G não se restringe apenas ao eIF4G típico, mediador da iniciação da tradução, mas inclui ainda um conjunto de proteínas que apresentam homologia ao eIF4G por conter os domínios HEAT-1/MIF4G e HEAT-2/MA3 (Figura 5). Dentre esses

homólogos, podemos citar: a proteína de ligação à PABP (Paip1), cujo domínio central possui 39% de similaridade com o HEAT-1/MIF4G do eIF4GI, interage com o eIF4A e estimula a tradução (CRAIG *et al.*, 1998) possivelmente através de uma interação com o eIF3 (MARTINEAU *et al.*, 2008); a proteína humana p97 (LEVY-STRUMPF *et al.*, 1997; LEE e MCCORMICK, 2006), descrita como repressor traducional e que está relacionada à tradução de mRNAs contendo IRES (HENIS-KORENBLIT *et al.*, 2002; NEVINS *et al.*, 2003); a proteína nucleolar NOM1 (SIMMONS *et al.*, 2005), de papel funcional desconhecido, mas que contém domínios equivalentes aos HEAT-1/MIF4G e HEAT-2/MA3, e que interage com o eIF4AIII e com a proteína Fosfatase I (GUNAWARDENA *et al.*, 2008); a pcdc4 (proteína de morte celular programada 4 - *programmed cell death protein 4*), uma proteína supressora de tumor que inibe a tradução, através de seus dois domínios HEAT-2/MA3, que competem com eIF4G e RNA pela ligação ao eIF4A (SUZUKI *et al.*, 2008). Finalmente, uma outra proteína, cuja estrutura e domínios funcionais são semelhantes ao eIF4G, é a maior subunidade do complexo nuclear de ligação ao *cap* (CBP80). Juntamente com a subunidade CBP20, a CBP80 está envolvida no processamento e maturação dos mRNAs nascentes, bem como em um provável teste traducional destes mRNAs, ainda no núcleo, antes de serem enviados para a tradução citoplasmática (MARINTCHEV e WAGNER, 2005).

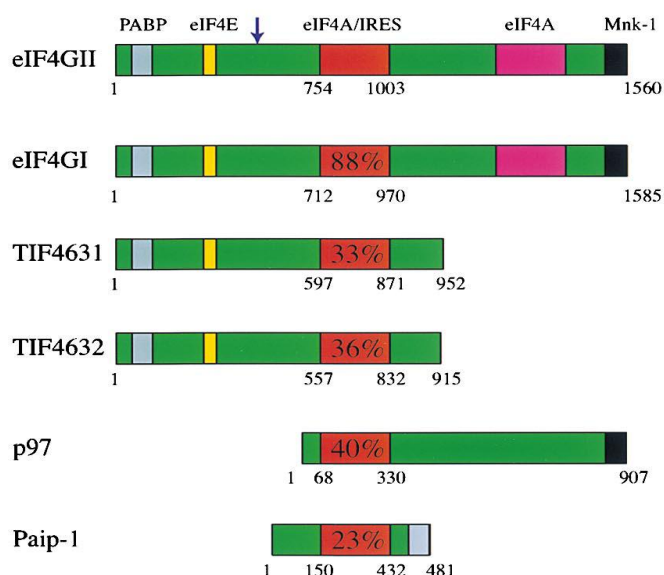


Figura 5. Motivos presentes no eIF4GI, eIF4GII e em outras proteínas da família eIF4G. Na figura estão representadas, em valores percentuais, as identidades entre as sequências dos eIF4Gs humanos, das duas isoformas de levedura (TIF4631 e TIF4632) e das proteínas homólogas humanas, p97 e Paip-1 (MARCOTRIGIANO *et al.*, 2001).

2.4 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos são organismos diploides e vários aspectos da organização de seus genomas e da regulação da expressão gênica são pouco usuais comparados a outros organismos-modelo eucarióticos. Algumas diferenças podem ser vistas através da análise individual da organização genômica e da expressão dos genes transcritos pelas três classes de RNA polimerases encontradas em tripanossomatídeos: RNAPol I, pol II e pol III (revisto por DANIELS *et al.*, 2010). Nos tripanossomatídeos, o perfil global de expressão gênica durante o desenvolvimento e durante a mudança entre os hospedeiros mostra que vários genes são regulados de forma diferenciada: 2 a 9% dos genes são modulados no nível dos RNAs (principalmente pela estabilidade dos mRNAs) e 12 a 18% são regulados em nível protéico, envolvendo eventos durante a tradução e pós-traducionais. Além destes, outros mecanismos genéticos (na expressão das VSGs – *variant surface proteins*, por exemplo) e epigenéticos específicos estão presentes no repertório de regulação da expressão destes organismos (HAILE e PAPADOPOULOU, 2007; RUDENKO, 2010).

Algumas espécies de *Trypanosoma* são únicas por possuírem uma RNAPol I capaz de transcrever não apenas genes de rRNA, mas também por transcreverem genes codificantes de proteínas, os quais incluem os genes das proteínas de superfície VSGs, na forma sanguínea, e das prociclinas, na forma procíclica. Desta forma, a transcrição pela RNAPol I nessas espécies está intimamente ligada à diferenciação entre os estágios do ciclo de vida e também à capacidade de sobrevivência no hospedeiro mamífero. A transcrição de genes codificadores de proteínas dirigida pela RNAPol I não parece ser uma característica comum dos tripanossomatídeos, exceto para o *T. brucei* e algumas espécies africanas relacionadas. Entretanto, alguns complexos contendo a RNAPol I de organismos como *T. cruzi* e *Leishmania* são competentes em transcrever esse tipo de genes em casos específicos, sugerindo que os mecanismos que permitem esse tipo de transcrição em *T. brucei* não são específicos deste organismo (revisto por DANIELS *et al.*, 2010).

A escassez de promotores para a RNAPol II é também uma característica importante destes organismos, indicando uma complexa regulação da expressão gênica. Um promotor de RNAPol II para sequência *spliced leader* (SL) já foi caracterizado (GILINGER e BELLOFATTO, 2001). Existem alguns relatos de

sequências presentes nos *loci* de actina e HSP70 que podem agir como promotores quando colocados a montante de genes repórteres, mas nenhum possui características típicas de um promotor de RNAPol II, como a presença das sequências CCAAT ou TATA (BAYELE, 2009). Aparentemente a transcrição pela RNAPol II se inicia indistintamente em regiões de troca de fitas (*strand switch regions* – SSRs) e continua ao longo do policístron até o término deste, que pode acontecer pela presença de outra SSR, de um ponto específico entre dois policístrons, ou pela presença de uma região que é transcrita por outra classe de RNA pol. A ideia de que a iniciação e a terminação da transcrição ocorram nas SSRs tem sido fortalecida por achados de modificações de histonas (acetilação), histonas variantes e fatores de transcrição nestas regiões. A presença destas marcas de histonas poderia representar um modo mais antigo de iniciação e terminação da transcrição, antes da emergência de fatores de transcrição e sequências de DNA promotoras específicas (revisto por DANIELS *et al.*, 2010 e ERSFELD, 2011).

A terceira polimerase eucariótica, RNAPol III, transcreve pequenos RNAs não codificadores que atuam na tradução (tRNAs e 5S rRNAs) e outros processos celulares. A transcrição de snRNAs e do 7SL RNA pela RNAPol III em tripanossomatídeos é dependente de elementos regulatórios localizados em um gene de tRNA adjacente (DANIELS *et al.*, 2010).

Numa visão mais ampla, a regulação da expressão da maioria dos genes dos tripanossomatídeos envolve vários processos, no nível pós-transcricional, que incluem a regulação do processamento e exportação dos mRNAs; a degradação dos mRNAs, controlada em parte por sequências presentes na região 3'UTR; a tradução, com atuação de complexos de ligação ao *cap* e regulação por sequências de reconhecimento próximas ao AUG; e ainda por processos que envolvem modificações de histonas e a modificação, transporte e degradação das proteínas (eventos pós-traducionais) (CLAYTON e SHAPIRA, 2007; HAILE e PAPADOPOULOU, 2007) (Figura 6).

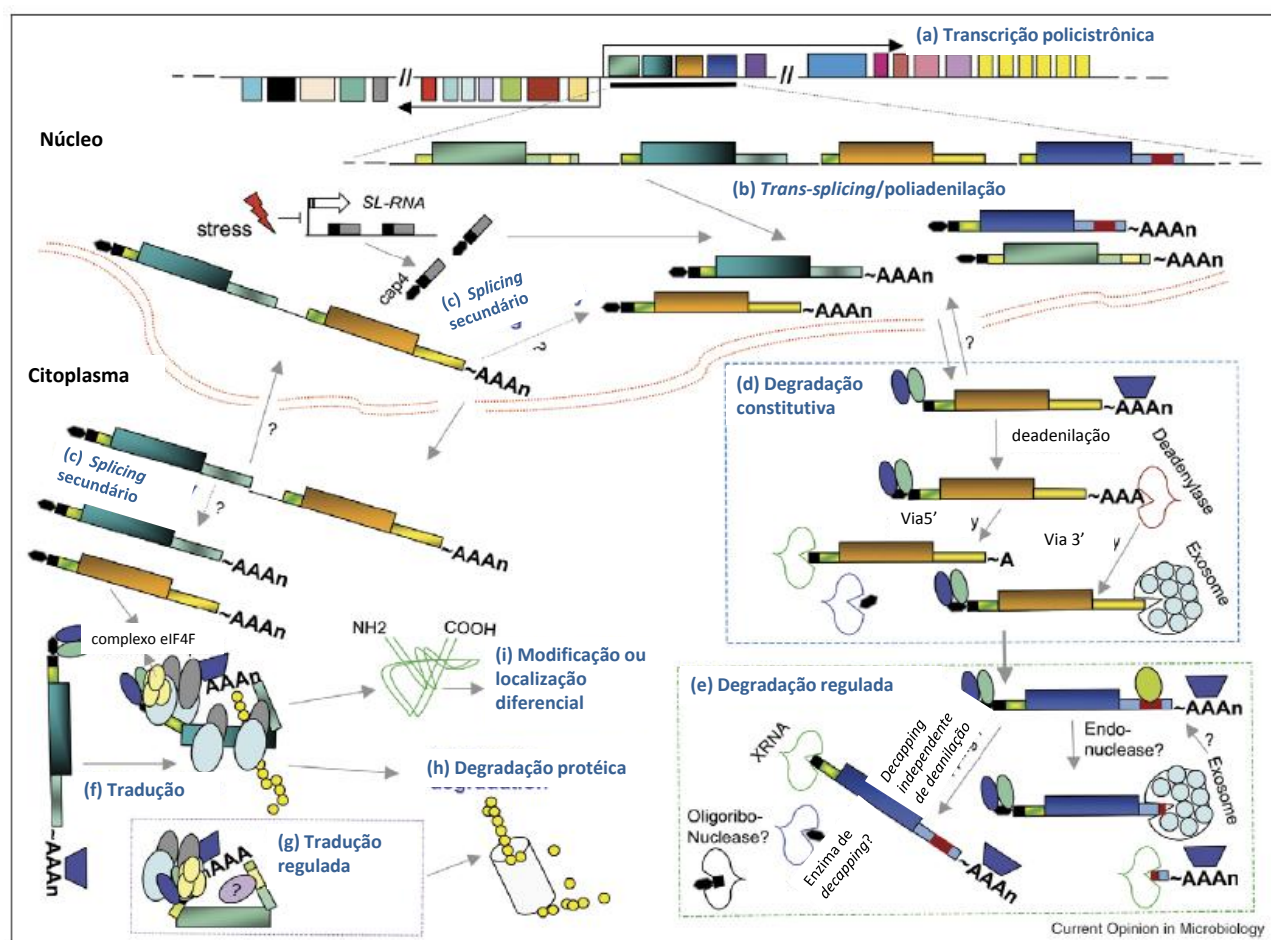


Figura 6. Representação das vias de controle pós-transcricional da expressão gênica nos tripanossomatídeos. A transcrição nos tripanossomatídeos ocorre de forma policistrônica (a), e os mRNAs maduros são formados pelo *trans-splicing* juntamente com a poliadenilação (b). Possíveis eventos envolvendo processamentos secundários são representados em (c). Vias de degradação de mRNAs podem ser iniciadas tanto a partir da 5'UTR quanto 3'UTR (d) e também pode ocorrer a degradação regulada de populações específicas de mRNAs (e). A maquinaria básica de tradução nos tripanossomatídeos ainda está em fase de caracterização, bem como seus eventos de regulação (f e g). Eventos pós-traducionais são representados em (h e i), mas ainda precisam ser mais bem investigados. Os sinais de interrogação representam eventos que ainda precisam ser confirmados experimentalmente. Modificado de Haile e Papadopoulos (2007).

2.5 Complexo eIF4F e PABP nos tripanossomatídeos

Os dados obtidos a partir de sequências de projetos genomas de tripanossomatídeos (TriTryps) (EL-SAYED *et al.*, 2005b) serviram como ponto de

partida para análises mais refinadas na busca de indícios sobre a real função de proteínas homólogas a fatores de iniciação da tradução. Uma vez que a regulação da expressão gênica nestes parasitas é predominantemente pós-transcricional e que a tradução pode ter um papel crítico neste processo, alguns trabalhos vêm se detendo na caracterização funcional de homólogos das subunidades do eIF4F e da PABP no controle da expressão gênica de tripanossomatídeos.

2.5.1 PABPs

Homólogos da PABP em *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* já foram descritos anteriormente (BATISTA *et al.*, 1994; PITULA *et al.*, 1998; BATES *et al.*, 2000). O primeiro homólogo identificado foi a PABP1 de *T. cruzi*, codificada por dois genes adjacentes, e expressa constitutivamente durante o ciclo de vida do parasita (BATISTA *et al.*, 1994). O ortólogo em *T. brucei*, também é codificado por dois genes e apresenta 86,4% de identidade com a proteína de *T. cruzi* (HOTCHKISS *et al.*, 1999). A proteína PABP1 de *L. major*, designada aqui como *LmPABP1*, é codificada por apenas um gene e também é expressa constitutivamente durante o ciclo de vida do parasita. Ela é representada por duas isoformas, onde uma delas é fosforilada, com predominância de localização citoplasmática. Ensaios de complementação demonstraram que a *LmPABP1* não é capaz de reverter a letalidade causada pela deleção da *pab1p*, em *Sacharomyces cerevisiae*. Surpreendentemente a *LmPABP1* é apenas 35% idêntica aos homólogos de PABP descritas em espécies de *Trypanosoma* - um nível de identidade comparado ao observado entre a proteína de *Leishmania* e a PABP humana (36% de identidade) (BATES *et al.*, 2000).

O ortólogo da PABP2 de *T. cruzi* interage diretamente com a *TcUBP-1*, uma proteína que se liga à 3' UTR de mRNAs com regiões ricas em repetições dos nucleotídeos AU (AREs), que são seletivamente desestabilizados durante o estágio tripomastigota do parasita (D'ORSO e FRASCH, 2002). No tripanossomatídeo *Crithidia fasciculata*, o ortólogo da PABP2 faz parte de um complexo que reconhece sequências presentes nas regiões não traduzíveis de mRNAs que acumulam-se, periodicamente, durante o ciclo celular (MITTRA e RAY, 2004). Análises de bioinformática após conclusão do projeto genoma dos TriTryps confirmaram que espécies do gênero *Trypanosoma* apresentam dois homólogos de PABP (PABP1-2), e que *L. major* apresenta um terceiro homólogo (*LmPABP3*) adicional (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010).

A caracterização funcional dos três homólogos da PABP encontrados em *L. major* (*LmPABP1-3*) indica que eles tenham desenvolvido funções divergentes, apresentando propriedades distintas de ligação ao mRNA e a outras proteínas, onde a *LmPABP1* estaria mais relacionada com o processo de iniciação da tradução; enquanto que *LmPABP2* e *LmPABP3* teriam outras funções relacionadas ao metabolismo dos mRNAs (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010).

2.5.2 EIF4As*

Um homólogo ao eIF4A, denominado de LeIF, foi descrito inicialmente em *L. brasiliensis* e *L. major*. O LeIF se mostrou expresso constitutivamente nos estágios infectivos do inseto e do mamífero e suas características imunológicas foram avaliadas, não tendo sido investigado o seu papel na tradução (SKEIKY *et al.*, 1998). Posteriormente, além do LeIF (também denominado de *LmEIF4AI*) foi identificado um segundo homólogo ao eIF4A, o *LmEIF4AIII*. Ambos apresentam uma identidade de 59% e 52%, respectivamente, em relação ao eIF4AI humano e possuem ortólogos em *T. brucei*. Estas proteínas variam quanto ao seu nível de expressão na forma promastigota, sendo o *LmEIF4AI* muito abundante, com níveis acima de 10^5 moléculas/célula, enquanto o *LmEIF4AIII* é ausente ou está presente em níveis abaixo de 10^4 moléculas/célula (DHALLIA *et al.*, 2005). Em outro trabalho, a proteína *LmEIF4AI* mostrou ter função ATPase dependente de RNA, e apesar da alta homologia em eucariotos, esta proteína não pôde complementar *in vivo* a função do eIF4A de levedura nem o de mamífero, *in vitro*. Ainda neste trabalho, foi visto que a superexpressão do *LmEIF4AI* inibe o crescimento celular em levedura, por provavelmente sequestrar proteínas envolvidas com a tradução, sendo demonstrado sua interação direta com o eIF4G de levedura (BARHOUMI *et al.*, 2006). Dentre os dois ortólogos de *T. brucei*, *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII*, apenas o

* Nota: os homólogos do complexo eIF4F e da PABPs seguem a nomenclatura genética unificada adotada para tripanossomatídeos (Clayton *et al.*, 1998), a qual seguiu alguns dos princípios adotados para *Saccharomyces cerevisiae*:

1 – Genes selvagens devem ser escritos em letras maiúsculas e em itálico, podendo variar de três a seis letras, ex. *DHFRTS*;

2 – Genes múltiplos relacionados, mas não idênticos, podem ser nomeados com letras ou números adicionais, sem necessidade de hífen, ex. PGKA e PGKB;

3 – Os produtos proteicos devem possuir as mesmas designações dos seus respectivos genes, sem usar itálico, ex. DHFRTS;

4 – A natureza do organismo pode, em casos de comparação com outras espécies ou subespécies, ser indicada como prefixo e este deve ser em itálico, ex. *LmDHFRTS* (referente à espécie *Leishmania major*).

primeiro parece estar envolvido com a formação do complexo eIF4F da iniciação da tradução e especula-se que o *TbEIF4AIII* faça parte de algum mecanismo de degradação de mRNAs, sendo funcionalmente equivalente ao eIF4AIII humano (DHALLIA *et al.*, 2006). Recentemente foram isolados em tripanossomatídeos dois componentes funcionais (Mago e Y14) do complexo de junção dos éxons (EJC) presente em humanos. Surpreendentemente, o homólogo do eIF4AIII não foi detectado junto ao complexo, necessitando estudos mais aprofundados para confirmar sua função nos tripanossomatídeos (BERCOVICH *et al.*, 2009).

2.5.3 EIF4Es

Com relação aos homólogos do eIF4E, quatro proteínas têm sido investigadas em tripanossomatídeos (YOFFE *et al.*, 2004; DHALLIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2006). Nenhum dos quatro homólogos (*LmEIF4E1-4*), entretanto, é capaz de complementar a função do eIF4E de levedura (YOFFE *et al.*, 2006), sendo que o *LmEIF4E1* também não pôde complementar a função do eIF4E de mamíferos (YOFFE *et al.*, 2004). *LmEIF4E1* e *LmEIF4E4* se ligam ao *cap* monometilado clássico (YOFFE *et al.*, 2004; DHALLIA *et al.*, 2005) e ao *cap4* de tripanossomatídeos (YOFFE *et al.*, 2004), enquanto que o *LmEIF4E2* liga principalmente ao *cap4* e o *LmEIF4E3* liga fracamente ao *cap* monometilado (YOFFE *et al.*, 2004). A partir da resina m⁷-GTP Sefarose, as proteínas *LmEIF4E1* e *LmEIF4E4* foram purificadas juntamente com *LmEIF4G3* a partir de extratos de *L. major* e foi demonstrado que, em gradientes de sacarose, estas proteínas estão associadas aos polissomos e à fração contendo a subunidade ribossomal 40S (YOFFE *et al.*, 2009). Estudos envolvendo os ortólogos destas proteínas em *T. brucei* demonstram que várias características são mantidas nesta outra espécie, entretanto o perfil de ligação com os homólogos da subunidade eIF4G pode ser diferenciada. Além disso, os homólogos foram separados em dois grupos: o primeiro, com proteínas de distribuição nuclear e citoplasmática e sem nenhum indício de envolvimento na biossíntese proteica (*TbEIF4E1* e *TbEIF4E2*) e o segundo grupo, com proteínas de localização restrita ao citoplasma (*TbEIF4E3* e *TbEIF4E4*) e com resultados de RNAi e marcação metabólica condizentes com uma possível atuação como fatores de iniciação da tradução (FREIRE *et al.*, 2011). Mais recentemente, foram identificadas em *L. major* duas novas proteínas entre os possíveis homólogos ao eIF4E de eucariotos, denominados *LmEIF4E5* e *LmEIF4E6*, com os respectivos ortólogos em

T. brucei. Entretanto, ainda não existem muitos dados de caracterização referentes a estas proteínas (FREIRE, dados não publicados).

2.5.4 EIF4Gs

Usando a proteína humana eIF4G1 como parâmetro de busca e com o auxílio da ferramenta BLAST foram encontradas cinco proteínas contendo o domínio central do eIF4G em bancos de dados do genoma de *L. major*, que foram denominadas *LmEIF4G1* a 5. As cinco proteínas variam significativamente em tamanho (1016, 1425, 635, 765 e 782 aa), carga geral (positiva no *LmEIF4G1* e negativo nas demais) e na localização do domínio conservado HEAT-1/MIF4G. Ambos os genes *LmEIF4G1* e *LmEIF4G2* são localizados no cromossomo 15, enquanto os genes *LmEIF4G3*, *LmEIF4G4* e *LmEIF4G5* estão localizados nos cromossomos 16, 36 e 10, respectivamente. Nenhum domínio óbvio para ligação ao eIF3, ao eIF4E ou à PABP foi identificado baseado apenas na homologia das sequências, entretanto todas as sequências apresentam o domínio HEAT-1/MIF4G. As sequências não compartilham outras semelhanças, com exceção dos *LmEIF4G3* e 4. Estas duas proteínas mostram uma região N-terminal curta e uma região conservada de aproximadamente 120 aminoácidos localizada cerca de 180 aminoácidos após o domínio MIF4G, com similaridade aos dois outros domínios HEAT do eIF4G1 humano (HEAT-2/MA3 e ou HEAT-3/W2) (Figura 7) (DHALIA *et al.*, 2005).



Figura 7. Esquema dos homólogos do eIF4G de *Trypanosoma brucei* e seus principais domínios. A região mais conservada das proteínas, semelhante a outros organismos, é o domínio MIF4G (listras vermelhas). Os homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* aparentemente são funcionalmente relacionados, uma vez que, além do domínio HEAT-1/MIF4G, ambos possuem uma região N-terminal curta e uma região conservada de 120 aminoácidos na região C-terminal (listras azuis) que poderia ser um segundo domínio presente em eucariotos, o HEAT-2/MA3 ou o HEAT-3/W2 (ou ambos).

Em um ensaio preliminar, uma proteína recombinante truncada contendo apenas o domínio HEAT-1/MIF4G do *LmEIF4G3* foi capaz de se ligar especificamente à proteína *LmEIF4AI* *in vitro* (DHALIA *et al.*, 2005). Recentemente, foi mostrado que a incubação de extratos celulares de *L. major* com a resina m⁷GTP-Sefarose permitiu a purificação das proteínas *LmEIF4E1* e *LmEIF4E4*, assim como a coeluição das proteínas *LmEIF4G3* e *LmEIF4AI*. Estas interações foram confirmadas a partir da imunoprecipitação da proteína *LmEIF4G3* em fusão com FLAG, expressa em células transgênicas de *L. major*. As proteínas *LmEIF4G3*, *LmEIF4E1* e *LmEIF4E4* foram encontradas ainda em frações polissomais indicando a formação de pelo menos um complexo eIF4F nos tripanossomatídeos (YOFFE *et al.*, 2009).

Através de ensaios de *pull down in vitro*, dos cinco homólogos do eIF4G em *L. major*, apenas o *LmEIF4G5* não se ligou à proteína *LmEIF4AI*, entretanto apenas as proteínas *LmEIF4G3* e 4 foram capazes de se ligar aos homólogos do EIF4E de *Leishmania*, mostrando que, a princípio, formam-se pelo menos dois complexos eIF4F nestes parasitas (REIS, 2009). O mesmo trabalho mostrou que a proteína *LmEIF4G3* interage forte e especificamente, com as proteínas *LmEIF4AI*, *LmEIF4E4* e *LmPABP1*, todas interações esperadas para a proteína eIF4G - arcabouço do complexo eIF4F. Embora a proteína *LmEIF4G4* apresente uma ligação mais reduzida ao *LmEIF4AI* e a *LmPABP1*, sua interação com o *LmEIF4E3* foi considerada forte e específica.

Na tentativa de identificar os resíduos de aminoácidos responsáveis por essas interações foi descrito recentemente, por meio de ensaios de duplo híbrido, que o *LmEIF4G3* liga-se ao *LmEIF4E4* através de sua região N-terminal e que um motivo formado pelos aminoácidos YPG**F**SLD seria responsável por essa interação, visto que a mudança do Y, F, ou L por A, individualmente, aboliram a interação com o *LmEIF4E4* (YOFFE *et al.*, 2009). Ensaio de *pull down in vitro* confirmaram o envolvimento de alguns destes resíduos na interação do *LmEIF4G3* com o *LmEIF4E4*. De forma intrigante, apesar da região FSL ser conservada nos homólogos EIF4G3 e EIF4G4 dos *Trypanosoma*, mutações pontuais nesta sequência foram capazes de abolir a interação entre *LmEIF4G3/LmEIF4E4*, porém não afetou a interação *LmEIF4G4/LmEIF4E3*. Entretanto, uma análise detalhada da sequência dos ortólogos do EIF4G4 indicou um novo motivo M/F/YXXXXI/LL, onde os resíduos IL quando modificados são capazes de abolir a interação *LmEIF4G4/LmEIF4E3* (Figura 8) (MOURA, 2007; REIS, 2009).

TbEIF4G3	1	-----MH	VYIDITTEL	RSLYPEP-EY	ECFSLSEACR	RKKQTQT---	KLVRGPN	AWAARG-SAK	TTAEWVERIV	YGSLNKLISAA	*****
TcEIF4G3	1	-----MH	VYSIQIIEV	BSMYKDA-EY	ECFSLSEACR	RKKMTQT---	KLVRGAN	AWVARG-SAR	TTAEWVERIV	QGSLNKLSTA	
LmEIF4G3	1	-----M	QFVEQHRSV	RNNYLEP-EY	ECFSLDEVVR	RRRLTQT---	KLVRGEN	AWVARG-TAQ	TTAEWVERIV	HCLNKLKTEE	
TbEIF4G4	1	MLFKPRGVTS	NDPRYAGGSR	LMSVSDLLAY	ROTWRGRPPT	ESFSLAQIDR	DARAADCKPV	VTEKLVMSEN	GFKVKSRSI	DSLGRGVRAV	QSALNKLTEW
TcEIF4G4	1	MLFKPRGVTS	NDPKYAGNSR	IMLIPDDLAY	ROTWRGRPPT	DDFSLGRILF	AARAASKSPA	APEKLVMTSN	GFKVKDRDIT	APSERGVRAV	QSLNKLITES
LmEIF4G4	1	MLFNLRGIVP	QKEEKVKN--	QMLADILAF	ROTWTAT-EE	ENFSLERVL	TARLEKORKA	EIPKLVTSN	GERVDRKDM	DASELELRV	QGSLNKLTDK

TbEIF4G3	75	NFNETVSQLO	INTIFSSDEM	LKKTVSITFN	KALCEPENS	VYAGLCYKLA	EYVSLNVVQ	KQ-----	KEGKRISKLR	NAVVGIACTE	
TcEIF4G3	75	NFDMDVAKLO	DEVIFSTKET	LNIAVRILEK	KALDEPECCK	SVAGVCYKLA	EEVVGITAAK	OK-----	AEGKYSKLR	NAVVGIACTE	
LmEIF4G3	74	NFDIMIDKLE	TKELFATEDI	MNMVNIIEK	KALDEPENS	LYAGVCHSLA	LYEAKVLRDG	HK-----	GE-RPQSQR	DALISTACHE	
TbEIF4G4	101	NFDVVQTVL	EPDIIINNEV	VKDVRILIME	KALMEPVFAG	LYARMCHSIV	RESEYRTKF	LP-----	GTQVPSAVR	VAIVKCCQM	
TcEIF4G4	100	NFDLIAKAL	VPEIILNANV	VADVRLIYD	KALMEPVFAG	LYARLCVMIV	RYEYDYRSTQ	SG-----	EVDAAQSEVR	VAIVKCCQM	
LmEIF4G4	98	NFDVAVVEAL	SPDLVLNPLV	LKGAVDIIFN	KAMAEVFSG	LYALQCORIK	VYEODLVAEA	AENPTSELGQ	LMAAVQAGDE	DQKNVNGRVR	NALVKKRCQEF

TbEIF4G3	157	FNRR-RNVPS	SEGLSEEEVE	QQRSSFMRRK	VANMRFGCEI	FLHKVLSHST	MMDIINIIMQ	P---EKGGY	PASEDELEFLT	VLFITVCKSL	DSIA-----
TcEIF4G3	157	FLSR-RKMP	MEGLTEEEVE	LRRITTFMRRK	RANMKFGCEI	EMHKVLSCNT	MMNIQTIMQ	EA---ERGGY	PTSEDELEFLT	EDFLITGSEL	DAVP-----
LmEIF4G3	155	PRTLSEKLSK	MEKSEEEVE	YERSNVMRRK	RNNMRFGCEI	YLCTALHST	MFTVMDLTMR	CS---DKTGF	PSENTEELLA	ALNTITGDLR	DKN-----
TbEIF4G4	183	FTNAVEESK	-QTMSEEEAE	RLR---KRN	VNNMKFAGEL	FLKSLITQKI	IDRLNERNIY	E---MV	PNDMELEVII	NLEVVGKLY	EENK-----
TcEIF4G4	182	FDGATKAVR	-ETASEEEAE	KVR---KRN	VNNMKFAGEL	FLKSLITQKI	IDRLNERNIY	E---MV	PNDMELEVII	NLEVVGKLY	EENK-----
LmEIF4G4	198	HDSFVKQP--	-PPRNAEAE	QLR---KRN	MANMKFVGEI	YMRSLISHRV	LLAVCSTALV	LGFIPSPKLV	TTDADLEMMV	SLMNVIGKRF	DENAGMALNH

TbEIF4G3	245	-----ELRP	KLDAYFKVDE	GLK-DQK-IV	PPRIQCKMLD	LIEDRDRNM	ESR-----	-----	-----	-----	ET
TcEIF4G3	246	-----ELRV	RLNGYFELDE	KLK-DQKEVY	PPRIQCKMLD	LIEDRSKFMW	ERR-----	-----	-----	-----	AT
LmEIF4G3	244	-----HKK	TLDPYETSTDE	NFNKSDCPY	PPRIQCKMLD	LIEDR-KRGW	GLPKPKV--	-----	-----	-----	KA
TbEIF4G4	263	-----PD	AQQLNKLMS	SMQ--ENRRY	SMRIREFLLQ	LIEDR-NGGW	KPBEPEQVIV	EDIQSQQQPQ	QSQSQQQQQQ	-----	QQ
TcEIF4G4	262	-----PA	AQPALNKLMS	ELQ--EERRE	SMRIREFLLQ	LIEDR-NGGW	KPBEPEQVIV	EDPQ-----	-----	-----	QQ
LmEIF4G4	291	VPKDAAAAH	PHDTINRAIN	SSM--NDRRE	SMRIREFLLQ	LIEDR-NDGW	KPBEPEQVIV	EDPQ-----	-----	-----	QQ

TbEIF4G3	293	VMPKTSAAQ	K---EPPRA	SDRAVRSSTT	P-----	-----	-----	-----	-----	-----	ET
TcEIF4G3	295	AAPKTSAAQ	R---EPTRV	TDKVVATRS-	-----	-----	-----	-----	-----	-----	AT
LmEIF4G3	296	ALPSPSHKPK	KYATAPPKK	GGRDQGSAAA	A-----	-----	-----	-----	-----	-----	KA
TbEIF4G4	335	QSQSQQQPQ	QSQSQQKHSQ	QQRHQQSFPH	HNQPSQSHGQ	QHQPFPFPFP	PRNSYQHTP	CMKCGSYHE	VSSSLGMGGR	CSQSTNDLTR	GGSYNNMPPP
TcEIF4G4	324	QSQSQQQPQ	RYHFHHHHHQ	QQHQHQHQHQ	HHQQ-----	-----	-----	-----	-----	-----	QQ
LmEIF4G4	388	MHRNTAPNNF	GGSGSWQQQM	QQHSGGRGP	IIGSSNAGN	RGGRTPPSMA	DRGDEKYGRG	CGPGCLRQGP	VSSPNDLSQF	PASNDHMMPP	PPFFAAPPFP

TbEIF4G3	362	-----AWRD	VVKSEIVACD	DHEMTVTSV	AFBFRVRSLE	QEWLSGYRTG	CLPNQOEFR	DCGARIPDM	DLPTAVAAQV	VREACMTTRK	
TcEIF4G3	360	-----SWSN	VVKSPQSPRD	ATVARAVETV	NFBFRVRSLE	QEWVLECSND	FIPEMNEFR	HCQRHFDSED	ALCKAAAEVV	VREACMTTRK	
LmEIF4G3	374	-----STAA	ATAPAGASFR	DEASPOVPLV	KFBFRVRSLE	QEWVADRTND	VILHVDQFN	TCDRFFSES	ELCVAVAEV	IHSACTTRK	
TbEIF4G4	434	-----AHGFS	SRLAPEERKR	LNFAFPAPQ	LEEFKKNIFE	IVRDAEAEEM	ADPEGMKQVL	N-ALVQDSN	APISEVSYYV	TLIRALMDAN	
TcEIF4G4	409	PP-----P	PPTLQYAGVE	EQLSVDERKL	IVLARPPETI	TEEVERNIER	IARDVDEGL	PNRDITNDL	SRVLGNESS	SQSLMTSVYV	TLIRALMDAN
LmEIF4G4	488	FPGEIGMPPS	MAPQAASAPG	PQMSDEDRKL	MALSTPPKCV	DADSSRIIS	CIRDAHTDGD	WAAAGKATVE	A---VPDAA	HMCRCMAVEV	LAKKVTETSS

TbEIF4G3	447	DAQCBASRLM	VIGLFLEDDQ	VFNCFARALS	SAIEEGILED	VPKFSERFAN	MLRFSQD--	-DVKTQVYD	AVRVLTATG	MLRDPDEMSL	STLMEFWCKI
TcEIF4G3	445	EAQCBASSFL	IVGLFLEDDQ	VLDGFAFALV	SAIEEGILED	VPKFSERFAN	MLRFSQD--	-NTVADVYD	AVRVLTATG	LMREPDEMVL	DTMMEFWCKI
LmEIF4G3	459	DAQCBASFPL	VVGLFIMIDTE	VFDGCFASALA	SAIEDGLLED	VPKFSERFAN	MLRFSQD--	-ETRADVYD	AVRVLTATG	RLESPPDSAV	DTLMSFWDRV
TbEIF4G4	520	BSERKLLLSV	LQKGSFENHI	LTRGFSWALA	KIHSDDRCDD	CPRIYARDAE	AVWSIPSFNF	RCVTRQIVSR	TALIGALSIV	EYE-SEGWE	EDFIAVWENI
TcEIF4G4	502	BSERKLLLSV	LESNWNERSI	LGRGFACWLT	KIHAERDVAF	CPRIYARDAE	VVTRVTELNF	LCVTRQILAR	TARVLDVLQV	VYD-ETEWE	EDFIAVWENI
LmEIF4G4	585	BAQCBASRLM	INSQMFIDKE	LTRGYSWCLT	SAVAVNWKED	CPRIYARDAE	CVVATKSMDF	LSMVSNVVAR	TANVLDALIV	PUEGACMEWE	EDFIAVWENI

TbEIF4G3	544	PPP-EKKED	-AIFSLPVVQ	SLVTMTKL--	GRAQITGHII	SSLHANGLVD	DATHEMLGT	PGGE-VDAEV	KDAFRKATVG	KGTLT	
TcEIF4G3	542	PRP-ATDEN	-AVLPLQVQV	SLVEMSTR--	GOAPLTGRII	ASLHSLGLVH	DETREMLAT	PHEE-TSAEV	VEAFKKANK-	-----	
LmEIF4G3	557	PLP-STDEN	MIRMDLDVVY	SLCNPEGVQD	GLEKLLSRII	HSMQLQMLD	AEVLEFLCL	DVEDGLCAK	IADYKKEFPK	-----	
TbEIF4G4	619	VTASETGROG	ESKPSVADMM	ESTAPSCVTP	FMCNVLPDFV	AVMVQARFFT	EEELGATRNK	NKDNSKVFSL	LEELSUYIA-	-----	
TcEIF4G4	601	LVA-----RQA	PNKVTAESM	ESMSFTRLGS	FLRGILPDFV	ASMVQARFFT	EEELGATRNK	NKDNSKVFSL	LEELSUYIA-	-----	
LmEIF4G4	685	LQKWEHAFG	D-KSTGSDIL	NCTASIKQRP	FMKDIQVDFV	MELSQQGYLD	DAETKTIRE	NRTNEKYKVF	VDQMEQMYPD	TA---	

Figura 8. Alinhamento múltiplo comparando as sequências dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* de *Trypanosoma brucei*, com seus ortólogos de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*. Presença dos motivos IL e FSLXXXX na porção N-terminal (setas simples), sugerido como possível sítio de ligação à subunidade eIF4E. A região de conservação indicada pelos asteriscos é referente ao domínio HEAT1-MIF4G. O outro possível domínio HEAT2-MA3 está destacado na caixa em preto, caracterizando outra região com alguns resíduos conservados. Destaque também para os resíduos de triptófano encontrados na região C-terminal, como possíveis constituintes de um domínio HEAT2-W2 (setas duplas). Os resíduos conservados estão destacados em preto e os com conservação moderada em cinza. Modificado a partir de Moura (2007).

O estudo dos ortólogos de três destas proteínas de *T. brucei* (*TbEIF4G3* a 5) permitiu o uso preliminar de abordagens *in vivo* para caracterização das mesmas. Através da técnica de interferência de RNA, foi possível observar que as três proteínas são essenciais à viabilidade do parasita, mas os perfis de crescimento das culturas

após indução do RNAi mostraram-se diferenciados, onde a depleção do *TbEIF4G3* resultou num fenótipo mais pronunciado, com morte das células logo após 24 horas. A análise da superexpressão destes homólogos em fusão à proteína fluorescente amarela (eYFP) mostrou que todas possuíam localização citoplasmática, compatível com um possível papel na tradução (MOURA, 2007). Os dados obtidos em *L. major* e em *T. brucei* até o momento indicam EIF4G3 e EIF4G4 como os homólogos funcionais envolvidos na etapa de iniciação da tradução dos tripanossomatídeos.

2.6 *Trypanosoma brucei* como modelo experimental para estudos de genética reversa

A produção de vetores capazes de expressar proteínas heterólogas com propriedades particulares é um dos pontos centrais de análises pós-genômicas em vários organismos. *Trypanosoma brucei* é o modelo experimental mais utilizado para o estudo dos protozoários kinetoplastídeos patogênicos e possui o repertório mais avançado de ferramentas para análises de genética reversa disponível para protozoários. A grande maioria dessas ferramentas tem como vantagem a predominância da ocorrência de recombinação homóloga em *T. brucei*, que permite a construção de vetores para *loci* genômicos específicos (KELLY *et al.*, 2007). As técnicas de genética reversa nestes organismos se tornaram mais sofisticadas a partir do desenvolvimento de linhagens de *T. brucei* modificadas que expressam o repressor de tetraciclina (TetR), o que facilitou a expressão regulada de transgenes (WIRTZ *et al.*, 1999) e posteriormente, de linhagens que expressavam conjuntamente ambos TetR e a T7 RNA polimerase viral (T7 RNAPol), permitindo que os transgenes fossem transcritos e expressos em níveis elevados (WIRTZ *et al.*, 1999). Essas mesmas linhagens também são utilizadas em outra ferramenta importante de análise pós-genômica que envolve o estudo da função gênica baseado na interferência de RNA (RNAi), cuja maquinaria se encontra presente neste organismo, mas não em *T. cruzi* (SHI *et al.*, 2000; SUBRAMANIAM *et al.*, 2006); e onde só foi identificada recentemente em espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (LYE *et al.*, 2010).

Contribuindo ainda em estudos pós-genômicos, a expressão de transgenes fusionados a diferentes peptídeos ou fragmentos protéicos marcadores (*tags*) tem

permitido a análise da função de proteínas individuais em diferentes organismos. Estes *tags* adicionam propriedades de interesse às proteínas-alvo, facilitando seu estudo, como por exemplo, deixando-as fluorescentes, o que permite a sua localização subcelular em células vivas, ou ainda facilitando sua purificação através de resinas ou anticorpos específicos, o que otimiza a purificação de complexos protéicos e, quando aliada à espectrometria de massa, permite a identificação de parceiros funcionais. Nos últimos anos, o estudo em *T. brucei* tem sido facilitado pelo desenvolvimento e descrição de vários vetores para a expressão de transgenes, tanto na forma constitutiva quanto na forma induzida, sob o controle de promotores específicos e com direcionamento para *loci* ectópicos e endógenos (KELLY *et al.*, 2007).

Aliados ao uso de *tags* nas técnicas de genética reversa, ensaios utilizando genes repórteres, cujos produtos podem ser detectados e/ ou medidos, têm sido amplamente utilizados no estudo de expressão gênica e de eventos celulares ligados à expressão gênica. A grande característica dessa abordagem é que um bom gene repórter pode ser facilmente identificado e sua expressão avaliada quantitativamente. Um desses exemplos é a utilização de repórteres cujo produto é proveniente de uma reação de bioluminescência. A bioluminescência é encontrada em vários filos, incluindo celenterados, equinodermos e insetos, entretanto, poucas destas reações foram completamente caracterizadas. Dentre as reações caracterizadas, duas incluem enzimas luciferases distintas. A luciferase do vagalume *Photinus pyralis* (*firefly luciferase*) utiliza a luciferina como substrato luminescente, enquanto que a luciferase do cnidário *Renilla reniformis* (*Renilla luciferase*) utiliza a coelenterazina. A vantagem do uso da bioluminescência inclui o fato de ser um ensaio de 10 a 1000 vezes mais sensível que o uso de repórteres fluorescentes como a GFP, o que melhora consideravelmente o desempenho de ensaios aplicados a amostras de sistemas biológicos complexos (LESKINEN *et al.*, 2003; ALLARD e KOPIH, 2008). Vários ensaios utilizando vetores contendo o gene repórter da luciferase em *T. brucei* têm sido descritos para avaliação da expressão gênica, entretanto a grande maioria utilizam cotransfecção e análise de fenótipos transientes como abordagem (WEBB *et al.*, 2009; DAS e BELLOFATTO, 2009).

Atualmente, a geração de novos vetores de transfecção e modificações nos vetores mais antigos, além de melhorias nas técnicas de transfecção, têm sido realizadas em tripanossomatídeos na tentativa de melhorar a disponibilidade de sistemas para obtenção de bibliotecas de RNAi e de novas linhagens celulares para o

desenvolvimento de ensaios de identificação de genes importantes envolvidos nos mais diversos processos celulares (BATISTA *et al.*, 2010; SCHUMANN BURKARD *et al.*, 2011; ALSFORD *et al.*, 2011). Recentemente, um sistema utilizando um repórter bicistrônico com expressão das luciferases de vagalume e de *Renilla* foi desenvolvido para análise de elementos regulatórios envolvidos na regulação pós-transcricional de *T. cruzi*, confirmando a importância de algumas sequências regulatórias presentes nas UTRs deste parasita (ARAÚJO *et al.*, 2010).

2.6.1 Repórteres traducionais para avaliação da função de homólogos de fatores de iniciação da tradução em *T. brucei*

Vários ensaios convencionais já foram utilizados na caracterização funcional dos múltiplos homólogos do complexo eIF4F de tripanossomatídeos (DHALLIA *et al.*, 2006; YOFFE *et al.*, 2009, FREIRE *et al.*, 2011). Os resultados obtidos nos trabalhos citados foram importantes para selecionar alguns deles como possíveis homólogos funcionais envolvidos na tradução, entretanto, a falta de um ensaio *in vivo* específico que confirmasse a função real destas proteínas até o momento não permitiu a finalização da caracterização funcional das mesmas. Enquanto o ensaio utilizando um repórter monocistrônico poderia avaliar de forma mais geral a influência da expressão ou *knock down* de proteínas na expressão gênica global, o ensaio com um repórter bicistrônico pode avaliar de forma mais direta a capacidade de proteínas em recrutar a maquinaria de tradução, sendo assim, mais específico.

2.6.1.1 Repórter traducional monocistrônico

O monitoramento dos níveis de expressão da enzima luciferase tem sido amplamente usado como repórter da função de proteínas envolvidas no metabolismo de RNAs. Proteínas da família eIF4G têm sido avaliadas utilizando este tipo de repórter e os resultados têm mostrado a influência direta destas proteínas na expressão gênica, sendo possível identificar proteínas que atuam inibindo ou estimulando a tradução. Um exemplo é o estudo da proteína p97 (DAP5), que possui homologia à porção C-terminal do eIF4G (IMATAKA *et al.*, 1997). Através de ensaios utilizando o mRNA da luciferase como repórter, foi possível identificar sua função como estimuladora da tradução em

células de humanos e ainda mapear os seus domínios funcionais (LEE e MCCORMICK, 2006).

2.6.1.2 Repórter traducional bicistrônico (baseado na técnica de *tethering*)

Um ensaio funcional baseado na técnica de *tethering* (que aqui traduzimos como ancoramento) é um método destinado a acessar o papel de uma proteína ligadora de RNA sobre o metabolismo de um RNA repórter. A maioria das proteínas que estão envolvidas no controle de mRNAs poderão se ligar ao RNA e desempenhar uma função, diretamente ou como parte de um complexo multiprotéico. Assim, a base do ensaio é ancorar uma proteína de função desconhecida a um RNA repórter, usando uma interação proteína-RNA conhecida como âncora, e subsequentemente, acessar os efeitos dessa proteína sobre este RNA repórter (MINSHALL *et al.*, 2010).

Uma das principais interações proteína-RNA (âncoras) usada nesses ensaios é a λ N-(1-22)/boxB. A designação λ N-(1-22) corresponde aos 22 primeiros aminoácidos do antiterminador transcricional N do bacteriófago λ , que reconhecem especificamente uma pequena sequência de RNA (19 nt) em forma de grampo, denominada boxB. Fusões de uma proteína de interesse ao peptídeo λ N-(1-22) podem levar ao seu recrutamento artificial a um mRNA-alvo contendo um ou mais grampos boxB, permitindo uma análise independente de suas funções (ECKHARDT *et al.*, 2011). Outras âncoras utilizadas são baseadas nas interações da proteína de superfície do bacteriófago MS2 (MS2/RNA) e da proteína de ligação ao elemento responsivo ao ferro (IRE/IRP) (revisto por COLLIER e WICKENS, 2007).

Atualmente, a técnica de ancoramento é amplamente usada para estudo de várias proteínas ligadoras de RNA em estudos como: avaliação funcional de fatores de tradução, papel das proteínas Argonautas na repressão traducional, função da PABP no mecanismo de decaimento de mRNA (mRNA *decay*), análise de proteínas envolvidas no *splicing* (ECKHARDT *et al.*, 2011; TSUBOI e INADA, 2010; DELESTIENNE *et al.*, 2010), entre outros.

O ensaio de ancoramento para avaliar a função do eIF4G foi inicialmente descrito nos trabalhos de De Gregorio e colaboradores (1999), onde os autores descrevem a construção dos vetores e avaliam a capacidade da proteína eIF4GI humana em recrutar o ribossomo, além de identificar quais domínios da proteína são essenciais para que isso ocorra (Figura 9). Os autores desenvolveram vetores que

tinham a capacidade de fusionar o eIF4G humano com o peptídeo λ N-(1-22) e além disso, desenvolveram um vetor para a produção do mRNA bicistrônico, utilizando a atividade de luciferase (LUC) como parâmetro para a tradução do primeiro cistron (com *cap*) e a atividade da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT) para a tradução do segundo cístron (sem *cap*, porém com a sequência boxB). Após transfecção de células HeLa com os vetores produzidos, os resultados mostraram que o domínio λ N-(1-22) foi capaz de reconhecer a sequência boxB do mRNA bicistrônico, e que a proteína de fusão com o eIF4GI humano traduziu a enzima repórter (CAT) de forma semelhante à tradução ocorrida com a enzima LUC, confirmando assim sua capacidade de recrutar o ribossomo e os demais fatores envolvidos na iniciação da tradução e, mostrando seu papel central na síntese proteica (DE GREGORIO *et al.*, 1999; 2001).

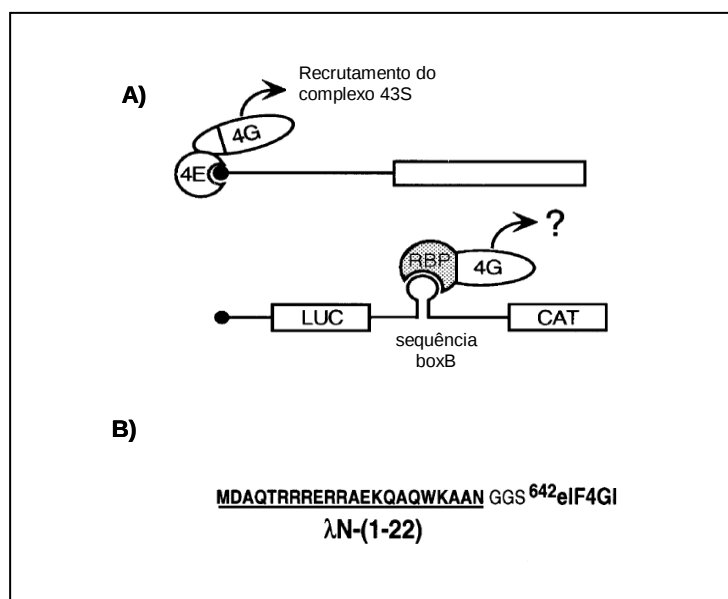


Figura 9. Esquema representativo do ensaio de ancoramento (*tethering*) para a proteína eIF4G de humanos. A) Na parte superior têm-se a representação do reconhecimento do *cap* e da ligação do eIF4G a um mRNA maduro, como parte do processo de recrutamento do complexo ribossomal 43S. Na parte inferior, está representado o mRNA bicistrônico que foi avaliado pelo ensaio, onde o primeiro cístron, com *cap*, codifica para a enzima luciferase (LUC), seguido do segundo cístron, que não apresenta a estrutura *cap*, mas contém a sequência boxB. Esta sequência boxB seria reconhecida por uma proteína de ligação a RNA (RBP - *RNA binding protein*) em fusão ao eIF4G, e assim seria possível avaliar a sua capacidade de recrutamento do complexo ribossomal 43S, seguida da tradução da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT). B) Representação da proteína de fusão, mostrando em destaque a sequência de aminoácidos referentes ao peptídeo λ N-(1-22). Modificado a partir de De Gregorio *et al.* (1999).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Investigar a participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese proteica em *Trypanosoma brucei*, através do desenvolvimento e aplicação de novas ferramentas de biologia molecular voltadas ao estudo de fatores de tradução neste organismo.

3.2 Objetivos Específicos:

- Confirmar a localização subcelular dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* através de imunofluorescência e comparar os resultados com a superexpressão dos mesmos fusionados à proteína fluorescente amarela (eYFP).
- Analisar o perfil de síntese proteica, via marcação metabólica, de células de *T. brucei* submetidas à depleção de *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*.
- Avaliar a influência da expressão ectópica das proteínas *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* selvagens e mutantes na viabilidade celular de *T. brucei*.
- Analisar *in vivo* a interação dos dois homólogos de eIF4G (proteínas selvagens e/ou mutantes) com homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F.
- Desenvolver ensaios *in vivo* para análise do papel dos fatores *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* na tradução de mRNAs-repórteres em *T. brucei*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção dos plasmídeos

Várias etapas de PCR e clonagem foram realizadas para a obtenção dos diversos plasmídeos utilizados ao longo de todo o trabalho e, para um melhor entendimento, a descrição de cada uma delas segue abaixo separadamente. Para as clonagens foram usadas células competentes de *Escherichia coli* DH10B para transformação química e obtenção de DNA plasmidial por lise alcalina, segundo Sambrook e Russel (2001).

4.1.1 Subclonagem dos genes *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*

Em trabalho anterior, os genes *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* (números de acesso no GeneDB – Tb927.8.4820 e Tb11.01.2330, respectivamente) foram amplificados utilizando oligonucleotídeos flanqueados por sítios de restrição das enzimas *Hind*III e *Bam*HI e clonados no vetor pGEMT easy (Promega) (MOURA, 2007). No mesmo trabalho, foram obtidas as construções para realização da técnica de RNAi, utilizando o vetor p2T7-177 (WICKSTEAD *et al.*, 2002). Neste trabalho, para as demais subclonagens que visavam a fusão gênica com as etiquetas de purificação HA e TY, os genes nativos e/ ou mutantes foram recuperados do vetor pGEMT easy por digestão parcial com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI e subclonados, respectivamente, nos mesmos sítios dos vetores p2477 (KELLY *et al.*, 2007) e p3927 modificado (SUNTER J, dados não publicados) – descrição com mais detalhes no item 4.1.4

4.1.2 PCR e clonagem dos genes *PAC*, *eGFP*, *sTomato*, *luciferase* e da região intergênica da proteína paraflagelar de *T. brucei* (PFR)

Para amplificação do gene da puromicina acetiltransferase (*PAC*) foram desenhados oligonucleotídeos (*forward* 5'-CCCCATGGCCGAGTACAAGCCCACG-3' e *reverse* 5'-GGGAGGCTGTTCGATCAGGCACCGG-3') contendo sítios de restrição das

enzimas *NcoI* e *StuI*, que permitiram a amplificação a partir do vetor p2678 (SCHIMANSKI *et al.*, 2005). Para o gene da eGFP foram usados os oligonucleotídeos contendo sítios de restrição para as enzimas *HindIII* e *BamHI* (*forward* 5'-AAGCTTCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGC- 3', *reverse* 5'-GGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT- 3'), para o sTomato, os oligonucleotídeos possuíam sítios de *Sall* e *BamHI* (*forward* 5'-GTCGACCCGCCACCATGGTGTCCAAGGGTG - 3', *reverse* 5'-GGATCCTTAGAGCTTATAAAGTTCGTC - 3') e para o gene da luciferase os oligonucleotídeos também continham os sítios de *HindIII* e *BamHI* (*forward* 5'-AAGCTTCCGCCACCATGGAAGACGCCAAAAAC - 3', *reverse* 5'-GGATCCTTACAATTTGGACTTTCCGCC - 3'). Os genes de ambas as proteínas fluorescentes e da luciferase foram amplificados a partir de plasmídeos contendo as regiões codificadoras, do banco de DNAs do Departamento de Bioquímica da Universidade de Cambridge. A região intergênica da PFR foi amplificada a partir de DNA total do parasita com os oligonucleotídeos (*forward* - 5'-GGATCCTGTGGCCGCAATTATTATGTAAATTG- 3', *reverse* 5'-GAGCTCGACCCGCCACCATATGGGTAGCACTCTTTTA), onde estes apresentavam sítios das enzimas de restrição e *BamHI* e *NdeI*, respectivamente.

As condições da reação de PCR foram 94 °C por 4 min para desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos (94 °C – 1 min / 50 °C – 30 s / 68 °C – 30s) e 10 min a 68°C para extensão final com a *Pfx* DNA polimerase ou o sistema *Expander High Fidelity Plus PCR System* (Roche). Os fragmentos amplificados foram purificados em kit Qiagen e clonados no vetor pGEM®T e/ou pGEM®-T Easy (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

4.1.3 Obtenção de sequências nucleotídicas sintéticas

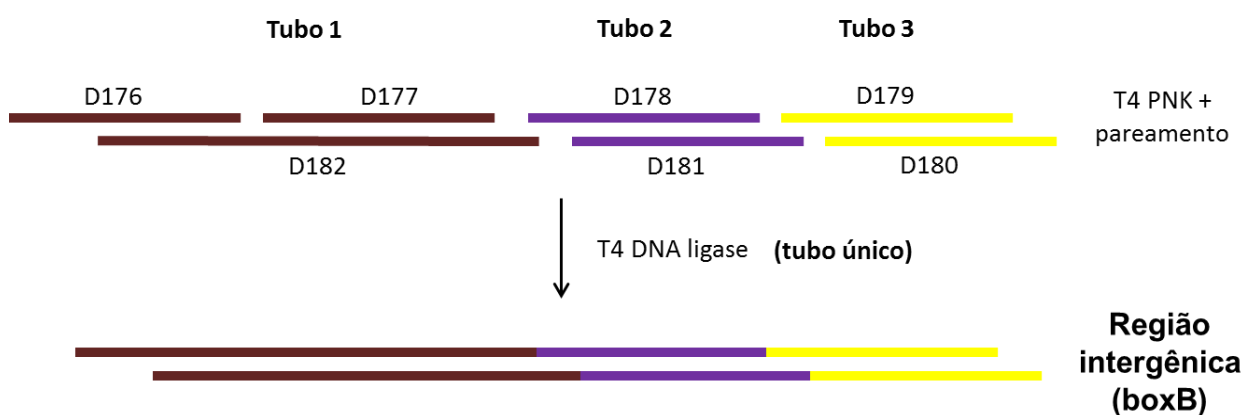
Oligonucleotídeos foram desenhados para a obtenção da sequência codificadora do peptídeo λN-(1-22) em fusão à etiqueta TY e da sequência sintética da região intergênica contendo a estrutura boxB flanqueada pelas regiões 5' e 3' UTR (Tabela 1). Para esta etapa, foi utilizado o programa GCK (*Gene Construction Kit*™ versão 2.5).

Para a montagem das sequências sintéticas, os oligonucleotídeos sintetizados foram submetidos individualmente ao tratamento com a enzima T4 polinucleotídeo

kinase (T4 PNK - New England Biolabs) a 37 °C por 30 min. A enzima foi inativada a 65 °C por 20 min, pares de oligonucleotídeos complementares foram reunidos em um tubo e a reação foi incubada a 95 °C por 5 min e então resfriada lentamente até atingir 40 °C, para que houvesse o pareamento correto dos oligonucleotídeos. Em seguida, os oligonucleotídeos já pareados foram unidos em um tubo único e a reação foi então tratada por 10 min com a enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) para a formação das sequências boxB e NpepTY (Figura 10).

Uma segunda sequência intergênica boxB foi desenhada de forma otimizada com ajuda do programa GCK e enviada para síntese comercial (www. mrgene.com).

A)



B)

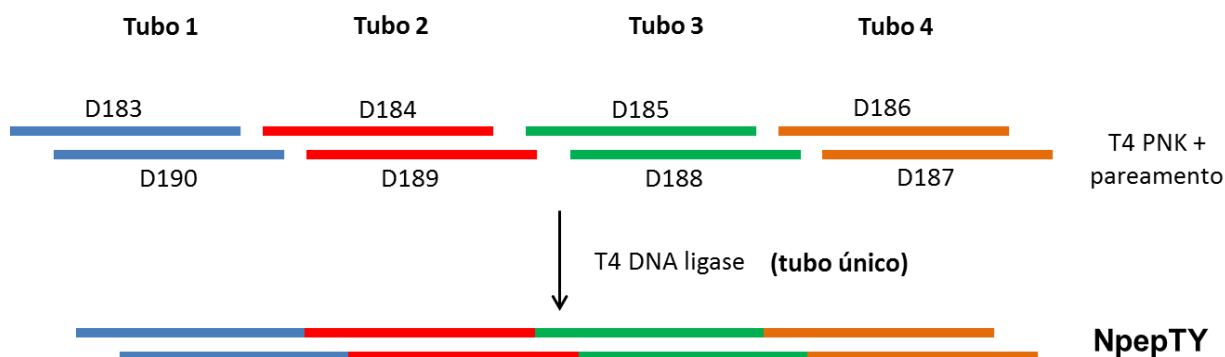


Figura 10. Esquema representando a obtenção das sequências sintéticas boxB e NpepTY. As sequências nucleotídicas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos utilizados na obtenção das sequências sintéticas boxB e do peptídeo λ N-(1-22) em fusão à etiqueta TY (NpepTY). Os nucleotídeos sublinhados correspondem a regiões de sítios de restrição que foram escolhidos para permitir a inserção nos vetores.

Região intergênica (boxB)	Oligonucleotídeos
D176	5'- <u>GATCT</u> GTCTCGTTACTGCCATAAAATAATTGTAAT-3'
D177	5'-ATTCGGGCCCTGAAG <u>A</u> AGGG-3'
D178	5'-CCCTATATGCAAACACCGGGTTGTGTGGCCAAATT -3'
D179	5'-TGTTCTCGAGTAAG -3'
D180	5'- <u>GATCCT</u> TACTCGAGGAACAAATTTGGCCACACAAC-3'
D181	5'-CCGGTGTTCATATAGGGCCCTTCTTCAGGG-3'
D182	5'-CCCGAATATTACAATTATTTTATGGCAGTAACGAGACA-3'
NpepTY	Oligonucleotídeos
D183	5'- <u>TCGAG</u> CCGCCACCATGGGTCTTGACGCGCAGACACGT-3'
D184	5'-CGTCGCGAGCGTCGCGCGGAGAAGCAGGCGCAGTGG-3'
D185	5'-AAGGCGGCAAACGGTGGTTCAGGTGGTTCAGAGGT-3'
D186	5'-TCACACAAACCAAGACCCGCTTGACGGTAGTGGCTCACA-3'
D187	5'- <u>AGCTT</u> GTGAGCCACTACCGTCAAGCGGGTCTTG-3'
D188	5'-GTTTGTGTGAACCTCTGAACCACCTGAACCACC-3'
D189	5'- GTTTGCCGCCTTCCACTGCGCCTGCTTCTCCGCGCG-3'
D190	5'-ACGCTCGCGACGACGTGTCTGCGCGTCAAGACCCATGGTGGCGGC-3'

4.1.4 Construção dos plasmídeos efetores

Para a realização desta etapa, foram realizadas modificações em um vetor convencional de expressão induzida em *T. brucei*, denominado p3927 (SUNTER J, dados não publicados). As modificações incluíram inicialmente a inserção da sequência do peptídeo λ N-(1-22) em fusão à etiqueta TY entre os sítios das enzimas de restrição *XhoI* e *HindIII*. Em seguida, foi inserido um par de oligonucleotídeos contendo um códon de parada (TAA) logo após o sítio de *BamHI* e foram realizadas as subclonagens dos genes de interesse nesse vetor, entre os sítios de *HindIII* e *BamHI*, resultando na obtenção de um conjunto de plasmídeos efetores, denominados plasmídeos da série pD (Figura 11) (Tabela 2).

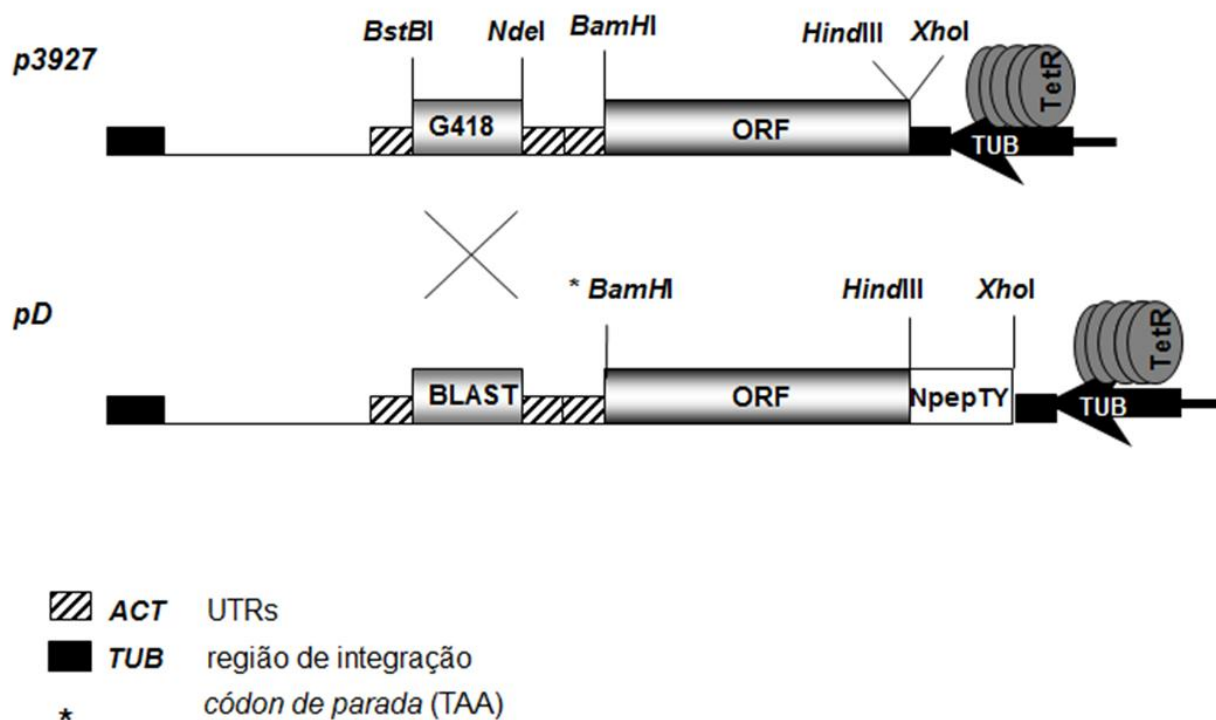


Figura 11. Esquema das modificações realizadas no vetor p3927 para a obtenção da série de plasmídeos efetores pD. Na figura estão representadas a alteração da marca de resistência ao antibiótico G418 por blasticidina (BLAST), a inserção da sequência NpepTY e de um códon de parada, para obtenção das proteínas efetoras. ACT, actina; TUB, tubulina; TetR, repressor do operador de tetraciclina.

Tabela 2. Relação dos plasmídeos efetores utilizados no ensaio de ancoramento.

Plasmídeo	Descrição
pD1	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>firefly</i> luciferase
pD2	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4G3</i>
pD3	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4G3</i> Mutante FSL
pD4	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4G3</i> Mutante LNK
pD5	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4G4</i>
pD6	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4G4</i> Mutante LL
pD7	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4G4</i> Mutante LNK
pD8	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4E1</i>
pD9	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4E2</i>
pD10	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4E3</i>
pD11	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4E4</i>
pD12	Proteína de fusão λ N-(1-22) +TY+ <i>TbEIF4AI</i>

4.1.5 Construção do plasmídeo-repórter codificando um mRNA monocistrônico

Os vetores originais utilizados nessa etapa do experimento foram pLew20 e pLew82, gentilmente cedidos pelo Dr. George Cross (Rockefeller University/NY). Inicialmente, foram realizadas a remoção do(s) operador(es) de tetraciclina da região promotora e a alteração de sítios internos das enzimas *NcoI* e *StuI* de ambos os vetores, através de mutagênese sítio-dirigida (descrita com detalhes no item 4.2). Posteriormente, a marca de seleção por antibiótico foi mudada, através da troca do gene de resistência à bleomicina (fleomicina) pelo gene que confere resistência ao antibiótico puromicina. A construção *PAC/pGEMTeasy* foi inicialmente linearizada com *Nco I* e posteriormente submetida à digestão parcial com a enzima *StuI*, devido à presença de um sítio interno da mesma enzima na região do gene. Após digestão, foi liberada a banda de 600 pb, correspondente ao fragmento de interesse, que foi subclonado nos vetores já digeridos, entre os sítios das enzimas *NcoI* e *StuI*, gerando ao final dois vetores com expressão constitutiva da luciferase, denominados *pLew20 Δ tetOpuro* e *pLew82 Δ tetOpuro* (Figura 12).

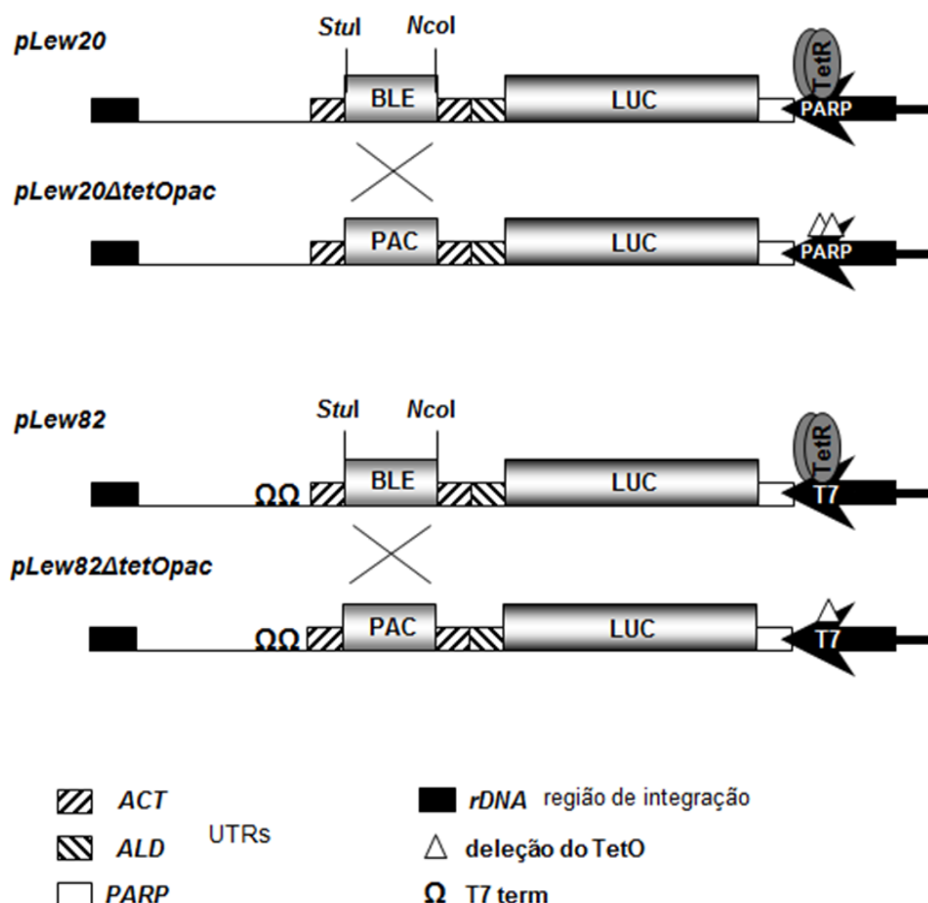


Figura 12. Esquema das modificações realizadas nos vetores da série pLew usados para a obtenção das linhagens de *Trypanosoma brucei* com expressão constitutiva de luciferase. Na figura estão representadas a alteração da marca de resistência à bleomicina (BLE) por puomicina (PAC) e a deleção dos operadores de tetraciclina presentes nas regiões promotoras. ACT, actina; ALD, aldolase; PARP, prociclina (*procyclic acidic repetitive protein*); TetR, repressor do operador de tetraciclina..

4.1.6 Construção do plasmídeo-repórter codificando um mRNA bicistrônico

Para a realização desta etapa, foram realizadas várias modificações num vetor de expressão constitutiva em *T. brucei*, nomeado p3605 (SUNTER J, dados não publicados). Inicialmente a marca de seleção por antibiótico foi mudada, através da troca do gene de resistência à blasticidina pelo gene que confere resistência ao antibiótico G418, por subclonagem simples entre os sítios das enzimas *Bst*BI e *Nde*I. Em seguida, o gene referente ao primeiro cístron (eGFP) foi subclonado entre os sítios das enzimas *Hind*III e *Bam*HI. Após confirmação da subclonagem, foi inserida (através de clonagem no sítio de *Bam*HI) a sequência intergênica sintética contendo a estrutura boxB. Por fim, o gene referente ao segundo cístron (sTomato), foi subclonado após

inserção entre os sítios de *XhoI* e *BamHI*, presente na sequência sintética. Este plasmídeo repórter inicial foi denominado p4214. Modificações neste plasmídeo geraram os derivados p4227 (região intergênica boxB inicial) e p4228 (região intergênica boxB otimizada). Estes derivados possuem em comum a substituição da região 3'UTR do gene de actina pela 3'UTR da PFR, realizada por subclonagem simples entre os sítios de *BamHI* e *NdeI* do p4214 (Figura 13). Um terceiro derivativo foi gerado pela subclonagem de toda a região situada entre os sítios de *HindIII* e *BamHI* do p4228 para a região contendo os mesmos sítios no plasmídeo pDex377, que possui expressão controlada por tetraciclina (KELLY *et al.*, 2007). Este último ainda passou por modificações que incluíram a substituição da marca de resistência à blasticidina para resistência a G418 e troca da região 3'UTR (de actina para PFR, como citado anteriormente), gerando o plasmídeo final p4235.

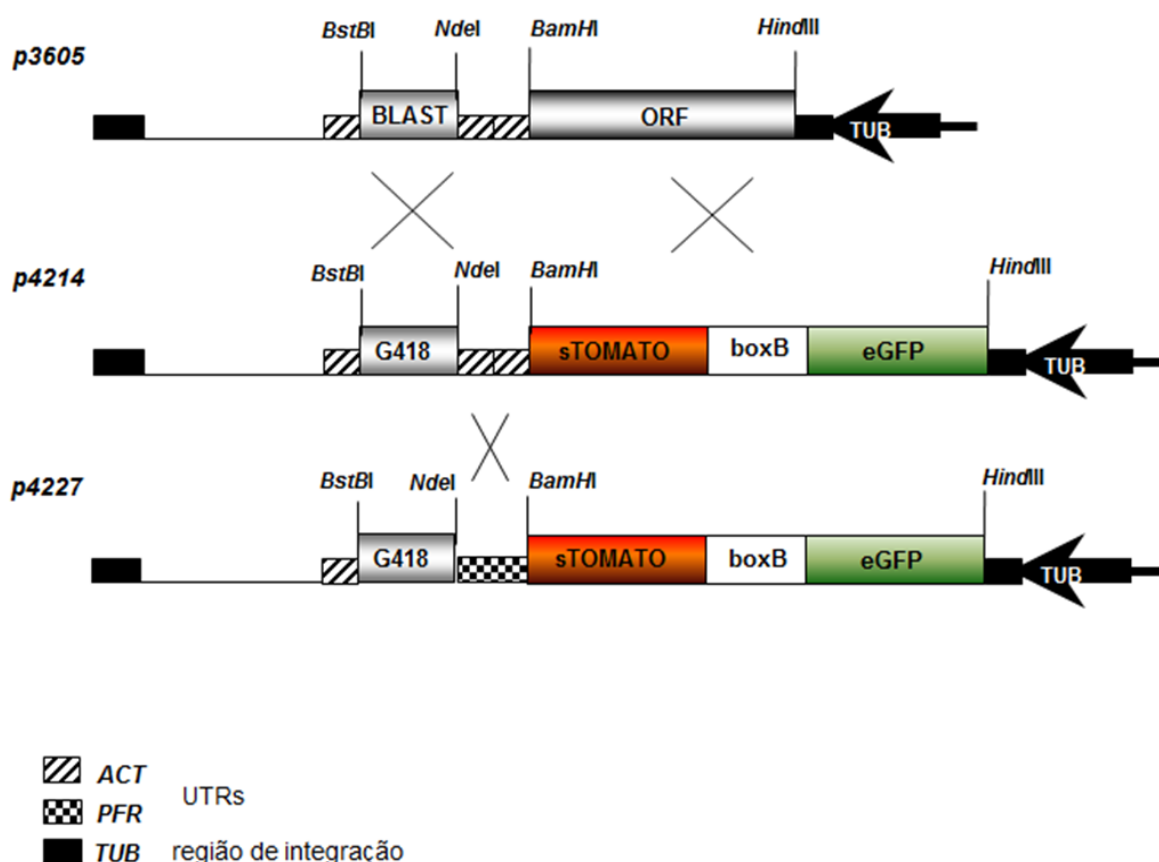


Figura 13. Esquema das modificações realizadas no vetor p3605 para a obtenção da série de plasmídeos repórteres para expressão do mRNA bicistrônico. Na figura estão representadas a alteração da marca de resistência a G418 por blasticidina (BLAST) e da região 3' UTR e a inserção das regiões codificantes das proteínas fluorescentes, separadas pela região intergênica contendo a boxB. ACT, actina; PFR, proteína paraflagelar; TUB, tubulina.

4.2 Mutagênese sítio-dirigida

Os genes *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, subclonados no vetor p2477 e os vetores pLew20 e pLew82 (WIRTZ *et al.*, 1999) foram submetidos a reações de mutagênese sítio-dirigida utilizando o Kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene), seguindo as especificações do fabricante. Foram utilizados 30 ng dos diferentes DNAs e 125 ng de cada oligonucleotídeo (Tabela 3). As condições utilizadas na reação de PCR foram: 95 °C por 30 s, 55 °C por 1 min e 68 °C por 8 min (16 ciclos). Em seguida, as reações foram tratadas com 1 µL da enzima *DpnI* (10 U/µL) a 37 °C, por 1 h, para digerir os plasmídeos não mutagenizados. Bactérias *XL1-Blue* eletrocompetentes foram transformadas com 1-5 µL das reações de mutagênese (tratadas com *DpnI*) através de um choque elétrico de 2,5 kV em eletroporador (Eppendorf®). Após a descarga elétrica, as bactérias foram inoculadas em 1 mL de meio SOC por 1 h e semeadas em placas de meio Luria Bertani (LB) sólido com ampicilina (100 µg/mL), a 37° C por 18 h. Alguns dos clones obtidos foram inoculados em 2 mL de LB líquido contendo ampicilina, cultivados a 37 °C por 18 h e submetidos à extração de DNA plasmidial por lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

4.3 Cultivo e transfecção de *T. brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei*, das linhagens convencionais 427 (selvagem) e 29-13 (com transgenes da T7RNA pol e repressor de tetraciclina) (WIRTZ *et al.*, 1999) foram cultivadas em meio SDM-79 (Brun e Schonenberger, 1979), suplementado com 10% de soro fetal bovino, hemina e mistura de ampicilina/estreptomicina (Sigma®). Em algumas etapas do trabalho (ensaios com mRNA repórter bicistrônico e avaliação de mutantes) foi usada como linhagem inicial a 4106, que é derivada da 427 e apresenta expressão constitutiva do repressor de tetraciclina (SUNTER J, dados não publicados).

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados nas reações de mutagênese sítio-dirigida. Os nucleotídeos modificados estão sublinhados.

Modificação	Sequência (5' – 3')
Alteração dos aminoácidos FSL para AAA na proteína <i>TbEIF4G3</i>	<i>forward</i> – CACCGTACCCCGGCG <u>CTGCAGCT</u> GAGGAGGCTTGCCGC <i>reverse</i> – GCGGCAAGCCTCCTC <u>AGCTGCAGC</u> GCCGGGGTACGGTGG
Alteração dos aminoácidos LNK para AAA na proteína <i>TbEIF4G3</i>	<i>forward</i> – CGCCTCGTCTACGGGT <u>CAGCAGCTGCGCT</u> GAGTGCGGCTAATTC <i>reverse</i> – GAAATTAGCCGCACTCAG <u>CGCAGCTGCT</u> GACCCGTAGACGAGGCGC
Alteração dos aminoácidos LL para AA na proteína <i>TbEIF4G4</i>	<i>forward</i> – CGGCTAATGTCTGTGTCGGAT <u>GCTGCT</u> GCGTACCGTGACACG <i>reverse</i> – CGTGTCACGGTACGCAGCAGCATCCGACACAGACATTAGCCG
Alteração dos aminoácidos LNK para AAA na proteína <i>TbEIF4G4</i>	<i>forward</i> – GAGCAGTGCAATCTGCC <u>GCCGCCGCACT</u> CACTGAATGGAATTTTGACG <i>reverse</i> – CGTCAAAATTCCATTAGTGAGT <u>GCGGCGGC</u> GCGCAGATTGCACTGCTC
Deleção dos operadores de tetraciclina no vetor pLew20	<i>forward</i> – GTTATCGGGTAGGGATCTCCCTGAGTACTGAGTT <i>reverse</i> – AACTCAGTACTCAGGGAGATCCCTACCCGATAAC
Deleção do operador de tetraciclina no vetor pLew82	<i>forward</i> – CACTATAGGGAGATCTCTCCCGGGCTGCAC <i>reverse</i> – GTGCAGCCCGGGAGAGATCTCCCTATAGTG
Alteração do sítio de <i>Nco</i> I nos vetores pLew20 e pLew82	<i>forward</i> – CTCTATCGAAGAACTT <u>G</u> CATGGTACAACTGGTCG <i>reverse</i> – CGACCAGTTTGTACCAT <u>G</u> CAAGTTCTTCGATAGAG
Alteração do sítio de <i>Stu</i> I no vetor pLew20	<i>forward</i> – CTATGCAGTATTCTGCAC <u>GGC</u> CTTGCAGGCATG <i>reverse</i> – CATGCCTGCAAGG <u>CCG</u> TGCAGAATACTGCATAG

Os parasitas foram monitorados por microscopia óptica e contados em câmara de Neubauer. Para as transfecções, alíquotas de 2×10^7 células de *T. brucei* foram ressuspensas em tampão ZPFM (NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{Mg}(\text{CH}_2\text{COO})_2$ 0,5 mM e $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{COO})_2$ 0,09 mM), incubadas com 10 µg de DNA plasmidial linearizado e submetidas à eletroporação (1,5 kV) no aparelho Gene Pulser II (BioRad) e/ou BTX (ECM 830). Para a manutenção dos diferentes transgenes foram adicionados ao meio SDM-79 os antibióticos G418 (15 µg/mL), higromicina (25 µg/mL), puromicina (1 µg/mL) e blasticidina (10 µg/mL), quando necessário.

Para a seleção das novas linhagens de *T. brucei* com expressão da luciferase (29-13-20m e 29-13-82m), após o tempo de recuperação de 18 h, foi acrescentada puromicina na concentração final de 1 µg/mL. Parte destas culturas foi submetida a diluições seriadas em placas de cultura de 24 poços para a seleção dos clones (cinco a seis dias), com confirmação da morte dos parasitas nos poços de controle negativo (transfecção sem DNA).

4.4 Extração de RNA

RNA total de *T. brucei* foi extraído para diversos fins. Partindo-se de 2×10^8 células, o RNA total foi obtido por kits comerciais RNeasy® (Qiagen) ou Illustra RNeasy® (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante, de acordo com o protocolo para células em cultura.

4.5 RT-PCR

Para cada reação foram utilizados 100 ng de RNA total, que juntamente com 1 µL de oligodT (Invitrogen) a 50 µM foram incubados a 70 °C por 10 min e em seguida foram resfriados a 4 °C. Posteriormente foram adicionados a cada RNA, 12,5 µL de RT-PCR MasterMix® 2X (Affymetrix), 6 µL de água livre de RNase e 0,5 µL de cada oligonucleotídeo específico a 10 mM. Foram submetidos a 45 °C por 45 min para a transcrição reversa e 30 ciclos de PCR (95 °C por 30s, 55 °C por 30s, 68 °C por 1 min, precedidos por uma etapa de desnaturação inicial de 95 °C por 2 min).

4.6 Northern blot

Após transfecção dos parasitas e seleção dos transfectados, a integridade do mRNA bicistrônico foi avaliada por *Northern blot*. O RNA total dos clones foi extraído pelo kit RNeasy® (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. 3 µg de cada RNA foram desnaturados após incubação com tampão de RNA 50X (Na₃PO₄ 0,5 M, pH 6,9) contendo glioxal, separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e transferidos para membranas de nylon Hybond-N® (GE Healthcare) com tampão 20X SSC (NaCl 3 M e citrato de sódio 0,3 M, pH 7). Foram utilizadas duas sondas diferentes, ambas marcadas com P³²: a primeira com alvo para a região codificadora de sTomato e a segunda, para eGFP. Para produção de cada sonda, foram utilizados 25 ng de produtos de PCR purificados como molde e estas foram marcadas nas extremidades com [γ -³²P] dATP através de reação com a T4 PNK. As membranas foram hibridizadas, lavadas e expostas a filmes de autorradiografia.

4.7 Citometria de fluxo

Após 24 ou 48 h de indução da expressão das proteínas efetoras pela adição de tetraciclina, dois clones de cada linhagem foram analisados quanto à expressão das proteínas fluorescentes em citômetro de fluxo FacScan DXP8 (Cytex), utilizando os lasers 488 nm (BluFL1) e 561 nm (YeFL1), sendo avaliadas 2x10⁶ células por experimento. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados foram analisados através do software FlowJo versão 7.6.

4.8 Imunofluorescência

Alíquotas de 2,5x10⁶ células da linhagem selvagem 427 de *T. brucei*, após atingirem a fase logarítmica de crescimento (10⁶ – 10⁷ células/mL), foram fixadas em meio SDM-79 (sem soro fetal bovino e sem hemina) contendo paraformaldeído 3%. Após 18 h de fixação, as células foram centrifugadas e lavadas em PBS (600 g, 10 min, 4 °C). As células fixadas foram imobilizadas em lamínulas contendo poli-L-lisina (Sigma) por 15 min, lavadas com solução de PBS/glicina 20 mM, permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1% em PBS/glicina por 5 min e bloqueadas com solução de albumina bovina 1% em PBS/glicina por 20 min. Em seguida, foram incubadas por 1h

com soro policlonal imunopurificado a 37 °C, lavadas e incubadas novamente com anti-IgG de coelho marcada com AlexaFluor 488[®] (Invitrogen). Após novas lavagens com PBS/glicina, seguida da incubação com Hoescht 33258[®] (Sigma) por 10 min, as lamínulas foram secas em papel de filtro e montadas sobre lâminas de microscopia, contendo Prolong Gold[®] (Invitrogen) e mantidas ao abrigo da luz até visualização em microscópio de fluorescência (Leica AF6000).

4.9 Interferência de RNA e indução da expressão dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*

Após a transfecção e seleção dos parasitas com as construções para RNAi e superexpressão, o efeito sobre a viabilidade celular foi analisado através de curvas de crescimento na ausência (-TET) e presença (+TET) do indutor tetraciclina (1 µg/mL). As curvas de crescimento foram obtidas pela contagem do número de parasitas, a cada 24 h, em câmara de Neubauer, e a expressão das proteínas foi avaliada por ensaios de *Western blot*, utilizando lisados celulares coletados ao longo da curva de crescimento. Ainda para o RNAi do *TbEIF4G4*, alíquotas de células foram retiradas após 72 h da adição de tetraciclina e fixadas em paraformaldeído 3%, para avaliação da morfologia em microscopia eletrônica de transmissão.

4.10 Obtenção de lisados celulares

Células procíclicas de *T. brucei* na fase logarítmica foram utilizadas para obtenção de lisados celulares com duas finalidades diferentes. No primeiro caso, para obtenção de extrato protéico total, alíquotas de culturas com quantidades definidas de células, foram centrifugadas (6000 *g* / 4 °C/ 10 min), lavadas em PBS e ressuspensas em tampão desnaturante para SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Para obtenção apenas da fração citoplasmática, 1x10⁸ células foram centrifugadas, lavadas em tampão de lise (HEPES-KOH 20 mM, pH 7,4, acetato de potássio 75 mM, acetato de magnésio 4 mM, ditioneitol 2 mM) suplementado com um coquetel de inibidores de proteases Complete[®] (Roche) e centrifugadas novamente. Em seguida, o sedimento foi ressuspensão em 1 mL deste mesmo tampão e submetido a vários (oito a dez) ciclos de congelamento/descongelamento, utilizando-se nitrogênio líquido, seguido de

centrifugação (6000 *g*/ 4 °C/ 15 min) para separação e coleta do sobrenadante. Todos os lisados obtidos foram mantidos a -80 °C.

4.11 Marcação metabólica com S³⁵

Amostras contendo 1×10^7 células de *T. brucei* submetidas às condições de RNAi (+TET) dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, e seus respectivos controles (-TET), foram incubadas na presença de metionina marcada com S³⁵ por 1 hora (10 µCi). Em seguida, as células foram centrifugadas e submetidas à lise celular em tampão de amostra para SDS-PAGE. Após análise das amostras em gel SDS-PAGE 15%, estes foram submetidos à autorradiografia para identificação de possíveis diferenças na expressão proteica, por comparação do perfil apresentado pelas células-controle não submetidas às condições de RNAi.

Para análise quantitativa, 100 µL das culturas após incubação com metionina marcada foram inicialmente lisadas com solução de SDS 2% e NaOH 0,1 M e imobilizadas em discos de papel de filtro. Para precipitação das proteínas, os discos de papel de filtro foram incubados em solução de ácido tricloroacético a 10%, lavados com acetona e clorofórmio, secos e submetidos à contagem por cintilação líquida.

4.12 Imunoprecipitação

Culturas de *T. brucei* transfectadas com as construções *p2477/TbEIF4G3-4* foram induzidas com tetraciclina (1 µg/mL) por 24 h, para expressão das respectivas proteínas fusionadas à etiqueta HA (6xHA). Lisados celulares (fração citoplasmática) foram obtidos a partir dessas culturas e incubados por 2 h, a 4 °C, com 15 µL de anticorpo monoclonal anti-HA imobilizado em agarose (Sigma), seguindo as recomendações do fabricante. As proteínas expressas a partir dos vetores da série pD, contendo fusão com a etiqueta TY também foram induzidas por 24 ou 48 h e os lisados celulares obtidos como citado anteriormente. Para a imunoprecipitação, inicialmente 30 µL da resina GammaBind G[®] (GE Lifesciences) foram lavados três vezes com 1 mL de PBS e incubados por 18 h com 1 mL de sobrenadante de cultura de células de hibridoma produtoras do anticorpo monoclonal anti-TY BB2 (BASTIN *et al.*, 1996). Em seguida, a resina foi lavada três vezes com tampão de lise e incubada com os lisados celulares 2 h, a 4 °C. Decorrido o tempo, o sobrenadante foi removido após

centrifugação e a resina, após novas lavagens com PBS, foi recuperada e mantida a -80 °C. Na etapa de imunoprecipitação para identificação de RNAs, seguiu-se o mesmo protocolo, entretanto foram utilizadas a resina anti-IgG recombinante (Zymed) e soluções livre de RNases.

4.13 Western-blot

Anticorpos policlonais purificados contra as proteínas de interesse e anticorpos monoclonais anti-HA[®] (Invitrogen), anti-TY BB2 e anti-eGFP[®] (Invitrogen) foram utilizados em ensaios de *Western-blot*. Lisados de parasitas foram fracionados em SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana Immobilon-P PVDF[®] (Millipore). Cada membrana foi bloqueada com solução leite desnatado a 5% em TBS /Tween (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,5), à temperatura ambiente, sob agitação, por 1 h. Em seguida, foi incubada com anticorpo primário (diluições variadas) em solução de TBS/Tween, nas mesmas condições já relatadas. Após lavagens com TBS, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho ou anti-IgG de camundongo, conjugadas à peroxidase), numa diluição de 1:5.000, nas mesmas condições anteriores. Após novas lavagens com TBS, a membrana foi incubada por 1 min com uma solução contendo luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM (em DMSO) e peróxido de hidrogênio 0,03%, para a reação de quimioluminescência. A membrana foi seca com papel de filtro, exposta contra filme fotográfico (GE Healthcare), em intervalos variáveis de tempo, que foi revelado através de sua incubação em solução 1:2 dektol (Kodak), seguida de fixação em solução de ácido acético.

4.14 Dosagem de luciferase

Amostras de 5×10^5 células provenientes de curvas de crescimento foram sedimentadas (6000 g/ 4 °C/ 10 min), lavadas em PBS, ressuspensas e mantidas em 50 uL de tampão de lise (100 mM HEPES pH 8; 5 mM DTT; 2mM MgCl₂; 2% Triton X-100) por 10 minutos. Após a lise, as amostras foram transferidas para uma microplaca branca de 96 poços e foram acrescentados 100 µL da solução reagente (1 mM luciferina, 3 mM ATP, 15 mM MgSO₄ em 30 mM HEPES pH 8), seguida da leitura imediata realizada no luminômetro Mithras LB 940 (Berthold Technologies).

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho podem ser agrupados em três tópicos distintos devido às diferentes abordagens utilizadas para responder a questionamentos específicos. O primeiro reúne um conjunto de experimentos de caracterização mais geral, na tentativa de obter e/ou confirmar dados de localização celular e interação proteica e permitir o mapeamento de domínios presentes no *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* responsáveis pela interação *in vivo* com homólogos de outras subunidades do complexo eIF4F (eIF4E e eIF4A) e da PABP. Estes resultados juntamente com dados *in vitro* das proteínas ortólogas de *Leishmania* permitirá em breve a publicação do artigo científico **“Two eIF4G Homologues Conserved in Trypanosomatid species display functional differences compatible with roles in two diverged eIF4F complexes”**, em fase de finalização.

O segundo grupo aborda os resultados obtidos a partir do desenvolvimento de ferramentas para analisar diretamente o papel dos diferentes fatores na tradução, seja via expressão de luciferases - para uma análise do seu impacto na tradução global, ou via *tethering* para avaliar o papel de cada um na tradução; utilizando mRNAs-repórteres em ambas as abordagens (este último ensaio foi desenvolvido em colaboração com a Universidade de Cambridge). A descrição dos vetores desenvolvidos e da nova linhagem de *T. brucei* com expressão de luciferase permitirá a confecção do artigo **“A new *Trypanosoma brucei* cell line that is useful for accessing function of proteins involved in translation”**.

Por fim, algumas das técnicas ao longo do trabalho foram aplicadas a outras proteínas, de forma a complementar o trabalho com os homólogos de outras subunidades do complexo eIF4F. Os resultados foram incluídos na confecção de dois artigos publicados intitulados **“The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties”** e **“Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners”**.

5.1 Localização subcelular

O trabalho de caracterização dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* foi iniciado com a confirmação da localização celular das duas proteínas, a fim de compará-los com os resultados de expressão de proteínas de fusão fluorescentes, obtidos em trabalho anterior (MOURA, 2007). Para isso foram realizados ensaios de imunofluorescência em células de *T. brucei* da linhagem 427, utilizando anticorpos policlonais imunopurificados (Figura 14). A distribuição das proteínas confirmou ser majoritariamente citoplasmática, com pouca ou nenhuma presença no núcleo; coerente com seu possível papel na tradução. Nota-se também uma maior concentração na região perinuclear, nas amostras do *TbEIF4G4*; enquanto que a distribuição do *TbEIF4G3* aparenta ser mais homogênea ao longo da célula.

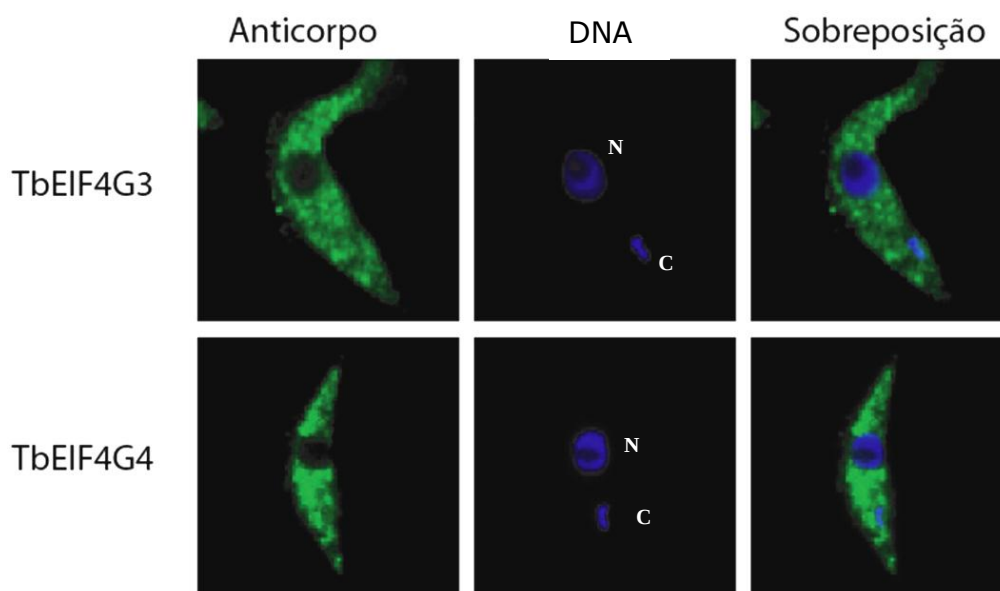


Figura 14. Localização subcelular das proteínas homólogas *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* de *Trypanosoma brucei*, por imunofluorescência. Células procíclicas da linhagem 427 de *T. brucei* foram submetidas a reações de imunofluorescência indireta. Foram utilizados anticorpos policlonais imunopurificados e anti-IgG de coelho marcado com AlexaFluor488. As duas proteínas apresentaram localização restrita ao citoplasma, sendo observadas as regiões referentes ao núcleo (N) e ao cinetoplasto (C) em azul, devido à coloração do DNA com Hoescht 33258.

5.2 Análise do perfil de síntese proteica em células de *T. brucei* submetidas à depleção dos homólogos de eIF4G

Para complementação dos resultados que foram obtidos em trabalho anterior (MOURA, 2007), a partir da análise de viabilidade celular de *T. brucei* sob a indução de interferência de RNA dos dois homólogos de interesse deste estudo, foram realizados ensaios de marcação metabólica, utilizando metionina radioativa para incubação de células submetidas à RNAi. Dessa forma, foi possível avaliar o perfil de síntese proteica das células sob condições de depleção dessas proteínas (Figura 15). O resultado de RNAi do *TbEIF4G3*, mesmo não depletando a proteína totalmente, é capaz de produzir um fenótipo de morte celular acentuada e rápida (24 h). A análise por marcação metabólica mostrou que o perfil de síntese proteica é afetado logo nas primeiras 12 horas da curva de crescimento (resultado não mostrado), ocorrendo uma diminuição global da síntese e indicando um possível papel desta proteína no processo de tradução destes parasitas. O mesmo não ocorreu para a proteína *TbEIF4G4*, que diferentemente do *TbEIF4G3*, é totalmente depletada após 24 h da indução de RNAi e causa morte celular após 72 h. Além disso, uma observação importante foi a modificação da morfologia das células, antes de ocorrer a morte celular. De forma surpreendente, mesmo com todas essas alterações observadas, não houve diferença no perfil de síntese proteica após sua depleção.

De forma complementar, a incorporação da metionina marcada após 1 h de incubação foi estimada quantitativamente tanto nas culturas controles (-TET) quanto nas induzidas (+ TET). Apesar de preliminares, os resultados da contagem da radiação incorporada mostraram que, no caso do *TbEIF4G3*, nas células submetidas a RNAi ocorreu uma diminuição na incorporação comparado às células controle da amostra de 24 h, indicando uma diminuição da síntese proteica global em cerca de 70%. De forma diferente, as células submetidas a RNAi do *TbEIF4G4* mantiveram a capacidade de incorporar a metionina de forma similar ao controle, indicando que houve pouco ou nenhum tipo de inibição da síntese proteica, mesmo com a mudança de morfologia observada (Tabela 4).

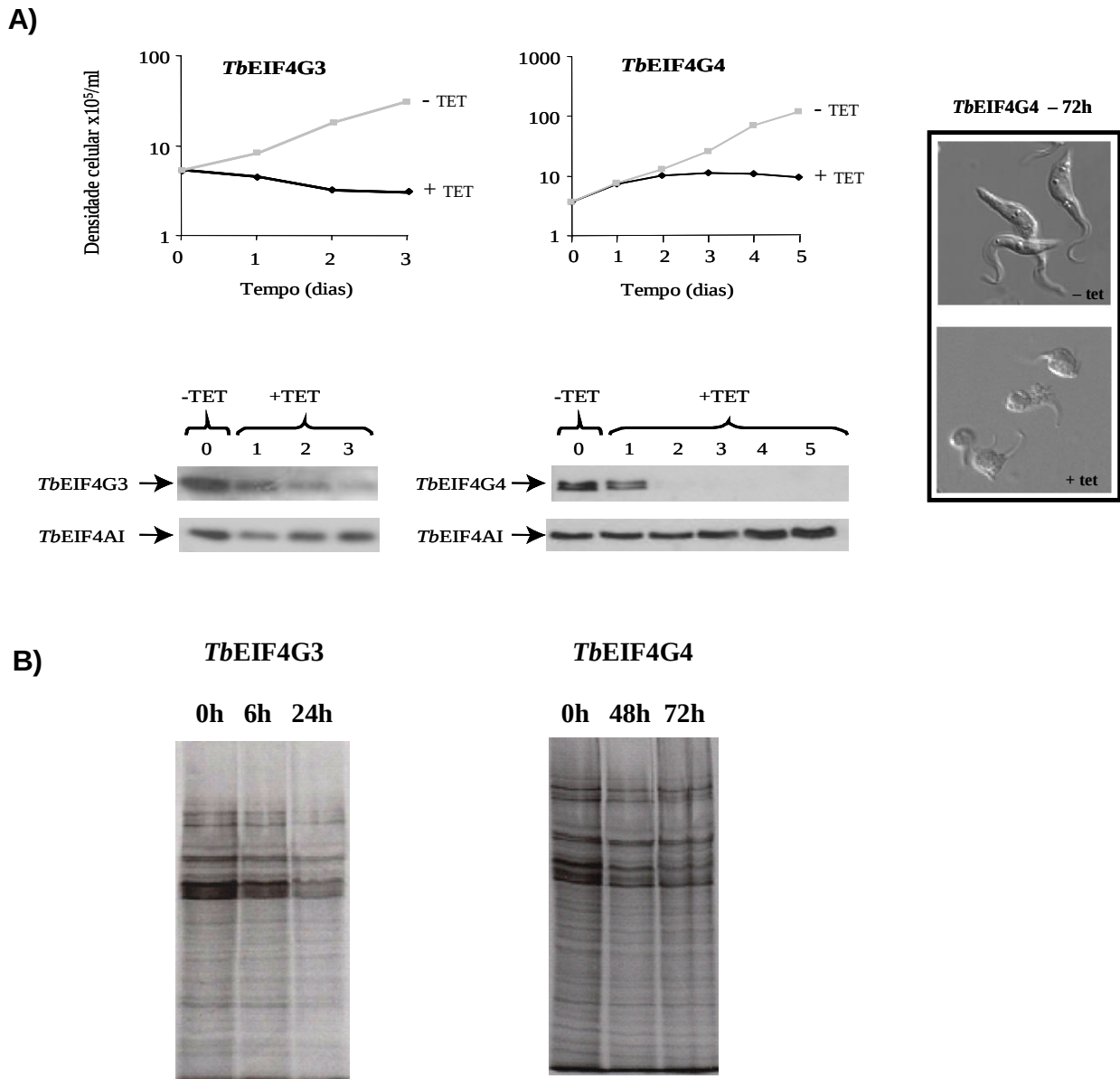


Figura 15. Perfil de crescimento e marcação metabólica de células de *Trypanosoma brucei* após indução de RNAi dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*. A) Curvas de crescimento de culturas controle (-TET) e após indução do RNAi (+ TET) e morfologia do *TbEIF4G4* (à direita). As imagens abaixo do gráfico mostram a depleção das proteínas ao longo da curva, avaliadas por *Western blot*. A expressão do *TbEIF4AI* foi usada como controle da quantidade de amostra aplicada. B) Autorradiografias mostrando o perfil de captação de metionina radioativa de amostras de extrato protéico total coletadas ao longo da curva de RNAi.

Tabela 4. Valores de incorporação de metionina radioativa na marcação metabólica.

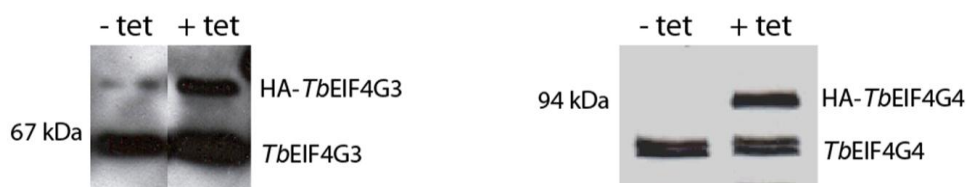
Valores relativos comparados à incorporação da cultura controle (-TET). NA, não-avaliado.

Incorporação relativa de metionina radioativa [^{35}S] (cpm/ 10^7 cels/h)		
Tempo após adição de tet	<i>TbEIF4G3</i>	<i>TbEIF4G4</i>
6 h	99%	NA
24 h	28,5%	91%
48 h	NA	100%

5.3 Análise da formação de complexos protéicos *in vivo* entre os homólogos do eIF4G e outras proteínas

A subclonagem dos genes *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* no vetor p2477, permitiu a expressão das proteínas em fusão a uma etiqueta de purificação constituída por seis epítomos HA em tandem (6xHA) em células de *T. brucei* da linhagem 29-13. A expressão de ambas as proteínas foi confirmada pela detecção por *Western blot* (Figura 16) e foi verificado que, apesar de ser um vetor destinado à superexpressão, os níveis de proteínas de fusão obtidos foram similares ou menores que o das proteínas endógenas. A partir daí, foram realizadas curvas de crescimento, para identificar se a expressão ectópica destas proteínas causaria alguma alteração no crescimento celular. Diferentemente do perfil após depleção, o crescimento celular não foi alterado pela expressão. No caso das células expressando o HA-*TbEIF4G3*, houve detecção da proteína de fusão mesmo nas amostras das culturas sem adição de tetraciclina, por isso, as curvas foram repetidas e comparadas com o crescimento de células da linhagem 29-13. Mesmo assim, as curvas se comportaram de maneira similar, ou seja, a expressão dessa proteína não levou a alterações na cinética de crescimento celular, o que pressupõe que não houve mudanças significativas na síntese proteica e que as proteínas de fusão foram capazes de realizar as mesmas funções que as proteínas endógenas. Devido a isso não foram realizados ensaios de marcação metabólica.

A)



B)

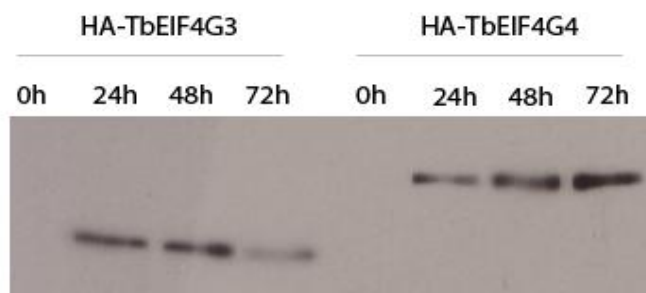


Figura 16. Expressão das proteínas HA-TbEIF4G3 e HA-TbEIF4G4 em *Trypanosoma brucei*. Ensaios de *Western blot* foram utilizados para confirmar a expressão das proteínas de fusão, após indução por tetraciclina. A) As proteínas foram detectadas inicialmente pelos soros policlonais específicos – as bandas inferiores correspondem à expressão das proteínas endógenas. B) *Western blot* mostrando a expressão das proteínas de fusão detectadas pelo anticorpo monoclonal anti-HA. No caso da curva do TbEIF4G3, a amostra de 0 h corresponde à cultura controle de células da linhagem 29-13.

5.3.1 Interações EIF4G/EIF4E e EIF4G/EIF4A

Após confirmação da expressão das proteínas EIF4G fusionadas ao epítipo HA, estas foram utilizadas para ensaios de imunoprecipitação com anticorpo monoclonal anti-HA para investigação das interações destes homólogos com homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F. A estratégia de imunoprecipitação a partir de lisados celulares das culturas de expressão com HA foi escolhida para esta etapa do trabalho, pois a imunoprecipitação convencional, utilizando células da linhagem selvagem de *T. brucei* e soros policlonais imunopurificados, seria dificultada devido à baixa titulação dos soros obtidos na imunização dos coelhos, principalmente no caso do anti-TbEIF4G3. Além disso, o anticorpo monoclonal anti-HA imobilizado em agarose, de uso comercial, por ser produzido em camundongo, não interferiria na detecção das demais proteínas que seriam identificadas por *Western blot* utilizando

soros produzidos em coelhos, seguida da utilização da anti-IgG de coelho marcado com peroxidase.

Os ensaios com o anticorpo anti-HA mostraram-se específicos, onde apenas as proteínas de fusão foram imunoprecipitadas, e foi possível demonstrar as interações *TbEIF4G3/TbEIF4E4* e *TbEIF4G4/TbEIF4E3* (Figura 17). A presença de homólogos do eIF4E na amostra não ligada pode ser consequência do resultado da interação com as proteínas endógenas, que continuaram expressas mesmo na presença das proteínas de fusão com HA. Neste experimento não foi visualizada a interação dos homólogos *TbEIF4G3* ou *TbEIF4G4* com o *TbEIF4A1*, que pode ser explicado pelo fato de ainda não estar bem estabelecido se a interação eIF4G/eIF4A acontece de forma permanente ou transitória, ou ainda se a concentração da proteína *TbEIF4A1* endógena nas amostras de lisado total e sobrenadante era bem superior àquela na amostra da IP, o que diminuiria a capacidade de reconhecimento do anticorpo.

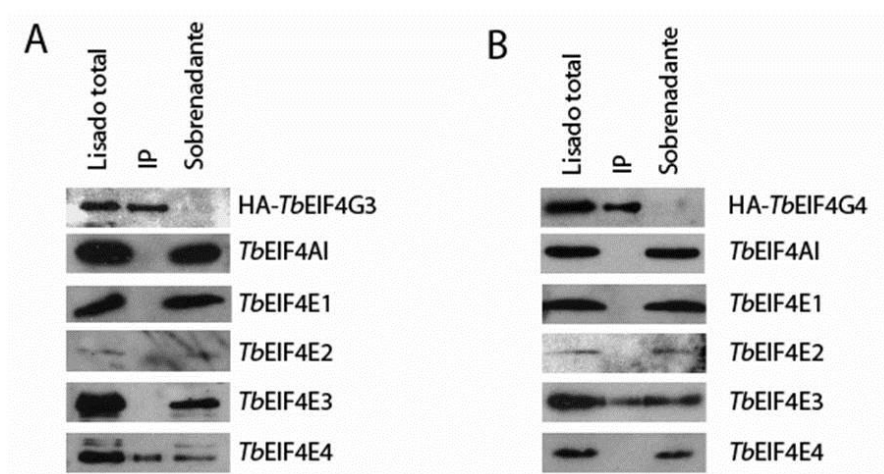


Figura 17. Avaliação da interação entre as proteínas homólogas eIF4G e eIF4E de *Trypanosoma brucei*. A) Western blot detectando a proteína HA-*TbEIF4G3* pelo anticorpo monoclonal anti-HA, seguida da identificação das demais proteínas avaliadas por anticorpos policlonais imunopurificados, mostrando a interação específica *TbEIF4G3/TbEIF4E4* na amostra da imunoprecipitação (IP). B) Detecção da proteína HA-*TbEIF4G4* pelo anticorpo monoclonal de camundongo anti-HA, seguida da identificação das demais proteínas avaliadas, mostrando a interação específica *TbEIF4G4/TbEIF4E3* na amostra IP.

5.3.2 Interação EIF4G/ PABPs

Através da imunoprecipitação também foi possível confirmar *in vivo* a interação entre *TbEIF4G3* e *TbPABP1* e uma fraca interação entre *TbEIF4G4* e *TbPABP2* foi observada, mas que precisa ser melhor investigada (Figura 18).

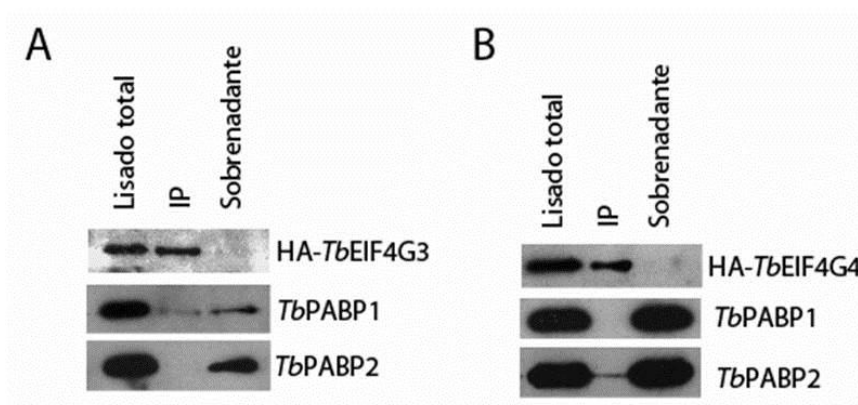


Figura 18. Avaliação da interação entre proteínas homólogos eIF4G e PABP de *Trypanosoma brucei*. A) Western blot detectando a proteína HA-*TbEIF4G3* pelo anticorpo monoclonal anti-HA, seguida da identificação das proteínas *TbPABP1-2* por anticorpos policlonais imunopurificados, mostrando a interação específica *TbEIF4G3/TbPABP1* na amostra da imunoprecipitação (IP). B) Detecção da proteína HA-*TbEIF4G4* pelo anticorpo monoclonal anti-HA, seguida da identificação das demais proteínas avaliadas, mostrando uma fraca interação entre *TbEIF4G4* e *TbPABP2*.

5.4 Efeito da expressão de *TbEIF4Gs* mutantes no crescimento de *T. brucei*

Baseados nos resultados da imunoprecipitação e do estudo de mapeamento dos domínios funcionais dos homólogos *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4*, os genes ortólogos de *T. brucei* foram submetidos a reações de mutagenese sítio-dirigida para modificação de alguns resíduos de aminoácidos que poderiam ser importantes nas interações observadas (Figura 19). Desta forma, os resíduos FSL, do domínio putativo FSLEEAQ, presente na região N-terminal do *TbEIF4G3* (aminoácidos 24 a 26) e supostamente responsável pela interação *TbEIF4G3/TbEIF4E4*, foram alterados para AAA para em seguida ser realizada a expressão da proteína mutante em células de *T. brucei*. Em relação à interação *TbEIF4G4/TbEIF4E3*, foram selecionados dois resíduos de leucina

LL (aminoácidos 27 e 28), também modificados para duas alaninas, visto que estas alterações foram capazes de abolir *in vitro* a referida interação.

Mesmo sem a identificação de uma interação entre as proteínas *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* com o homólogo *TbEIF4A* no ensaio de imunoprecipitação com HA, os resíduos LNK (aminoácidos 67 a 69 e 94 a 96, respectivamente) foram alterados para AAA. No alinhamento de sequências, os aminoácidos LNK representam uma região bem conservada, presente no domínio HEAT-MIF4G e seu equivalente em humanos foi implicado na interação eIF4G/eIF4A. A alteração nessa região das proteínas poderia ser importante na identificação de fenótipos diferenciados de crescimento celular de mutantes, devido à importância da função do eIF4A no metabolismo do parasita.

<i>TbEIF4G3</i>	1	-----MH	VYIDQITEL	RSLYPEP-EY	EGFSLDEACR	RKKQTQT---	KLVRGPN	AWAARG-SAK	TTAEWVERLV	YGS LNKUSAA	*****
<i>TcEIF4G3</i>	1	-----MH	VYSIQITIEV	BSMYKDA-PY	EGFSLDEACR	RKKMTQT---	KLVRGAN	AWVARG-SAK	TTAEWVERLV	QGS LNKUSTA	
<i>LmEIF4G3</i>	1	-----M	QFVEQPSV	RNNYLEP-EY	EGFSLDEVVR	RKKLTQT---	KLVRGEN	AWVARG-TAQ	TTAEWVERLV	EGS LNKLTAE	
<i>TbEIF4G4</i>	1	MLFKPRGVT	NDPRYAGGSR	LMVSUHLAY	RDWRGRPET	ESFSLAQITR	DARAADCKEV	VTEKLVMSEN	GFKVKSRSI	DSLGRGVRAV	QSL LNKATFW
<i>TcEIF4G4</i>	1	MLFKPRGVT	NDPKYAGNSR	LMLEPDDAY	RDWRKER-LS	DDFSLGRILF	AAARAASKPA	APKLVMTSN	GFKVKRDSI	APSRGVRAV	QSL LNKLTES
<i>LmEIF4G4</i>	1	MLFNLRGIVP	QKEEKVKN--	QMLADITAF	RDWTAT-DE	ENFSLERVLL	TARLEKQKKA	EIKLVTSSE	GERVDRKDM	DASLELRRV	QGS LNKLTDK

<i>TbEIF4G3</i>	75	NFNELVSOLO	TNTIFSSDEM	LKCTVSITFN	KALGEBENS	VYAGLCVKLA	EYVSLNVVQ	KQ-----	KEGKRISKLR	NAVVGIAETE	
<i>TcEIF4G3</i>	75	NFDLMVAKLO	TEVIFSTKET	LNTAVRIIEK	KALDEPECSE	SYAGVCVKLA	EYVGLTAAK	QK-----	AEGRKYSKLR	NAVVSIAQEE	
<i>LmEIF4G3</i>	74	NFDIMIDKIL	TKELFATEDI	MNMVNILEK	KALDEBENS	LYAGVCBSLA	LYBAKVLROG	HK-----	GE-RPQSOLF	DALLSTACHE	
<i>TbEIF4G4</i>	101	NFDVVMQTVL	TPDIIINNEV	VKDVVRHIEE	KALDEEVFAG	LYARMCFSTV	RBYEYRTKFL	LP-----	GTCQVFSAMR	VAIVEKCCQM	
<i>TcEIF4G4</i>	100	NFDLIAKAIL	VPETIILNANV	VADVVRHLYD	KALVEEVFAG	LYARLCMTIV	RBYDYRSTQ	SG-----	EVDQRSEVR	VAIVEKCCQM	
<i>LmEIF4G4</i>	98	NFDVAVVEEAL	SPDIVLNPLV	LKGANDITFN	KAMPEEVFSG	LYAQICQRIK	VYEDLVAEA	AENPTSELGQ	IMAAVQAGDE	DQKNVNGRVR	NAVVKRCQEF

Figura 19. Identificação dos possíveis motivos envolvidos nas interações eIF4G/eIF4E e eIF4G/eIF4A em *Trypanosoma brucei*. Parte do alinhamento da região N-terminal dos homólogos de *T. brucei* e seus ortólogos em *T. cruzi* e *L. major*. Os resíduos de aminoácidos escolhidos para a mutagenese estão destacados em vermelho.

Devido ao “vazamento” e/ou baixos níveis de expressão das proteínas fusionadas a HA, bem como o desenvolvimento de vetores mais recentes e com maior capacidade de regulação da expressão induzida, as sequências originais e aquelas apresentando mutações em regiões específicas dos genes dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* foram subclonadas no plasmídeo p3927 modificado e usados em novas transfecções. Após indução com tetraciclina, o perfil das culturas foi avaliado através de curvas de crescimento e a expressão das proteínas foi confirmada através de *Western blot* (Figuras 20 e 21). Nenhum dos mutantes avaliados apresentou fenótipo letal, entretanto as mutações no possível sítio de ligação ao eIF4E (resíduos FSL no *TbEIF4G3* e LL no *TbEIF4G4*), em ambos os

homólogos, causaram uma pequena diminuição no crescimento comparada ao crescimento das culturas não induzidas. Em relação à mutação na região referente ao sítio de ligação ao eIF4A (resíduos LNK em ambos), o maior efeito visualizado foi da mutação do *TbEIF4G3* e estas células apresentaram diminuição no crescimento a partir de 48h de indução - cerca de 50% de crescimento em relação ao controle, porém, as células continuaram viáveis até o final da curva (120 h). Em contraste, a presença da mesma mutação no homólogo *TbEIF4G4* não foi capaz de promover nenhuma alteração no perfil de crescimento da cultura.

Outra observação importante visualizada pelo *Western blot* é que a expressão das proteínas de fusão de ambos os homólogos, na sua sequência selvagem, altera o perfil de expressão das proteínas endógenas, com clara diminuição dos níveis das proteínas a partir de 24 h e que se segue ao longo da curva. No caso do *TbEIF4G3*, a expressão dos mutantes não causa nenhuma alteração visível na expressão das proteínas endógenas, que mantêm os níveis similares ao ponto controle de 0 h. Esta observação sugere uma possível via de regulação da expressão do homólogo funcional, numa tentativa de manter seus níveis constantes na célula. No caso do *TbEIF4G4*, a diminuição dos níveis da proteína endógena se mantém mesmo durante a expressão das proteínas mutantes.

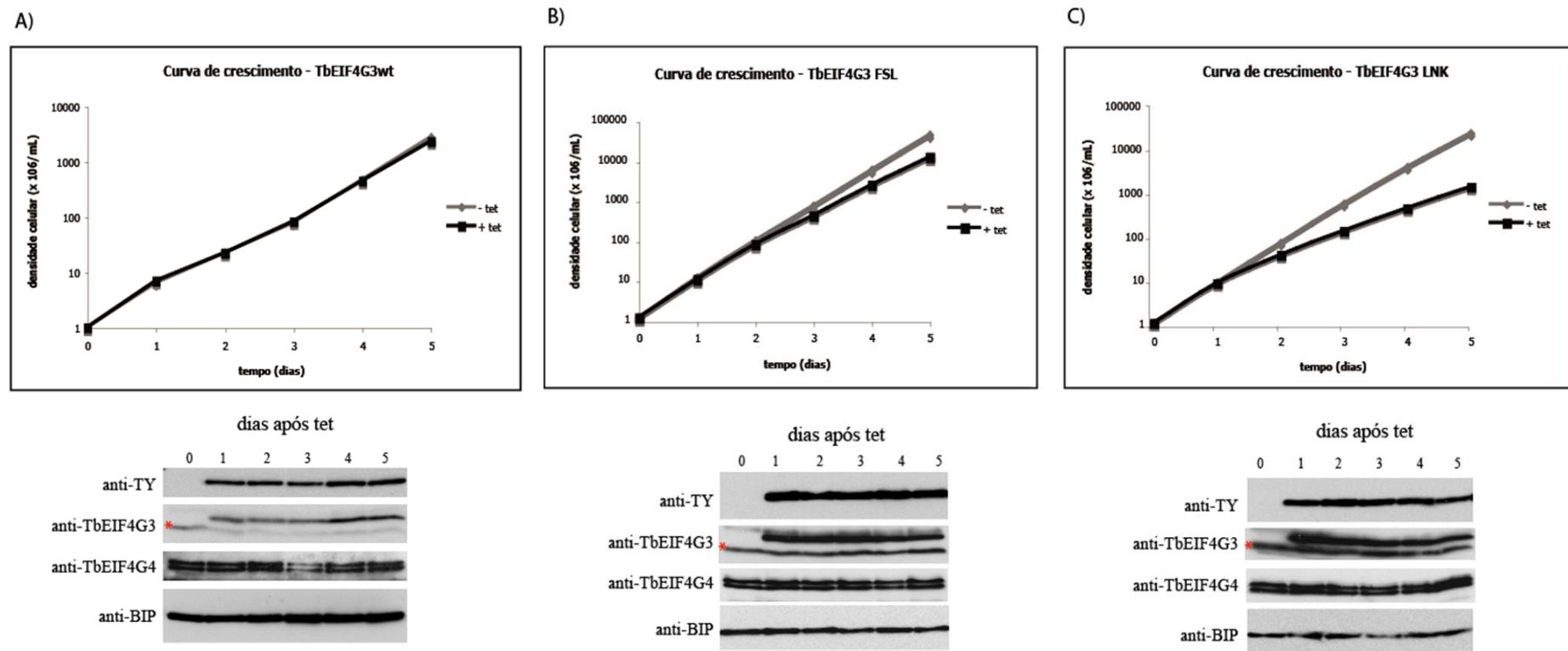


Figura 20. Efeito da expressão de mutantes do TbEIF4G3 no crescimento de *Trypanosoma brucei*. Curvas de crescimento de células superexpressando a proteína selvagem (wt) (A) foram realizadas e comparadas com curvas de crescimento de células superexpressando as proteínas mutantes (B e C). O perfil de expressão das proteínas mutantes e endógenas (asterisco vermelho) foi avaliado por *Western blot*. A proteína BiP foi usada como controle de número de células aplicadas em cada amostra.

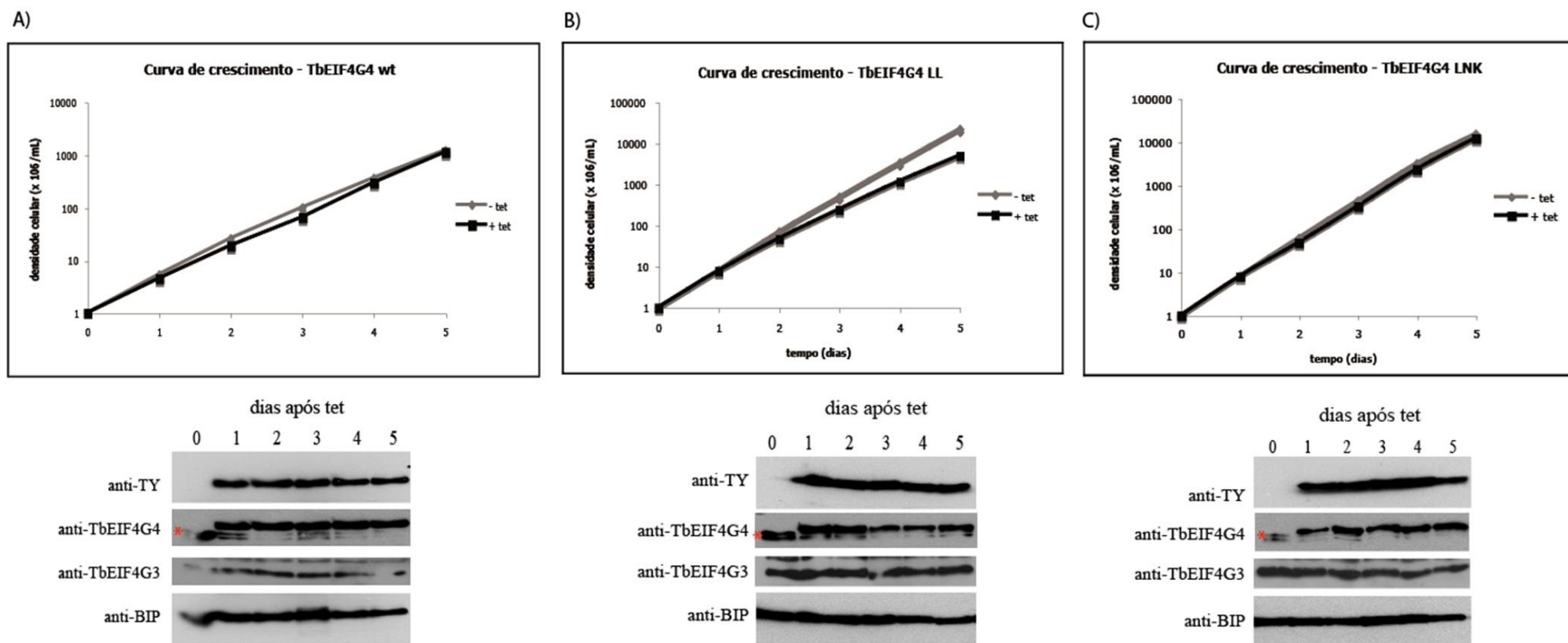


Figura 21. Efeito da expressão de mutantes do TbEIF4G4 no crescimento de *Trypanosoma brucei*. Curvas de crescimento de células superexpressando a proteína selvagem (wt) (A) foram realizadas e comparadas com curvas de crescimento de células superexpressando as proteínas mutantes (B e C). O perfil de expressão das proteínas mutantes e endógenas (asterisco vermelho) foi avaliado por *Western blot*. A proteína BiP foi usada como controle de número de células aplicadas em cada amostra.

5.5 Perfil de interação das proteínas mutantes com os homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F

Da mesma forma que as proteínas selvagens, as proteínas mutantes foram avaliadas quanto à capacidade de interação com os demais homólogos das diferentes subunidades do complexo eIF4F, através de ensaios de imunoprecipitação. Os resultados confirmam *in vivo* o envolvimento dos resíduos de aminoácidos selecionados nas interações citadas anteriormente. Além disso, os resíduos FSL e LL quando modificados são responsáveis pela ablação quase total de interação entre as proteínas, enquanto que a alteração nos resíduos LNK apenas diminui a capacidade de ligação com o *TbEIF4AI* (Figura 22).

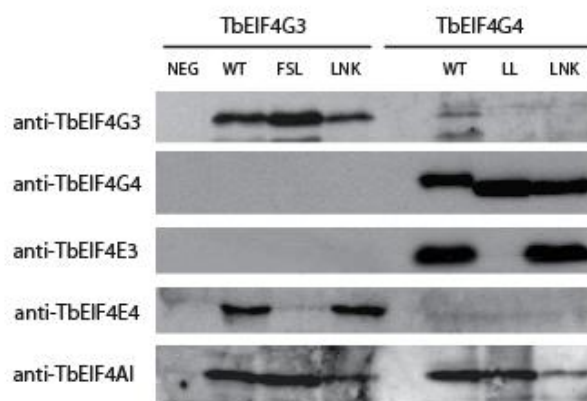


Figura 22. Efeito da expressão de mutantes de homólogos do eIF4G no perfil de interação com as demais subunidades do complexo eIF4F de *Trypanosoma brucei*. Amostras concentradas de imunoprecipitação utilizando anti-TY imobilizado em proteína G-sepharose foram testadas com anticorpos produzidos contra os homólogos das subunidades do eIF4E e eIF4A. A interação das proteínas mutantes foi comparada com a das proteínas selvagens (WT). Anti-TY imobilizado em proteína G-sepharose foi incubado com a fração citoplasmática de células que não expressavam as proteínas de fusão (NEG).

Finalizada a etapa de caracterização mais geral, a ideia seguinte foi avaliar a participação direta dos homólogos do eIF4G selecionados no processo de biossíntese proteica dos tripanossomatídeos e para isso, teriam que ser desenvolvidas novas ferramentas que fossem aplicáveis a esse tipo de abordagem, as quais são descritas na segunda parte destes resultados.

5.6 Repórter traducional monocistrônico

Este ensaio teve por finalidade avaliar de forma mais específica o envolvimento dos homólogos do eIF4G na etapa de síntese de proteínas, através do monitoramento dos níveis de atividade da enzima luciferase. A proposta então foi utilizar um sistema utilizando um repórter traducional monocistrônico e para isso, optou-se pela construção de um vetor integrativo que permitisse a obtenção de uma linhagem de *T. brucei* transgênica expressando constitutivamente a enzima luciferase, e assim, avaliar de forma rápida e de fácil quantificação, os efeitos da superexpressão ou da depleção dos homólogos do eIF4G (e de seus mutantes) na síntese proteica, utilizando os níveis de atividade da luciferase como parâmetro. Foram escolhidos dois vetores iniciais da série de vetores de expressão denominada pLew. Ambos possuem sítios de integração para a região de rDNA e também possuem a sequência codificadora da enzima luciferase, entretanto, apresentavam algumas diferenças quanto ao controle da expressão da enzima:

1. O pLew20 apresenta duas cópias da sequência do operador de tetraciclina e o promotor da prociclina GPEET, para transcrição pela RNA polimerase I.
2. O pLew82 apresenta apenas uma sequência do operador de tetraciclina e o promotor da T7 RNA polimerase viral, que é expressa constitutivamente na linhagem 29-13 de *T. brucei*.

Para a realização dos ensaios funcionais posteriores, foi necessário fazer algumas alterações nos vetores originais que incluíram:

5.6.1 Remoção do(s) operador(es) de tetraciclina (TetO) da região promotora para a expressão do gene da luciferase

O operador de tetraciclina é composto por uma sequência de 19 pb (TCCCTATCAGTGATAGAGA). O vetor pLew20 apresenta duas cópias dessa sequência posicionadas uma após a outra, enquanto que o pLew82 apresenta apenas uma cópia. Em ambos os vetores, foi necessário remover essas sequências através de mutagênese sítio-dirigida, a fim de permitir a expressão constitutiva do gene da luciferase. As deleções foram confirmadas inicialmente por digestão pelas endonucleases *EcoRV/BglII* e posteriormente por sequenciamento (resultados não mostrados).

5.6.2 Alteração de sítios internos de *Nco*I e *Stu*I nos vetores pLew20 Δ tetO e pLew82 Δ tetO

Para permitir a subclonagem do gene de resistência à puromicina (*PAC*), foi necessário promover a mutagênese de alguns sítios internos de endonucleases. Um sítio de *Nco*I, presente na posição 206 de ambos os vetores, foi modificado de CCATGG para GCATGG. Além desse, um sítio interno de *Stu*I presente na posição 4005, apenas no vetor pLew20 Δ tetO, também foi alterado de AGGCCT para AAGCCT. Os clones contendo os plasmídeos com as mutações foram selecionados a partir de digestões utilizando as enzimas *Nco*I e *Stu*I (resultados não mostrados).

5.6.3 Alteração da marca de resistência

Os vetores pLew20 e pLew82 após sofrerem a remoção da região do operador de tetraciclina (agora denominados pLew20 Δ tetO e pLew82 Δ tetO) necessitaram da troca da marca de resistência ao antibiótico fleomicina - marca de resistência muito comum utilizada em outros vetores de transfecção de *T. brucei* (superexpressão e RNAi). Devido a isso, foi necessário mudar essa marca de resistência pelo gene da puromicina N-acetiltransferase (*PAC*), que confere resistência ao antibiótico puromicina. O gene *PAC* foi inicialmente amplificado por PCR a partir do vetor p2678, gerando um fragmento de 600 pb, flanqueado pelos sítios das enzimas de restrição *Nco*I e *Stu*I (Figura 23).

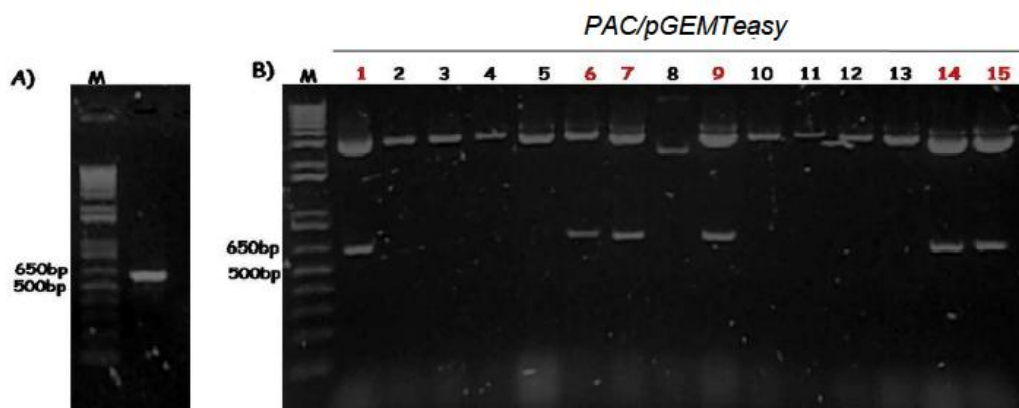


Figura 23. Clonagem do gene de resistência à puromicina (*PAC*). A) Gel de agarose 1% mostrando o fragmento *PAC* amplificado. B) Gel de agarose 1%, mostrando o perfil de digestão do DNA plasmidial, com liberação da banda de 600 pb referente ao gene *PAC*. M – marcador DNA Ladder 1Kb plus (Invitrogen). Coloração SYBR SAFE (Invitrogen).

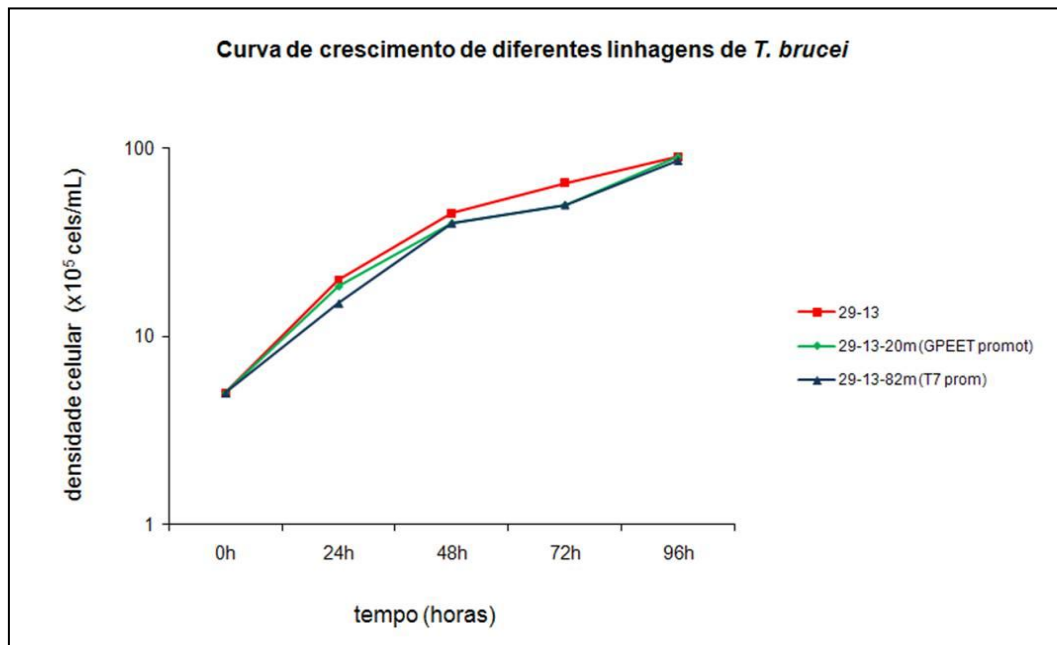
Em seguida, foi realizada a subclonagem do gene *PAC* nos vetores *pLew20ΔtetO* e *pLew82ΔtetO*. Com a confirmação das subclonagens do gene *PAC* e de todas as alterações necessárias os vetores finais foram denominados *pLew20ΔtetOpuro* e *pLew82ΔtetOpuro*.

5.6.4 Análise das linhagens obtidas

Os vetores *pLew20ΔtetOpuro* e *pLew82ΔtetOpuro* foram utilizados na transfecção de células de *T. brucei* da linhagem 29-13, e submetidos à seleção de clones por puromicina. Após seleção, as novas linhagens de *T. brucei* obtidas foram denominadas 29-13-20m e 29-13-82m, respectivamente. Essas novas linhagens foram submetidas a uma análise de crescimento e expressão da luciferase ao longo de uma curva, comparadas à linhagem parental 29-13 (Figura 24). Os perfis das curvas de crescimento das linhagens foram bastante similares, enquanto que a expressão da enzima foi bem mais pronunciada na linhagem 29-13-82m, resultado da regulação pelo promotor da T7 RNA polimerase. Novos testes de expressão foram realizados para avaliação e comparação das duas novas linhagens obtidas após cultivo contínuo das células (10 passagens) e os resultados mostraram uma redução drástica na expressão da linhagem 29-13-82m, enquanto que a linhagem 29-13-20m continuou a expressar luciferase em níveis regulares (resultados não mostrados).

Devido a isso, a linhagem 29-13-20m foi selecionada para as etapas posteriores do ensaio e foram usadas em transfecções com plasmídeos da série pD, contendo os homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* e seus respectivos mutantes. Entretanto durante o tempo de seleção ou em etapas subsequentes, ocorreram vários episódios de contaminação das culturas que inviabilizaram a continuação dos experimentos em tempo hábil.

A)



B)

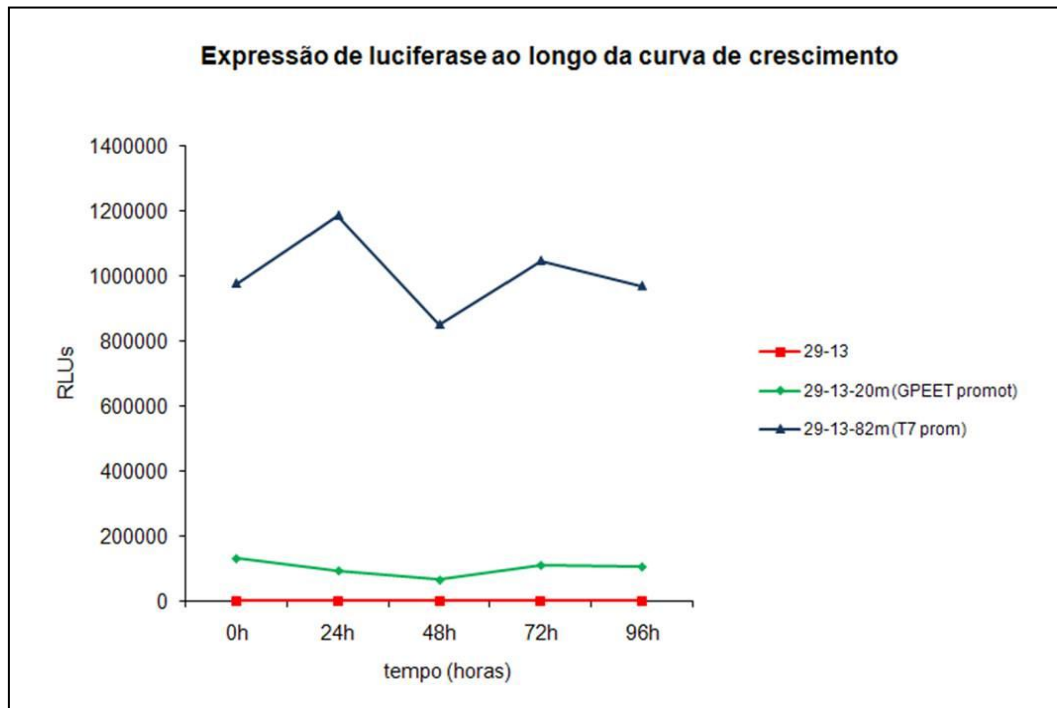


Figura 24. Linhagens de *Trypanosoma brucei* com expressão constitutiva de luciferase. A) Perfil de crescimento das novas linhagens de *T. brucei* (29-13-20m e 29-13-82m) comparadas com a linhagem parental (29-13). B) Expressão de luciferase (RLU – *relative light unit*) pelas linhagens ao longo de uma curva de crescimento (0 a 96 h), logo após seleção, onde se pode observar que ambas as linhagens são capazes de expressar a enzima ao longo de toda a curva, porém a maior produção ocorre na linhagem 29-13-82m, a qual possui transcrição controlada pelo promotor da T7 RNAPol.

5.7 Repórter traducional bicistrônico

Para avaliar de forma mais direta a capacidade individual de cada homólogo em recrutar a maquinaria de tradução, foi desenvolvido um ensaio de tradução *in vivo* por ancoramento usando células de *T. brucei*, o qual incluiu a construção de um vetor para o mRNA bicistrônico e de outro vetor para a inserção da sequência λ N-(1-22) em fusão com os homólogos do eIF4F de *T. brucei*, bem como a posterior avaliação da expressão através da detecção dos repórteres fluorescentes. A ideia inicial era trabalhar apenas com os dois homólogos da subunidade eIF4G, mas devido ao bom andamento do trabalho e à falta de uma proteína que sabidamente funcionaria em recrutar a maquinaria de tradução (controle positivo), decidiu-se testar todos os homólogos disponíveis, para que o conjunto completo de resultados fosse analisado.

5.7.1 Obtenção das sequências sintéticas do peptídeo λ N-(1-22) e boxB

A primeira etapa para obtenção dos vetores a serem usados neste ensaio incluiu a obtenção das sequências sintéticas do peptídeo λ N-(1-22) e da região intergênica contendo a estrutura boxB. Após as reações de pareamento e ligação dos oligonucleotídeos, foram obtidas as bandas específicas de tamanho esperado, as quais tiveram suas sequências confirmadas através de sequenciamento (Figura 25) e puderam ser usadas nas etapas subseqüentes.

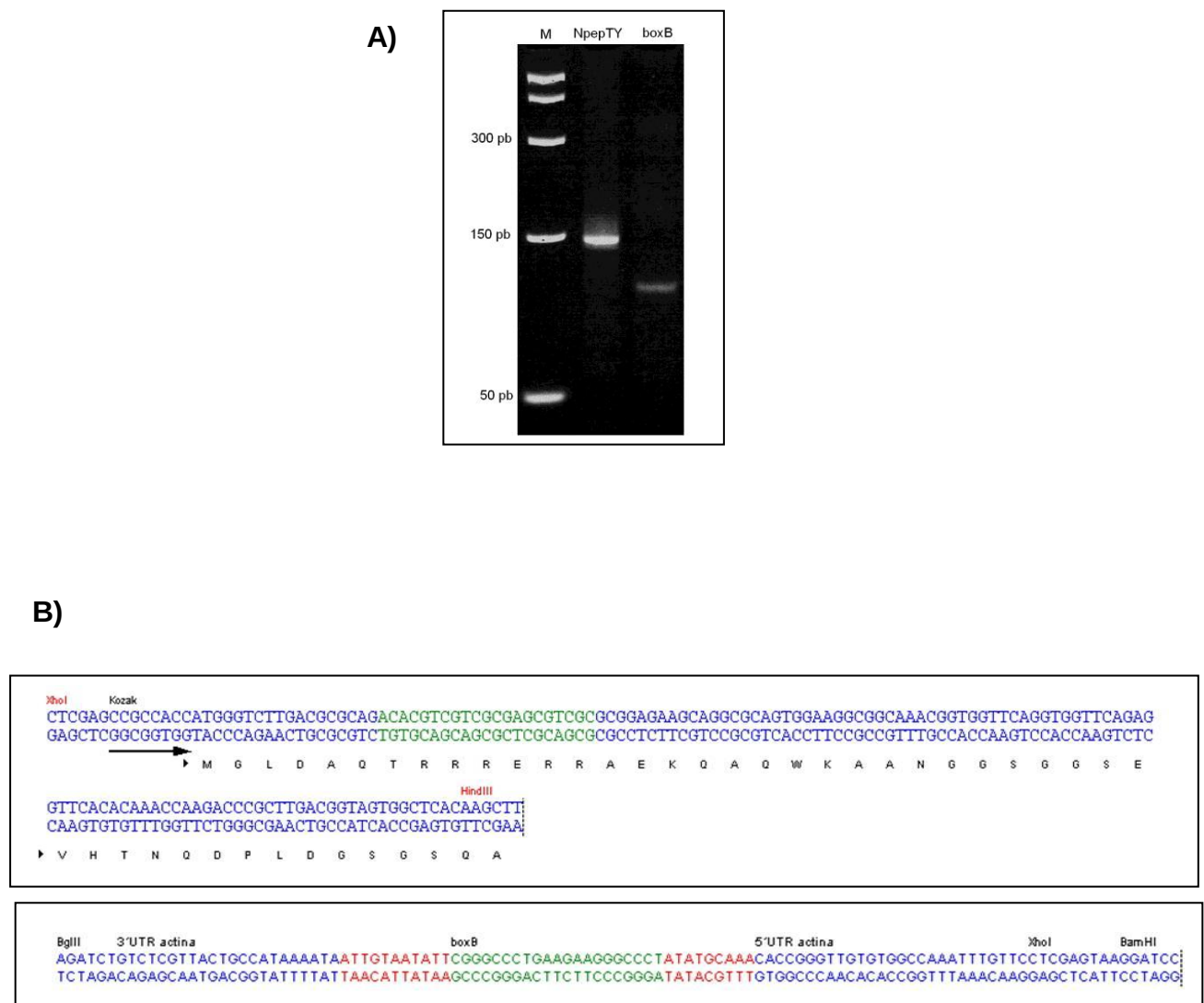


Figura 25. Sequências codificadoras para o NpepTY e sequência boxB. A) Gel de poliacrilamida a 6% corado com brometo de etídeo, mostrando as bandas obtidas após pareamento e ligação dos oligonucleotídeos. As bandas apresentam os tamanhos aproximados de 150 pb e 135 pb e são referentes as sequências nucleotídicas do NpepTY e da região intergênica contendo a estrutura boxB, respectivamente. M - marcador PCR marker (New England Biolabs). B) Representação das sequências sintéticas do NpepTY e região intergênica contendo a estrutura boxB. Em verde, estão representadas as regiões envolvidas diretamente na interação λ N-(1-22)/boxB.

5.7.2 Construção dos plasmídeos efetores

O vetor de expressão em *T. brucei* p3927 modificado foi usado como base para promover a expressão das proteínas efetoras, mas para isso foram necessárias algumas modificações, dentre elas, a inserção da sequência NpepTY e as subclonagens dos genes de interesse (homólogos das subunidades do complexo eIF4F) gerando ao final uma série de plasmídeos denominada pD (Figura 26). Os plasmídeos desta série têm região de integração no *locus* de tubulina e transcrição controlada por cinco operadores de tetraciclina.

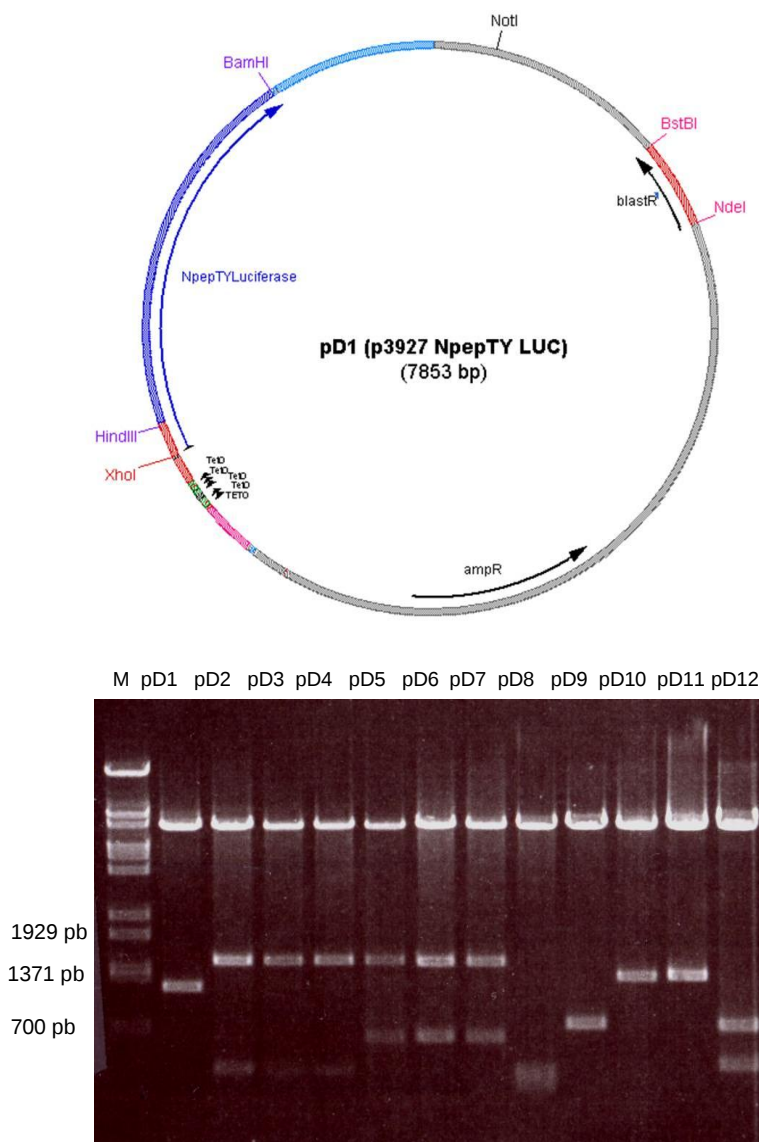


Figura 26. Plasmídeos efetores. A) Representação do plasmídeo pD1 da série de plasmídeos efetores pD, indicando seus principais componentes e sítios de restrição. B) Gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo, mostrando o perfil de bandas dos plasmídeos efetores pD1 a pD12 após digestão com as enzimas *HindIII* e *BamHI*. M – marcador de peso molecular, λ *BstEII*.

5.7.3 Construção de um vetor para produção de mRNAs bicistrônicos (plasmídeo repórter)

O vetor inicial p3605 foi modificado por uma série de etapas de subclonagens, a fim de permitir a expressão de um mRNA bicistrônico, contendo a sequência codificadora da proteína fluorescente eGFP, seguida de uma região intergênica contendo a estrutura em grampo boxB e da região codificadora da proteína sTomato, obtendo assim uma estrutura similar ao representado abaixo, e cujo plasmídeo foi denominado p4214 (Figura 27).

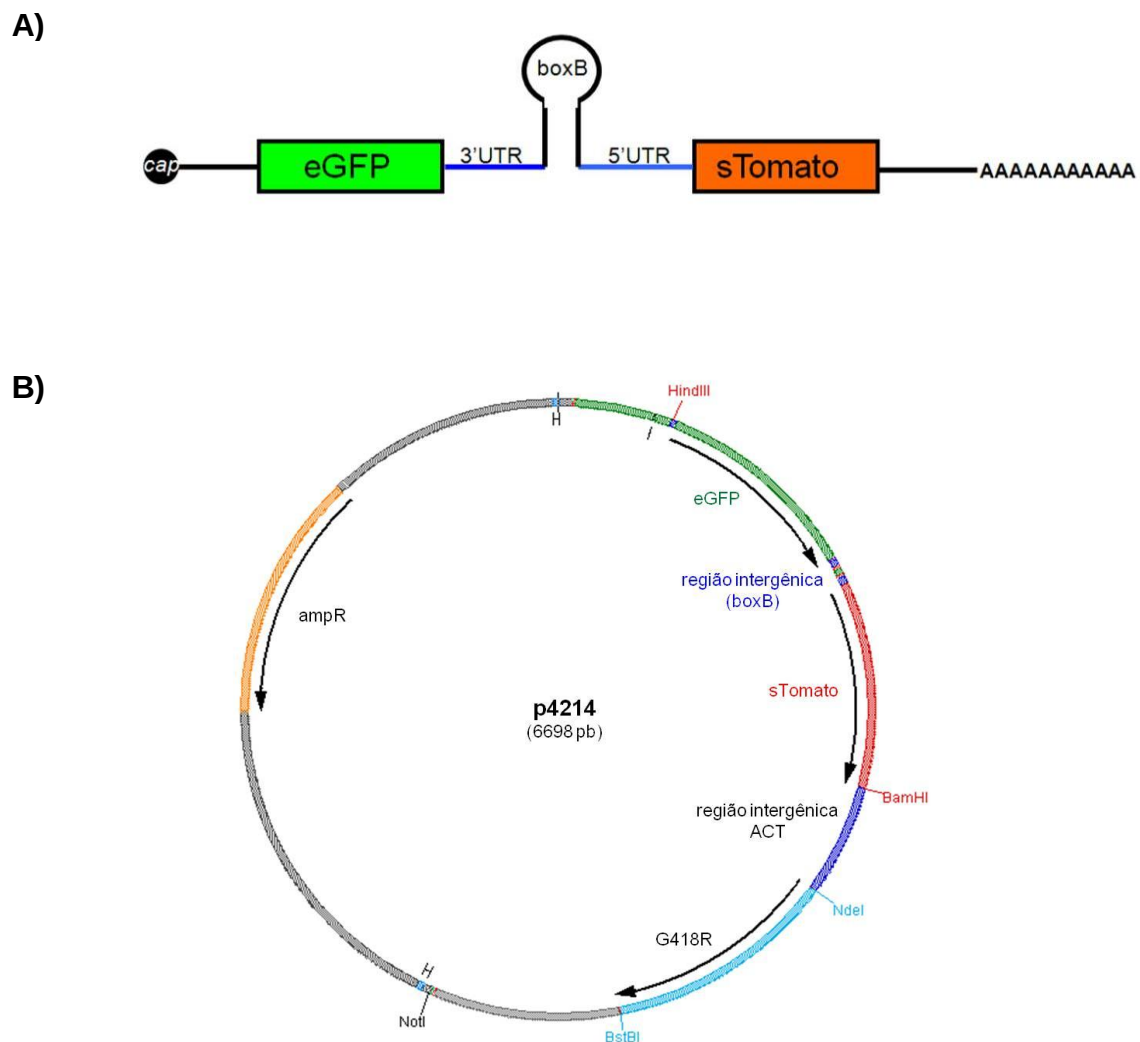


Figura 27. Repórter traducional bicistrônico. A) Esquema representativo do mRNA bicistrônico apresentando a região intergênica contendo a sequência boxB, que separa o primeiro códon, com *cap*, que codifica para a proteína fluorescente eGFP do segundo códon, que contém a região codificadora da proteína fluorescente sTomato. B) Representação do plasmídeo p4214 da série de plasmídeos repórteres, indicando seus principais componentes e sítios de restrição.

Após transfecção dos parasitas com o plasmídeo repórter, nove clones da nova linhagem obtida (denominada 4214) foi analisada quanto à expressão constitutiva da proteína eGFP por microscopia de fluorescência. Todos os clones expressaram eGFP de forma similar e satisfatória (Figura 28).

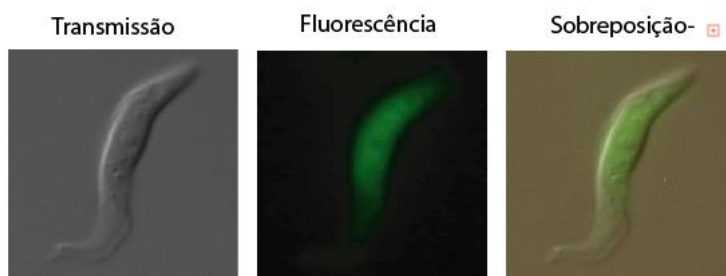


Figura 28. Análise da expressão do mRNA-repórter bicistrônico. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência de uma célula de *Trypanosoma brucei* da linhagem 4214 com expressão constitutiva de eGFP.

A partir daí, três desses clones, denominados C5, C7 e C9, foram utilizados para obtenção de RNA total e o mRNA em questão foi avaliado por *Northern blot*, utilizando duas sondas diferentes para a hibridização: a primeira com alvo para a região codificadora de sTomato e a segunda, para eGFP (Figura 29). O resultado identificou a presença de bandas de mesmo peso molecular (aproximadamente 1560 pb), utilizando as duas sondas diferentes, mostrando que o mRNA bicistrônico estava presente e íntegro em todos os clones analisados.

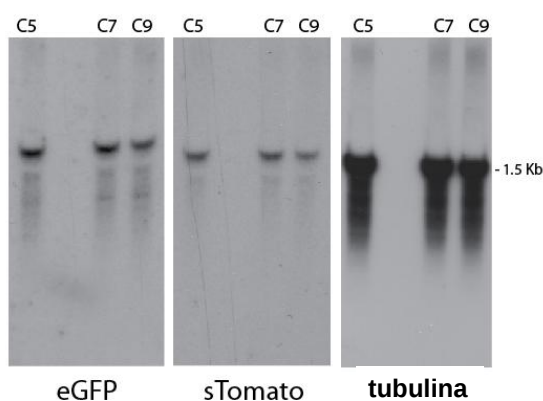


Figura 29. Análise da integridade do mRNA bicistrônico por *Northern blot*. Duas sondas marcadas com P^{32} (eGFP e sTomato) foram utilizadas em ensaio de *Northern blot* para confirmar a integridade do mRNA repórter. A sonda de tubulina foi usada como controle de peso molecular.

5.7.4 Ensaio de ancoramento e análise de expressão das proteínas fluorescentes por citometria de fluxo

Posteriormente à confirmação da integridade do mRNA, células da nova linhagem 4214 foram utilizadas na transfecção com os plasmídeos efetores. Inicialmente foram utilizados apenas alguns dos plasmídeos efetores para testar a indução das proteínas de fusão, correspondentes ao controle negativo - pD1 (luciferase) e um homólogo de cada subunidade do complexo eIF4F - pD2 (*TbEIF4G3*), pD10 (*TbEIF4E3*) e pD12 (*TbEIF4AI*). Após transfecção e indução com tetraciclina, a expressão das proteínas efetoras foi avaliada por *Western blot*. Todas as proteínas em questão foram expressas em tamanho esperado (Figura 30).

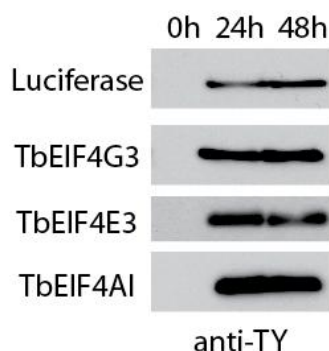


Figura 30. Análise da expressão das proteínas efetoras por *Western blot*. A presença das proteínas nas linhagens expressando os plasmídeos pD1 (luciferase), pD2 (*TbEIF4G3*), pD10 (*TbEIF4E3*) e pD12 (*TbEIF4AI*), respectivamente, foi confirmada através de *Western blot* utilizando anticorpo anti-TY. As amostras foram avaliadas após 24 e 48 h após adição de tetraciclina.

Essas mesmas culturas foram submetidas à análise em citômetro de fluxo. A análise por citometria confirmou a identificação de células expressando eGFP, entretanto nenhuma das amostras analisadas apresentou expressão da proteína sTomato (Figura 31).

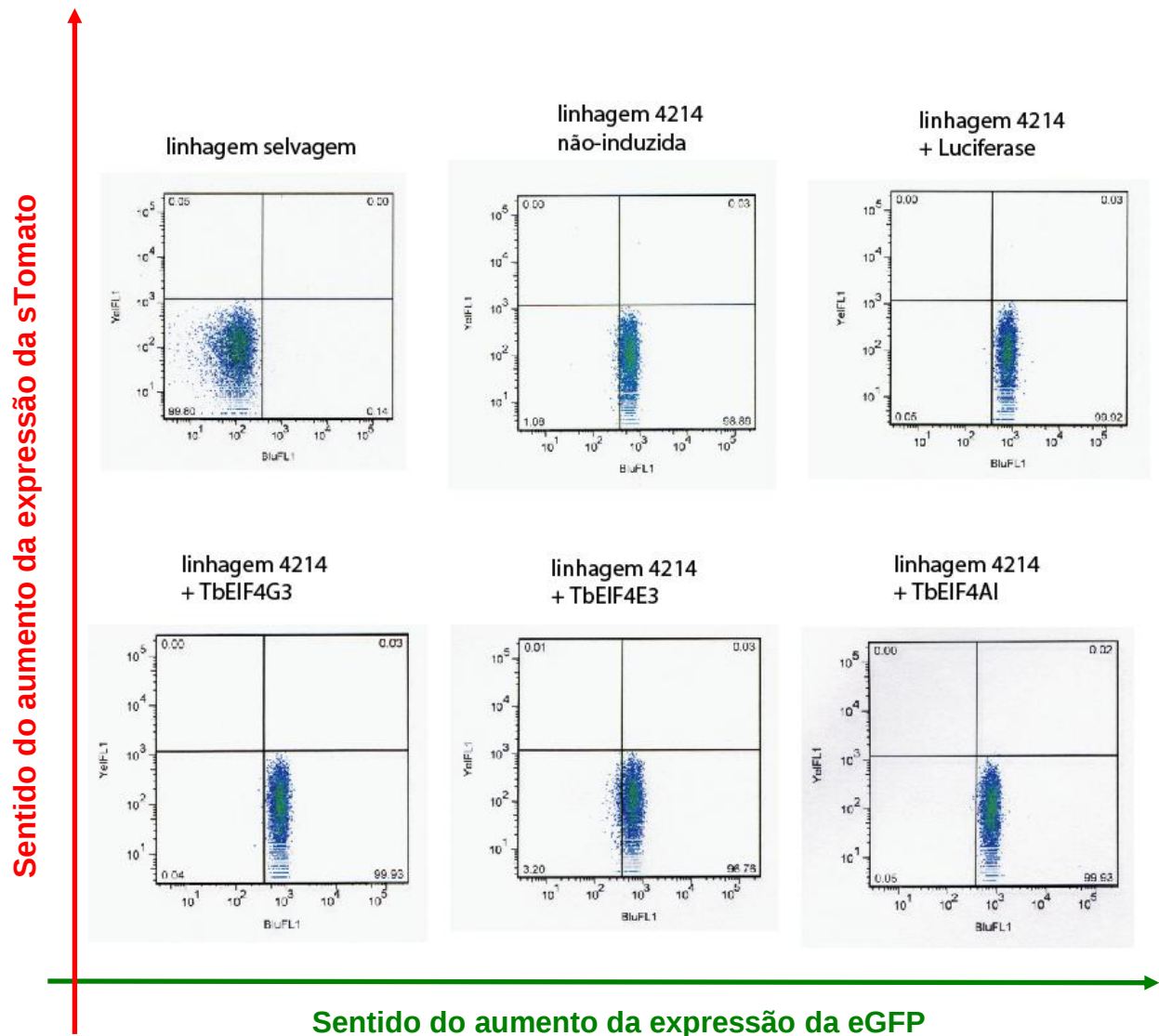


Figura 31. Análise das proteínas fluorescentes por citometria de fluxo. A presença de proteínas fluorescentes nas linhagens expressando os plasmídeos pD1 (Luciferase), pD2 (*TbEIF4G3*), pD10 (*TbEIF4E3*) e pD12 (*TbEIF4AI*), respectivamente, foi confirmada através de citometria de fluxo, utilizando os laser de 488 nm (BluFL1 - eixo das abcissas) para detecção de eGFP e de 561 nm (YelFL1 - eixo das ordenadas), para detecção da sTomato.

5.7.5 Otimização das condições do ensaio de ancoramento

Devido ao resultado negativo inicial, algumas modificações foram realizadas no vetor do mRNA-repórter, na intenção de se obter um mRNA com maior estabilidade e/ou maior número de cópias. Desta forma, a sequência nucleotídica presente entre os dois cístrons do mRNA foi alterada, gerando uma região intergênica ligeiramente maior

e contendo uma parte da sequência *spliced-leader* de *T. brucei* e a 3'UTR do vetor inicial (actina) foi trocada pela região intergênica da proteína paraflagelar de *T. brucei* (PFR), que geraria um maior nível de expressão do repórter. Em outra tentativa de otimização, o sistema de expressão do mRNA repórter foi transferido para um vetor induzido por tetraciclina (pDex377), que a princípio geraria uma nível de expressão superior ao vetor de expressão constitutiva (Figura 32).

BglII 3' UTR actina
 AGATCTCACC GGTTGTGTGGCCAAATTTGTTCTGTCGTTGCTGTGCGTTGACACGGCTCGTGGGGCCCTGAAGAAGGGCCCTAACGCTATTATTAGAACA
 TCTAGAGTGGCCCAACACACCGGTTTAAACAAGACAGCAACGACACGCAACTGTGCCGAGCAGCCCGGGACTTCTTCCCGGGATTGCGATAATAATCTTGT
 5' UTR actina
 GTTTCTGTA CTATATTGGTCTCGTTACTGCCATAAAATACTCGAGTAAGGATCC
 CAAAGACATGATATAACCAGAGCAATGACGGTATTTTATGAGCTCATTCTAGG
 boxB
 XhoI BamHI
 SL

Figura 32. Sequência intergênica boxB otimizada. Representação da sequência sintética modificada da região intergênica contendo a estrutura boxB (em verde). SL representa parte da sequência *spliced-leader*.

Após modificações no p4214, foram obtidos os novos plasmídeos p4227 (sequência intergênica original e 3' UTR da PFR); p4228 (sequência intergênica otimizada e 3' UTR da PFR) e p4235 (sequência intergênica otimizada e vetor induzível). Após transfeção, os níveis de expressão da eGFP das novas linhagens foram então avaliados por Northern e *Western blots* e comparados com os níveis de expressão da linhagem anterior 4214 (Figura 33).

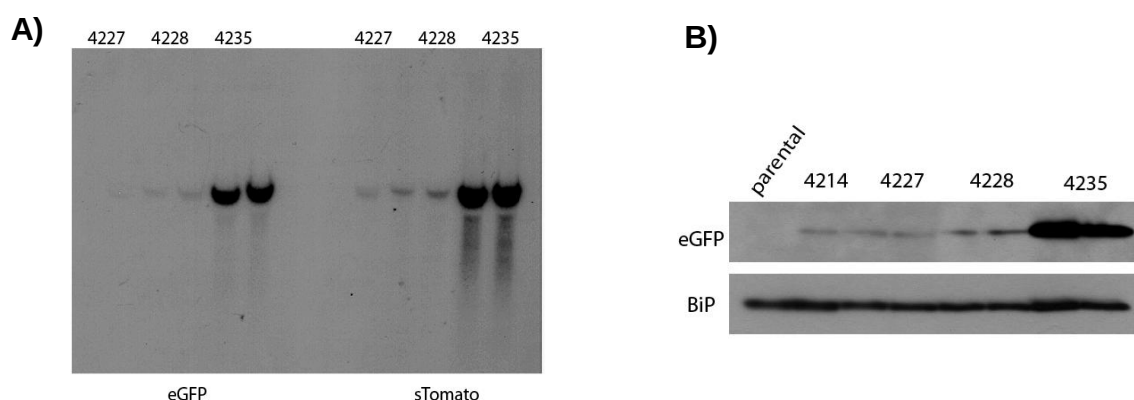


Figura 33. Análise das diferentes linhagens de *Trypanosoma brucei* expressando um mRNA-repórter bicistrônico. A) Análise da expressão dos mRNAs por *Northern blot*, com as sondas radioativas para as sequências de eGFP e sTomato. B) Aliquotas de 5×10^5 células referentes a dois clones das diferentes linhagens expressando o mRNA repórter foram analisadas por *Western blot* usando anticorpo anti-eGFP. A expressão da proteína BiP foi usada como controle.

Devido ao bom resultado com a expressão de eGFP, a linhagem 4235 foi escolhida para ser utilizada nas novas transfecções, desta vez testando todos os homólogos das diferentes subunidades do complexo eIF4F (Figura 34). Após indução dos plasmídeos repórteres e efetores e análise no citômetro, foi possível constatar que a nova linhagem 4235 é capaz de expressar 10 vezes mais eGFP que as linhagens resultantes de vetores constitutivos. Entretanto, mesmo com todas as modificações, o resultado não foi diferente do visto com a linhagem inicial 4214 e, com exceção da linhagem controle que expressava a sTomato constitutivamente, nenhuma célula expressando a proteína vermelha sTomato foi detectada durante as análises por microscopia de fluorescência ou por citometria de fluxo (Figura 35).

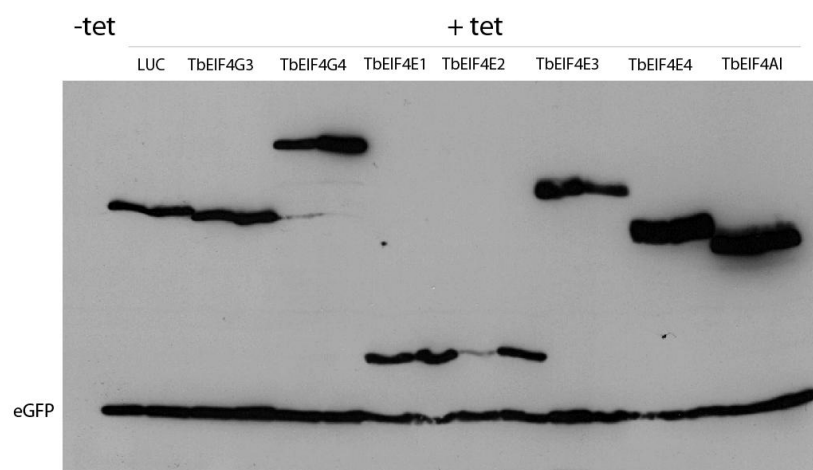


Figura 34. Análise da expressão das proteínas efetoras. A presença das proteínas de fusão nas linhagens expressando os plasmídeos da série pD foi confirmada através de *Western blot* utilizando anticorpo anti-TY. Amostras de dois clones de cada linhagem foram avaliadas após 24 h de indução com tetracilina (+tet) e comparadas com a amostra controle (-tet).

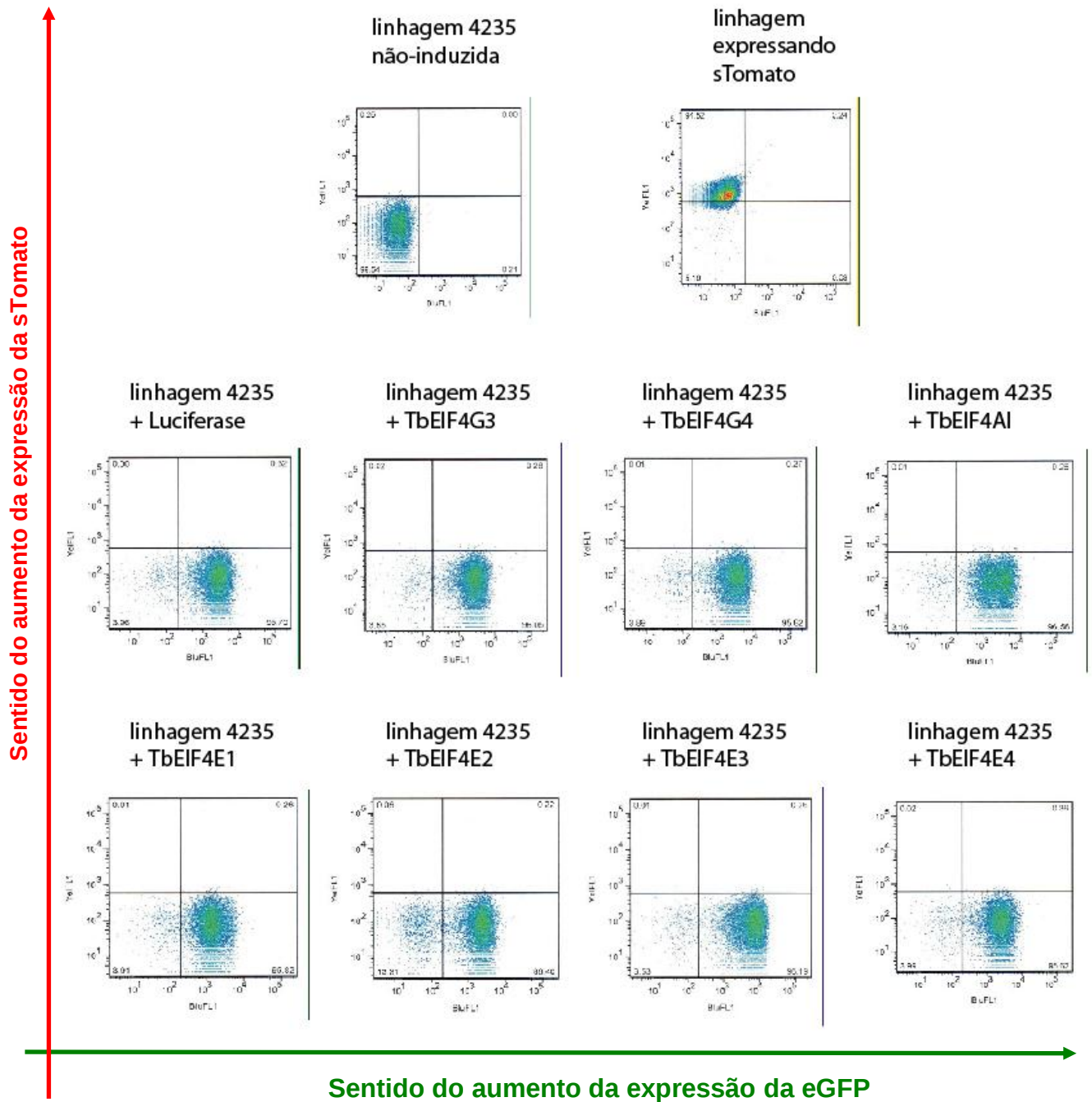


Figura 35. Análise das proteínas fluorescentes por citometria de fluxo. A presença de proteínas fluorescentes nas linhagens expressando as proteínas efetoras foi avaliada através de citometria de fluxo, utilizando os laser de 488 nm (BluFL1 - eixo das abcissas) para detecção de eGFP e de 561 nm (YeIFL1 - eixo das ordenadas), para detecção da sTomato. Uma linhagem expressando a proteína sTomato e a linhagem 4235 não induzida foram usadas como controle do experimento.

5.7.6 Confirmação da interação λ N-(1-22)/boxB

Diante dos resultados, foi necessário checar se a interação λ N-(1-22)/boxB estava ocorrendo de forma efetiva. Para isso, foram testados clones da linhagem 4214 expressando as proteínas *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* em fusão ao NpepTY. Foi feita então uma imunoprecipitação das proteínas efetoras a fim de extrair e identificar o RNA que estaria interagindo com estas, através de RT-PCR.

Como controle inicial, foram realizadas reações de RT-PCR utilizando RNA total extraído do sedimento das culturas 4214 e 4235 (- tet e + tet), além da linhagem parental 4106. Foi confirmada a presença dos RNAs tanto da eGFP quanto da sTomato, além de mostrar a especificidade da reação (Figura 36).

Em seguida, amostras de imunoprecipitação das proteínas efetoras presentes na fração citoplasmática de lisados celulares destas linhagens foram submetidas à extração de RNA total e estes foram analisados por RT-PCR nas mesmas condições, tendo como alvo a sequência codificante da sTomato. Foi observada a presença de fragmentos de aproximadamente 700 pb, cuja identidade foi confirmada por sequenciamento. Assim foi possível confirmar a presença do mRNA bicistrônico nas amostras de imunoprecipitação contendo as proteínas efetoras, mostrando que a interação λ N-(1-22)/boxB ocorreu devidamente.

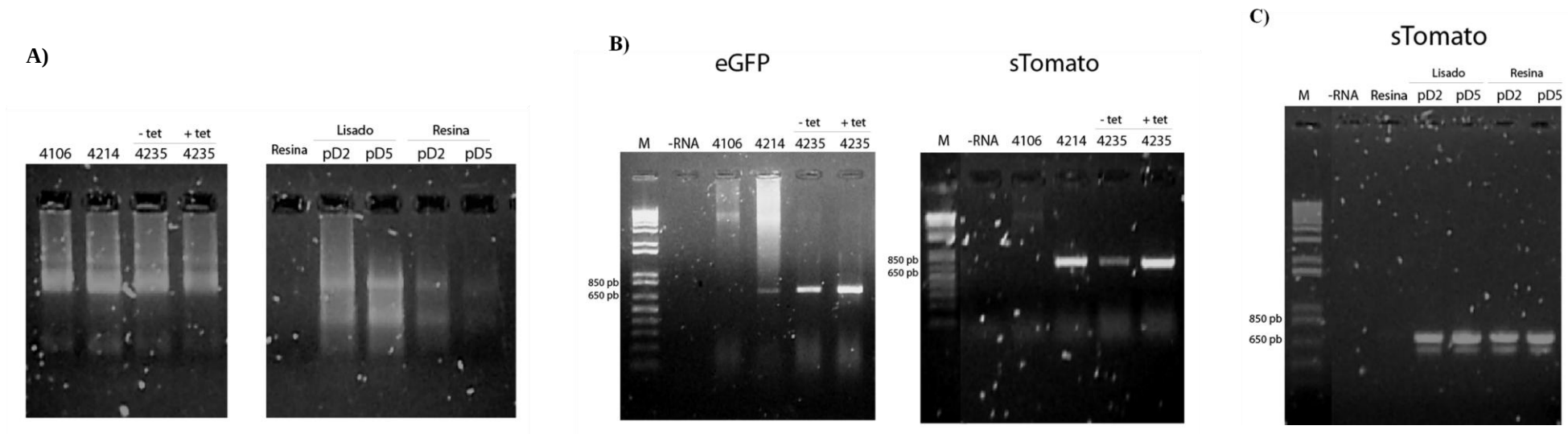


Figura 36. Interação λ N-(1-22)/boxB. A) Géis de agarose a 1,2 %, mostrando alíquotas de RNA total de amostras de diferentes linhagens de *T. brucei* (painel esquerdo) e RNAs presentes nas amostras da fração citoplasmática de lisados de células com expressão dos plasmídeos efetores pD2 e pD5 e das resinas usadas na etapa de imunoprecipitação (painel direito). B) Géis de agarose a 0,8%, mostrando as bandas produzidas após reação de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para as sequências eGFP e sTomato e RNA total das diferentes linhagens de *T. brucei* usadas no ensaio de ancoramento, bem como controles sem RNA (- RNA) e com RNA da linhagem parental 4106. C) Gel de agarose a 0,8%, mostrando as bandas identificadas após RT-PCR das amostras de lisado e resina usadas na imunoprecipitação. Como controles foram usadas amostras sem RNA (-RNA) e de RNA extraído da resina incubada apenas com tampão de lise (resina). M – marcador Ladder 1Kb plus (Invitrogen). Coloração SYBR SAFE (Invitrogen).

5.8 Resultados complementares

Como a tradução é um processo que envolve a interação de diversas proteínas, o estudo dos múltiplos homólogos dos fatores de iniciação da tradução de tripanossomatídeos se interliga em diversos momentos. Devido a isso, foram obtidos resultados em alguns experimentos paralelos realizados ao longo do doutorado, que contribuíram para a caracterização de quatro homólogos da subunidade eIF4E, através da confirmação de sua localização celular; e no caso dos homólogos da PABP identificados inicialmente em *L. major*, mostrou-se necessária a investigação de sua função através da interferência de RNA, sendo então utilizadas as proteínas correspondentes em *T. brucei*.

5.8.1 Localização subcelular dos *TbEIF4Es* por imunofluorescência

Da mesma forma que foi aplicada aos dois homólogos do eIF4G, foram realizadas reações de imunofluorescência, utilizando anticorpos policlonais imunopurificados para quatro homólogos da subunidade eIF4E (*TbEIF4E1* a *TbEIF4E4*) (Figura 37). Foram identificados dois padrões de localização: uma distribuição ao longo de toda a célula (núcleo e citoplasma) para os homólogos *TbEIF4E1* e *TbEIF4E2*; e uma localização restrita ao citoplasma para as proteínas *TbEIF4E3* e *TbEIF4E4*. Este padrão diferenciado já havia sido observado pela detecção das mesmas proteínas fusionadas à eYFP e, juntamente com os demais resultados obtidos é indicativo que proteínas que apresentam a localização ao longo de toda a célula poderiam estar envolvidas no transporte núcleo/citoplasma de mRNAs, enquanto que as proteínas de distribuição apenas citoplasmática, poderiam ser os homólogos funcionais envolvidos na tradução.

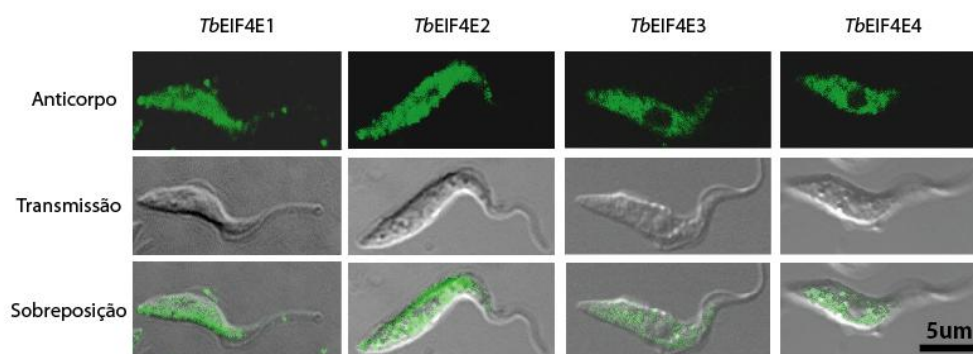


Figura 37. Localização subcelular dos homólogos *TbEIF4E1* a 4. Células procíclicas de *T. brucei* linhagem 427 foram submetidas a reações de imunofluorescência indireta. Foram utilizados anticorpos policlonais imunopurificados seguido da incubação com anti-IgG de coelho marcado com AlexaFluor488. *TbEIF4E1* e 2 apresentam distribuição ao longo de toda a célula enquanto que *TbEIF4E3* e 4 apresentaram localização restrita ao citoplasma, podendo ver a região referente ao núcleo sem emissão de fluorescência. As imagens foram analisadas em microscópio confocal a laser Leica TCPS SP2 AOBS.

5.8.2 RNAi das *TbPABPs* e análise do perfil de síntese proteica por marcação metabólica

A viabilidade celular de células de *T. brucei* após indução de RNAi dos dois homólogos da PABP foi avaliada da mesma forma que foi aplicado para os homólogos do eIF4G (Figura 38). As curvas de crescimento mostraram que ambas as proteínas são essenciais à viabilidade celular do parasita. O efeito na cinética de crescimento celular em ambos os casos é observado a partir de 24 h de indução. Neste mesmo ponto já pode ser observada a depleção da proteína *TbPABP1*, enquanto que não ocorre a depleção total nos níveis de *TbPABP2* mesmo após 72 h. O perfil de síntese proteica avaliado por marcação metabólica também apresentou diferenças. A proteína *TbPABP1* apresentou uma diminuição na captação de metionina radioativa a partir de 48 h de indução de RNAi, enquanto que a *TbPABP2* apenas diminui a síntese proteica em 72 h, o que já pode ser reflexo da morte celular e não estar relacionado com a depleção da proteína. Estes resultados indicam um possível papel da *TbPABP1* na síntese proteica, enquanto que a *TbPABP2* poderia desempenhar uma função distinta, porém envolvida no metabolismo de RNAs.

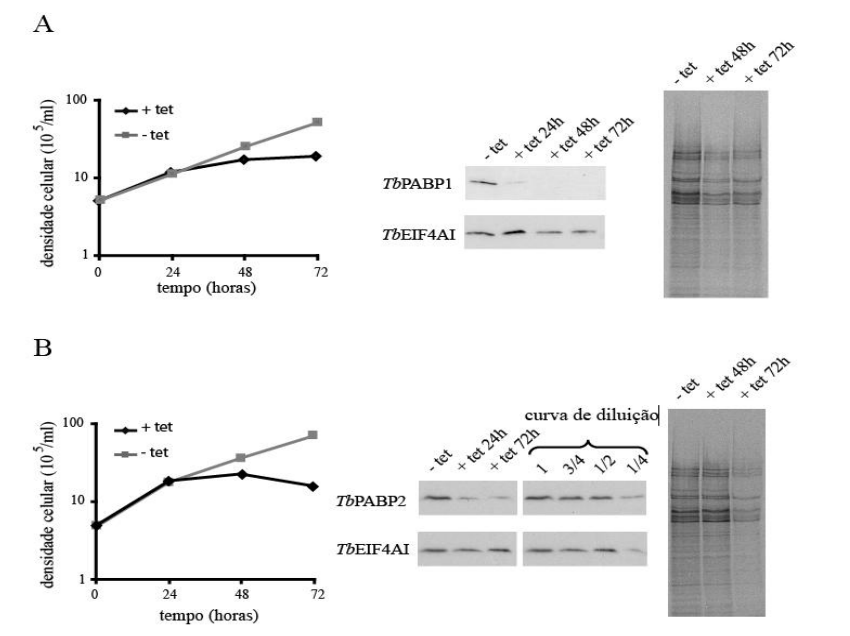


Figura 38. Marcação metabólica dos homólogos da PABP de *Trypanosoma brucei* após indução de RNAi. A) Curva de crescimento de cultura controle (-tet) e após indução do RNAi (+ tet) da *TbPABP1* (esquerda). A depleção da proteína ao longo da curva foi avaliada por *Western blot* (centro) e o perfil da marcação metabólica foi avaliado em autorradiografias mostrando o perfil de captação de metionina radioativa de amostras coletadas em tempos determinados da curva (direita). B) Mesmo procedimento realizado para a proteína *TbPABP2*.

6. DISCUSSÃO

O estudo dos processos biológicos básicos de organismos patogênicos é uma das etapas-chave para a obtenção de novos conhecimentos que ajudem a estabelecer formas de neutralização desses parasitas. Com a conclusão do sequenciamento dos genomas dos três principais representantes da família Trypanosomatidae (TriTryps) (BERRIMAN *et al.*, 2005; EL SAYED *et al.*, 2005a; IVENS *et al.*, 2005), a busca por sequências de proteínas que estejam envolvidas em processos básicos destes parasitas tornou-se uma ferramenta essencial para a compreensão da sua biologia. A análise comparativa dos genomas dos TriTryps revelou que mais da metade de seus genes são bem conservados e que apresentam um alto grau de sintonia (EL SAYED *et al.*, 2005b). Desta forma, o estudo de processos conservados, como a tradução, utilizando um modelo experimental de uma determinada família pode ser fundamental para o entendimento nas demais espécies.

Os recentes esforços na compreensão da etapa de tradução e seus mecanismos de controle nos tripanossomatídeos têm mostrado que esse processo apresenta diferenças importantes ao observado em outros eucariotos (DHALLIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2009). Isso pode ser resultado da falta de mecanismos de controle da expressão gênica durante a transcrição, tornando assim a biossíntese proteica uma etapa crucial nesse controle. Como têm sido descrito nos últimos anos, vários homólogos a fatores de iniciação da tradução já foram identificados em tripanossomatídeos e caracterizados de forma preliminar, mas ainda não foi possível elucidar todos os eventos que conduzem ao reconhecimento do mRNA mensageiro pelo ribossomo. Este grande número de homólogos identificados, no que se refere ao complexo eIF4F, é certamente intrigante e pode ser um ponto-chave para explicar como estes parasitas conseguem regular e alterar sua expressão gênica frente às mudanças morfológicas e fisiológicas que eles sofrem durante as diferentes fases do seu ciclo de vida.

Os resultados de interação *in vitro* entre os homólogos de eIF4G de *L. major* e as demais subunidades do complexo eIF4F obtidos em trabalho anterior, bem como o início do processo de mapeamento dos domínios envolvidos nessas interações (REIS, 2009), serviram como ponto de partida para a investigação da função dos principais homólogos da subunidade eIF4G *in vivo*, utilizando para isso a espécie *T. brucei*. Para

TbEIF4G3 e *TbEIF4G4*, os resultados da imunofluorescência obtidos no presente estudo confirmaram a localização citoplasmática das duas proteínas, corroborando o que já tinha sido observado em trabalho anterior com a superexpressão *in vivo* das proteínas fusionadas à eYFP (MOURA, 2007). A distribuição citoplasmática destas proteínas é similar ao que foi encontrado para alguns homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F de *T. brucei*. Assim como os EIF4Gs, as proteínas *TbEIF4A1*, *TbEIF4E3* e *TbEIF4E4* foram identificadas no citoplasma, com pouca ou nenhuma localização nuclear (DHALLIA *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2011) bem como a proteína PABP de *L. major* (*LmPABP1*) (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). A presença destas proteínas no citoplasma é compatível com sua interação com mRNAs maduros e com um possível envolvimento na tradução e, como elas estão distribuídas no mesmo compartimento celular, mostra que elas poderiam interagir entre si, formando complexos. Resultados obtidos para o fator eIF4G de humano também mostram o eIF4G apresentando localização citoplasmática, com distribuição periférica e também na região perinuclear (rica em retículo endoplasmático) (WILLETT *et al.*, 2006). Neste último caso, os autores inferem um papel desses fatores no recrutamento de mRNAs codificantes de proteínas secretórias e de membrana e, possivelmente, de algumas proteínas nucleares, as quais devem possuir mRNAs presentes nessa área específica da célula. Outros experimentos com fracionamento de vários tipos celulares têm mostrado que componentes da maquinaria de tradução apresentam um padrão complexo de localização, mostrando que os fatores de tradução podem vir associados a ribossomos, a mRNAs específicos e a componentes do citoesqueleto da célula (BASSELL *et al.*, 1999; JANSEN, 1999).

A análise do perfil de captação de metionina radioativa após indução da interferência de RNA mostrou que as células respondem de forma diferente à depleção (*knock down*) das proteínas em estudo. A diminuição dos níveis de *TbEIF4G3* levou a uma rápida diminuição da incorporação de metionina logo nas primeiras horas após indução de RNAi, enquanto que a depleção do *TbEIF4G4* alterou pouco ou quase nada da captação, mesmo após 72 h de indução de RNAi. Um experimento semelhante feito com os quatro homólogos do eIF4E de *T. brucei* mostrou que o *knock down* do *TbEIF4E3* e da combinação *TbEIF4E1/4* foram os únicos responsáveis pela inibição geral da tradução (FREIRE *et al.*, 2011). Resultado similar foi encontrado para as *TbPABPs* (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). A rápida e potente diminuição da tradução vista com diminuição dos níveis endógenos do *TbEIF4G3* por RNAi é realmente

intrigante, visto que foi diferente de todas as respostas dos homólogos das demais subunidades do eIF4F avaliadas até o momento (DHALLIA *et al.*, 2005; DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2011). Entretanto, nenhuma alteração na tradução global foi vista na análise do *TbEIF4G4*, mesmo com a mudança de morfologia das células que precedeu a morte celular. Um estudo recente de análise de fenótipos observados após *knock down* em larga escala dos genes de *T. brucei*, nas suas diferentes formas do ciclo de vida (procíclica, sanguínea e durante diferenciação induzida), classificou o *TbEIF4G4* num grupo de genes que causavam perda de *fitness* significativa após depleção, em todas as formas de vida avaliadas, enquanto que, de forma surpreendente, o *TbEIF4G3* foi inserido no grupo de genes que não causam nenhuma perda de *fitness* em nenhuma das formas do ciclo de vida (ALSFORD *et al.*, 2011). Este resultado vai de encontro com os dados obtidos neste trabalho, principalmente porque o fenótipo observado após RNAi do *TbEIF4G3* é um dos mais rápidos e potentes vistos até o momento, quando comparado com os realizados para os demais homólogos dos fatores de tradução identificados.

Na avaliação da ligação eIF4G/eIF4E, os resultados obtidos na imunoprecipitação com anti-HA e anti-TY confirmam a interação específica *TbEIF4G3/TbEIF4E4* e *TbEIF4G4/TbEIF4E3* já observadas com os ortólogos de *Leishmania* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (YOFFE *et al.*, 2009). Entretanto, nas condições do experimento, não foi observada a interação entre *TbEIF4G3* e *TbEIF4E1*, citada no mesmo trabalho, onde os autores identificaram esta interação tanto por purificação com a resina m⁷-GTP-Sepharose quanto por *pull-down in vivo*. No presente trabalho, apenas em ensaios contendo amostras concentradas da resina usada na imunoprecipitação foi possível identificar a interação entre dois homólogos (*TbEIF4G3* e 4) com o *TbEIF4A1*.

O uso de proteínas com mutações em sítios específicos foi importante para o mapeamento dos motivos de interação destas proteínas. A sequência dos resíduos de aminoácidos FSL presentes na região N-terminal da proteína já tinha sido identificada como envolvida na interação *TbEIF4G3/ TbEIF4E4*, através de ensaios de *pull down in vitro* (REIS, 2009) e duplo-híbrido (YOFFE *et al.*, 2009), entretanto, a identificação de um sítio distinto do consenso YXXXXLφ, mas que apresenta uma discreta semelhança (MSVSDLL), é um dado novo e interessante, mostrando que tripanossomatídeos podem ter uma interação eIF4G/eIF4E diferenciada. Neste trabalho não foi possível identificar claramente a interação *TbEIF4G3/TbEIF4E3* vista no trabalho de Freire e

colaboradores (2011). Isto pode ter ocorrido provavelmente devido à diferença dos níveis de expressão das proteínas de fusão. A expressão ectópica dos homólogos da subunidade eIF4E leva à produção de níveis muito elevados das proteínas de fusão comparados aos obtidos com os homólogos do eIF4G o que deve ter facilitado a identificação da interação supracitada. A mesma interação foi confirmada por imunoprecipitação das proteínas endógenas e uma nova investigação de quais seriam os aminoácidos envolvidos nesta ligação ainda precisa ser realizada. A interação eIF4G/eIF4E têm sido alvo de vários grupos de pesquisa para atuação de diferentes drogas que interfiram na biossíntese proteica para o tratamento de diversas disfunções, servindo como ferramentas terapêuticas potenciais em mamíferos e até o momento, apresentam resultados satisfatórios, o que reforça o interesse nessas proteínas em outros organismos (MOERKE *et al.*, 2007; HOEFFER *et al.*, 2011; CENCIC *et al.*, 2011).

Os resíduos LNK presentes no domínio MIF4G de ambos os homólogos estudados estão presentes nas proteínas eIF4G e correlatas de outras espécies, como humanos, leveduras e plantas. Assim como nas outras espécies, os resíduos fazem parte de uma região que apresenta alto grau de conservação, formada pelos resíduos 736VRSILNKLT744, situados entre o primeiro par de hélices da estrutura HEAT. Múltiplos aminoácidos do domínio HEAT, localizados em posições distintas já foram citados como importantes para a interação eIF4G/eIF4A. Isso justifica porque teria ocorrido apenas uma redução na ligação entre as proteínas mutantes de *T. brucei* com o TbEIF4AI, pois outros aminoácidos podem ser necessários para que ocorra a interação de forma efetiva. Mutações realizadas no sítio ativo da atividade de helicase dos homólogos TbEIF4AI e TbEIF4AIII identificaram um fenótipo dominante-negativo para o mutante do TbEIF4AI, resultando numa potente inibição da síntese proteica e redução de crescimento das células, enquanto que o do TbEIF4AIII não causou efeito algum na viabilidade celular de *T. brucei* (DHALIA *et al.*, 2006). Neste trabalho, em relação à análise da expressão dos mutantes do TbEIF4G3 e TbEIF4G4 na viabilidade celular, um efeito dominante negativo foi visualizado apenas para o mutante LNK do TbEIF4G3, enquanto que os demais causaram pouco ou nenhum efeito sobre o crescimento das células. Considerando uma taxa molar de 1:1:1 na interação das subunidades do complexo eIF4F, o maior impacto do mutante LNK poderia se justificar pela diferença nos níveis de expressão das proteínas formadoras do complexo. Enquanto os homólogos TbEIF4E3 e TbEIF4E4 são expressos em níveis de 10^4

moléculas/ célula, o *TbEIF4AI* é o fator mais abundante, com níveis de aproximadamente 10^5 moléculas/célula (DHALLIA *et al.*, 2006, FREIRE *et al.*, 2011). Assim, a presença de mutações que afetem a interação eIF4G/eIF4A seriam mais pronunciadas, já que a versão mutante continua capaz de se ligar ao eIF4E, causando o sequestro desta proteína e dificultando a formação de complexos funcionais. No caso das mutações que afetam a interação eIF4G/eIF4E, mesmo havendo sequestro do *TbEIF4AI*, este ainda estaria presente em níveis suficientes (já que ele é expresso 10 vezes mais em comparação aos EIF4Es) para promover a formação do complexo eIF4F e a iniciação da tradução.

A utilização da expressão ectópica das proteínas EIF4Gs nativas e mutantes também foi útil para identificar a existência de uma possível via de controle dos níveis intracelulares destas proteínas. Resultados recentes envolvendo o sequenciamento dos mRNAs que estariam associados com os homólogos do eIF4E de tripanossomatídeos, mostraram que, diferente dos demais, o *TbEIF4E3* está ligado em grande parte ao seu próprio mRNA (HOLETZ F, dados não publicados), o que poderia ser sugestivo de algum tipo de autorregulação. A utilização da mesma abordagem para os EIF4Gs poderia verificar se o mesmo ocorre nestas proteínas.

Já a ligação eIF4G/PABP avaliada em *T. brucei* mostra a interação específica entre *TbEIF4G3* e *TbPABP1*, reforçando um possível papel da *TbPABP1* na iniciação da tradução. A fraca ligação entre *TbEIF4G4* e *TbPABP2* ainda precisa ser melhor investigada, pois esta interação não foi vista nos ensaios *in vitro* e o homólogo *TbPABP2* apresenta características diferenciadas da *TbPABP1*, e pode não estar envolvida na tradução, porém com indícios de possuir uma função envolvida no processamento e/ou transporte de mRNAs (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010).

Todas as interações observadas pelos ensaios de imunoprecipitação, juntamente com os fenótipos observados pela depleção das proteínas por RNAi reiteram a hipótese da presença de, no mínimo, dois complexos eIF4F atuando nos tripanossomatídeos (*TbEIF4G3/TbEIF4E4/TbEIF4AI/TbPABP1* e *TbEIF4G4/TbEIF4E3/TbEIF4AI*) com características de ligação diferenciadas, com aquele contendo o *TbEIF4G3* tendo um papel mais pronunciado para a viabilidade dos parasitas.

Para um estudo mais aprofundado da ação do *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* na tradução em *T. brucei*, fez-se necessária a utilização de um ensaio que acessasse

suas funções *in vivo* de forma mais direta. A função das diferentes subunidades do complexo eIF4F de iniciação da tradução de humanos foi confirmada através de ensaios de ancoramento (DE GREGORIO *et al.*, 1999; 2001) e a mesma abordagem foi aplicada a células de *T. brucei*, na tentativa de identificar ortólogos dos fatores de tradução nos tripanossomatídeos. Diferentemente do que foi visto em células de mamíferos, os resultados obtidos para os múltiplos homólogos das diferentes subunidades do complexo eIF4F em *T. brucei* não gerou nenhum indício de quais deles são os ortólogos funcionais. Como se sabe a técnica de ancoramento, apesar de poderosa, é artificial. Apenas resultados positivos são representativos, e a falta de efeitos não deve ser interpretada como resultado funcional negativo; pois algumas proteínas ligadoras de RNA necessitam de outras proteínas ou de elementos presentes no sítio de ligação do mRNA, para que sua função seja desempenhada de forma eficaz (COLLER e WICKENS, 2007). Uma possibilidade é que a iniciação da tradução em tripanossomatídeos ocorra de forma singular e totalmente dependente da estrutura *cap* e/ou de outros elementos do mRNA. Outra, é que o ensaio de ancoramento da maneira que foi realizado não continha todos os elementos otimizados para que isto ocorresse da melhor forma em tripanossomatídeos. Entretanto estes foram resultados preliminares e devem ser mais bem investigados, pois várias modificações podem ser realizadas a fim de otimizar o ensaio. A otimização da técnica de ancoramento inclui modificações que podem melhorar seu desempenho, como alterações no número e localização dos sítios de ancoramento, a escolha dos repórteres, a conformação do mRNA, a escolha de um melhor sistema de interação proteína-RNA (λ N-(1-22)/boxB; IRE/IRP ou MS2/RNA), entre outros (COLLER e WICKENS, 2007; MINSHALL *et al.*, 2010).

Recentemente um vetor bicistrônico para identificação de elementos envolvidos na regulação pós-transcricional presentes nas UTRs de *T. cruzi* foi testado com bons resultados, utilizando repórteres enzimáticos baseado na comparação da atividade das luciferases (ARAÚJO *et al.*, 2011). A linhagem de *T. brucei* gerada, com expressão constitutiva de luciferase e compatível com novas transfecções utilizando plasmídeos que conferem resistência à fleomicina, deve permitir a avaliação quantitativa da influência da depleção das proteínas nativas e/ou da superexpressão de mutantes na tradução. Seguindo o mesmo raciocínio, modificações nos plasmídeos usados no ensaio de ancoramento poderão ainda levar a uma otimização e este servir como uma forma elegante de confirmação dos dados obtidos até o momento. Espera-se com isso,

obter resultados robustos e que elucidem o papel das proteínas *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, assim como os homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F, no metabolismo do parasita.

7. CONCLUSÕES

- Os fatores estudados, *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, são citoplasmáticos e essa localização, confirmada por expressão fluorescente e imunofluorescência, é condizente com um possível papel na tradução.
- A expressão ectópica de ambos os homólogos, na sua sequência selvagem, leva à diminuição dos níveis de expressão produzidos pelos genes endógenos, sugerindo que a expressão destas proteínas é regulada; entretanto, isto não é responsável por alterações no perfil de crescimento das células.
- A expressão ectópica do *TbEIF4G3* apresentando mutações em aminoácidos envolvidos na interação com homólogos do eIF4E não altera os níveis de expressão das proteínas endógenas, mas ainda assim levam à uma diminuição discreta no perfil de crescimento celular.
- A mutação nos resíduos LNK do *TbEIF4G3*, responsável pela interação com o *TbEIF4A1*, resulta numa forte diminuição da viabilidade celular de *T. brucei*, enquanto que a mesma mutação no *TbEIF4G4* não altera o perfil de crescimento celular.
- As proteínas estudadas, quando contendo mutações em sítios específicos, perdem e/ ou diminuem a capacidade de interação com os homólogos das subunidades eIF4E e eIF4A.
- O ensaio de ancoramento baseado na técnica de *tethering* não se mostrou útil na identificação da função direta dos homólogos de tripanossomatídeos como fatores de iniciação da tradução.
- A nova linhagem de *T. brucei* obtida, com expressão constitutiva de luciferase, pode ser útil na avaliação da ação dos homólogos estudados como estimuladores ou inibidores da tradução.
- Em conjunto, os resultados confirmam a presença de pelo menos dois complexos eIF4F (*TbEIF4G3/TbEIF4E4/TbEIF4A1* e *TbEIF4G4/TbEIF4E3/TbEIF4A1*) em *T. brucei*, que apresentam sítios de interação à subunidade eIF4E distintos e, aquele contendo o *TbEIF4G3*, aparentemente, possui uma maior importância para a viabilidade celular do parasita.

8. REFERÊNCIAS

ALBRECHT M; LENGAUER T. Survey on the PABC recognition motif PAM2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 316: 129-138, 2004.

ALLARD S; KOPIK K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. **Cell Notes** 21: 23-26, 2008.

ALSFORD *et al.* High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. **Genome Res.** 21(6): 915-924, 2011

AMRANI N *et al.* Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. **Nature** 453: 1276-1280, 2008.

ANDRADE M; BORK P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. **Nat. Genet.** 11: 115-116, 1995.

ARAÚJO P *et al.* Development of a dual reporter system to identify regulatory cis-acting elements in untranslated regions of *Trypanosoma cruzi* mRNAs. **Parasitol. Int.** 60(2): 161-169, 2011.

BARHOUMI M *et al.* *Leishmania infantum* LelF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. **FEBS J.** 273: 5086-5100, 2006.

BASSELL G; OLEJNIKOV Y; SINGER R. The travels of mRNAs through all cells large and small. **FASEB J.** 13: 447-454, 1999.

BASTIN P *et al.* A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 77(2): 235-239, 1996.

BATES E; KNUPFER E; SMITH D. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. **Nucleic Acids Res.** 28: 1211-1220, 2000.

BATISTA *et al.* A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol.** 10: 259, 2010.

BATISTA J *et al.* Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 67: 301-312, 1994.

BAYELE H. *Trypanosoma brucei*: a putative RNA polymerase II promoter. **Exp. Parasitol.** 123: 313-318, 2009.

BELLSOLELL L *et al.* Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. **Structure** 14: 913-923, 2006.

BERCOVICH N *et al.* Identification of core components of the exon junction complex in trypanosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.** 166: 190-193, 2009.

BERRIMAN *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science.** 309(5733): 416-422, 2005.

BRADLEY C *et al.* Mass spectrometric analysis of the N terminus of translational initiation factor eIF4G-1 reveals novel isoforms. **J. Biol. Chem.** 277: 12559-12571, 2002.

BRINGAUD F; RIVIÈRE L; COUSTOU V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Mol. Biochem. Parasitol.** 149(1): 1-9, 2006.

BROWNING K. The plant translational apparatus. **Plant Mol. Biol.** 32: 107-144, 1996.

BRUN *et al.* Human African trypanosomiasis. **Lancet** 375: 148-59, 2010.

BRUN R; SCHONENBERGER M. Cultivation and *in vitro* cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. **Acta Trop** 36: 289-292, 1979.

BRUNE C *et al.* Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. **RNA** 11: 517-531, 2005.

BUGUET A *et al.* The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. **Sleep Med. Rev.** 5(2): 139-153, 2001.

BYRD M; ZAMORA M; LLOYD R. Translation of eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) proceeds from multiple mRNAs containing a novel cap-dependent internal ribosome entry site (IRES) that is active during poliovirus infection. **J. Biol. Chem.** 280: 18610-18622, 2005.

BYRD M; ZAMORA M; LLOYD R. Generation of multiple isoforms of eukaryotic translation initiation factor 4GI by use of alternate translation initiation codons. **Mol. Cell Biol.** 22: 4499-4511, 2002.

CAMPBELL D; THOMAS S; STURM N. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect.** 5: 1231-1240, 2003.

CARON S *et al.* Selective modification of eukaryotic initiation factor 4F (eIF4F) at the onset of cell differentiation: recruitment of eIF4GII and long-lasting phosphorylation of eIF4E. **Mol. Cell Biol.** 24: 4920-4928, 2004.

CARUTHERS J; JOHNSON E; MCKAY D. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 97: 13080-13085, 2000.

CENCIC *et al.* Blocking eIF4E-eIF4G interaction as a strategy to impair coronavirus replication. **J. Virol.** 85(13): 6381-6389, 2011.

CHAKRABURTTY K. Translational regulation by ABC systems. **Res. Microbiol.** 152: 391-399, 2001.

CHANG T *et al.* UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. **Genes Dev.** 18: 2010-2023, 2004.

CHAPPUIS F *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat. Rev. Microbiol.** 5: 873-882, 2007.

CHEKANOVA J; BELOSTOTSKY D. Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. **RNA** 9: 1476-1490, 2003.

CHENG S; GALLIE D. eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B bind the poly(A)-binding protein through overlapping sites within the RNA recognition motif domains. **J. Biol. Chem.** 282: 25247-25258, 2007.

CLAYTON C; SHAPIRA M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.** 156: 93-101, 2007.

CLAYTON C *et al.* Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 97: 221-224, 1998.

COLDWELL M; MORLEY S. Specific isoforms of translation initiation factor 4GI show differences in translational activity. **Mol. Cell Biol.** 26: 8448-8460, 2006.

COLLER J; WICKENS M. Tethered function assays: an adaptable approach to study RNA regulatory proteins. **Methods Enzymol.** 429: 299-321, 2007.

DA COSTA LIMA T *et al.* Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryot. Cell.** 9(10): 1484-1494, 2010.

DA COSTA LIMA T. Caracterização funcional de homólogos à Proteína de Ligação a Cauda Poli-A (PABP) de *Leishmania major*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife- PE. 98pp. 2007.

CRAIG A *et al.* Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. **Nature** 392: 520-523, 1998.

DANIELS J; GULL K; WICKSTEAD B. Cell biology of the trypanosome genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 74(4): 552-569, 2010.

DAS A; BELLOFATTO V. The non-canonical CTD of RNA-II is essential for productive RNA synthesis in *Trypanosoma brucei*. **PLOS One** 4, e6959, 2009.

DE GREGORIO E *et al.* Tethered-function analysis reveals that eIF4E can recruit ribosomes independent of its binding to the cap structure. **RNA** 7: 106-113, 2001.

DE GREGORIO E, PREISS T, HENTZE M. Translation driven by an eIF4G core domain *in vivo*. **EMBO J.** 18: 4865-4874, 1999.

DELESTIENNE N *et al.* The splicing factor ASF/SF2 is associated with TIA-1-related/TIA-1-containing ribonucleoproteic complexes and contributes to post-transcriptional repression of gene expression. **FEBS J.** 277(11): 2496-2514, 2010.

D'ORSO I; FRASCH A. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and Poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. **J. Biol. Chem.** 277: 50520-50528, 2002.

DHALIA R *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Res.** 34: 2495-2507, 2006.

DHALIA R *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Mol. Biochem. Parasitol.** 140: 23-41, 2005.

DUNN E *et al.* Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. **Genes Dev.** 19: 90-103, 2005.

ECKHARDT S *et al.* Artificial tethering of Argonaute proteins for studying their role in translational repression of target mRNAs. **Methods Mol. Biol.** 725:191-206, 2011.

EL-SAYED N *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 309: 409-415, 2005a.

EL-SAYED N *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science** 309: 404-409, 2005b.

ERSFELD K. Nuclear architecture, genome and chromatin organisation in *Trypanosoma brucei*. **Res. Microbiol.** 162(6): 626-636, 2011.

FÈVRE *et al.* The burden of human African trypanosomiasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2 (12): e333, 2008.

FREIRE E *et al.* The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Mol. Biochem. Parasitol.** 176(1): 25-36, 2011.

GALLIE D; BROWNING K. eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. **J. Biol. Chem.** 276: 36951-36960, 2001.

GILINGER G; BELLOFATTO V. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. **Nucleic Acids Res.** 29 (7): 1556-1564, 2001.

GINGRAS A; RAUGHT B; SONENBERG N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.** 68: 913-963, 1999.

GOODFELLOW I; ROBERTS L. Eukaryotic initiation factor 4E. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 40: 2675-2680, 2008.

GOYER C *et al.* TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. **Mol. Cell Biol.** 13: 4860-4874, 1993.

GRADI *et al.* A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. **Mol. Cell Biol.** 18: 334-342, 1998.

GUNAWARDENA S *et al.* NOM1 targets protein phosphatase I to the nucleolus. **J. Biol. Chem.** 283: 398-404, 2008.

GUNZL A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? **Eukaryot. Cell.** 9(8): 1159-11570, 2010.

HAILE S; PAPADOPOULOU B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr. Opin. Microbiol.** 10: 569-577, 2007.

HE H *et al.* The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection. **Mol. Cell. Biol.** 23(15): 5431-5445, 2003.

HENIS-KORENBLIT S *et al.* The caspase-cleaved DAP5 protein supports internal ribosome entry site-mediated translation of death proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 5400-5405, 2002.

HOEFFER C *et al.* Inhibition of the interactions between eukaryotic initiation factors 4E and 4G impairs long-term associative memory consolidation but not reconsolidation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 108(8): 3383-3388, 2011.

HOLZMANN K *et al.* A human common nuclear matrix protein homologous to eukaryotic translation initiation factor 4A. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 267: 339-344, 2000.

HONG Y; SARGE K. Regulation of protein phosphatase 2A activity by heat shock transcription factor 2. **J. Biol. Chem.** 274: 12967-12970, 1999.

HOSODA N, LEJEUNE F, MAQUAT L. Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. **Mol. Cell Biol.** 26: 3085-3097, 2006.

HOSODA N. Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. **J. Biol. Chem.** 278(40): 38287-38291, 2003.

HOTCHKISS T *et al.* *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. **Mol. Biochem. Parasitol.** 98: 117-129, 1999.

HOTEZ P; KAMATH A. Neglected tropical diseases in sub-saharan Africa: review of their prevalence, distribution, and disease burden. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 3(8): e412, 2009.

IMATAKA H; SONENBERG N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. **Mol. Cell Biol.** 17: 6940-6947, 1997.

IMATAKA H, GRADI A, SONENBERG N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. **EMBO J.** 17: 7480-7489, 1998.

IMATAKA H, OLSEN H, SONENBERG N. A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G. **EMBO J.** 16: 817-825, 1997.

IVENS A *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science** 309(5733): 436-442, 2005.

JACKSON R; HELLEN C; PESTOVA T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 11: 113-127, 2010.

Jansen R. RNA- cytoskeletal associations. **FASEB J.** 13:455-466, 1999.

JOSHI B *et al.* Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. **BMC Evol. Biol.** 5: 48-52, 2005.

KELLY S *et al.* Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. **Mol Biochem. Parasitol.** 154: 103-109, 2007.

KENNEDY P. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Ann. Neurol.** 64: 116-126, 2008.

KESSLER; SACHS A. RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with eukaryotic translation initiation factor 4G. **Mol. Cell Biol.** 18: 51-57, 1998.

KHALEGHPOUR K *et al.* Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. **Mol. Cell** 7: 205-216, 2001.

KORNEEVA N *et al.* Interaction between the NH2-terminal domain of eIF4A and the central domain of eIF4G modulates RNA-stimulated ATPase activity. **J. Biol. Chem.** 280(3): 1872-1881, 2005.

KORNEEVA N *et al.* Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. **J. Biol. Chem.** 276: 2872-2879, 2001.

KOZLOV *et al.* Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 98: 4409-4413, 2001.

KUHN U; WAHLE E. Structure and function of poly(A) binding proteins. **Biochim. Biophys. Acta** 1678: 67-84, 2004.

KUHN U; PIELER T. *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. **J. Mol. Biol.** 256: 20-30, 1996.

LAMPHEAR B *et al.* Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. **J. Biol. Chem.** 270: 21975-21983, 1995.

LE H, NOTT A, MOORE M. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. **Trends Biochem. Sci.** 28: 215-220, 2003.

LE H *et al.* The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. **EMBO J.** 19: 6860-6869, 2000.

LE H *et al.* Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. **J. Biol. Chem.** 272: 16247-16255, 1997.

LEE S; MCCORMICK F. p97/DAP5 is a ribosome-associated factor that facilitates protein synthesis and cell proliferation by modulating the synthesis of cell cycle proteins. **EMBO J.** 25: 4008-4019, 2006.

LEFEBVRE *et al.* Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. **J. Biol. Chem.** 281: 22917-22932, 2006.

LEJEUNE F; MAQUAT L. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. **Curr. Opin. Cell Biol.** 17: 309-315, 2005.

LESKINEN P, VIRTÄ M, KARP M. One-step measurement of firefly luciferase activity in yeast. **Yeast** 20: 1109-1113, 2003.

LEVY-STRUMPF N *et al.* DAP-5, a novel homolog of eukaryotic translation initiation factor 4G isolated as a putative modulator of gamma interferon-induced programmed cell death. **Mol. Cell Biol.** 17: 1615-1625, 1997.

LI *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. **Mol. Cell Biol.** 19: 7336-7346, 1999.

LINDER P. Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. **Biol. Cell** 95: 157-167, 2003.

LORSCH J; HERSCHLAG D. The DEAD box protein eIF4A. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide. **Biochemistry** 37: 2180-2193, 1998.

LUKING A, STAHL U, SCHMIDT U. The protein family of RNA helicases. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 33: 259-296, 1998.

LYE L *et al.* Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. **PLoS Pathog.** 6(10): e1001161, 2010.

MADER S *et al.* The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. **Mol. Cell Biol.** 15: 4990-4997, 1995.

MARCOTRIGIANO J *et al.* A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. **Mol. Cell** 7: 193-203, 2001.

MARCOTRIGIANO J *et al.* Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. **Mol. Cell** 3: 707-716, 1999.

MARCOTRIGIANO J *et al.* Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. **Cell** 89: 951-961, 1997.

MARINTCHEV *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. **Cell** 136: 447-460, 2009.

MARINTCHEV A; WAGNER G. eIF4G and CBP80 share a common origin and similar domain organization: implications for the structure and function of eIF4G. **Biochemistry** 44: 12265-12272, 2005.

MARINTCHEV A; WAGNER G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Q. Rev. Biophys.** 37: 197-284, 2004.

MARTINEAU Y *et al.* Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. **Mol. Cell Biol.** 28: 6658-6667, 2008.

MATSUO H *et al.* Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. **Nat. Struct. Biol.** 4: 717-724, 1997.

MAYBERRY L *et al.* Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: Plant eIF4B, eIF4F and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. **Plant Physiol.** 150: 1844-1854, 2009.

MELO E *et al.* Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. **J. Biol. Chem.** 278: 46357-46368, 2003.

MINSHALL N *et al.* Translational control assessed using the tethered function assay in *Xenopus* oocytes. **Methods** 51(1): 165-169, 2010.

MITTRA B; RAY D. Presence of a poly(A) binding protein and two proteins with cell cycle-dependent phosphorylation in *Crithidia fasciculata* mRNA cycling sequence binding protein II. **Eukaryot. Cell** 3: 1185-1197, 2004.

MOERKE N. Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. **Cell** 128(2): 257-267, 2007.

MORINO S *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. **Mol. Cell Biol.** 20: 468-477, 2000.

MOSHIRI H; SALAVATI R. A fluorescence-based reporter substrate for monitoring RNA editing in trypanosomatid pathogens. **Nucleic Acids Res.** 38(13): e138, 2010.

MOUGNEAU E; BIHL F; GLAICHENHAUS N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol. Rev.** 240(1): 286-296, 2011.

MOURA D. Utilização de abordagens moleculares *in vivo* no estudo de homólogos do fator de iniciação da tradução 4G (eIF4G) de tripanossomatídeos. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2007. 100pp.

NEVINS T *et al.* Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4GI and p97/DAP5/NAT1. **J. Biol. Chem.** 278: 3572-3579, 2003.

NIELSEN P; TRACHSEL H. The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. **EMBO J.** 7: 2097-2105, 1998.

PARRA-PALAU *et al.* Features in the N and C termini of the MAPK-interacting kinase Mnk1 mediate its nucleocytoplasmic shuttling. **J. Biol. Chem.** 27: 44197-44204, 2003.

PITULA J; RUYECHAN W; WILLIAMS N. *Trypanosoma brucei*: identification and purification of a poly(A)-binding protein. **Exp. Parasitol.** 88: 157-160, 1998.

PONTING C. Novel eIF4G domain homologues linking mRNA translation with nonsensemediated mRNA decay. **Trends in Biochem. Sci.** 25: 423-426, 2000.

PRÈVÔT D; DARLIX J; OHLMANN T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biol. Cell** 95: 141-156, 2003.

PTUSHKINA *et al.* Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. **EMBO J.** 18(14): 4068-4075, 1999.

PYRONNET S *et al.* Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. **EMBO J.** 18: 270-279, 1999.

REIS C. Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator eIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2009, 152pp.

REITHINGER R. Leishmaniasis' burden of disease: ways forward for getting from speculation to reality. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 2: e285, 2008.

REITHINGER R *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** 7: 581-596, 2007.

RHOADS R. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. **J. Biol. Chem.** 284, 16711-16715, 2009.

RUDENKO G. Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. **Essays Biochem.** 48(1): 201-219, 2010.

SAMBROOK J; RUSSELL D. **Molecular Cloning, a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS D, *et al.* Leishmaniasis treatment - a challenge that remains: a review. **Parasitol. Res.** 103: 1-10, 2008.

SCHEPER G; PROUD C. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? **Eur. J. Biochem.** 269: 5350-5359, 2002.

SCHIMANSKI B; NGUYEN T; GUNZL A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. **Eukaryot Cell.** 4: 1942-1950, 2005.

SCHUMANN BURKARD G; JUTZI P; RODITI I. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. **Mol. Biochem. Parasitol.** 175(1): 91-94, 2011.

SHI H *et al.* Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA. **RNA** 6: 1069-1076, 2000.

SIMMONS H *et al.* Identification of NOM1, a nucleolar, eIF4A binding protein encoded within the chromosome 7q36 breakpoint region targeted in cases of pediatric acute myeloid leukemia. **Gene** 347: 137-145, 2005.

SIMPSON A; STEVENS J; LUKES J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** 22: 168-174, 2006.

SKEIKY Y *et al.* LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **J. Immunol.** 161: 6171-6179, 1998.

SLADIC R *et al.* Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. **Eur. J. Biochem.** 271: 450-457, 2004.

SMIRLIS D *et al.* Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasit. Vectors** 3:107, 2010.

SONENBERG N; HINNEBUSCH A. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell** 136: 731-745, 2009.

SONENBERG N. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. **Biochem. Cell Biol.** 86: 178-183, 2008.

SONENBERG N; DEVER T. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 13: 56-63, 2003.

STEVENS J. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. **Parasite** 15(3): 226-232, 2008.

STUART K *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** 118: 1301-1310, 2008.

STUART K *et al.* Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends Biochem. Sci.** 30: 97-105, 2005.

SUBRAMANIAM C *et al.* Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome. **Eukaryot. Cell** 5: 1539-1549, 2006.

SUZUKI C *et al.* PDCD4 inhibits translation initiation by binding to eIF4A using both its MA3 domains. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105: 3274-3279, 2008.

SVITKIN Y; SONENBERG N. Translational control by the poly(A) binding protein: a check for mRNA integrity. **Mol. Biol.** 40: 684-693, 2006.

TANGE T; NOTT A; MOORE M. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. **Curr. Opin. Cell Biol.** 16: 279-284, 2004.

TARLETON R *et al.* The challenges of Chagas Disease - grim outlook or glimmer of hope. **PLoS Med.** 4: e332, 2007.

TARUN S, Jr.; SACHS A. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. **EMBO J.** 15: 7168-7177, 1996.

TSUBOI T; INADA T. Tethering of poly(A)-binding protein interferes with non-translated mRNA decay from the 5' end in yeast. **J. Biol. Chem.** 285(44): 33589-33601, 2010.

UCHIDA N *et al.* A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. **J. Biol. Chem.** 27: 50286-50292, 2002.

VON DER HAAR T; BALL P; MCCARTHY J. Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. **J. Biol. Chem.** 275: 30551-30555, 2000.

WEBB H *et al.* A novel strategy to identify the location of necessary and sufficient cis-acting regulatory mRNAs elements in trypanosomes. **RNA** 11: 1108-1116, 2009.

WEINSTEIN D; HONORE E; HEMMATI-BRIVANLOU A. Epidermal induction and inhibition of neural fate by translation initiation factor 4AIII. **Development** 124: 4235-4242, 1997.

WICKSTEAD; ERSFELD K; GULL K. Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 125: 211-216, 2002.

WILLETT M *et al.* Compartmentalisation and localisation of the translation initiation factor (eIF) 4F complex in normally growing fibroblasts. **Exp. Cell Res.** 312: 2942-2953, 2006.

WIRTZ E *et al.* A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 99: 89-101, 1999.

WOODS A *et al.* Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. **Mol. Cell Biol.** 25: 3763-3773, 2005.

YANAGIYA A *et al.* Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. **Mol. Cell Biol.** 29: 1661-1669, 2009.

YÁNGUEZ E; NIETO A. So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. **Virus Res.** 156(1-2): 1-12, 2011.

YOFFE *et al.* Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Res.** 37: 3243-3253, 2009.

YOFFE *et al.* Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. **Eukaryot. Cell** 5: 1969-1979, 2006.

YOFFE *et al.* Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **RNA** 10, 1764-1775, 2004.

Referências eletrônicas

International Health Wellcome Trust (2005) Trypanosomatids: genomes and biology, mídia magnética – CD1 (Acesso em outubro, 2010).

WHO, 2011a – Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/

Acesso em 16/06/2011.

WHO, 2011b – Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/burden/en/

Acesso em 27/06/2011.

9. ANEXOS

Anexo A

Tabela 5. Lista de vetores produzidos e/ou modificados ao longo do trabalho, juntamente com a descrição das suas principais características.

Vetor	Resumo das características
<i>p2T7-177/TbEIF4G3</i> <i>p2T7-177/TbEIF4G4</i>	Presença de 2 promotores de T7RNA pol em orientação inversa para produção de RNAs dupla-fita de genes clonados entre os sítios de <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i> , com integração na região de um minicromossomo de <i>T. brucei</i> e presença do gene de resistência à fleomicina
<i>p2477/TbEIF4G3</i> <i>p2477/TbEIF4G4</i>	Expressão de proteínas em fusão ao tag de HA separados por um sítio TEV de clivagem (TEV-6xHA), com integração na região de rDNA <i>T. brucei</i> , presença do gene de resistência à fleomicina.
<i>pLew20</i>	Vetor de expressão em <i>T. brucei</i> sob controle do promotor de RNA pol I, presença de 2 sequências do operador de tetraciclina (TetO), região de integração de rDNA, presença do gene de resistência à fleomicina
<i>pLew82</i>	Vetor de expressão em <i>T. brucei</i> sob controle do promotor de T7 RNA pol, presença de 1 sequência do operador de tetraciclina (TetO), região de integração de rDNA, presença do gene de resistência à fleomicina
<i>pLew20ΔtetO</i>	<i>pLew20</i> com deleção da região dos operadores de tetraciclina
<i>pLew82ΔtetO</i>	<i>pLew82</i> com deleção da região do operador de tetraciclina
<i>pLew20ΔtetO-NcoI</i>	<i>pLew20</i> com deleção da região dos operadores de tetraciclina e modificação no sítio da endonuclease <i>Nco I</i>
<i>pLew82ΔtetO-NcoI</i>	<i>pLew82</i> com deleção da região dos operadores de tetraciclina e modificação no sítio da endonuclease <i>Nco I</i>
<i>pLew20ΔtetO-NcoI-StuI</i>	<i>pLew20</i> com deleção da região dos operadores de tetraciclina e modificação nos sítios das endonucleases <i>Nco I</i> e <i>Stu I</i>
<i>pGEMTeasy/PAC</i>	Vetor de clonagem contendo a ORF do gene da puromicina acetiltransferase (PAC)
<i>pLew20ΔtetOpuro</i>	<i>pLew20</i> com deleção da região dos operadores de tetraciclina, modificação nos sítios das endonucleases <i>Nco I</i> e <i>Stu I</i> e marca de resistência à puromicina
<i>pLew82ΔtetOpuro</i>	<i>pLew82</i> com deleção da região do operador de tetraciclina, modificação nos sítios das endonucleases <i>Nco I</i> e <i>Stu I</i> e marca de resistência à puromicina

<i>p3927</i>	Vetor de expressão em <i>T. brucei</i> , de caráter induzível, com região de integração e controle do promotor do <i>locus</i> de tubulina, presença de 5 sequências do operador de tetraciclina (TetO), presença de marca de resistência à blasticidina
<i>pD0</i>	<i>p3927</i> modificado para permitir a fusão do epítipo TY à porção N-terminal das proteínas de interesse
<i>série pD</i>	<i>pD0</i> modificado contendo as ORFs da luciferase (<i>pD1</i>) e dos homólogos dos fatores de iniciação da tradução de tripanossomatídeos (<i>pD2 a pD12</i>)
<i>p3605</i>	Vetor de expressão em <i>T. brucei</i> , de caráter constitutivo, com região de integração e controle do promotor do <i>locus</i> de tubulina, presença do gene de resistência a blasticidina
<i>p3605_G418</i>	<i>p3605</i> com modificação da marca de resistência para G418
<i>eGFP/pGEMT</i>	Vetor de clonagem contendo a ORF do gene da proteína verde fluorescente (eGFP)
<i>sTomato/pGEMT</i>	Vetor de clonagem contendo uma sequência da ORF do gene da proteína fluorescente vermelha Tomato
<i>p4214</i>	<i>p3605_G418</i> modificado para expressão de um mRNA bicistrônico, com ORFs para eGFP e sTomato, separadas por uma região intergênica contendo a sequência boxB, clonadas entre os sítios de <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i>
<i>PFR/pJET2.1</i>	Vetor de clonagem comercial contendo a sequência da região intergênica da proteína paraflagelar de <i>T. brucei</i> (PFR)
<i>p4227</i>	<i>p4214</i> modificado, com substituição da região 3' UTR da actina pela região intergênica da PFR
<i>p4228</i>	<i>p4227</i> modificado, com substituição da região intergênica contendo a sequência boxB inicial, por uma sequência box sintética otimizada
<i>pDex377</i>	Vetor de expressão em <i>T. brucei</i> , de caráter induzível, com integração no minicromossomo, controle do promotor da prociclina EP1 e da 3'UTR da aldolase e presença do gene de resistência à higromicina
<i>p4235</i>	derivativo do <i>pDex377</i> , modificado para expressão de um mRNA bicistrônico, com ORFs para eGFP e sTomato, separadas por uma região intergênica contendo a sequência boxB otimizada, clonadas entre os sítios de <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i> , com controle pela 3'UTR da PFR e marca de resistência a G418.

Anexo B

Artigo intitulado “**Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners**”, publicado no periódico Eukaryotic Cell em outubro de 2010.

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

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

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

Received 11 June 2010/Accepted 19 July 2010

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pulldown assays. Pulldown assays were performed essentially as described previously (20), using glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare). The beads alone or GST or GST-tagged PABP fusions immobilized on the beads were assayed for the ability to bind to 35 S-labeled *LmEIF4G3*, obtained after transcription and translation of the full-length gene cloned on the pET21D plasmid. Alternatively, GST-tagged full-length *LmEIF4G3* (GST-*LmEIF4G3*₁₋₆₃₆ [21]) was incubated with the 35 S-labeled *Leishmania* PABP homologues obtained through the transcription and translation of the pET21A-derived plasmids linearized with either NotI (*LmPABP2* and -3) or HindIII (*LmPABP1*).

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

RESULTS

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

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

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

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

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

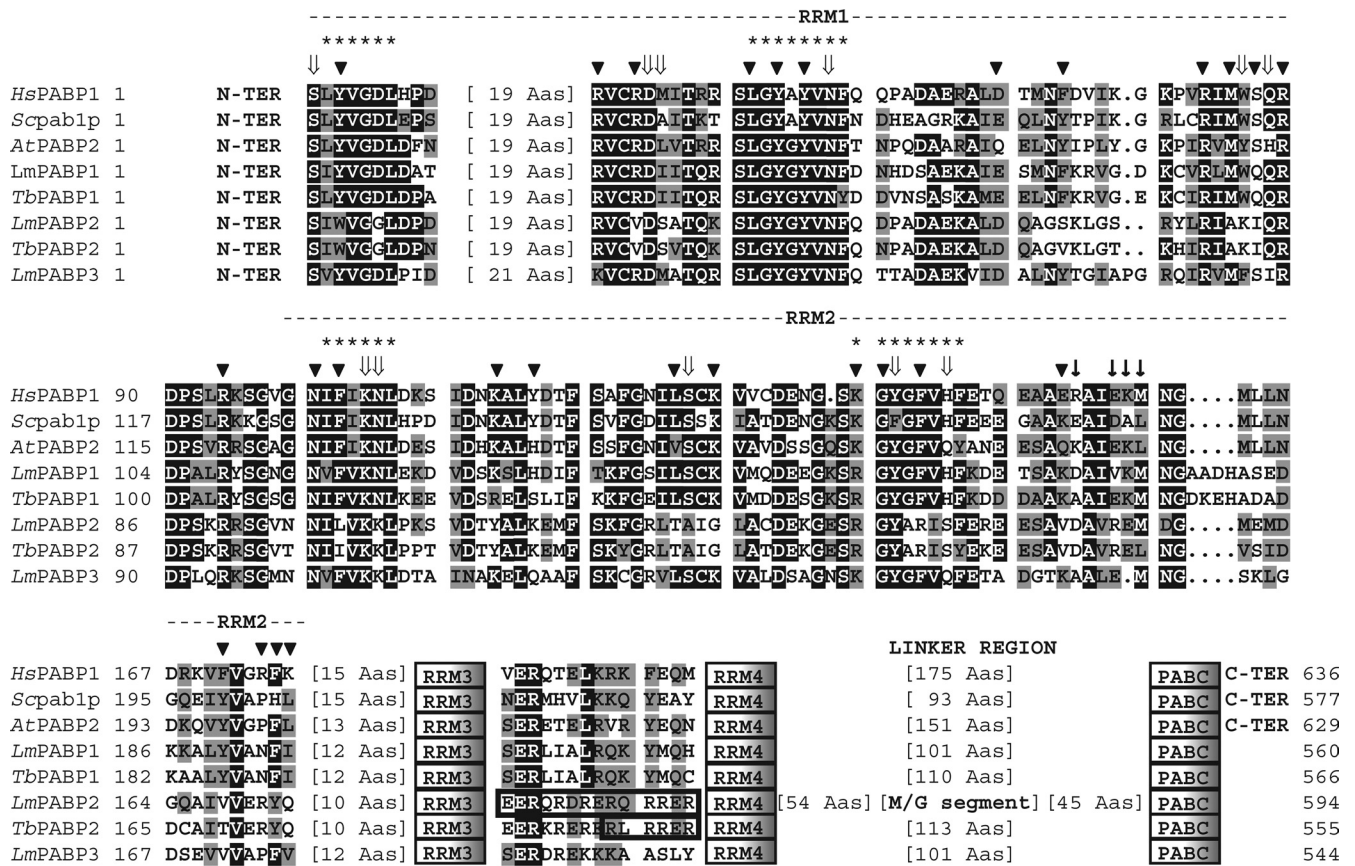


FIG. 1. Sequence analysis of the *L. major* and *T. brucei* PABP homologues. Shown is a ClustalW alignment comparing the sequences from RRM1 and -2 of the human (*Hs*), yeast (*Sc*; *S. cerevisiae*), and plant (*At*; *A. thaliana*) PABP homologues with the various *L. major*/*T. brucei* proteins. The two RRMs are indicated, as well as the positions of RRM3 and -4, the linker region, and the PABC domain. Sequences between RRM3 and -4 where putative NLS were identified in the PABP2 orthologues are also shown. Within the aligned regions, amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, while amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, in more than 60% of the sequences are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dots) to allow better alignment. The asterisks define the two RNP motifs. The arrowheads indicate amino acids that have been shown to interact with the RNA, while ↓ highlights amino acids specifically involved in poly(A) recognition (18). ↓ symbols indicate the residues in yeast PABP RRM2 relevant to the interaction with eIF4G (based on reference 48). The location of the methionine/glycine-rich segment within the linker region from *LmPABP2* is highlighted. The *A. thaliana* PABP2 homologue was included in the alignment because it is the nearest homologue to *LmPABP1* within the various *A. thaliana* PABPs (not shown). For the GenBank/GeneDB accession numbers for the trypanosomatid PABP homologues, see Materials and Methods. The other GenBank accession numbers are as follows: *HsPABP*, P11940; *Scpab1p*, NP_011092; *AtPABP2*, P42731.

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

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

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

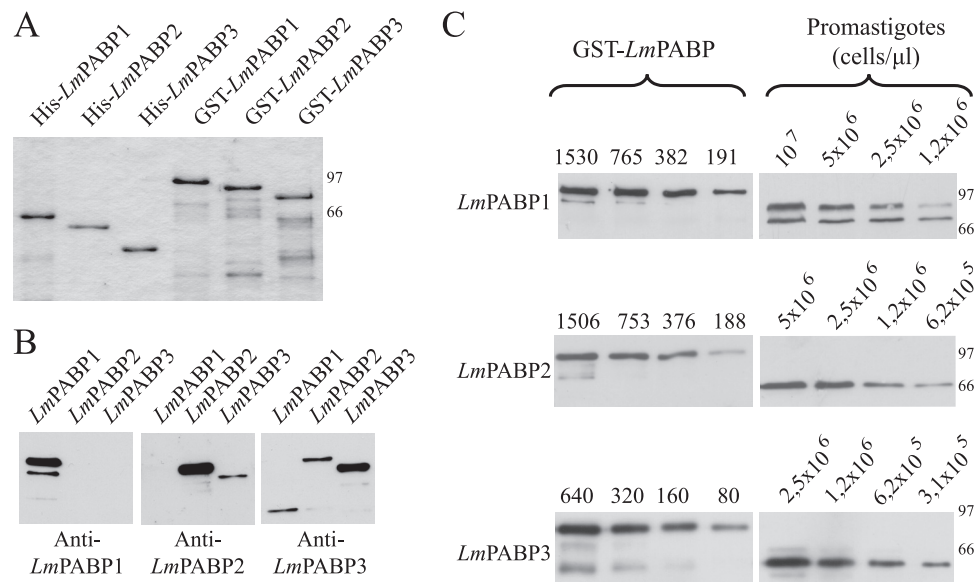


FIG. 2. Quantitation of intracellular levels of *LmPABP1*, -2, and -3. (A) His- and GST-tagged recombinant versions of the three *L. major* PABP homologues used in this work. The sizes of molecular mass markers (kDa) run on the same gel are shown on the right. (B) Specificities of the antibodies produced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

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

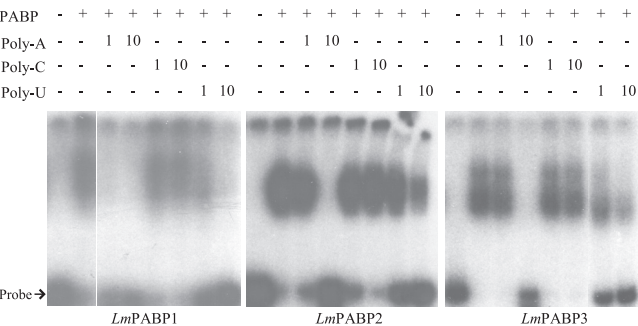


FIG. 3. Electrophoretic mobility shift assay to investigate binding of the *Leishmania* PABPs to an A-rich RNA probe. The assay was performed by incubating the ³²P-labeled A-rich probe described in the text with a fixed amount (100 ng) of the three recombinant GST fusions and analysis on a 5% nondenaturing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

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

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

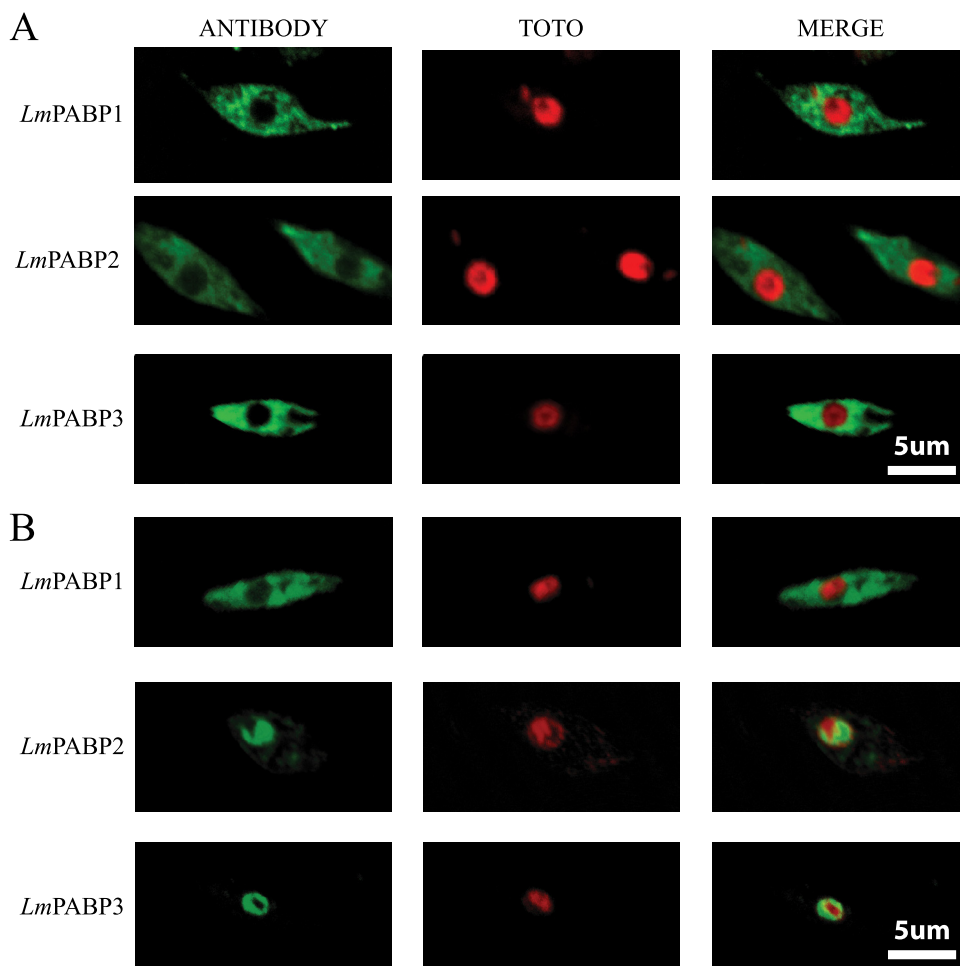


FIG. 4. Subcellular localization of *LmPABP1*, -2, and -3. Subcellular localization of the three *L. major* PABP homologues was carried out by indirect immunofluorescence using the distinct antiserum sets specific for each protein, followed by incubation with Alexa 488-conjugated secondary antibodies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

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

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

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

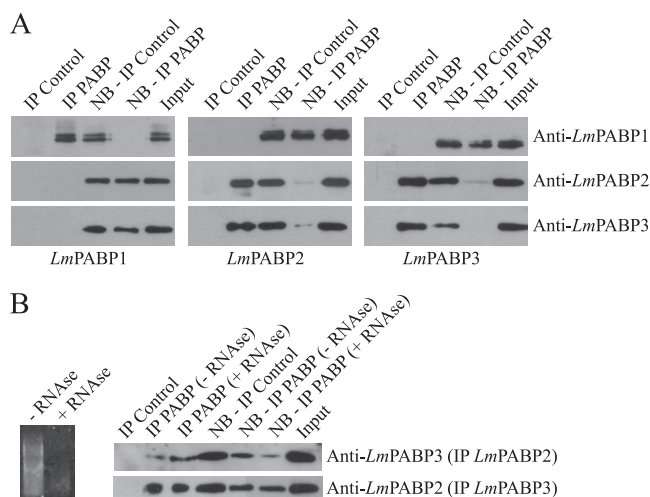


FIG. 5. Analysis of the interactions between the three PABP homologues *in vivo*. (A) Distinct IP reactions were set up using total *L. major* cytoplasmic extract and affinity-purified antibodies directed against *LmPABP1* (left), *LmPABP2* (middle), and *LmPABP3* (right), as well as the respective preimmune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

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

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

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

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

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

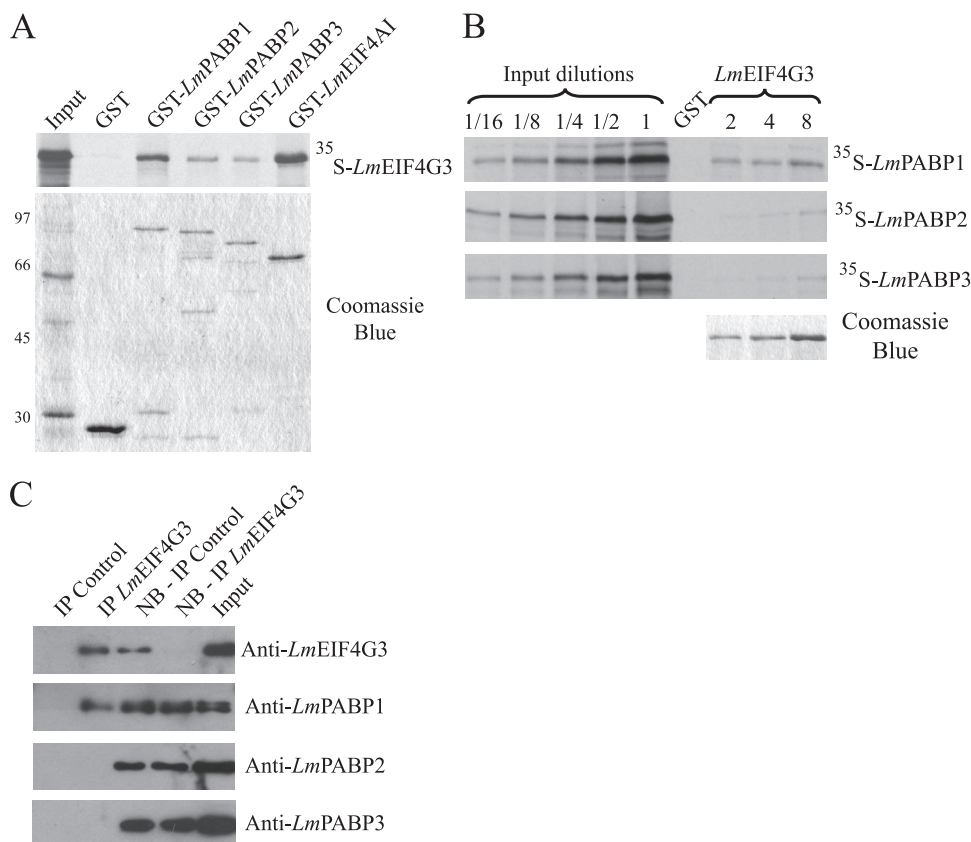


FIG. 6. Analysis of the interaction between an *L. major* eIF4G homologue (*LmEIF4G3*) and *LmPABP1*, -2, and -3. (A) Pulldown assays between GST-PABP fusions and ^{35}S -labeled *LmEIF4G3*. GST-*LmEIF4AI* was used as a positive control. On top is shown the autoradiography with the pulldown results,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

DISCUSSION

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

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

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

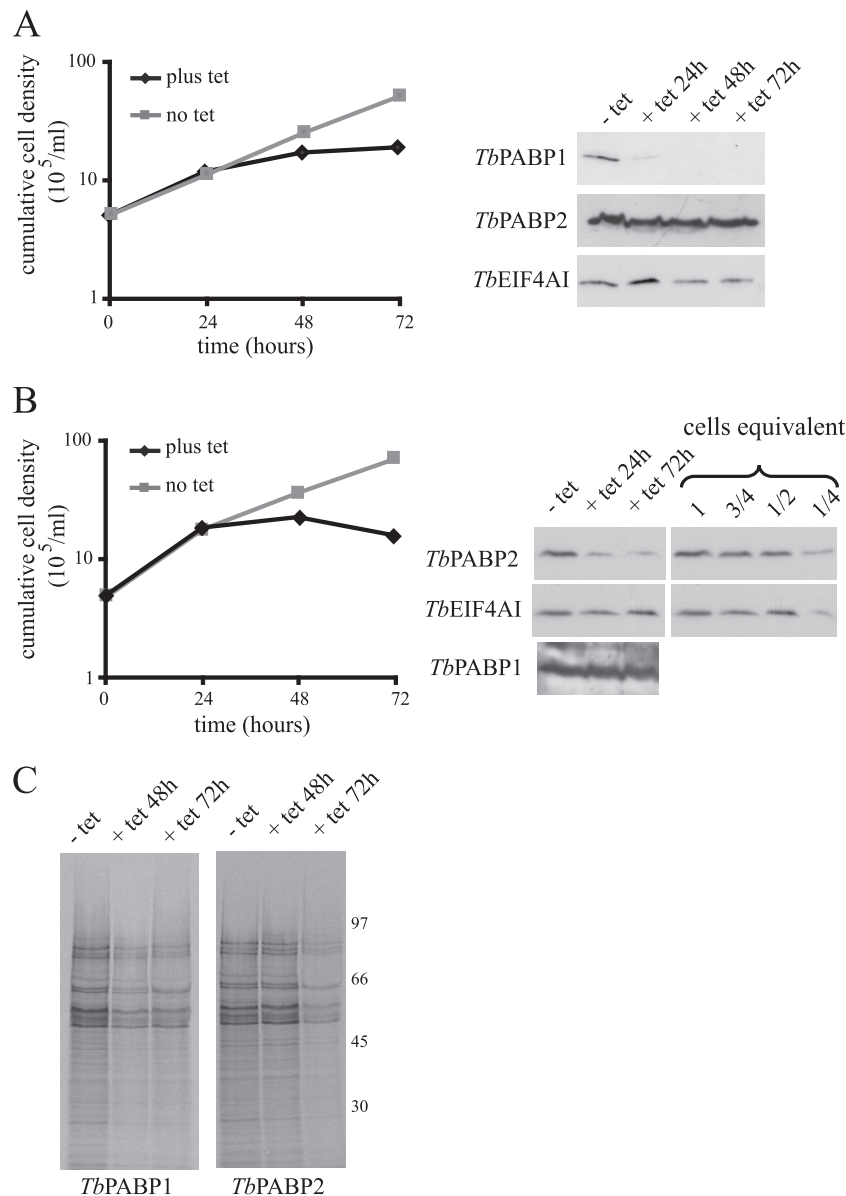


FIG. 7. RNA interference of the *T. brucei* PABP homologues. (A and B) Representative growth curves after tetracycline (tet) induction of the RNAi for *TbPABP1* (A) and *TbPABP2* (B). Growth was monitored by counting the viable cells, and the expression of *TbPABP1* and -2 or an endogenous control protein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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

REFERENCES

- Adam, S. A., T. Nakagawa, M. S. Swanson, T. K. Woodruff, and G. Dreyfuss. 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol. Cell. Biol.* **6**:2932–2943.
- Afonina, E., R. Stauber, and G. N. Pavlakakis. 1998. The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **273**:13015–13021.
- Amrani, N., S. Ghosh, D. A. Mangus, and A. Jacobson. 2008. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* **453**:1276–1280.
- Bates, E. J., E. Kneuper, and D. F. Smith. 2000. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res.* **28**:1211–1220.
- Batista, J. A., S. M. Teixeira, J. E. Donelson, L. V. Kirchhoff, and C. Martins de Sa. 1994. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**:301–312.
- Belostotsky, D. A. 2003. Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants: three conserved lineages that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics* **163**:311–319.
- Bravo, J., L. Aguilar-Henonin, G. Olmedo, and P. Guzman. 2005. Four distinct classes of proteins as interaction partners of the PABC domain of *Arabidopsis thaliana* Poly(A)-binding proteins. *Mol. Genet. Genomics* **272**: 651–665.
- Brook, M., J. W. Smith, and N. K. Gray. 2009. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* **137**:595–617.
- Brune, C., S. E. Munchel, N. Fischer, A. V. Podtelejnikov, and K. Weis. 2005. Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* **11**:517–531.
- Cassola, A., and A. C. Frasch. 2009. An RNA recognition motif mediates the nucleocytoplasmic transport of a trypanosome RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **284**:35015–35028.
- Chang, T. C., A. Yamashita, C. Y. Chen, Y. Yamashita, W. Zhu, S. Durdan, A. Kahvejian, N. Sonenberg, and A. B. Shyu. 2004. UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev.* **18**:2010–2023.
- Chekanova, J. A., and D. A. Belostotsky. 2003. Evidence that poly(A) binding protein has an evolutionarily conserved function in facilitating mRNA biogenesis and export. *RNA* **9**:1476–1490.
- Cheng, S., and D. R. Gallie. 2007. eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B bind the poly(A)-binding protein through overlapping sites within the RNA recognition motif domains. *J. Biol. Chem.* **282**:25247–25258.
- Clayton, C., and M. Shapira. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* **156**: 93–101.
- Clayton, C. E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* **21**:1881–1888.
- Cokol, M., R. Nair, and B. Rost. 2000. Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep.* **1**:411–415.
- de Melo Neto, O. P., N. Standart, and C. Martins de Sa. 1995. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.* **23**: 2198–2205.
- Deo, R. C., J. B. Bonanno, N. Sonenberg, and S. K. Burley. 1999. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**:835–845.
- Dhalia, R., N. Marinsek, C. R. Reis, R. Katz, J. R. Muniz, N. Standart, M. Carrington, and O. P. de Melo Neto. 2006. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res.* **34**:2495–2507.
- Dhalia, R., C. R. Reis, E. R. Freire, P. O. Rocha, R. Katz, J. R. Muniz, N. Standart, and O. P. de Melo Neto. 2005. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol. Biochem. Parasitol.* **140**:23–41.
- D'Orso, I., and A. C. Frasch. 2002. TcUBP-1, an mRNA destabilizing factor from trypanosomes, homodimerizes and interacts with novel AU-rich element- and poly(A)-binding proteins forming a ribonucleoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **277**:50520–50528.
- Dunn, E. F., C. M. Hammell, C. A. Hodge, and C. N. Cole. 2005. Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes Dev.* **19**:90–103.
- Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:913–963.

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

Anexo C

Artigo intitulado **“The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties”**, publicado no periódico Molecular and Biochemical Parasitology em 2011.



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

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2010

Received in revised form 15 October 2010

Accepted 16 November 2010

Available online 24 November 2010

Keywords:

Translation

eIF4E

eIF4G

Trypanosomatid

Leishmania

ABSTRACT

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

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Materials and methods

2.1. Sequence analysis

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

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

2.2. PCR and cloning methods

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

2.3. Cap binding assay

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

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

2.4. Parasite growth, transfection and RNA interference

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

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

2.5. RNA and protein analysis

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

2.6. Fluorescence microscopy

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

2.7. Pull-down assays

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

2.8. Immunoprecipitation assays

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

3. Results

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

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

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

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

<i>TbEIF4E3</i>	1	MNPEAE EFVEKGNRTP	105 Aas	- P rich	PLSLSATPYT	PTNPKISSKF	PATPEAQRGP	69 Aas
<i>LmEIF4E3</i>	1	MNPSAA AYIQQSDAK	21 Aas		KLSAAAEFPV	PGGPKQMSAT	STHVDPKATT	54 Aas
<i>TbEIF4E4</i>	1	MON.LRADAV EYTFWQKRS	92 Aas	- P rich	HMSPNAVSYV	P..RGAAAGS	LMPLPTSTAD	87 Aas
<i>LmEIF4E4</i>	1	MSTPLDVRRA EYSEFAVTM	118 Aas	- P rich	HMNPNATEFM	PGRRNGPDGG	LEALPTSTAD	75 Aas
↓ ↓ * * \$ \$ \$ * ↓ ↓ *								
<i>HseIF4E-1</i>	1	MATVEPETTP	25 Aas		KHPLNRMWAT	WFFK.	5 Aas	
<i>SceIF4E</i>	1	MSVEEVSKKF	25 Aas		KHPLNTKWTLL	WYTKP	6 Aas	
<i>AteIF4E</i>	1	MAVEDTPKSV	48 Aas		SHPLEHSTTF	WEDNP	7 Aas	
<i>PfeIF4E</i>	1	MKYLTFFNN	19 Aas		PLLLQYNWVI	WEQVS	8 Aas	
<i>GleIF4E</i>	1	ME.....			DIILDEDTLL	FFSNQ	10 Aas	
<i>TbEIF4E1</i>	1	MMAESSAKEM	27 Aas		RHLNRPWTLL	WYDSV	6 Aas	
<i>LmEIF4E1</i>	1	MSAPSSVPPH	4 Aas		LHKLQRAWTL	WYDSP	6 Aas	
<i>TbEIF4E2</i>	1	MOTLLRPRPG	11 Aas		CTQLGWGWM	WCVL	30 Aas	
<i>LmEIF4E2</i>	1	MDPNTCAPAS	7 Aas		LTLLGWGWM	WCMP	11 Aas	
<i>TbEIF4E3</i>	221	MLPLSFQEV	8 Aas		PVRENTWAL	YADDEH	8 Aas	
<i>LmEIF4E3</i>	122	KLPKLFQCHN	8 Aas		AIPHASWDL	YADH	16 Aas	
<i>TbEIF4E4</i>	227	KPSFTLTPD	2 Aas		DMRFQDPWCL	FYLTV	9 Aas	
<i>LmEIF4E4</i>	244	QPSPLALAPS	8 Aas		EMMLDDIWL	FYLPT	9 Aas	
↓ ↓ * * \$ \$ \$ * ↓ ↓ *								
<i>HseIF4E-1</i>	85	LMPGC.....			DYSLFKDGLIE	PMWEDEKNKR	GGR..WLITLN	
<i>SceIF4E</i>	87	LMPLKS.....			DYHVERNDVR	PEWEDEANAK	GGR..WSFQLR	
<i>AteIF4E</i>	111	LAHGA.....			DFYCFKHIE	PKWEDPICAN	GGR..WTMTFP	
<i>PfeIF4E</i>	83	LLAQSRMTRF	SEDGIFRIVD		ALMIFERNIQ	PMWEDPANSG	GGR..FEYKIL	
<i>GleIF4E</i>	58	IDCNQ.....			GWHFFKKGIR	PAEDPAHVK	CIRIKIMIAS	
<i>TbEIF4E1</i>	89	LRVSA.....			QWHFFREGVK	PMWEDPNKA	GGR..LWVSLDD	20 Aas
<i>LmEIF4E1</i>	66	LRTSS.....			QWHFFQEGVK	PMWEDPANCK	GGR..LWVNLDI	20 Aas
<i>TbEIF4E2</i>	97	LPPGF.....			NYLFFRNIA	PMWHEANRR	GGR..WVMRFR	17 Aas
<i>LmEIF4E2</i>	74	LPPNG.....			SYLFLRKHIA	PMWHEANRR	GGR..WVIFP	5 Aas
<i>TbEIF4E3</i>	290	LPLAF.....			TYHWFRRDIR	PNWEHTRNKN	GGR..TITVFIFD	3 Aas
<i>LmEIF4E3</i>	199	LPTVY.....			TYSWFRKDIK	PEWEHPRNKK	GGR..TISIVVFD	3 Aas
<i>TbEIF4E4</i>	291	MCAG.....			TLYLFRDGIN	PKWEDLRNR	GGR..IVRAKVR	
<i>LmEIF4E4</i>	314	LQLS.....			TLYLFRDGIN	PKWEDPANRD	GGR..IVKVKAT	
↓ ↓ * * \$ \$ \$ * ↓ ↓ *								
<i>HseIF4E-1</i>	138	I..GESFDDYS	DDV		CGAVNVVRK	GD.....	KIALW	TTECENREAV
<i>SceIF4E</i>	138	I..GETIDEDD	SQI		NGVVLIRK	GN.....	KFALW	TK..SEDKEPL
<i>AteIF4E</i>	160	I..GEQFDHG	DEI		CGAVNVIRGK	QE.....	RISLW	TKNASNEAAQ
<i>PfeIF4E</i>	152	I..GCSLKHYD	LI		TGIRLVKLS	TTRYG.....	YIRIEIW	YTTITDESVK
<i>GleIF4E</i>	107	FRGL..LDECP	KV		TCIEFRGRKV	VAN.....	EFIALW	MRDKTDEDQK
<i>TbEIF4E1</i>	164	V..GEYLDYG	VEGEHI		MGVVLTRKY	CN.....	RIALW	LKDASDSAV
<i>LmEIF4E1</i>	141	V..GEYLDVGD	KKDTPTEPFV		TGIVMSKRY	HN.....	RLAVW	VSDASATDKI
<i>TbEIF4E2</i>	168	I..GEQLPGDE	TEI		CGAVVRAER	R.....	RDWKLSTW	TRTAADRCTQ
<i>LmEIF4E2</i>	132	I..GELFPGDE	EEI		CGVTVSRGRQ	RTLPSGHATS	ALSEWKLCLW	TRSDNRGSG
<i>TbEIF4E3</i>	348	S..GSLAEAST	TNL		NGVMLKVRN	KPT.....	TLQIW	TASSDELKLR
<i>LmEIF4E3</i>	257	V..GESFHECS	TTL		NGIMLKVRN	KPV.....	TLQIW	TAHSEVGKLR
<i>TbEIF4E4</i>	339	V..GESWSRSV	R.....NSV		NGIALKVR	A..AAF.....	MLEVW	VTEQT....S
<i>LmEIF4E4</i>	362	I..GDSWSPSV	R.....ETV		NGVVLKVR	E..RAY.....	WLELW	VTKNS....S
↓ ↓ * * \$ \$ \$ * ↓ ↓ *								
<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	FHIQ		168			
<i>TbEIF4E1</i>	221	KPIFT	AHGASKA		233			
<i>LmEIF4E1</i>	203	SMVFT	KHGEAS		214			
<i>TbEIF4E2</i>	222	DGSLQYF	SHRELMOASE	12 Aas	251			
<i>LmEIF4E2</i>	204	30 Aas	SGIPSAMTYV	28 Aas	281			
<i>TbEIF4E3</i>	404	PLQKLEYF	SHORTQV...	23 Aas	442			
<i>LmEIF4E3</i>	313	TLQKLEYF	SHQKQA...	21 Aas	349			
<i>TbEIF4E4</i>	391	FQVPYI	PHSVAQERAA	20 Aas	427			
<i>LmEIF4E4</i>	414	FATTYL	THAMMQUERS	18 Aas	447			

Fig. 1. Sequence analysis of the four *T. brucei* eIF4E sequences. Clustal W alignment of the *T. brucei* and *L. major* eIF4E homologues with sequences from representative eukaryotic lineages. Amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, whilst amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, on more than 60% of the sequences, are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dots) to allow better alignment. The first two boxes highlight regions which share conserved elements in the N-terminus of the eIF4E3 and 4 homologues from *Leishmania* and *Trypanosoma* species, with phosphorylated residues identified in *TbEIF4E3* [49] indicated by the symbol \$. The third box highlights the unique insertion observed in *LmEIF4E2*. * indicates the conserved tryptophan residues. Large arrows indicate non-tryptophan residues required for the interaction with the cap structure (based on [20]). Thin arrows indicate conserved non-tryptophan residues shown to be involved in eIF4G binding [41]. The symbol # marks the conserved D residue which is replaced by H solely in the trypanosomatid eIF4E2 and eIF4E3 sequences. GenBank accessions for the non-trypanosomatid sequences: *Hs* (human) eIF4E-1 – NP.001959; *Sc* (*Saccharomyces cerevisiae*) eIF4E – NP.014502; *At* (*Arabidopsis thaliana*) eIF4E – NP.193538; *Pf* (*Plasmodium falciparum*) eIF4E1 – XP.001351220; *Gl* (*Giardia lamblia*) eIF4E2 – XP.001710318.

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

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

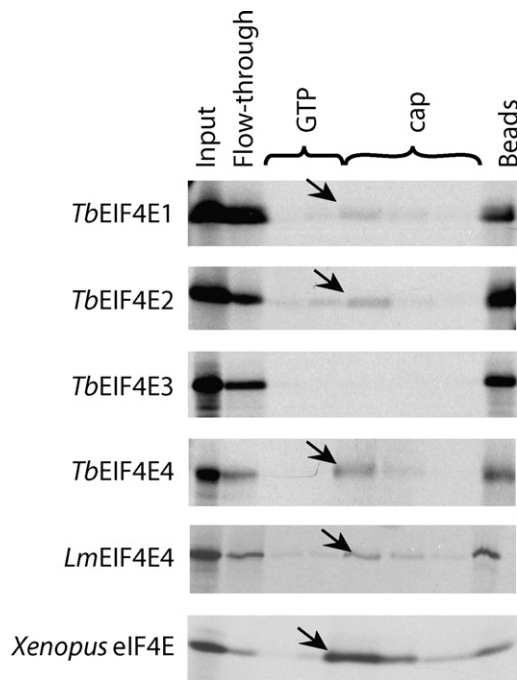


Fig. 2. Cap binding assays. Autoradiography of the cap binding chromatography performed with the four ^{35}S -labeled *T. brucei* eIF4E homologues, the *Leishmania* LmEIF4E4 and the *Xenopus leavis* eIF4E homologue as positive control. Aliquots of the various washes were run on SDS-PAGE and compared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

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

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

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

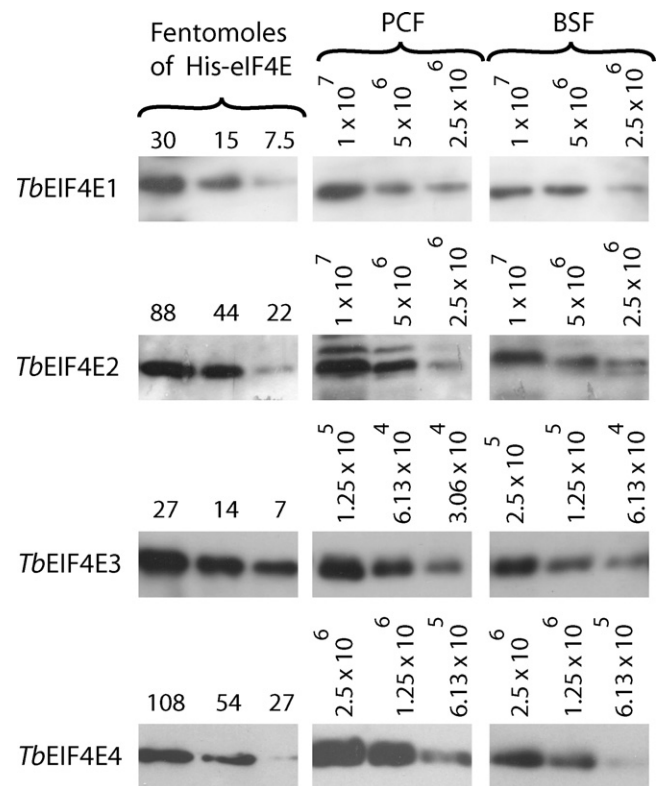


Fig. 3. Expression analysis of TbEIF4E1 through 4 in procyclic and bloodstream procyclic cells. Quantitation and expression analysis of TbEIF4E1, 3 and 4 proteins in procyclic/bloodstreams forms. Recombinant His tagged TbEIF4E1, 2, 3 and 4 were quantitated, diluted to defined concentrations (in femtomoles)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

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

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

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

Table 1

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

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

^a Based on Ref. [33].

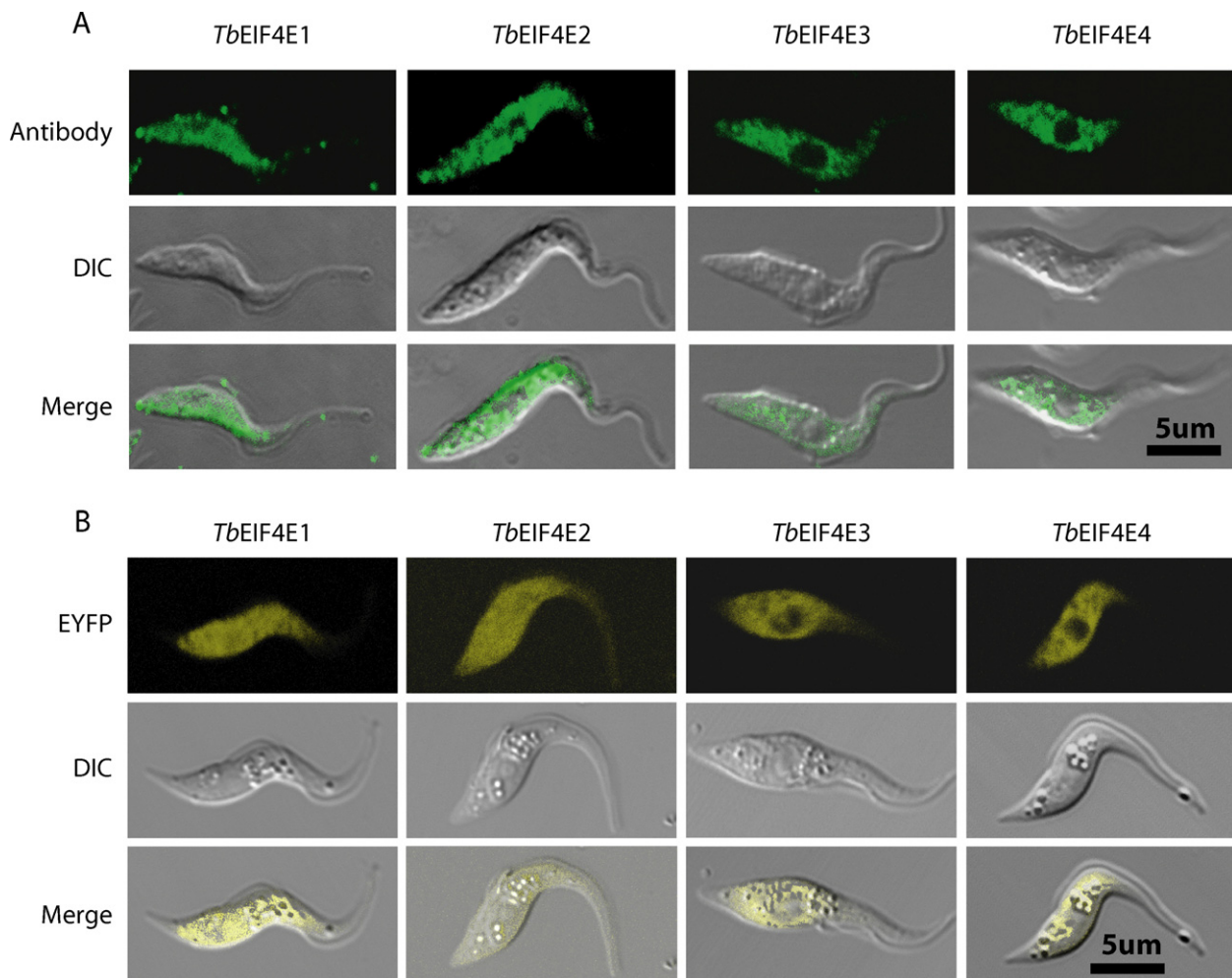


Fig. 4. Subcellular localization of *TbEIF4E1* through 4 in *T. brucei* procyclic forms. (A) Subcellular localization of the four eIF4E homologues in wild type *T. brucei* procyclic cells (WT 427) by indirect immunofluorescence. This was performed using the antibodies directed to the various homologues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

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

The requirement for the various eIF4E homologues for cellular viability was then investigated in *T. brucei* procyclic and bloodstream forms by knockdown of their expression through RNA interference. Representative growth curves of the various knockdowns for procyclic cells are shown in Fig. 5. The phenotype of cells after RNAi ablation of *TbEIF4E1*, 2 and 4 (Fig. 5A, B and D) was similar and no significant impact on cell survival was observed after knockdown of any of the three proteins. For *TbEIF4E1*, a reduction in the rate of cellular growth was observed four days after addition of tetracycline, but the cells remained viable and cell numbers kept increasing. Western blotting, shown below each curve, confirmed major depletions of the respective proteins (over 90% depletion for *TbEIF4E1* and 4; 70–80% depletion for *TbEIF4E2*) within two to three days of RNAi induction, with no effect observed on the levels of the endogenous loading control, the *T. brucei* homologue of eIF4A, *TbEIF4A1*. Knockdown of *TbEIF4E3* produced a very distinct phenotype, since proliferation stopped two days after RNAi induction, followed by subsequent cell death (Fig. 5C). The Western-blotting confirmed substantial reduction (over 90%)

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

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

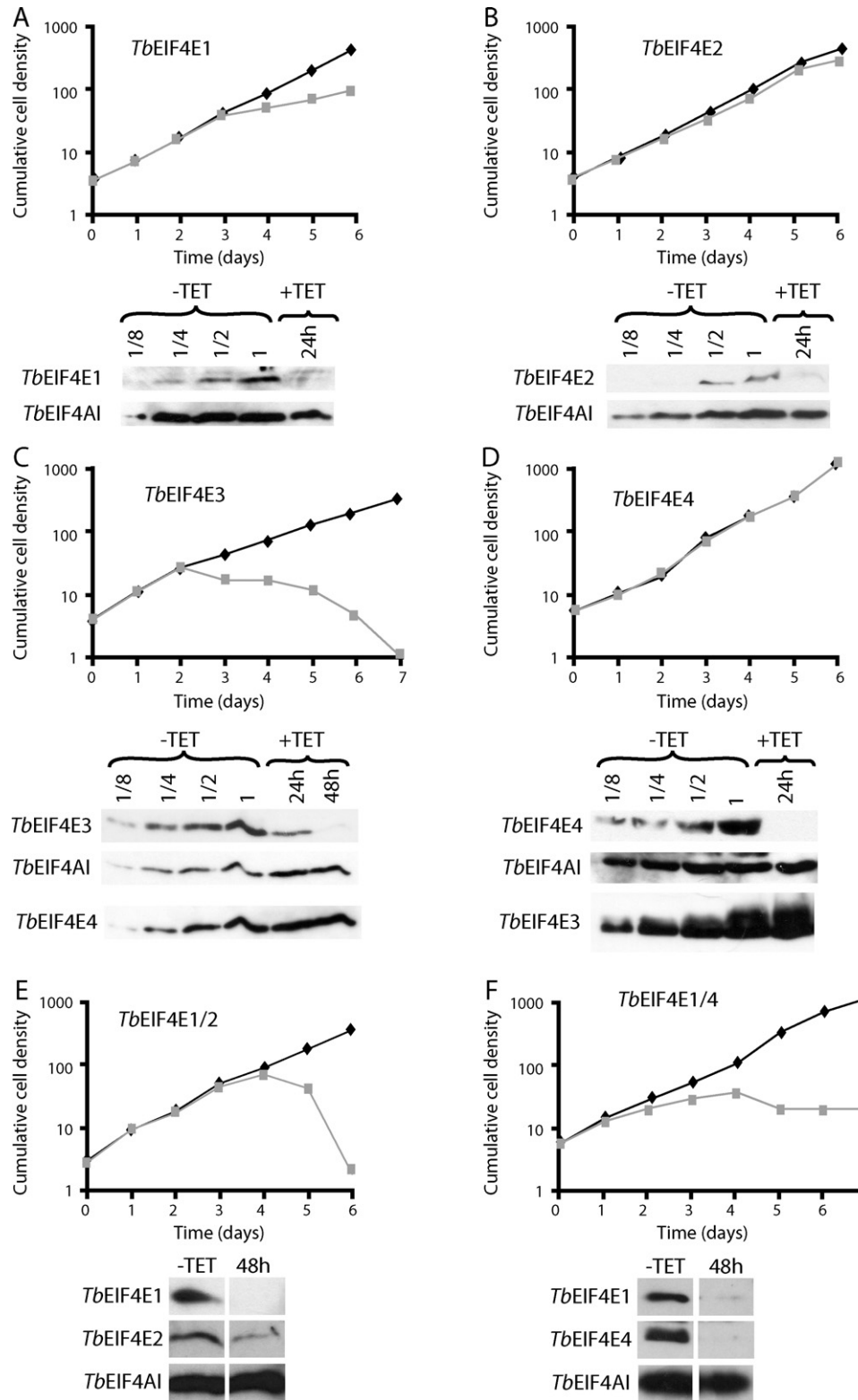


Fig. 5. RNA interference of *TbEIF4E1* through 4 in procyclic cells. Procyclic *T. brucei* cells were transfected with the p2T7-177 derived plasmid containing the individual eIF4E genes (*TbEIF4E1* (A), *TbEIF4E2* (B), *TbEIF4E3* (C), *TbEIF4E4* (D)) or the double constructs *TbEIF4E1/2* (E) and *TbEIF4E1/4*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

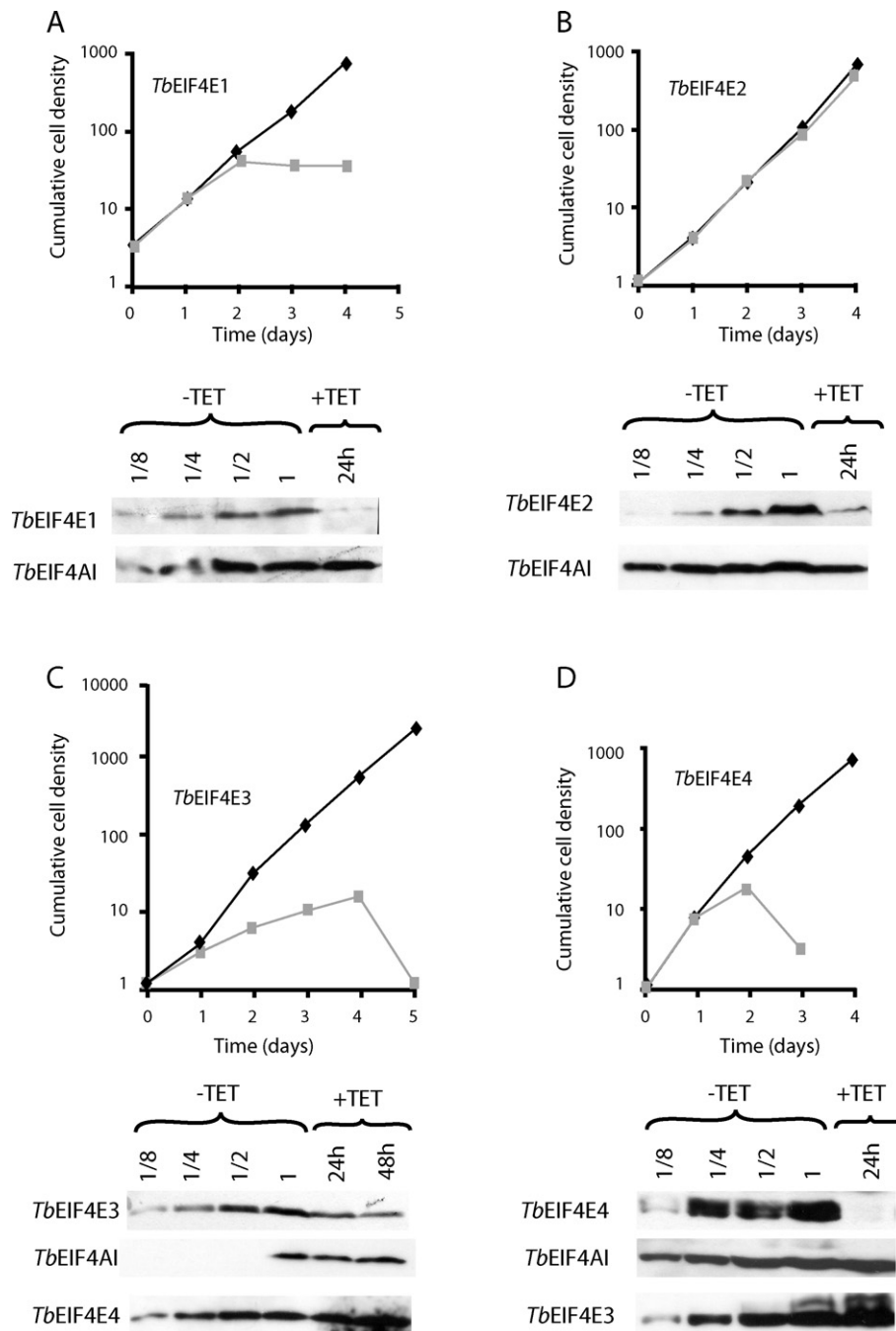


Fig. 6. RNA interference of *TbEIF4E1-4* in bloodstream cells. Bloodstream *T. brucei* cells were transfected with the p2T7-177 derived plasmids containing the eIF4E genes and monitored for cellular growth in the presence (gray curve) or absence (black curve) of tetracycline (*TbEIF4E1* (A), *TbEIF4E2*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

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

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

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

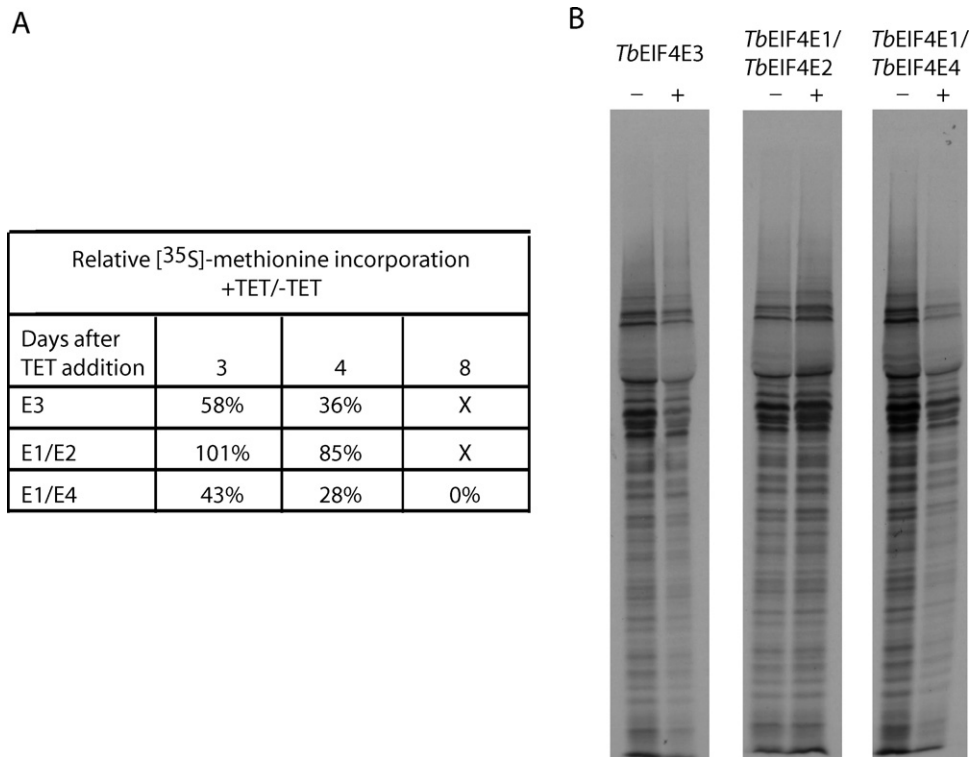


Fig. 7. Metabolic labeling of procyclic cells from select RNAi curves. (A) Total protein synthesis was estimated after RNAi for *TbEIF4E3* (E3) and the double constructs *TbEIF4E1/2* (E1/E2) and *TbEIF4E1/4* (E1/E4). At selected time points (3 and 4 days for the first two samples and 3, 4 and 8 days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

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

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

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

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

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

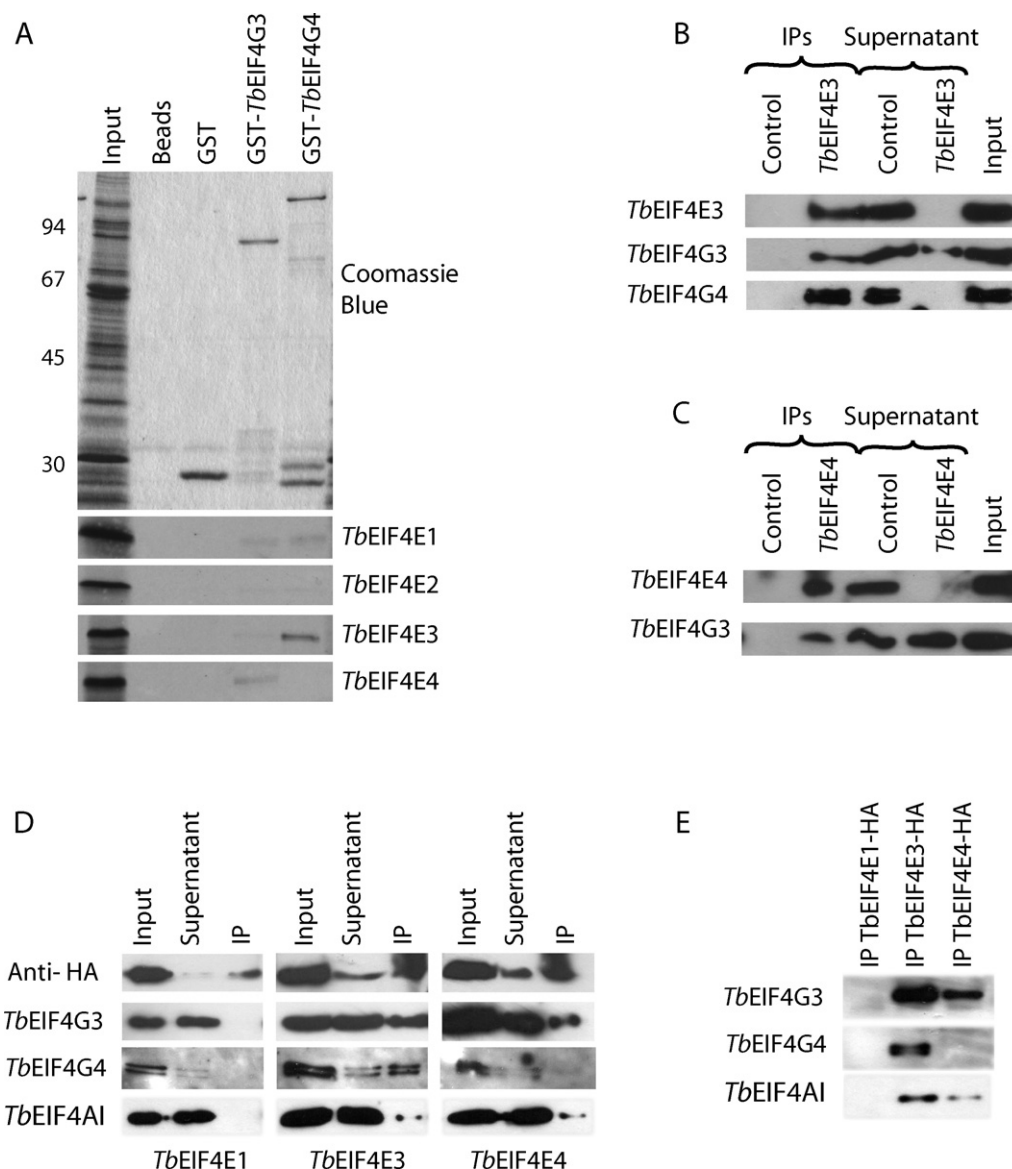


Fig. 8. Analysis of the interactions between TbEIF4E3/TbEIF4E4 and TbEIF4G3/TbEIF4G4. (A) Pull-down assay using GST-tagged TbEIF4G3 and 4 and ³⁵S-labeled TbEIF4E1 through TbEIF4E4. As controls GST on its own or only the glutathione sepharose beads were tested for their ability to bind the labeled protein.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

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

4. Discussion

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

homologues. In unicellular eukaryotes this may not apply although one initial aspect investigated here was the possibility that different eIF4E homologues would be differentially expressed during distinct life stages of the trypanosomatid life cycle, as indeed has been proposed for *Leishmania* eIF4E1 [34]. Overall the data presented rule out large differences in expression for the four eIF4E homologues between the two stages of the *T. brucei* cycle, consistent with the different homologues acting on different aspects of mRNA metabolism or on different mRNA populations, whilst reinforcing differences in abundance previously observed for the *L. major* proteins, with eIF4E3, and also eIF4E4, being present at significantly higher levels than eIF4E1 and 2. The distinct RNAi phenotypes in procyclic and bloodstream cells might suggest differences in the translation machinery, but the differential sensibilities of the two stages to the knockdowns could also be a consequence of their different metabolic rates, with bloodstream cells, which grow much faster, being most sensitive to changes in translation rate.

The localization data suggests that TbEIF4E3 and 4 do not function in the nucleus though TbEIF4E1 and 2 may have nuclear roles. In mammals, at least, nuclear eIF4E localize to speckles which are also the sites where splicing factors are found [45]. This localization pattern differs from what was seen for the endogenous or the over-expressed TbEIF4E1 and 2 which are spread throughout the nucleoplasm. The RNAi data does implicate both TbEIF4E1 and 2 as having important and possibly redundant roles for cellular survival, which could be associated with their nuclear localization, although the possibility remains that the two proteins participate in independent processes which, upon simultaneous inhibition by the double RNAi procedures, result in sufficient overall damage to produce the phenotype observed (the same applies to the TbEIF4E1/4 knockdown discussed below). So far eIF4E2 seems to be the least conserved of the four trypanosomatid eIF4E homologues studied. Although TbEIF4E2 binds to the m⁷G Sepharose in a similar manner to TbEIF4E1 and 4, *Leishmania* LmEIF4E2 does not bind this cap [33], but rather, preferentially binds the methylated cap4 [34]. This difference, plus the existence of insertions in the *Leishmania* eIF4E2 which are missing from its *T. brucei* or *T. cruzi* orthologues, or even the human and yeast sequences, imply a divergence in function unique to the *Leishmania* protein.

In *L. major*, both eIF4E1 and 4 bind the cap4 structure, physically interact with eIF4G3 and all co-migrate with polysomes in sucrose gradients, strongly implicating these proteins in translation [34,43]. *Leishmania* eIF4G3 also binds efficiently to the eIF4A homologue involved in translation [33,35] and *T. brucei* eIF4G3 acts in protein synthesis, since its depletion rapidly blocks translation (D. Moura, unpublished data). Both TbEIF4E1 and 4 are required for growth of the bloodstream cells although the lack of a phenotype after knockdown in procyclics does not rule out a minor requirement for them in levels below the threshold produced after RNAi (considering the efficiency of the RNAi procedure, any requirements are nevertheless well below their original intracellular levels). Here we have confirmed, by both *in vitro* and *in vivo* approaches, the interaction between the eIF4G3 and eIF4E4 in *T. brucei* which clearly implicates the latter in protein synthesis. However, contrary to a previously reported interaction [43], neither *in vitro* (with *L. major* and *T. brucei*) nor *in vivo* (*T. brucei*) assays detected any interaction between eIF4G3 and eIF4E1 (this work and unpublished data). This discrepancy remains unresolved but it is nevertheless possible that in Fig. 8D minor amounts of TbEIF4G3 co-precipitated with HA-tagged TbEIF4E1 but was not detected through the Western-blotting procedure.

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

and eIF4G subunits and within the same organism, has only been reported from plants where they were named eIF4F and eIF(iso)4F [46]. These two complexes can co-exist and differ in their ability to translate different classes of mRNAs [47,48], raising the possibility that something similar may be happening with the trypanosomatid proteins. A potential role for phosphorylation in regulating their activity is also possible since TbEIF4E3 has been identified as a phosphoprotein [49] and TbEIF4E4 migrates in gels with a pattern indicative of post-translational modifications. Indeed the phosphorylated residues in TbEIF4E3 are located next to one of the two blocs of conserved residues unique to the N-terminus of both eIF4E3 and 4 sequences (see Fig. 1).

eIF4E3, the most abundant *Trypanosoma* and *Leishmania* eIF4E, is the only confirmed essential homologue in procyclic and bloodstream *T. brucei*. Nevertheless, when compared with eIF4E4 in *L. major*, it binds much less efficiently to the trypanosomatid cap4 [34]. Moreover, *L. major* eIF4E3 does not seem to associate with polysomes [34], although this does not necessarily exclude a role in translation since the majority of mammalian eIF4E is not bound to ribosomes either [50]. To date, eIF4F-like complexes participate only in translation, so it seems plausible to suggest then that both eIF4E3 and 4 participate in protein synthesis; however their distinct cap binding affinities may indicate distinct modes of mRNA recognition leading to binding to different target mRNAs. It is possible that eIF4E3 may only bind to mRNAs in the context of an eIF4F complex or when associated with some other RNA binding protein. In metazoans the eIF4E-2 homologue (4EHP), involved in the selective translation repression of target messages, is recruited to selected mRNAs by binding proteins associated with their 3' UTRs [28,29,51]. This protein binds very weakly to the cap [52], so it cannot compete with eIF4E-1 in the absence of its co-factors. It is plausible to suggest then that, despite its abundance, for the parasite eIF4E3 to bind to the message RNAs it needs some other protein partner which can mediate selectivity in mRNA binding with a direct consequence on translation.

Acknowledgements

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

Appendix A. Supplementary data

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

References

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

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

Moura, Danielle Maria Nascimento

Análise da participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese protéica de *Trypanosoma brucei* Danielle Maria Nascimento Moura. – Recife: O Autor, 2011.

143 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

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

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Tripanossomatídeos 2. Genética molecular 3. Protozoário patogênico I. Título.**

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-016

