

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

**Utilização de abordagens moleculares *in vivo*
no estudo de homólogos do fator de iniciação
da tradução 4G (eIF4G) de
tripanosomatídeos**

DANIELLE MARIA NASCIMENTO MOURA

Recife, maio de 2007

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

Utilização de abordagens moleculares *in vivo* no estudo de homólogos do fator de iniciação da tradução 4G (eIF4G) de tripanosomatídeos

DANIELLE MARIA NASCIMENTO MOURA

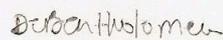
Dissertação apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco**, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Genética**.

Orientador: **Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto**

**Recife - PE
Maio/ 2007**



Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
(Deptº de Microbiologia/CPqAM)

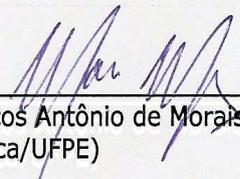


Membro Externo: Drª. Daniella Castanheira Bartholomeu
(Depto. de Parasitologia/UFMG)

Membro Interno: Drª. Laura Helena Vega Gonzales Gil
(Deptº de Genética/UFPE)



Suplente: Dr. José Ronnie Carvalho de Vasconcelos
(Deptº de Microbiologia/CPqAM)



Coordenador do Programa: Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
(Deptº de Genética/UFPE)

"A ciência vai muito além da sua mera prática. Por trás de fórmulas complicadas e da linguagem técnica, encontra-se uma pessoa tentando transcender as barreiras imediatas da vida diária, guiada por um insaciável desejo de adquirir um nível mais profundo de conhecimento e de realização própria".

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, pela confiança depositada em meu trabalho e por toda a orientação, as quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, que de certa forma tornaram-se minha segunda família: Ronnie Vasconcelos, Éden Freire, Mariana Palma, Francisco Cariri, Rodrigo Pontes, Marília Barbosa, Rafaela Paiva, Rodolfo Katz e em especial à Tamara De' Carli, Christian Reis, Mariana Marques, Pollyana Rocha e Franklin Magalhães.

A todos os integrantes do Departamento de Microbiologia do CPqAM – funcionários e estagiários - por toda a ajuda e companheirismo.

À Dr^a Regina Bressan e ao Dr Rafael Dhália, pela ajuda nas etapas de microscopia e transfecção, respectivamente.

Aos colegas do CPqAM: Marcelo Paiva, Duschinka Guedes, Mineo Nakasawa, Tatyane Romão, Cássia Docena e Sérgio, sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos de hoje e sempre - Georgia Guimarães, Gabriel Lobo, Paulo Fernandes, Juliana Lyra, Lígia Fagundes, Lillyane Oliveira, Vladimir Silveira, Wellington Marques, Hélder Souza, Eliane Coimbra, Karina Ferreira, Rose Selma e tantos outros.

À minha família, pelo apoio incondicional e pelo incentivo durante todos esses anos.

Aos meus grandes incentivadores Ivete Maria, Helvio e Israel.

E a todos os demais que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS E TABELA

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	4
2.1 Geral	4
2.2 Específicos.....	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1. Família Trypanosomatidae	5
3.1.1 <i>Trypanosoma brucei</i>	6
3.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
3.1.3 <i>Leishmania sp.</i>	10
3.2 Características biológicas dos tripanosomatídeos	13
3.2.1 Transcrição policistrônica e <i>trans-splicing</i>	13
3.2.2 Cap4	14
3.3 Controle traducional da expressão gênica em eucariotos	15
3.4 Iniciação da tradução em eucariotos	16
3.4.1 Complexo eIF4F e PABP	17
3.4.2 eIF4G : funções e características.....	19
3.4.3 Sítios de ligação do eIF4G	20
3.5 Complexo eIF4F em tripanosomatídeos	23
3.6 Manipulação genética em tripanosomatídeos.....	26
3.6.1 Expressão de proteínas de fusão fluorescentes	27
3.6.2 Expressão de proteínas de fusão fluorescentes em tripanosomatídeos	28
3.6.3 Interferência de RNA (RNAi)	28
3.6.4 Interferência de RNA em tripanosomatídeos	30

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5. MANUSCRITO DO ARTIGO CIENTÍFICO	44
6. CONCLUSÕES	77
7. ABSTRACT	78
8. ANEXOS	79
8.1 Instruções para autores	79

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP – Adenosina Trifosfato
- AUG – Códon de iniciação da tradução
- BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA – Albumina sérica bovina
- CBC – *Cap Binding Complex*
- CT – Carboxi-terminal
- dsRNA - RNA dupla-fita (*double stranded RNA*)
- siRNA – pequeno RNA de interferência (*small interfering RNA*)
- ECL – Detecção por quimioluminescência (*Enhanced Chemiluminescence*)
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- eIF – Fator de iniciação da tradução eucariótico (*eukaryotic Initiation Factor*)
- G418 – Análogo da Neomicina
- GST – Glutathione-S-Transferase
- HEAT – Huntingtin, Elongation factor 3, A subunit of protein phosphatase 2A and Target of rapamycin
- His – seqüência de poli-histidinas
- IPTG – Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
- kDa – Kilodalton
- LB – meio de cultura Luria Bertani
- mRNA – ácido ribonucléico mensageiro
- Met – Metionina
- Mnk1 – Quinase responsável pela fosforilação do eIF4E
- nt - nucleotídeo
- ORF – Quadro aberto de leitura (*Open Reading Frame*)
- OD – Densidade Óptica (*Optic Density*)
- PABP – Proteína de ligação à cauda poli-A (*Poly-A binding protein*)

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

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

v/v – volume/volume

RNA pol – RNA polimerase

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

rRNA – Ácido ribonucléico ribossômico

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfatum – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*)

SL – Seqüência *Spliced Leader* ou mini-éxon

VSG – Glicoproteína Variante de Superfície (*Variant Surface Glycoprotein*)

UTR – Região não-traduzida (*Untranslated Region*)

TE – Tampão Tris-EDTA

TET – Tetraciclina

tRNA – Ácido ribonucléico transportador

tRNAi - Ácido ribonucléico transportador iniciador

ZPFM – tampão para eletroporação (*Zimmerman Post-Fusion Medium*)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Revisão da Literatura

Figura 1. Ciclo de vida dos tripanosomatídeos <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>Leishmania sp.</i>	6
Figura 2. Formas celulares de <i>T. brucei</i> visualizadas por microscopia eletrônica de varredura	7
Figura 3. Mosca tse-tse, vetor da Doença do sono, realizando repasto sanguíneo.....	8
Figura 4. Formas celulares de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 5. Inseto triatomíneo fêmea da espécie <i>Panstrongylus megistus</i> , realizando repasto sanguíneo	10
Figura 6. Formas celulares do gênero <i>Leishmania</i>	11
Figura 7. Inseto flebotomíneo fêmea da espécie <i>Phlebotomus ariasi</i> , realizando repasto sanguíneo	11
Figura 8. Esquema representativo da circularização do mRNA e reciclagem dos ribossomos	18
Figura 9. Esquema do eIF4GI humano e seus domínios de ligação a outras proteínas	21
Figura 10. Esquema dos homólogos ao eIF4G de <i>L. major</i> e seus principais domínios	25
Figura 11. Esquema do mecanismo geral de RNAi	29

Tabela 1. Seqüências homólogas aos fatores de iniciação da tradução do complexo eIF4F identificadas em <i>L. major</i>	25
---	----

Artigo Científico

Tabela 1. Sumário das seqüências dos vários homólogos da subunidade eIF4G em <i>L. major</i> , <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i> , descrevendo as similaridades com as seqüências de humano.	67
---	----

Figura 1. Alinhamento múltiplo comparando a região do domínio HEAT dos homólogos ao fator eIF4G identificados em <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>L. major</i>	68
--	----

Figura 2. Alinhamento múltiplo comparando as seqüências dos homólogos <i>TbEIF4G3</i> e <i>TbEIF4G4</i> com seus ortólogos de <i>T. cruzi</i> e <i>L. major</i>	69
--	----

Figura 3. Localização celular dos homólogos <i>TbEIF4G3-5</i> por fluorescência direta	70
---	----

Figura 4. Proteínas <i>TbEIF4G3-5</i> recombinantes	71
--	----

Figura 5. Reconhecimento dos anticorpos anti- <i>TbEIF4G3-5</i>	72
--	----

Figura 6. RNAi do <i>TbEIF4G3</i>	73
--	----

Figura 7. RNAi do <i>TbEIF4G4</i>	74
--	----

Figura 8. Efeito do RNAi do <i>TbEIF4G4</i> na morfologia de <i>T. brucei</i>	75
--	----

Figura 9. RNAi do <i>TbEIF4G5</i>	76
--	----

RESUMO

Os tripanosomatídeos são protozoários causadores de infecções humanas e animais, dentre elas a Doença de Chagas (*T. cruzi*), Doença do Sono (*T. brucei*) e as várias formas de Leishmaniose (*Leishmania sp.*). Estes parasitas possuem algumas características moleculares bem distintas quando comparados aos outros eucariotos, como a ausência de controle de expressão gênica durante a etapa da transcrição dos mRNAs. Portanto, os eventos pós-transcricionais, incluindo a tradução, são pontos fundamentais de regulação da expressão gênica nesses organismos. Baseado nesses fatos, partiu-se para a identificação de homólogos a fatores que atuam durante o processo de iniciação da tradução em tripanosomatídeos, focando os estudos no complexo eIF4F. Esse complexo (formado pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G) atua na etapa de reconhecimento do mRNA e sua associação ao ribossomo. Em relação aos homólogos do eIF4G, foram identificadas cinco seqüências em *L. major* e *T. brucei*, que atualmente estão em diferentes fases de caracterização. Visando a obtenção de maiores informações que complementem os resultados *in vitro* obtidos em trabalhos paralelos, foram realizados ensaios de análise *in vivo*, que incluíram as técnicas de interferência de RNA e de localização celular de proteínas de fusão fluorescentes, as quais foram aplicadas a três dos cinco homólogos de *T. brucei* (*TbEIF4G3-5*). Com isso, foi identificada a presença das proteínas no citoplasma da célula de *T. brucei* e também que os três homólogos em estudo são essenciais à sua viabilidade celular, mas que apresentam perfis diferenciados quando submetidos ao RNAi. Apesar de importantes, esses resultados mostram ainda a necessidade de ensaios complementares que continuem a caracterização dessas proteínas e elucidem seu papel na iniciação da tradução dos tripanosomatídeos.

Palavras-chave: tripanosomatídeos, eIF4G e iniciação da tradução.

1. INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae é constituída por protozoários flagelados, cujos principais representantes são os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Os tripanosomatídeos são responsáveis por diferentes enfermidades de impacto mundial, como a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), Doença do Sono (*Trypanosoma brucei*) e as várias formas de Leishmaniose (*Leishmania sp.*). Em todo o mundo, cerca de 350 milhões de pessoas se encontram em áreas de risco e milhares de pessoas morrem por ano devido a essas enfermidades (www.who.int/tdr).

Nos tripanosomatídeos, são encontradas algumas particularidades que os diferem dos demais eucariotos, como a presença de transcrição policistrônica e o processamento dos RNAs através de *trans-splicing*. Além disso, nestes protozoários o controle da expressão gênica é realizado principalmente a nível pós-transcricional, onde a síntese de proteínas desempenha um papel importante nesse controle (Clayton, 2002)

Desta forma, a biossíntese protéica, também conhecida por tradução, desempenha uma ação fundamental na regulação da expressão gênica destes organismos, porém pouco se sabe sobre as particularidades desse processo nos tripanosomatídeos. A iniciação da tradução, etapa mais susceptível a eventos de regulação, é bem caracterizada em leveduras, plantas e vertebrados, onde esse processo tem início com a formação e ligação do complexo de iniciação eIF4F (formado pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G) ao cap presente na região 5' do mRNA (Prevot *et al.*, 2003). A subunidade eIF4G é um polipeptídeo de alto peso molecular que interage com diferentes proteínas celulares e virais (Gingras *et al.*, 1999) e possui um papel central na iniciação da tradução através da organização e montagem do complexo eIF4F, permitindo a interação das demais subunidades,

através de sítios de ligação presentes em sua estrutura (Prevot *et al.*, 2003).

A partir da análise de dados disponíveis em projetos de seqüenciamento de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* foram encontradas seqüências homólogas aos fatores de iniciação da tradução de eucariotos. Assim, foram identificados seis homólogos à subunidade eIF4E, dois homólogos ao eIF4A e cinco homólogos ao eIF4G nos genomas das três espécies. Em relação aos homólogos ao eIF4G em tripanosomatídeos, as cinco seqüências identificadas apresentam-se em diferentes fases de caracterização, mas devido à multiplicidade de seqüências, não foi possível identificar ainda qual delas corresponderiam aos fatores funcionais, semelhante aos já caracterizados em outros eucariotos (Dhalia *et al.*, 2005).

Pela impossibilidade de se estudar as cinco seqüências simultaneamente, este trabalho teve por objetivo realizar uma análise comparativa de três dos homólogos do eIF4G de *T. brucei* (*TbEIF4G3-5*), utilizando ensaios *in vivo*, que permitiram identificar a localização celular destas proteínas e caracterizar a sua importância na viabilidade celular destes parasitas. A localização celular e a interferência de RNA realizadas geraram dados importantes para a caracterização destes homólogos em *T. brucei*, reforçando a necessidade do uso de técnicas *in vivo* na análise funcional das proteínas identificadas. Os resultados aqui obtidos enriquecem de forma significativa àqueles conseguidos através de ensaios *in vitro* de interação proteína-proteína (realizados em trabalhos paralelos), permitindo um melhor entendimento dos eventos que conduzem à iniciação da biossíntese protéica em tripanosomatídeos, bem como a identificação das proteínas envolvidas nesse processo.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Caracterizar três homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4G identificados em *Trypanosoma brucei*, utilizando técnicas de biologia molecular de análise *in vivo*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Amplificar os genes *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* e *TbEIF4G5* e cloná-los em vetores tetraciclina-indutíveis, para expressão em *T. brucei*;
- Estabelecer condições de transfecção por eletroporação de células de *T. brucei*, utilizando os vetores de expressão obtidos no item anterior;
- Realizar a técnica de interferência de RNA para os genes clonados de *T. brucei*, visando observar seu efeito na viabilidade celular dos parasitas;
- Avaliar a depleção das proteínas *TbEIF4G3-5*, resultante da interferência de RNA, através de ensaios de Western-blot;
- Localizar os homólogos em células de *T. brucei* pela detecção das proteínas fusionadas à EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), utilizando microscopia confocal;
- Comparar os resultados obtidos com os três diferentes homólogos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae é composta por nove gêneros de protozoários unicelulares que reúnem parasitas obrigatórios e entre seus hospedeiros encontram-se protozoários, plantas, insetos, peixes, répteis e mamíferos (Neves, 2000). Esses parasitas são eucariotos primitivos, caracterizados por apresentarem corpo alongado com um único flagelo ou formas arredondadas semiflageladas, e também um único núcleo, geralmente central (Schimdt and Roberts, 1996). A sobrevivência e multiplicação destes organismos nos hospedeiros definitivos e intermediários, em geral vertebrados e invertebrados, respectivamente, são moduladas por profundas modificações bioquímicas e morfológicas, indispensáveis para sua adaptação em meios biológicos tão distintos (Alexander *et al.*, 1999).

Os tripanosomatídeos são patógenos importantes, principalmente os pertencentes aos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, que são responsáveis por doenças de impacto mundial como a Doença do Sono (*Trypanosoma brucei*), Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e várias formas de Leishmaniose (*Leishmania sp*) (TDR, 2006).

Apesar de estes três patógenos dividirem características comuns, incluindo a presença de estruturas subcelulares como o cinetoplasto e os glicossomos, cada um possui insetos vetores diferentes e apresentam particularidades ao longo de seu ciclo de vida (Figura 1), além de possuírem sítios-alvo diferentes e patógenese distinta nos hospedeiros vertebrados (El-Sayed *et al.*, 2005b).

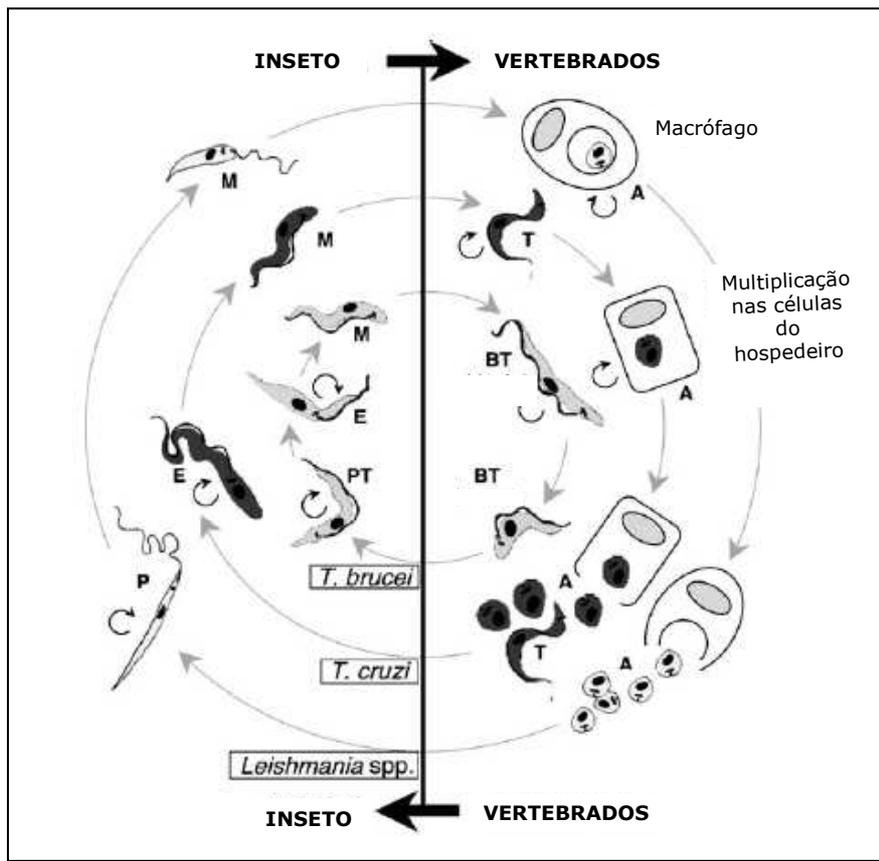


Figura 1. Ciclo de vida dos tripanosomatídeos *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania sp*, ilustrando a presença de diferentes formas celulares durante a transição entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados. A, amastigota; BT, tripomastigota sanguíneo; E, epimastigota; M, tripomastigota metacíclico; P, promastigota; PT, tripomastigota procíclico; T, tripomastigota. Modificado a partir de Bringaud *et al.*, 2006.

3.1.1 *Trypanosoma brucei*

O *Trypanosoma brucei* é um parasita flagelado extracelular que atua como o agente etiológico da Tripanosomíase Africana, também conhecida por Doença do Sono (Berriman *et al.*, 2005) (Figura2). Essa enfermidade afeta 36 países da África Subsaariana, sendo considerada endêmica em muitos desses locais. As três subespécies de *T. brucei* - *T. brucei brucei*, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* - são morfologicamente indistintas, mas, tradicionalmente, elas têm sido

tratadas de forma diferenciada. As subespécies variam em relação à infectividade e aos sintomas que provocam em seus hospedeiros. O *T. b. brucei* é fundamentalmente um parasita de antílopes e outros ruminantes africanos causando uma doença chamada nagana, mas o parasita também infecta animais domésticos (reservatórios), incluindo ovelhas, cabras, cavalos, cães, dentre outros. Os humanos, entretanto, não são susceptíveis. As subespécies *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense* são os agentes etiológicos da Doença do Sono. Eles apresentam diferenças fisiológicas e diferem quanto à patogênese, taxa de crescimento e biologia (Schmidt and Roberts, 1996).

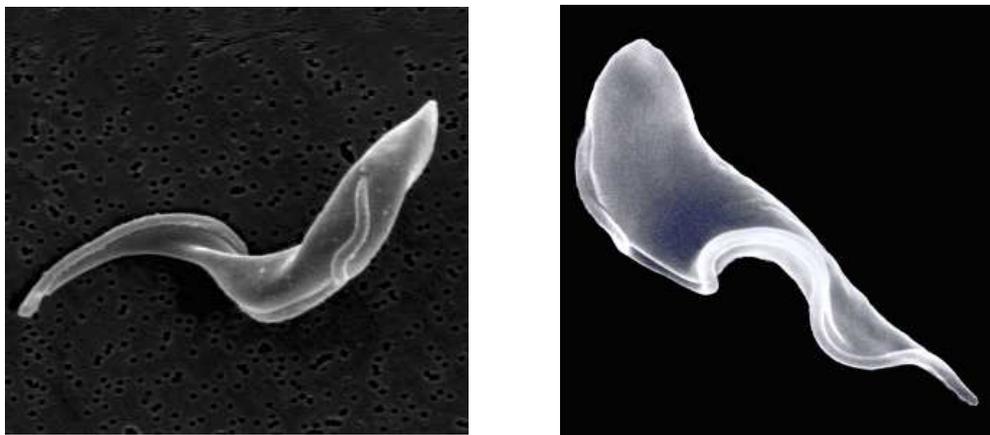


Figura 2. Formas celulares de *T. brucei* visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. À esquerda, a forma procíclica, presente no inseto vetor. À direita, a forma sanguínea, que se desenvolve livremente na corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados. Fonte: International Health Wellcome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

O vetor responsável pela transmissão de *T. brucei* é um inseto pertencente ao gênero *Glossina*, normalmente referido como mosca tse-tse, e a transmissão ocorre pelo repasto sanguíneo, através de sangue infectado (Figura 3). As espécies *Glossina morsitans*, *G. pallidipes* e *G. swynnertoni* são responsáveis pela transmissão de *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense*. No caso do *T. b. gambiense*, os vetores são *G. palpalis* e *G. tachinoides* (Schmidt and Roberts, 1996).



Figura 3. Mosca tse-tse, vetor da Doença do sono, realizando repasto sanguíneo.
Fonte: International Health Wellcome Trust , 2005.

De acordo com a região da África, onde as diferentes subespécies são encontradas, a doença pode ser dividida em Tripanosomíase Africana do Leste e Tripanosomíase Africana do Oeste. O *T. brucei rhodesiense* é o responsável pela Tripanosomíase Africana do Leste, que tem por característica, o desenvolvimento de uma infecção aguda e severa, podendo levar à morte em poucas semanas. O *T. brucei gambiense* é o agente etiológico da Tripanosomíase Africana do Oeste, causando uma infecção de caráter crônico. A Organização Mundial de Saúde registra anualmente cerca de 25.000 novos casos da Doença do sono em todo o mundo. O número de pessoas em área de risco ultrapassa 60 milhões e cerca de 500.000 estão pessoas infectadas em todo o mundo (International Health Wellcome Trust, 2005).

Os sinais e sintomas mais comuns da Doença do Sono são: mal-estar, lassidão e períodos irregulares de febre, podendo causar também dores de cabeça, anemia, dores nas articulações e inchaço de alguns órgãos (sinal de Winterbottom). Com o decorrer da infecção, ocorrem desordens neurológicas, que podem levar à deterioração mental, coma e à morte (International Health Wellcome Trust, 2005). O nome "Doença do Sono" surgiu justamente pelas características da fase terminal da enfermidade, que incluem sonolência diurna, evoluindo para uma fase de sono permanente e coma. O controle da doença é feito

principalmente pela vigilância sanitária nas áreas de risco, juntamente com o tratamento das pessoas infectadas. Os tratamentos atuais, que utilizam drogas como pentamidina, suramina e melarsoprol, são geralmente tóxicos e já foi relatada a presença de cepas resistentes a algumas dessas drogas. O tratamento é ainda mais difícil quando a doença atinge um estado mais avançado, com envolvimento do sistema nervoso central, onde a ação das drogas não é tão efetiva (TDR, 2006).

3.1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é o agente causador da Doença de Chagas, também conhecida como Tripanosomíase Americana (Figura 4). O táxon *T. cruzi* contém dois grupos definidos, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, além de grupos adicionais ainda sem designação. *T. cruzi* I está associado com o ciclo de transmissão silvestre e infecções em marsupiais. O táxon *T. cruzi* II consiste de cinco subgrupos, denominados IIa, IIb, IIc, IId e IIe, e está associado com o ciclo de transmissão doméstica e com a infecção de mamíferos placentários (El-Sayed *et al.*, 2005a). O *T. cruzi* é normalmente transmitido por insetos da subfamília Triatominae, através das fezes contaminadas do vetor (Figura 5). A transmissão também pode ocorrer por transfusão sanguínea ou via congênita (Neves, 2000).

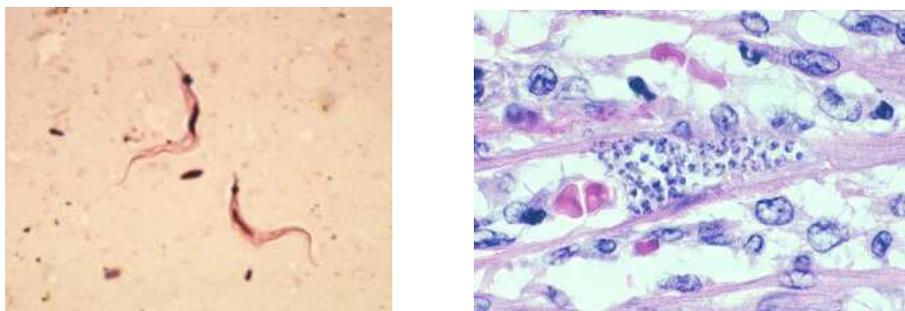


Figura 4. Formas celulares de *T. cruzi*. À esquerda, tripomastigotas encontradas em fezes do inseto triatomíneo. À direita, músculo cardíaco de um paciente com Doença

de Chagas, mostrando um pseudocisto contendo formas amastigotas de *T. cruzi*.
Fonte: International Health Wellcome Trust , 2005.



Figura 5. Inseto triatomíneo fêmea da espécie *Panstrogylus megistus*, realizando repasto sanguíneo. Fonte: International Health Wellcome Trust, 2005.

A Doença de Chagas distribuiu-se em 18 países da América do Sul e América Central (principalmente nas áreas rurais), podendo ser encontrada também no Sul dos Estados Unidos e no México. Estima-se que 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, com o registro de 21.000 mortes a cada ano (International Health Wellcome Trust, 2005).

As manifestações clínicas da doença podem se desenvolver de forma aguda ou crônica. Alguns dos sintomas da fase aguda incluem o chagoma de inoculação e o sinal de Romaña, que aparecem no local da infecção, causando febre e inchaço dos linfonodos próximos. A fase aguda pode causar debilidade e morte em alguns casos, mas a maioria dos pacientes se torna assintomática por meses ou até mesmo anos. Durante esse período, os parasitas invadem os órgãos internos, onde desenvolvem a fase crônica da doença, que é caracterizada principalmente pelo comprometimento do coração, intestino e esôfago. Aproximadamente 30% dos casos crônicos da Doença de Chagas evoluem para uma debilitação severa e morte (TDR, 2006).

3.1.3 *Leishmania* sp.

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários encontrados na forma flagelada promastigota, no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados e na forma semiflagelada amastigota, intracelular obrigatória do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (Neves, 2000) (Figura 6).

Os hospedeiros invertebrados parecem estar limitados a insetos hematófagos pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Schmidt and Roberts, 1996; Neves, 2000). Os hospedeiros vertebrados são primariamente mamíferos, onde os mais comumente infectados são os cães e várias espécies de roedores (Schmidt e Roberts, 1996). Embora as infecções sejam mais comuns nos roedores e canídeos, são conhecidas também entre edentados, marsupiais, primatas e entre estes, o homem (Neves, 2000).

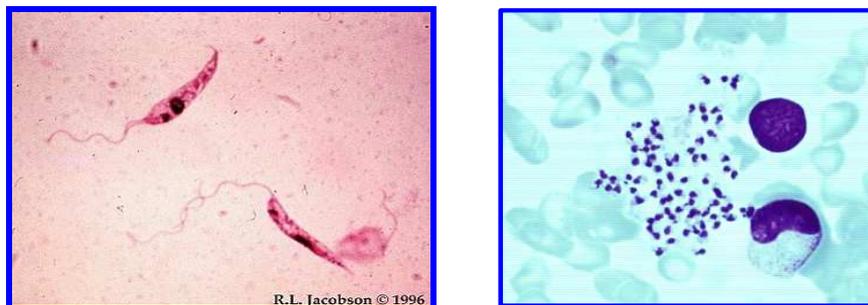


Figura 6. Formas celulares do gênero *Leishmania*. À esquerda, formas promastigotas: apresentam corpo alongado e flagelo livre. À direita, formas amastigotas presentes em um esfregaço sanguíneo. As amastigotas têm corpo ovóide e flagelo interno. Fonte: International Health Wellcome Trust, 2005.



Figura 7. Inseto flebotomíneo fêmea da espécie *Phlebotomus ariasi*, realizando repasto sanguíneo. Fonte: International Health Wellcome Trust , 2005.

Atualmente, os parasitas do gênero *Leishmania* que infectam o homem são classificados em complexos, sendo agrupados em dois subgêneros, cada um englobando várias espécies, que foram diferenciados por análises de isoenzimas, métodos moleculares ou por anticorpos monoclonais:

a) Subgênero *Viannia* com quatro espécies principais (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana*);

b) Subgênero *Leishmania*, que inclui o complexo donovani com três espécies (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*); o complexo mexicana com três espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*). Ainda fora desses complexos, existem as espécies *L. tropica*; *L. major* e *L. aethiopica* (CDC, 2006).

As Leishmanioses constituem um complexo de enfermidades que atingem o homem, causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania*. São endêmicas em 88 países e mais de 90% dos casos ocorrem no Irã, Afeganistão, Arábia Saudita, Índia, Peru e Brasil (TDR, 2006). São classificadas em quatro formas principais:

(a) Leishmaniose visceral ou Calazar – caracterizada pelo comprometimento de órgãos como o fígado e o baço. As principais espécies causadoras são *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi* (Neves, 2000).

(b) Leishmaniose cutânea ou tegumentar – a forma mais comum da doença, caracterizada por lesões agudas ou crônicas na pele. A principal espécie envolvida nesse tipo é a *L. braziliensis* (Neves, 2000).

(c) Leishmaniose mucocutânea – é causada principalmente por *L. braziliensis*, e produz ulcerações agressivas, que freqüentemente se disseminam para as membranas mucosas, principalmente nas áreas nasal, oral ou faríngea. (Henry, 1999).

(d) Leishmaniose cutânea difusa – caracteriza-se pela formação de lesões nodulares, não-ulceradas, crônicas e disseminadas na pele.

Está estreitamente associada a uma deficiência imunológica do paciente. Esta forma clínica é provocada por espécies do complexo mexicana (Neves, 2000).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 350 milhões de pessoas no mundo vivem em área de risco e a prevalência das diferentes formas de leishmaniose ultrapassa 12 milhões de casos, porém pouco se tem alcançado em termos de avanços no tratamento por quimioterapia ou desenvolvimento de vacinas (International Health Wellcome Trust, 2005).

3.2 Características biológicas dos tripanosomatídeos

Por representarem uma ramificação primária na árvore de evolução dos eucariotos, os organismos da família Trypanosomatidae apresentam algumas características bioquímicas, genéticas e morfológicas bem peculiares (Campbell *et al.*, 2003). 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). Apresentam ainda uma maturação diferenciada dos RNAs mensageiros, onde seus genes são transcritos inicialmente em unidades policistrônicas (transcrição policistrônica), que posteriormente sofrem um processo denominado *trans-splicing* (Campbell *et al.*, 2003).

3.2.1 Transcrição policistrônica e *trans-splicing*

Os genes dos tripanosomatídeos são agrupados de forma semelhante aos operons bacterianos, mas diferentemente do que ocorre em bactérias, esses genes muitas vezes não estão correlacionados. Devido a isso, a maturação do RNA mensageiro destes organismos

difere da maioria dos eucariotos, pois um número elevado de genes está sobre o controle de uma única região promotora e são transcritos inicialmente em unidades policistrônicas, que posteriormente sofrem um processo denominado *trans-splicing* (Sutton and Boothroyd, 1986; Campbell *et al.* 2003). Um exemplo da dinâmica da transcrição policistrônica nesses organismos fica evidente na estrutura do cromossomo 1 de *L. major*, onde a transcrição de 50 ORFs é orientada unidirecionalmente em uma fita do DNA e a das 29 ORFs restantes ocorre na fita oposta. Ao que parece, a transcrição do cromossomo 1 pela RNA pol II se inicia em um elemento promotor, próximo ao centro, e procede ininterruptamente em direção às extremidades, transcrevendo as múltiplas ORFs (Myler *et al.*, 1999).

O processo de *trans-splicing* foi descoberto há mais de 20 anos, durante estudos com mRNAs de *T. brucei* (Boothroyd and Cross, 1982); (Liang *et al.*, 2003). O *trans-splicing* difere do *splicing* convencional porque dois éxons provenientes de transcritos diferente são fusionados para a formação do mRNA maduro (Harris, Jr. *et al.*, 1995; Bruzik *et al.*, 1988). Durante esse processamento, os RNAs primários (policistrônicos) são clivados em mRNAs monocistrônicos, que recebem na sua extremidade 5' uma seqüência de 39 nucleotídeos denominada *Spliced-Leader* – SL ou mini-éxon. A presença da seqüência *Spliced-Leader* é característica dos mRNAs dos tripanosomatídeos e sua adição tem dois propósitos: adicionar o cap aos mRNAs e formar, juntamente com a poliadenilação na região 3', os mRNAs maduros (Agabian, 1990; Liang *et al.*, 2003). Até o momento, poucos genes em tripanosomatídeos parecem sofrer o processo de *splicing* convencional, sugerindo que estes dois processos coexistem nesses organismos (Mair *et al.*, 2000).

3.2.2 Cap4

A estrutura cap, presente na região 5' dos mRNAs da maioria dos eucariotos é composta por um resíduo de 7-metil-guanosina ligado ao

nucleosídeo inicial do transcrito por uma ligação fosfato 5'-5' (Snustad, 2000). De acordo com o número e a posição das metilações no nucleotídeo que forma o cap, e/ou dos nucleotídeos adjacentes ao mesmo, diferentes estruturas podem ser originadas. Outro exemplo conhecido é o cap3 ou cap trimetilado, apresentando a estrutura 2,2,7-metil-guanosina, que é encontrado em pequenos RNAs nucleares de vertebrados (snRNAs) e nos mRNAs de nemátodos (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998; Maroney *et al.*, 1995). Os tripanosomatídeos apresentam uma estrutura diferente das citadas anteriormente. O cap nesses organismos é denominado cap4, por apresentar a modificação de 4 nucleotídeos adjacentes ao m⁷GTP, gerando uma estrutura bastante complexa representada por m⁷ guanosina (5') ppp-N₆,N₆,2'-O-trimetil-adenosina-p-2'-O-metil-adenosina-p'-2'-O-metil-citosina-p-3,2'-O-di-metil-uridina (Bangs *et al.*, 1992). Apesar das evidências da necessidade do capeamento da seqüência *Spliced-Leader* durante o processo de *trans-splicing*, a função precisa do cap4 se mantém desconhecida. A presença dessa estrutura elaborada e hipermetilada, juntamente com os elementos da seqüência SL podem contribuir para a tradução nos tripanosomatídeos (Zamudio *et al.*, 2006). Recentemente foi possível sintetizar a estrutura do cap4 *in vitro*, o qual vem sendo utilizado em ensaios funcionais para elucidar melhor seu papel no processamento dos RNAs (Lewdorowicz *et al.*, 2004; Yoffe *et al.*, 2006).

3.3 Controle traducional da expressão gênica em eucariotos

A regulação transcricional desempenha o papel principal no controle da expressão gênica da maioria dos organismos. Contudo, o controle traducional é visto também como um determinante importante na proliferação celular e sobrevivência, bem como na maturação celular (Caron *et al.*, 2004). A tradução ou síntese de proteínas é um mecanismo complexo e desempenha um papel importante no controle da expressão gênica, entretanto, apesar de muitos exemplos já terem

sido demonstrados, muito ainda precisa ser entendido sobre os mecanismos de controle traducional (Prevot *et al.*, 2003; Gebauer and Hentze, 2004). A tradução dos mRNAs é regulada principalmente durante a sua etapa de iniciação, um processo que envolve a ação sinérgica da estrutura 5' cap e a cauda poli-A da região 3' do mRNA e de vários fatores protéicos denominados eIFs – *eukaryotic initiation factors*, como visto a seguir (Caron *et al.*, 2004).

3.4 Iniciação da tradução em eucariotos

A síntese protéica pode ser didaticamente dividida em três fases: iniciação, alongação e terminação. Enquanto que as fases de alongação e terminação são assistidas por um grupo limitado de fatores, a iniciação da tradução é um evento complexo, sendo auxiliado por mais de 25 polipeptídeos (Gebauer and Hentze, 2004).

Estudos realizados nos últimos anos têm evidenciado um grande número de mRNAs, cuja tradução é regulada temporária e espacialmente em vários tipos celulares. Apesar de nenhum mecanismo ser capaz de controlar sozinho a tradução de todos os mRNAs, evidências têm indicado que a ligação regulada dos fatores de iniciação da tradução (eIFs) ao cap dos mRNAs tem grande importância nesse processo (Gebauer and Hentze, 2004).

A iniciação da tradução é composta por várias etapas que envolvem a interação entre fatores de iniciação (eIFs), mRNAs, tRNAs e os ribossomos. Esses eventos podem ser resumidos em:

(1) Formação do complexo ternário entre o tRNA_i, o fator eIF2 e GTP e ligação à subunidade menor ribossomal 40S e ao eIF3 (formação do complexo de pré-iniciação 43S);

(2) Associação do complexo eIF4F ao cap presente na extremidade 5' do mRNA;

(3) Ligação do complexo 43S ao mRNA, por ação das subunidades do complexo eIF4F;

(4) Migração do complexo ribossomal ao longo da região 5' não-traduzida do mRNA (5' UTR) a partir do cap até o códon de iniciação da tradução (AUG) e

(5) Liberação dos fatores e recrutamento da subunidade ribossomal 60S, para formar o ribossomo 80S, deixando o tRNA_i no sítio P ribossomal e dar início a síntese da cadeia polipeptídica (Prevot *et al.*, 2003; Gebauer and Hentze, 2004).

3.4.1 Complexo eIF4F e PABP

O complexo eIF4F exerce uma função essencial na ligação entre o mRNA e o ribossomo (Gingras *et al.*, 1999). Através de suas subunidades - eIF4G, eIF4A e eIF4E - ele promove o reconhecimento e recrutamento do complexo 43S pelo mRNA, via interação cap-eIF4E-eIF4G-eIF3, formando assim o complexo 48S (Prevot *et al.*, 2003).

A subunidade eIF4G é um polipeptídeo de alto peso molecular que interage com diferentes proteínas celulares e virais, incluindo outros fatores de iniciação da tradução (Gingras *et al.*, 1999). Seu papel na iniciação da tradução é organizar a montagem do complexo eIF4F, permitindo a interação das demais subunidades. Nessa tarefa, ele interage com o eIF4A, eIF4E, eIF3 e PABP, através dos domínios presentes na sua estrutura (Prevot *et al.*, 2003).

O eIF4A é uma RNA helicase, de 46 kDa, que atua desfazendo as estruturas secundárias na região 5' UTR para facilitar a ligação da subunidade menor ribossomal ao mRNA e permitir sua migração até o códon de iniciação AUG (Sonenberg and Dever, 2003). O eIF4A é provavelmente o fator de iniciação da tradução mais abundante em uma célula eucariótica (von der Haar and McCarthy, 2002). São identificadas três isoformas em mamíferos: eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII (Li *et al.*, 1999).

O eIF4E, também conhecido por proteína de ligação ao cap, é uma fosfoproteína de 24 kDa, responsável pelo reconhecimento do cap presente nos mRNAs eucarióticos (Prevot *et al.*, 2003). A sua ligação ao cap ocorre pela interação entre dois resíduos conservados de triptofano e a estrutura m⁷GTP (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Matsuo *et al.*, 1997). O eIF4E interage com o eIF4G durante os eventos da iniciação da tradução, promovendo a formação do complexo 48S na região 5' do mRNA.

A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) é uma proteína conservada filogeneticamente, que interage com a cauda poli-A dos mRNAs eucarióticos e com várias outras proteínas, incluindo o eIF4G (Sachs and Varani, 2000). A interação da PABP com o eIF4G gera a circularização do mRNA (Figura 8), permitindo assim um sinergismo entre a estrutura do cap e a cauda poli-A (Wells *et al.*, 1998). Essa circularização seria responsável tanto pela "reciclagem" dos ribossomos, que após o término da síntese da cadeia polipeptídica voltariam à região 5', quanto por estimular a interação entre o eIF4E e o cap (Sachs and Varani, 2000).

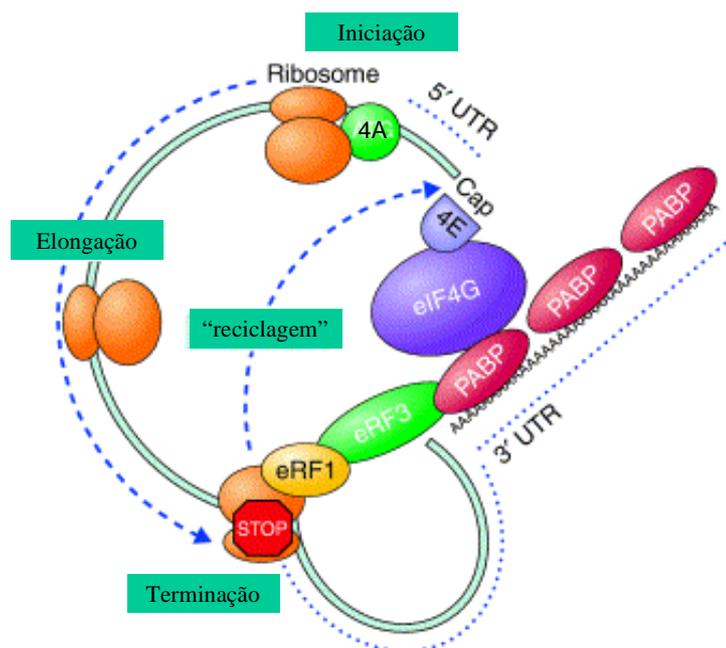


Figura 8. Esquema representativo da circularização do mRNA e reciclagem dos ribossomos. Na figura, estão presentes as subunidades do complexo eIF4F e a PABP. Modificado a partir de Sonenberg and Dever, 2003.

3.4.2 eIF4G : funções e características

O fator eIF4G é a proteína que permite a ligação física entre o cap do mRNA, a cauda poli-A e a subunidade menor ribossomal durante os eventos da iniciação da tradução e sua interação com o eIF4E ligado ao cap é necessária para a tradução cap-dependente (Richter and Sonenberg, 2005). Além da sua atuação no processo de iniciação da tradução, o eIF4G ainda interage com diferentes proteínas celulares e virais, como a proteína nuclear de ligação ao cap CBP80 (Fortes *et al.*, 2000), proteases virais (Aragon *et al.*, 2000), proteína de choque térmico HSP27 (Cuesta *et al.*, 2000) e outras proteínas envolvidas no metabolismo de RNA, como a PABP, a Dcp1, a MnK1 (Imataka and Sonenberg, 1997; Pyronnet *et al.*, 1999; Vilela *et al.*, 2000).

O eIF4G já foi isolado e clonado de diferentes organismos, incluindo leveduras, *Drosophila*, plantas e mamíferos. Duas isoformas foram encontradas em trigo (eIF4G e iso-eIF4G) (Browning, 1996), em *Sacharomyces cerevisiae* (TIF4631 e TF4632) (Goyer *et al.*, 1993) e em humanos (eIF4GI e eIF4GII) (Gradi *et al.*, 1998). O eIF4GI humano foi primeiramente isolado como parte de um complexo protéico em lisados de células HeLa infectadas por poliovírus. Mais tarde esse complexo foi identificado como sendo o eIF4F e que o eIF4GI estava associado ao eIF4E e eIF4A (Tahara *et al.*, 1981; Prevot *et al.*, 2003).

As duas isoformas de humanos são o eIF4G original, renomeado eIF4GI, e o eIF4GII. O eIF4GII tem 46% de identidade com o eIF4GI, exibe atividades bioquímicas similares e é funcionalmente complementar ao eIF4GI (Prevot *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a indução da diferenciação celular se correlaciona com o recrutamento seletivo do eIF4GII até o cap e que o eIF4GI e eIF4GII, apesar de

exibirem interações proteína-RNA e proteína-proteína semelhantes, possuem propriedades diferenciadas, visto que eles são recrutados seletivamente durante o início da diferenciação celular (Caron *et al.*, 2004).

O eIF4GI pode ser dividido funcionalmente em domínios, separados por sítios de clivagem de proteases virais (Morino *et al.*, 2000). A clivagem N-terminal gera um produto capaz de se ligar à proteína PABP e ao eIF4E, enquanto que na porção central existe um domínio HEAT, responsável pela interação com eIF3, eIF4A e RNA. Em mamíferos, o fragmento da clivagem C-terminal codifica um segundo sítio de ligação ao eIF4A também chamado de domínio MA3 (Yang *et al.*, 2004). Muitos processos regulatórios modulam a função do eIF4G pelo deslocamento de proteínas que normalmente se ligam a esse fator ou, alternativamente, a função do eIF4G pode ser modificada por clivagem proteolítica, que separa de forma específica um domínio dos demais (Byrd *et al.*, 2005).

3.4.3 Sítios de ligação do eIF4G

Através de estudos que permitiram a clivagem do eIF4GI humano, foram definidos três domínios de tamanhos similares nessa proteína: uma região N-terminal; o domínio central, necessário para a organização da maquinaria de tradução e a porção C-terminal (este domínio não se faz presente nos homólogos de leveduras) parece desempenhar um papel modulatório durante síntese protéica (Morino *et al.*, 2000). Estudos em mamíferos e leveduras mostram que a região N-terminal possui sítios de ligação ao eIF4E (conservado) e a PABP (não-conservado) (Prevot *et al.*, 2003). 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;Prevot *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 seqüência identificada apresentava um alto grau de conservação entre essas espécies. Com base numa análise mais extensa de seqüências de eIF4G de diferentes organismos chegou-se ao consenso Tyr-X-X-X-X-Leu-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 eIF4E-eIF4G aumenta sensivelmente a afinidade do eIF4E pela estrutura do 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)

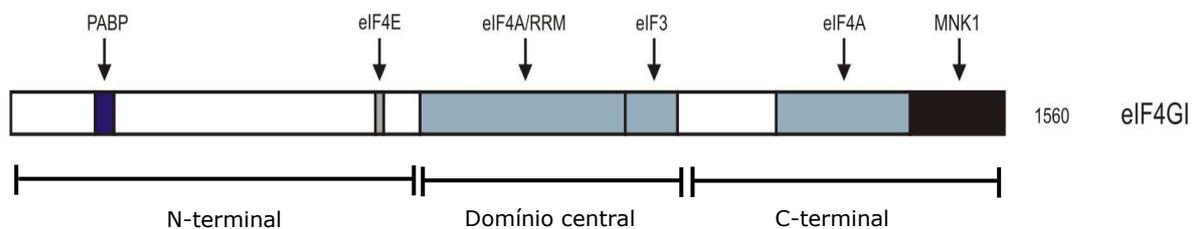


Figura 9. Esquema do eIF4GI humano e seus domínios de ligação. O eIF4G possui na sua região N-terminal os sítios de ligação à PABP e ao eIF4E. Na região central, encontra-se o domínio de ligação ao eIF4A, uma região que reconhece diretamente os mRNAs (RRM) e o sítio de ligação ao eIF3. Na parte C-terminal, encontra-se um segundo sítio de ligação ao eIF4A (denominado MA3) e o sítio de ligação à proteína quinase Mnk1 (Gingras *et al.*, 1999).

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. and 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 and Sonenberg, 1997; Prevot *et al.*, 2003).

Durante a análise da estrutura do domínio central presente no eIF4GII de mamíferos foi encontrado um tipo de domínio HEAT, caracterizado pela presença de cinco pares de α -hélices antiparalelas repetidas (Marcotrigiano *et al.*, 2001). Esse domínio HEAT é geralmente encontrado em proteínas envolvidas na montagem de complexos multiprotéicos (He *et al.*, 2003; Prevot *et al.*, 2003).

Inicialmente um sítio de ligação ao eIF4A foi encontrado 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 and 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 (Morino *et al.*, 2000; De Gregorio *et al.*, 1999). 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 outro sítio de ligação importante presente no eIF4G é aquele que permite sua interação com o fator eIF3. 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).

3.5 Complexo eIF4F em tripanosomatídeos

Até pouco tempo, nenhum homólogo às subunidades do complexo eIF4F de eucariotos havia sido caracterizado formalmente como fator de iniciação em tripanosomatídeos. Inicialmente, apenas um homólogo ao eIF4A (denominado de LeIF) foi descrito na literatura como um antígeno que induz a produção de interleucina 12 (IL-12) e resposta tipo Th1 em humanos em *L. braziliensis* (Skeiky *et al.*, 1995) e *L. major* (Skeiky *et al.*, 1998). Entretanto, nada foi investigado quanto ao seu papel na iniciação da tradução. Uma outra proteína envolvida na iniciação da síntese protéica cuja caracterização em tripanosomatídeos foi iniciada já há algum tempo é a proteína de ligação ao poli-A (PABP). Homólogos funcionais desta proteína já foram caracterizados em pelo menos três diferentes espécies de tripanosomatídeos: *T. cruzi* (Batista *et al.*, 1994), *T. brucei* (Hotchkiss *et al.*, 1999) e *L. major* (Bates *et al.*, 2000). Elementos conservados e divergentes foram identificados nestas proteínas em relação aos homólogos de vertebrados, embora não se saiba ainda seu significado funcional. Mais recentemente, e já fazendo uso de informações geradas pelos projetos genoma de *L. major*, dois homólogos de eIF4E foram descritos de forma preliminar em trabalhos que estudaram sua interação com o cap4 de tripanosomatídeos. Apenas um destes homólogos (LeishIF4E-1) foi descrito em detalhes e mostrou-se capaz de reconhecer especificamente tanto o cap de mamífero como o cap4 de tripanosomatídeos (Lewdorowicz *et al.*, 2004), contudo seu papel na síntese protéica não foi diretamente investigado. Por fim, com o término do seqüenciamento dos genomas de *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei*, análises de bioinformática preliminares permitiram identificar vários candidatos a fatores envolvidos na tradução nestes três organismos (Ivens *et al.*, 2005). Mais uma vez, nenhuma destas

proteínas teve sua função na síntese protéica confirmada por abordagens experimentais.

Os dados de sequenciamento do genoma das três espécies também permitiram a identificação de seqüências que apresentavam homologia a fatores eucarióticos de iniciação da tradução. Apesar de possuírem diferentes graus de similaridades, estas seqüências apresentam semelhanças entre as espécies, o que indica que elas devem ser conservadas e desempenham papéis importantes nestes parasitas, mas devido à multiplicidade de seqüências, não foi possível identificar qual delas corresponderiam aos fatores já caracterizados em outros eucariotos ou se os vários homólogos apresentariam expressão diferenciada nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita (Dhalia *et al.*, 2005).

Assim, foram identificados em *L. major* (Tabela 1), com os referentes ortólogos em *T. brucei* e *T. cruzi*: seis homólogos à subunidade eIF4E (*LmEIF4E1*, *LmEIF4E2*, *LmEIF4E3*, *LmEIF4E4*, *LmEIF4E5* e *LmEIF4E6*), dois homólogos ao eIF4A (*LmEIF4AI* e *LmEIF4AIII*) e cinco homólogos ao eIF4G (*LmEIF4G1*, *LmEIF4G2*, *LmEIF4G3*, *LmEIF4G4* e *LmEIF4G5*) (Dhalia *et al.*, 2005) – por terem sido identificados recentemente, a tabela não apresenta dados sobre os homólogos *LmEIF4E5* e *LmEIF4E6*).

Em relação aos homólogos de eIF4G de tripanosomatídeos, as cinco seqüências identificadas estão atualmente em diferentes fases de caracterização (Figura 10). Estudos preliminares desses homólogos incluíram a análise das seqüências, análise de expressão durante o ciclo de vida de *Leishmania* sp. através de ensaios de Western blot e ensaios de ligação *in vitro* (*pull down*). Dentre elas, as proteínas *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* se destacaram por seus resultados em ensaios funcionais preliminares, os quais geraram indícios que elas atuem realmente como fatores da tradução. Além de apresentarem semelhanças estruturais entre si e com a seqüência de outras espécies, estas duas proteínas

apresentam ainda níveis de expressão similares em *L. major*, sendo expressas constitutivamente na fase promastigota do parasita.

Tabela 1. Seqüências homólogas aos fatores de iniciação da tradução do complexo eIF4F identificadas em *L. major*.

Seqüências em <i>L. major</i>	Peso molecular predito (kDa)	Localização nos cromossomos	Similaridade aos homólogos humanos	Similaridade aos homólogos de <i>T. brucei</i>
<i>LmEIF4A1</i>	45.3	1 (2 genes)	74%	91%
<i>LmEIF4A2</i>	43.9	28	71%	89%
<i>LmEIF4E1</i>	31.5	19 (2 genes)	41%	57%
<i>LmEIF4E2</i>	24	27	42%	61%
<i>LmEIF4E3</i>	38	28	43%	61%
<i>LmEIF4E4</i>	33.8	30	45%	50%
<i>LmEIF4G1</i>	114	15	43%*	47%
<i>LmEIF4G2</i>	145.9	15	33%*	49%
<i>LmEIF4G3</i>	71.2	16	39%*	55%
<i>LmEIF4G4</i>	84.6	36	38%*	45%
<i>LmEIF4G5</i>	88.8	10	37%*	60%

* Similaridade com a proteína de humanos referente apenas ao nível do domínio central. Modificado a partir de Dhaliya *et al.*, 2005.

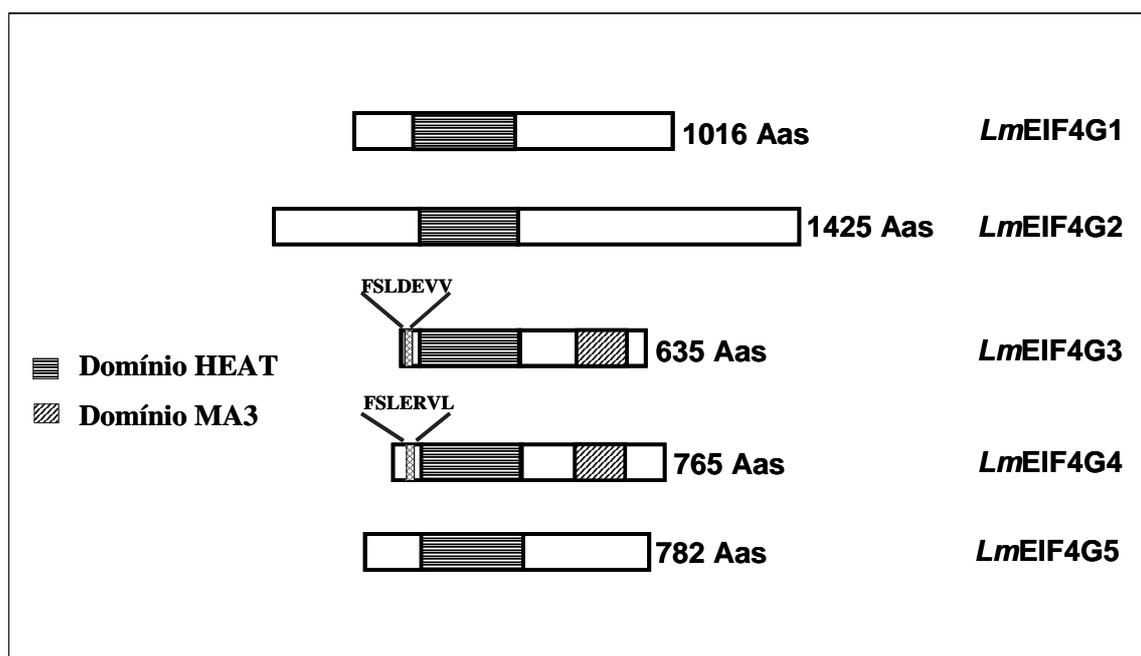


Figura 10. Esquema dos homólogos ao eIF4G de *L. major* e seus principais domínios. A região mais conservada das proteínas, semelhante a outros organismos, é a região central onde está localizado o domínio HEAT. Destaque para os homólogos *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4*, por apresentarem o motivo FSLXXVL na região N-terminal, que pode ser responsável pela interação com algum dos homólogos do eIF4E em *L. major*; e na região C-terminal dos mesmos homólogos tem-se outra região conservada, a qual pode atuar como segundo domínio de ligação ao eIF4A (MA3).

3.6 Manipulação genética em tripanosomatídeos

Muitos dos membros da família Trypanosomatidae são parasitas digenéticos, cujos ciclos de vida apresentam diferentes formas celulares, alternando entre os hospedeiros vertebrados e invertebrados. Sendo eucariotos primitivos, estes microrganismos têm chamado atenção não apenas por sua relevância médica, mas também por apresentarem características distintas nos mecanismos de controle da expressão gênica. Estudos mais antigos sobre o controle da expressão gênica nesses organismos eram focados no processo de variação antigênica. Atualmente, com novos conhecimentos de protocolos de transfecção e manipulação genética, várias ferramentas de genética reversa têm sido utilizadas para permitir a manipulação dos genomas dos tripanosomatídeos. Muitos desses métodos auxiliam no estudo de função dos genes por estratégias de perda de função (interferência de RNA, por exemplo) e no estudo de localização de proteínas usando marcadores *in vivo*, como as proteínas fluorescentes (Teixeira and DaRocha, 2003; Beverley, 2003).

3.6.1 Expressão de proteínas de fusão fluorescentes

A descoberta de uma proteína que é naturalmente fluorescente – a *green fluorescent protein* (GFP) - proveniente da água-viva *Aequorea*

victoria, serviu como uma ferramenta poderosa para estudos da expressão gênica no nível protéico. Durante os últimos anos, a GFP e suas formas derivadas têm sido usadas para monitorar a síntese e a localização de proteínas específicas numa grande variedade de organismos. Esses estudos permitem a construção de genes contendo a seqüência nucleotídica que codifica a GFP em fusão com a seqüência nucleotídica que codifica a proteína de interesse e, introduzindo o gene quimérico nas células por transformação, é possível detectar a fluorescência através da exposição das células transgênicas à luz azul ou ultra-violeta (Snustad, 2000). Através de mutações no gene da GFP, foi possível produzir formas variantes da proteína que emitem luz azul ou amarela e com capacidade de fluorescência até 35 vezes maior. Como exemplo, tem-se a EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), que é resultante de mutações na GFP, gerando uma proteína de fluorescência amarela, com pico de excitação em 514 nm e pico de emissão de 527 nm e fluorescência aumentada (Chalfie M *et al.*, 1994). Enquanto a maioria das moléculas fluorescentes, como o FITC (isotiocianato de fluoresceína) usadas em microscopia mostrava-se tóxicas quando usadas em células vivas, as proteínas fluorescentes apresentam-se menos nocivas. Isto tem permitido o desenvolvimento de sistemas que podem observar células expressando uma ou mais proteínas fluorescentes ao longo do tempo. A análise dessas imagens tem redefinido o entendimento de vários processos biológicos que haviam sido estudados anteriormente apenas com material fixado (Phillips, 2001).

3.6.2 Expressão de proteínas de fusão fluorescentes em tripanosomatídeos

Apesar do sucesso com as transfecções em outros organismos da família Trypanosomatidae (principalmente em *T. brucei*), a transfecção de *T. cruzi* e de espécies de *Leishmania* mostrou-se inicialmente como

um processo laborioso e ineficiente. O primeiro registro de transfecção eficiente de *T. cruzi* ocorreu em 1991 (Coburn *et al.*, 1991), utilizando o vetor pTEX, o qual ainda é bastante utilizado nos dias atuais. Além do pTEX, outros vetores têm sido desenvolvidos na tentativa de se obter melhores condições de expressão em *T. cruzi*, como os descritos por (Ramirez *et al.*, 2000; Da Rocha *et al.*, 2004). Já em *Leishmania*, foram desenvolvidos alguns vetores para expressão controlada nas espécies *L. donovani* (Yan *et al.*, 2002) e *L. tarentolae* (Kushnir *et al.*, 2005) e mais recentemente em *L. major* (Besteiro *et al.*, 2006).

3.6.3 Interferência de RNA (RNAi)

A interferência de RNA foi primeiramente descrita no nemátoda *Caenorhabditis elegans* por Fire e colaboradores, que descobriram que RNAs dupla-fita, quando inseridos numa célula, induziam um silenciamento seqüência-específico potente (Fire *et al.*, 1998). Esta defesa contra material genético exógeno é uma das várias rotas fisiológicas que são induzidas por RNAs dupla-fita e está relacionado à defesa normal das células contra vírus e transposons. Esse silenciamento gênico pós-transcricional é um processo conservado em um amplo número de organismos como plantas, fungos, *Drosophila*, *C. elegans* e mamíferos (Sledz and Williams, 2005; Leung and Whittaker, 2005).

O mecanismo de RNAi se caracteriza pela ação de uma enzima citoplasmática endógena (Dicer), com atividade de RNase III, que cliva RNAs dupla-fita longos (dsRNAs) em duplexes menores de 19-21 nucleotídeos (siRNAs). Após a clivagem pela Dicer, os duplexes se associam a várias proteínas com funções de nucleases, para formar um complexo conhecido como RISC (*RNA-induced silencing complex*). A fita *sense* do siRNA é então removida do complexo. Esta etapa mantém a fita *antisense* "aderida" ao RISC e com capacidade de hibridizar especificamente com o mRNA-alvo. O RISC é então liberado do mRNA

inativo e este é degradado por exonucleases celulares, silenciando sua tradução. Se a seqüência-alvo não é totalmente complementar, o mRNA não é degradado e a tradução é apenas inibida (Tebes and Kruk, 2005).

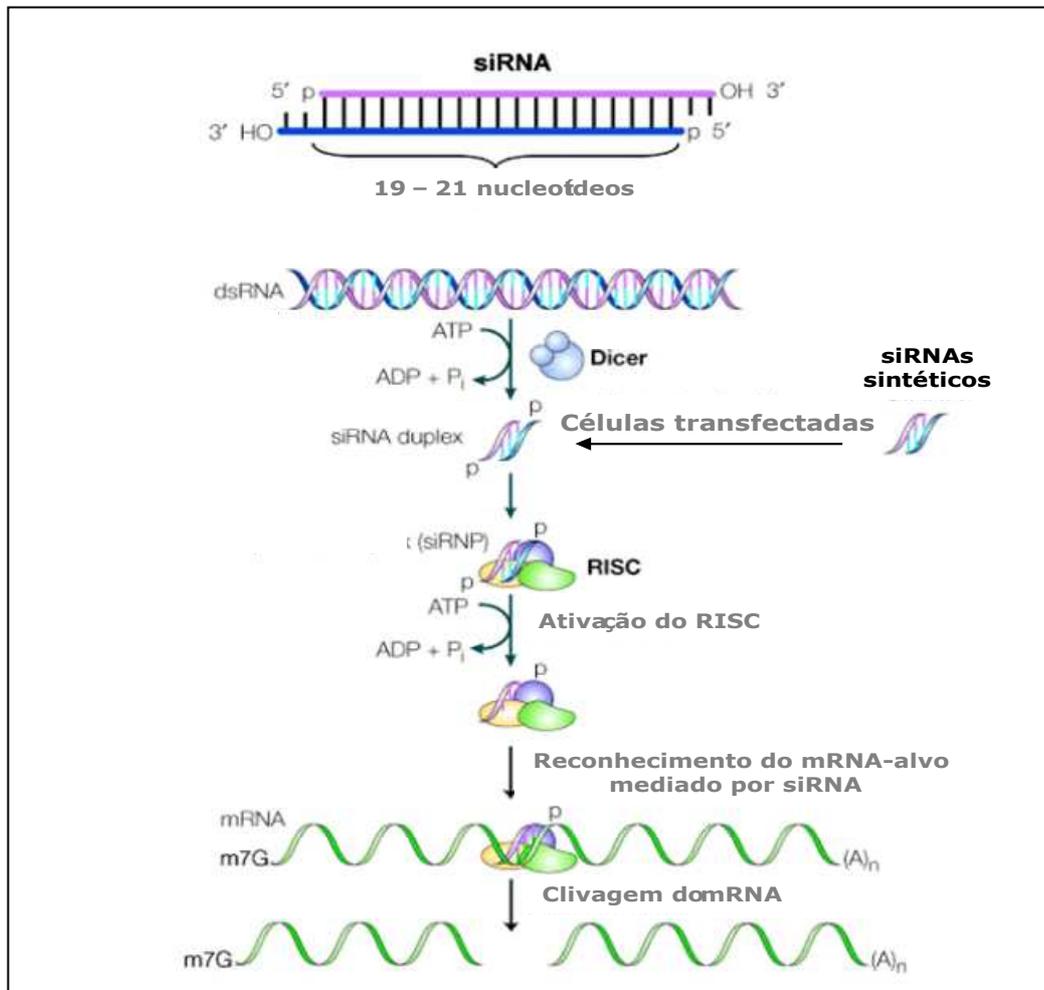


Figura 11. Esquema do mecanismo geral de RNAi. Modificado de Dykxhoorn *et al.*, 2003.

Os siRNAs têm sido usados extensivamente em células de mamíferos para definir as funções de genes individuais, particularmente aqueles envolvidos em doenças e processos celulares como endocitose, transdução de sinais, apoptose, controle do ciclo celular, em genes relevantes envolvidos em doenças neurodegenerativas e xenotransplantes (Leung ad Whittaker, 2005). Alguns parasitas como *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasmas gondii*, *Giardia* e *Entamoeba*

também têm sido estudados por esta técnica, onde genes essenciais já foram identificados, oferecendo alvos importantes para o desenvolvimento de novas drogas que combatam essas infecções (Leung and Whittaker, 2005).

3.6.4 Interferência de RNA em tripanosomatídeos

Os primeiros experimentos de RNAi em tripanosomatídeos utilizaram a eletroporação de células com RNAs dupla-fita, gerando fenótipos potentes, porém transientes (Ngô *et al.*, 1998). A utilização do RNAi foi melhorada com a produção de vetores que conseguiram uma integração estável no genoma. Os primeiros vetores usados tinham promotores regulados por tetraciclina para controlar a expressão dos RNAs. Estes vetores continham repetições invertidas da seqüência do gene-alvo, separadas por um fragmento "separador" de seqüência irrelevante produzindo um RNA em forma de grampo. Em outra classe de vetores, o gene a ser silenciado é circundado por um par de promotores T7 em sentido oposto, ambos induzidos por tetraciclina. A transcrição a partir desses promotores opostos produz moléculas de RNA complementares que são capazes de hibridizar para formar uma molécula linear de dsRNA. Esses vetores com promotores T7 duplos podem ser utilizados tanto na forma sanguínea quanto na forma procíclica (Wickstead *et al.*, 2002; Motyka and Englund, 2004).

A interferência de RNA é um método particularmente conveniente para examinar a função gênica e a ausência de mecanismos de RNAi em *T. cruzi* e *L. major* levou-se a utilizar *T. brucei* como modelo para análise funcional em tripanosomatídeos. A falta aparente do mecanismo de RNAi em *T. cruzi* e *L. major* gerou uma surpresa, considerando que eles também pertencem à família Trypanosomatidae. Então, a explicação mais aceitável atualmente é que o mecanismo de RNAi tenha se perdido em *T. cruzi* e *L. major*. Outros precedentes poderiam confirmar essa explicação, pois se sabe que o genoma de *Saccharomyces cerevisiae* não possui os genes de RNAi, enquanto que o

mecanismo é totalmente funcional em *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa* e *Cryptococcus neoformans*, dentre outros (Ullu *et al.*, 2004; Alford *et al.*, 2005).

Em tripanosomatídeos, a escolha dos sítios de integração dos vetores é dificultada pela organização incomum dos genes e pela natureza indistinta da RNA polimerase II (RNA pol II). Por isso, para se obter uma regulação forte nas células não-induzidas, deve-se evitar a integração dos vetores em regiões de genes muito ativos ou com transcrição forte pela RNA pol II. A seqüência-alvo para a integração de vetores indutíveis em *T. brucei* tem sido a região *upstream* ao promotor do gene de RNA ribossomal 18S – um sítio referido como rDNA espaçador. Porém, existem outros sítios de integração dentro do genoma de *T. brucei* que permitem uma boa regulação dos vetores. Dentre eles, têm-se os minicromossomos, que são pequenos cromossomos lineares, que possuem de 30 a 150 Kb e são mantidos nesse organismo como reservatórios dos genes VSG. Os minicromossomos são sítios potencialmente úteis para integração por varias razões, sendo a mais importante delas que são sítios transcricionalmente silenciosos (Wickstead *et al.*, 2002; Ullu *et al.*, 2004).

Até o momento, vários vetores que permitem a expressão controlada de transgenes em tripanosomatídeos foram produzidos, bem como linhagens de parasitas transgênicos que permitem a integração desses vetores em seu genoma. As linhagens mais utilizadas para esse propósito co-expressam constitutivamente o repressor que regula o operon procariótico de resistência à tetraciclina (TetR) e uma RNA polimerase de bacteriófago (T7 RNA polimerase – T7RNAP), que foram inseridos no genoma do parasita e são mantidos por marcas de resistência a antibióticos específicos. Dessa forma, tornou-se possível a utilização de promotores da T7 RNA polimerase nos vetores de integração, o que resolveu o problema da falta de controle de expressão pela ausência de promotores da RNA pol II e o desejo de não se utilizar

os promotores da RNA pol I de *T. brucei*, que são reconhecidamente fortes e sujeitos à regulação endógena (Wirtz *et al.*, 1999). Atualmente, a linhagem procíclica de *T. brucei* mais utilizada é a 29-13, que co-expressa T7RNAP e TetR, e foi obtida a partir da transfecção estável seqüencial da linhagem selvagem 427 com os vetores pLew13 (codifica a T7RNAP) e pLew29 (codifica o TetR), que conferiram resistência aos antibióticos neomicina e higromicina, respectivamente (Wirtz *et al.*, 1999).

A inclusão de técnicas *in vivo* na análise dos homólogos a fatores de iniciação da tradução identificados em tripanosomatídeos teve início com a caracterização das proteínas *TbEIF4AI* e *TbEIF4AIII* (Dhalia *et al.*, 2006) onde foram realizadas a localização subcelular, a indução da interferência de RNA e a identificação de dominantes negativos pela super-expressão das proteínas em *T. brucei*.

A utilização dessas técnicas permitiu a geração de dados importantes para a caracterização desses dois homólogos da subunidade eIF4A de *T. brucei* e reforçou a necessidade do uso de técnicas *in vivo* na análise funcional de proteínas, pois os resultados obtidos enriquecem de forma significativa àqueles conseguidos *in vitro*, gerando informações de qualidade.

Com bases nos bons resultados obtidos previamente na caracterização dos homólogos aos fatores de iniciação da tradução identificados em tripanosomatídeos, este trabalho visou a utilização de técnicas *in vivo* para continuar a análise funcional de três dos cinco homólogos ao fator eIF4G identificados (*TbEIF4G3-5*). As abordagens utilizadas incluíram a interferência de RNA e a localização celular através da detecção de proteínas fluorescentes. Para isso foram utilizadas células geneticamente modificadas de *T. brucei*, por este ser o organismo-modelo nos estudos de manipulação genética em tripanosomatídeos e também pela falta de protocolos bem estabelecidos dessas técnicas que se apliquem às espécies de *Leishmania*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agabian N (1990) Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell* 61: 1157-1160.

Alexander J, Satoskar AR and Russell DG (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J.Cell Sci.* 112 Pt 18: 2993-3002.

Alsford S, Kawahara T, Glover L and Horn D (2005) Tagging a *T. brucei* RRNA locus improves stable transfection efficiency and circumvents inducible expression position effects. *Mol.Biochem.Parasitol.* 144: 142-148.

Aragon T, de la LS, Novoa I, Carrasco L, Ortin J and Nieto A (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. *Mol.Cell Biol.* 20: 6259-6268.

Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA and Boothroyd JC (1992) Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J.Biol.Chem.* 267: 9805-9815.

Bates EJ, Knuepfer E and Smith DF (2000) Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res.* 28: 1211-1220.

Batista JA, Teixeira SM, Donelson JE, Kirchhoff LV and de Sa CM (1994) Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Mol.Biochem.Parasitol.* 67: 301-312.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE et al (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309: 416-422.

Besteiro S, Coombs GH and Mottram JC (2006) The SNARE protein family of *Leishmania major*. BMC.Genomics 7: 250.

Beverley SM (2003) Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. Nat.Rev.Genet. 4: 11-19.

Boothroyd JC and Cross GA (1982) Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. Gene 20: 281-289.

Bringaud F, Riviere L and Coustou V (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. Mol.Biochem.Parasitol. 149: 1-9.

Browning KS (1996) The plant translational apparatus. Plant Mol.Biol. 32: 107-144.

Bruzik JP, Van DK, Hirsh D and Steitz JA (1988) Trans splicing involves a novel form of small nuclear ribonucleoprotein particles. Nature 335: 559-562.

Byrd MP, Zamora M and Lloyd RE (2005) 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.

Campbell DA, Thomas S and Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? Microbes Infect. 5: 1231-1240.

Caron S, Charon M, Cramer E, Sonenberg N and Dusanter-Fourt I (2004) 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.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W and Prasher D (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 11;263(5148):802-5.

Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* 21: 1881-1888.

Coburn CM, Otteman KM, McNeely T, Turco SJ and Beverley SM (1991) Stable DNA transfection of a wide range of trypanosomatids. *Mol.Biochem.Parasitol.* 46: 169-179.

Cuesta R, Laroia G and Schneider RJ (2000) Chaperone hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. *Genes Dev.* 14: 1460-1470.

DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ and Teixeira SM. (2004) Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res:* 92(2):113-20.

De Gregorio E, Preiss T and Hentze MW (1999) Translation driven by an eIF4G core domain in vivo. *EMBO J.* 18: 4865-4874.

Dhalia R, Marinsek N, Reis CR, Katz R, Muniz JR, Standart N, Carrington M and de Melo Neto OP (2006) The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res.* 34: 2495-2507.

Dhalia R, Reis CR, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JR, Standart N and de Melo Neto OP (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol.Biochem.Parasitol.* 140: 23-41.

Dykxhoorn DM, Novina CD and Sharp PA(2003). Killing the Messenger: Short RNAs that Silence Gene Expression. *Nature Revs. Mol. Cell. Biol.* 4: 457-467.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL et al (2005a) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA et al (2005b) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309: 404-409.

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

Fortes P, Inada T, Preiss T, Hentze MW, Mattaj IW and Sachs AB (2000) The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Mol.Cell* 6: 191-196.

Gebauer F and Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5: 827-835.

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

Goyer C, Altmann M, Lee HS, Blanc A, Deshmukh M, Woolford JL, Jr., Trachsel H and Sonenberg N (1993) 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.

Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S and Sonenberg N (1998) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol.Cell Biol.* 18: 334-342.

Harris KA, Jr., Crothers DM and Ullu E (1995) In vivo structural analysis of spliced leader RNAs in *Trypanosoma brucei* and *Leptomonas collosoma*: a flexible structure that is independent of cap4 methylations. RNA. 1: 351-362.

Henry J (1999) Parasitologia médica. In: Diagnósticos clínicos e tratamentos por métodos laboratoriais. 19ª edição. Ed. Manole, São Paulo, p. 1252-1310.

Hotchkiss TL, Nerantzakis GE, Dills SC, Shang L and Read LK (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.

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

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

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E et al (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science 309: 436-442.

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

Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Merrick WC and Rhoads RE (2001) Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. *J.Biol.Chem.* 276: 2872-2879.

Kushnir S, Gase K, Breitling R and Alexandrov K (2005) Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr.Purif.* 42: 37-46.

Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T and Rhoads RE (1995) 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.

Le H, Chang SC, Tanguay RL and Gallie DR (1997) The wheat poly(A)-binding protein functionally complements pab1 in yeast. *Eur.J.Biochem.* 243: 350-357.

Leung RK and Whittaker PA (2005) RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol.Ther.* 107: 222-239.

Lewdorowicz M, Yoffe Y, Zuberek J, Jemielity J, Stepinski J, Kierzek R, Stolarski R, Shapira M and Darzynkiewicz E (2004) Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *RNA.* 10: 1469-1478.

Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Jr., Richter-Cook NJ, Merrick WC and Sonenberg N (1999) Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol.Cell Biol.* 19: 7336-7346.

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

Mader S, Lee H, Pause A and Sonenberg N (1995) 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.

Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL et al (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6: 163-169.

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

Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N and Burley Sk (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell.* 3(6):707-16.

Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, Pestova TV, Hellen CU and Burley SK (2001) A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol.Cell* 7: 193-203.

Maroney PA, Denker JA, Darzynkiewicz E, Laneve R and Nilsen TW (1995) Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. *RNA.* 1: 714-723.

Matsuo H, Li H, McGuire AM, Fletcher CM, Gingras AC, Sonenberg N and Wagner G (1997) Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat.Struct.Biol.* 4: 717-724.

Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV and Sonenberg N (2000) 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.

Motyka SA and Englund PT (2004) RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr.Opin.Microbiol.* 7: 362-368.

Mylers PJ, Audleman L, Devos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, Magness C, Rickel E, Sisk E et al (1999) *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 2902-2906.

Neves D (2000) *Parasitologia Humana*. 10ª edição. Ed. Atheneu, São Paulo, 521p.

Ngo H, Tschudi C, Gull K, et al. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14687-92.

Phillips G (2001) Green fluorescent protein - a bright idea for the study of bacterial protein localization. *FEMS Microbiol Lett.* 16;204(1):9-18.

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

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T and Sonenberg N (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* 18: 270-279.

Ramirez MI, Yamauchi LM, de Freitas Jr LH, Uemura H and Schenckman S (2000) The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.*:111(1):235-40.

Richter JD and Sonenberg N (2005) Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433: 477-480.

Sachs AB and Varani G (2000) Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat.Struct.Biol.* 7: 356-361.

Schmidt G and Roberts L (1996) Foundations of Parasitology. 5ª edição. Times Mirror High Education Group, Iowa, USA, 659p.

Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G and Reed SG (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. J.Exp.Med. 181: 1527-1537.

Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Ovendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ et al (1998) LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. J.Immunol. 161: 6171-6179.

Sledz CA and Williams BR (2005) RNA interference in biology and disease. Blood 106: 787-794.

Snustad DJ and Simmons MJ (2000) Principles of Genetics. 2 nd edition. John Wiley & Sons Inc, USA, 876p.

Sonenberg N and Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. Curr.Opin.Struct.Biol. 13: 56-63.

Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL and Panigrahi AK (2005) Complex management: RNA editing in trypanosomes. Trends Biochem.Sci. 30: 97-105.

Sutton RE and Boothroyd JC (1986) Evidence for trans splicing in trypanosomes. Cell 47: 527-535.

Tahara SM, Morgan MA and Shatkin AJ (1981) Two forms of purified m7G-cap binding protein with different effects on capped mRNA translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. J.Biol.Chem. 256: 7691-7694.

Tarun SZ, Jr. and Sachs AB (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* 15: 7168-7177.

Tebes SJ and Kruk PA (2005) The genesis of RNA interference, its potential clinical applications, and implications in gynecologic cancer. *Gynecol.Oncol.* 99: 736-741.

Teixeira SM and DaRocha WD (2003) Control of gene expression and genetic manipulation in the Trypanosomatidae. *Genet.Mol.Res.* 2: 148-158.

Ullu E, Tschudi C and Chakraborty T (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.* 6: 509-519.

Vilela C, Velasco C, Ptushkina M and McCarthy JE (2000) The eukaryotic mRNA decapping protein Dcp1 interacts physically and functionally with the eIF4F translation initiation complex. *EMBO J.* 19: 4372-4382.

von der Haar T, Ball PD and McCarthy JE (2000) Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *J.Biol.Chem.* 275: 30551-30555.

von der Haar T and McCarthy JE (2002) Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function. *Mol.Microbiol.* 46: 531-544.

Wells SE, Hillner PE, Vale RD and Sachs AB (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol.Cell* 2: 135-140.

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

Wirtz E, Leal S, Ochatt C and Cross GA (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.

Yan S, Martinez-Calvillo S, Schnauffer A, Sunkin S, Myler PJ and Stuart K (2002) A low-background inducible promoter system in *Leishmania donovani*. Mol.Biochem.Parasitol. 119: 217-223.

Yang HS, Cho MH, Zakowicz H, Hegamyer G, Sonenberg N and Colburn NH (2004) A novel function of the MA-3 domains in transformation and translation suppressor Pcd4 is essential for its binding to eukaryotic translation initiation factor 4A. Mol.Cell Biol. 24: 3894-3906.

Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Stepinski J, Altmann M, Darzynkiewicz E and Shapira M (2006) Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. Eukaryot.Cell 5: 1969-1979.

Zamudio JR, Mittra B, Zeiner GM, Feder M, Bujnicki JM, Sturm NR and Campbell DA (2006) Complete cap 4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. Eucaryot Cell 5: 905-915.

Referências Eletrônicas

CDC - Centers for Disease Control and Prevention, <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx> (Outubro, 2006)

International Health Wellcome Trust (2005) Trypanosomatids: genomes and biology, mídia magnética - CD1 (Outubro, 2006).

TDR - Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, www.who.int/tdr/diseases, (Outubro, 2006)

5.0 – Artigo Científico

Análise funcional comparativa de três homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G de *Trypanosoma brucei*

Danielle M. N. Moura^{a,b}, Rodrigo P. de Lima^{a,b} e Osvaldo P. de Melo Neto^{b,*}

^aDepartamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^bCentro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil.

* Autor para correspondência:

Fax: 00558121012636

E-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br

Artigo a ser enviado para a revista Molecular and Biochemical Parasitology. ISSN 0166-6851. Fator de impacto (JCR, 2005): 2,733.

RESUMO

Em eucariotos superiores, a síntese protéica inicia-se com a formação do complexo eIF4F e sua ligação ao mRNA. Este complexo (composto pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G) está envolvido na etapa de iniciação da tradução e permite o reconhecimento do mRNA pela subunidade menor ribossomal. Pouco se sabe sobre a iniciação da tradução nos tripanosomatídeos e para investigar este processo, foram identificados múltiplos homólogos para cada subunidade do complexo eIF4F no genoma de *L. major*. Dentre eles, cinco homólogos ao fator eIF4G, onde suas seqüências mostraram graus diferentes de similaridade às proteínas de vertebrados. Assim, estes homólogos, denominados *LmEIF4G1-5*, sofreram um processo de caracterização inicial, incluindo análises de expressão durante o ciclo de vida de *L. major* e ensaios de *pull-down*. Para suplementar os dados obtidos *in vitro*, utilizamos ortólogos de *T. brucei* (*TbEIF4G3-5*) para a realização de análises *in vivo*. Com isso, os genes de interesse foram amplificados e clonados em vetores plasmidiais, permitindo a expressão de proteínas em *E. coli*, produção de anticorpos, realização da interferência de RNA e localização celular pela detecção de proteínas de fusão fluorescentes. A interferência de RNA mostrou que os três homólogos são essenciais à viabilidade celular, mas cada um apresentou um perfil de sobrevivência diferente após a indução de RNAi, observado através de curvas de crescimento. As células sob RNAi do *TbEIF4G4* apresentaram ainda redução na mobilidade e mudança de morfologia antes da morte dos parasitas. Anticorpos contra as proteínas *TbEIF4G3-5* foram usados em ensaios de Western blot para confirmar a depleção da proteína após RNAi. A localização celular das três proteínas confirmou sua presença no citoplasma das células de *T. brucei*.

Palavras-chave: tripanosomatídeos, eIF4G, RNAi e localização celular.

1. INTRODUÇÃO

Várias espécies pertencentes à família Trypanosomatidae são consideradas patógenos de grande importância médica, por serem os agentes etiológicos de enfermidades de relevância mundial como as Leishmanioses (*Leishmania sp.*), a Doença de Chagas (*T. cruzi*) e a Doença do Sono (*T. brucei*) (www.who.int/tdr/diseases). Os tripanosomatídeos apresentam características biológicas que os diferem da maioria dos demais eucariotos, destacando a transcrição policistrônica e processamento dos mRNAs por *trans-splicing*, além da ausência de controle transcricional da expressão gênica. Dessa forma, a tradução atua como um ponto fundamental na regulação da expressão dos genes nestes organismos[1].

O início da síntese protéica em eucariotos é mediada pela ação de um grupo fatores de iniciação da tradução (eIFs – eukaryotic initiation factors), que promovem a ligação do mRNA ao ribossomo [2]. Neste processo, o complexo eIF4F (composto pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G) está envolvido na etapa de reconhecimento do mRNA e no recrutamento de outros componentes da maquinaria de tradução [3].

O fator eIF4G é um polipeptídeo de alto peso molecular, que atua como uma proteína de ancoramento durante a iniciação da tradução, sendo responsável pela organização e montagem do complexo eIF4F. Nessa tarefa, ele interage com o eIF4A e o eIF4E, além de possuir sítios de ligação ao eIF3 e à proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) ao longo de sua estrutura [4]. Estruturalmente, o eIF4G pode ser dividido em três regiões: a porção N-terminal, onde se encontra o sítio de ligação ao eIF4E; uma região central com a presença de um domínio HEAT conservado, responsável pela interação com o eIF4A e o eIF3, e a porção C-terminal, presente apenas em eucariotos mais complexos, que tem um papel modulatório na síntese protéica. Nessa região C-terminal encontram-se o domínio MA3, apresentando um segundo sítio de

ligação ao eIF4A e o domínio W2, que permite a interação com a quinase MnK1, responsável pela fosforilação do eIF4E [5,6].

Pouco se sabe sobre a iniciação da tradução nos tripanosomatídeos e para investigar este processo, foram identificados múltiplos homólogos para cada subunidade do complexo eIF4F nos genomas de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Dentre eles, foram encontrados cinco homólogos ao fator eIF4G e a caracterização inicial de algumas das proteínas de *L. major*, que incluíram as análises das seqüências, a quantificação durante a fase promastigota e a investigação da sua capacidade de interação ao homólogo eIF4A, através de ensaios de ligação *in vitro* (*pull down*), mostrou que essas proteínas apresentavam graus diferentes de similaridade comparadas às proteínas de vertebrados [7]. *A priori* não foi possível identificar o papel funcional de algum deles na iniciação da tradução, mas os homólogos *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* foram considerados candidatos importantes a serem os ortólogos do eIF4G.

Este trabalho teve como objetivo a utilização de algumas técnicas de manipulação genética para continuar o estudo da função dos homólogos ao eIF4G de tripanosomatídeos. Para isso, utilizamos as proteínas *TbEIF4G3-5* de *T. brucei* para a realização de ensaios de localização celular, através de expressão de proteínas de fusão à *Enhanced Yellow Fluorescent Protein* (EYFP) e para a investigação da influência desses homólogos na viabilidade celular do parasita, através da técnica de interferência de RNA. Os resultados obtidos com essas técnicas, juntamente com os dados referentes às análises das seqüências dos homólogos forneceram maiores informações sobre essas proteínas e reforçaram a possibilidade de que pelo menos dois deles (*TbEIF4G3-4*) atuem realmente como fatores de iniciação da tradução em *T. brucei*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise de seqüências

Seqüências homólogas à subunidade eIF4G foram identificadas inicialmente em *L. major* através da ferramenta OmniBLAST do banco de dados GeneDB do Sanger Institute (www.genedb.org), utilizando como parâmetro de busca as proteínas já caracterizadas de humano e *Saccharomyces cerevisiae* [7]. Buscas similares no genoma de *T. brucei* e *T. cruzi* foram realizadas também através da ferramenta OmniBLAST do banco de dados GeneDB, utilizando como parâmetro as seqüências obtidas em *L. major*. Os alinhamentos múltiplos foram realizados através do programa Clustal W (Programa Bioedit), com alguns ajustes manuais para um maior refinamento.

2.2 Crescimento de parasitas

Formas procíclicas de *T. brucei*, cepa selvagem 427 e linhagem transgênica 29-13 [8] foram cultivadas a 27°C em meio SDM-79 (Sigma-Aldrich), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 0,002% de hemina e 0,1% de ampicilina/estreptomicina. Para a manutenção dos transgenes da T7 RNA polimerase e do repressor de tetraciclina na linhagem 29-13, foram adicionados ao meio SDM-79 os antibióticos G418 (15 µg/mL) e higromicina (25 µg/mL). Os parasitas foram monitorados por microscopia óptica até atingirem a fase logarítmica de crescimento ($10^6 - 10^7$ células/mL) para a obtenção de concentrados celulares a serem utilizados nas transfecções.

2.3 PCR e clonagem dos genes *TbEIF4G3-5* de *T. brucei*

Os genes *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* e *TbEIF4G5* foram amplificados a partir de DNA total de *T. brucei* (cepa selvagem 427), utilizando oligonucleotídeos flanqueados por sítios de restrição das enzimas *Hind* III e *Bam*H I: *TbEIF4G3* (forward - AAGCTTCCGCCACCATGCACGTCTACACCATCG e reverse - GGATCCAGTCAAGGTCCCCTTCCC); *TbEIF4G4* (forward - AAGCTTCCGCCACCATGCTGTTCAAACCTCGTG e reverse - GGATCCCGCAT ATATAACTGAGAGTTC) e *TbEIF4G5* (forward - AAGCTTCCGCCACC AGGAGCACCGCGCCGCAC e reverse - GGATCCTTTAGATTTCTCAAACGCAG). Ainda para o gene *TbEIF4G4*, outra amplificação foi realizada com oligonucleotídeos com sítios das enzimas *Bam*H I e *Xho* I (forward - TCTGGATCCCCCGCCACCATGCTGTTCAAACCTCGTGG e reverse - TTCCTCGAGCGCATATATAACTGAGAGTTC). Inicialmente, os produtos de PCR foram purificados e clonados no vetor pGEMT easy (Promega Corporation), seguindo as recomendações do fabricante. Os clones obtidos foram seqüenciados no seqüenciador ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), e após análise da integridade das seqüências, os genes *TbEIF4G3* e *TbEIF4G5* foram subclonados nos vetores tetraciclina-indutíveis p2T7-177 [9] e p2216 (cedido gentilmente pelo Dr. Mark Carrington), entre os sítios das enzimas de restrição *Hind* III e *Bam*H I, os quais serviriam para a realização das técnicas de interferência de RNA e expressão de proteínas de fusão à EYFP, respectivamente. O gene *TbEIF4G4* foi subclonado no vetor p2T7-177, entre os sítios das enzimas *Bam*H I e *Xho* I e no vetor p2216, entre os sítios *Hind* III e *Bam*H I.

Fragmentos codificantes para o domínio HEAT dos homólogos *TbEIF4G3-5* (*TbEIF4G3*₁₋₂₂₇, *TbEIF4G4*₁₋₃₁₉ e *TbEIF4G5*₁₋₄₀₁ - os números subscritos indicam os resíduos de aminoácidos da proteína selvagem que permanecem na proteína recombinante) foram amplificados por

PCR, utilizando oligonucleotídeos flanqueados pelos sítios de restrição das enzimas *BamH* I e *Xho* I. Para o gene *TbEIF4G3* (*forward* - TCTGGATCCCCCGCCACCATGCACGTCTACACCATCG e *reverse* - TTGCTCGAGCACAGCCCTGTCAGAGGC), *TbEIF4G4* (*forward* - TCTGGATCCCCCGCCACCATGCTGTTCAAACCTCGTGG e *reverse* - CCCCTCGAGCTGCTGAGATTGAA ATCC) e *TbEIF4G5* (*forward* - TCTGGATCCCCCGCCACCATGGAGCACCGCGCCGCAC e *reverse* - CCCCTCGAGATCACCCGTCCTGTCAC). Após digestão com as respectivas enzimas, os fragmentos amplificados foram clonados no plasmídeo pET21a (Novagen), para a expressão de proteínas de fusão à uma seqüência de poli-histidinas na porção C-terminal.

2.4 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas de fusão à seqüência de poli-histidinas, células de *Escherichia coli* BL21 competentes foram transformadas com as construções plasmidiais obtidas com clonagens dos fragmentos codificantes para os domínios HEAT no pET21a. Em seguida, foram realizadas culturas das células transformadas em meio LB líquido a 37° C suplementado com ampicilina (100 µg/mL), às quais, após atingirem uma densidade óptica de 0,5 (A_{600}), foi adicionado IPTG para uma concentração final de 0,1 mM. Em seguida, as culturas foram mantidas a 30°C por 3 horas, para a expressão das proteínas de fusão.

As células induzidas foram sedimentadas (2740g/4°C/15 min), ressuspensas em 20 mL de PBS e lisadas por ultrasonicação (6 pulsos de 30s). A purificação das proteínas recombinantes foi realizada de acordo com de Melo Neto [10], utilizando a resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). As proteínas purificadas foram analisadas e quantificadas em SDS-PAGE 15%, corado com azul de Coomassie R-250 (Sigma-Aldrich). Para a quantificação, diluições seriadas das proteínas foram comparadas com uma curva de diluição de BSA, de concentrações definidas e

analisadas por densitometria das bandas, utilizando o programa KODAK 1D (Scientific Image Systems).

2.5 Produção de anticorpos

As proteínas recombinantes citadas acima foram utilizadas na imunização de coelhos adultos New Zealand. Em cada inóculo do processo de imunização (num total de 4 inóculos, com intervalo de 15 dias entre eles), foram utilizados aproximadamente 100 µg de proteína purificada, isolados diretamente de um gel preparativo SDS-PAGE 10%. A região do gel contendo a proteína de interesse foi excisada e macerada num sistema de válvulas acoplado a seringas de 5mL. Em seguida, foram acrescentados 200µl de adjuvante de Freund (Gibco BRL Life Technologies) e 600µl de PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,47 mM KH₂PO₄, pH 7,3) . Os componentes homogeneizados foram aplicados por via subcutânea em coelhos (em 3 regiões diferentes do corpo). Após a 3ª inoculação, foi coletada uma alíquota de sangue venoso da orelha dos animais, para a confirmação da produção dos anticorpos. Depois dessa confirmação, foi realizado o 4º inóculo e após 1 semana, os animais foram sacrificados, sob anestesia, para a retirada de sangue através de punção cardíaca e obtenção do soro. Os soros foram armazenados a -80 °C.

2.6 Ensaios de *Western blot*

Para os ensaios de *Western blot* foram utilizadas membrana Immobilon-P PVDF (Millipore) e anticorpos primários específicos obtidos a partir da imunização de coelhos. As diluições variaram para cada anticorpo, sendo o anti-*TbEIF4G3* utilizado na proporção 1:15000; o anti-*TbEIF4G4*, 1:8000 e o anti-*TbEIF4G5*, 1:2000. O 2º anticorpo usado foi o anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories), na diluição de 1:15000. Os anticorpos

foram incubados durante 60 minutos em solução de leite desnatado 5% em PBS/ Tween-20 0,05%, seguido de 3 lavagens de 10 minutos com PBS. A detecção das proteínas foi realizada através de reações de quimioluminescência (ECL), utilizando filme fotográfico Kodak BioMax MR.

2.7 Transfecção estável de células de *T. brucei*

Para transfecção, alíquotas de $1,4 \times 10^7$ células procíclicas de *T. brucei*, da linhagem 29-13, foram ressuspensas em tampão ZPFM (NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na₂HPO₄ 8mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, acetato de magnésio 0,5 mM e acetato de cálcio 0,09 mM), juntamente com 20 µg de DNA plasmidial linearizado. Para a transfecção, foi utilizado eletroporador para células eucarióticas ECM 830 (BTX Molecular Delivery Systems), sob as seguintes condições:

Voltagem	1,5 kV
Duração do pulso elétrico	200 µs
Número de pulsos	3
Intervalo entre os pulsos	10 s
Cuveta	4 mm

Em seguida, os parasitas foram transferidos para 2 mL de meio SDM-79 suplementado com 20% de soro fetal bovino, G418 (15 µg/mL), higromicina (25 µg/mL) e mantidos a 27°C por 16 horas para recuperação. Após recuperação, foi acrescentada fleomicina (2,5 µg/mL), mantendo-se assim por aproximadamente 12 dias, para seleção dos transfectados.

2.8 Interferência de RNA dos homólogos *TbEIF4G3-5*

Para a realização da técnica de RNAi, os genes *TbEIF4G3-5* foram subclonados no vetor p2T7-177. Após a transfecção estável dos parasitas, na sua forma procíclica, com as construções p2T7-177/*TbEIF4G3-5* e seleção pela marca de resistência à fleomicina, o efeito de RNAi foi analisado através de curvas de crescimento na ausência (-TET) e presença (+TET) de tetraciclina (1 µg/mL). A curva foi obtida pela contagem do número de parasitas, a cada 24h, em câmara de Neubauer. A expressão das proteínas durante a indução do RNAi foi avaliada por ensaios de *Western blot*, utilizando extratos protéicos coletados ao longo da curva de crescimento.

2.9 Localização celular dos homólogos *TbEIF4G3-5*

Para a localização celular, os genes *TbEIF4G3-5* foram subclonados no vetor p2216. Após a transfecção estável dos parasitas procíclicos e seleção pela marca de resistência à fleomicina, a expressão das proteínas de fusão à EYFP foi realizada através da adição de tetraciclina (1 µg/mL) ao meio e mantendo-se as culturas a 27° C, por 24h. Para a análise da localização celular, alíquotas de 5×10^6 células induzidas foram lavadas com PBS e submetidas à microscopia confocal a laser (aparelho TCPS SP2 AOBS – Leica Microsystems) para detecção da fluorescência, com pico de excitação em 514 nm e pico de emissão de 527 nm.

3. RESULTADOS

3.1 Análise das seqüências dos cinco homólogos ao eIF4G de *T. brucei*

A proteína eIF4G se caracteriza por ser pouco conservada entre as espécies. Porém, o domínio central HEAT, responsável por sua interação com a subunidade eIF4A e com o RNA, aparece conservado em seqüências de organismos divergentes [3]. Este domínio tem como característica a presença de cinco pares de alfa-hélices antiparalelas na formação de sua estrutura secundária [11]. Devido a isso, apenas a região correspondente ao domínio HEAT das seqüências do fator eIF4G de humano e de levedura foi utilizada na comparação com as seqüências disponíveis em bancos de dados de *L. major* e assim, foi possível identificar cinco homólogos, denominados *LmEIF4G1-5* [7]. Posteriormente, seus cinco ortólogos foram identificados em *T. brucei* e *T. cruzi*, utilizando como parâmetro as seqüências obtidas em *L. major* (Tabela 1).

Da mesma forma, apenas as regiões do domínio HEAT foram utilizadas no alinhamento múltiplo dos cinco homólogos de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* (Figura 1). Nesse alinhamento é possível visualizar as regiões conservadas, responsáveis pela formação das alfa-hélices antiparalelas, características do domínio HEAT. Alguns resíduos de aminoácidos, necessários para a interação com a subunidade eIF4A, também se apresentam conservados na maioria das seqüências identificadas. Outros resíduos, não descritos como importantes para a ligação ao eIF4A, também estão presentes e a conservação entre eles é indicativa de que esses aminoácidos desempenham um papel importante na estrutura dessas proteínas.

3.2 Análise das seqüências dos homólogos *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* e seus ortólogos em *L. major* e *T. cruzi*.

A partir das análises das seqüências referentes aos cinco homólogos do eIF4G em tripanosomatídeos, foi possível confirmar a baixa conservação entre elas, com exceção à região referente ao domínio central HEAT. Contudo, duas dessas seqüências (*TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*) apresentaram características similares, indicativas de que ambas possam desempenhar uma função comum. Essas características incluem uma porção N-terminal curta e uma região C-terminal conservada, composta por aproximadamente 120 aminoácidos. A presença dessa região N-terminal curta levou-se a propor uma função apenas modulatória desses dois homólogos, visto que é nessa região que se encontram os sítios de ligação ao eIF4E e à PABP nas seqüências de humano e de outros eucariotos. Entretanto, o alinhamento das seqüências *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* e dos ortólogos de *L. major* e *T. cruzi* (Figura 2) mostra claramente a presença de um motivo composto por sete resíduos de aminoácidos (FSLXXXX) na porção N-terminal, conservado em ambas as proteínas nas três espécies, que poderia atuar como um sítio de ligação ao eIF4E, já que é bem semelhante ao encontrado no nemátoda *C. elegans* (FGRDFMV). Já na porção C-terminal, destaca-se a presença de uma região conservada, identificada como um provável domínio MA3 e dois resíduos de triptofano (W540 e W597 – numeração do *TbEIF4G3*), que podem representar um possível domínio W2 nestas proteínas, responsável em mamíferos pela interação com a quinase Mnk1.

O alinhamento mostra ainda algumas inserções presentes ao longo das seqüências do quarto homólogo nas três espécies, com destaque para uma região rica em resíduos de glutamina (Q315-Q369), mostrada nas seqüências de *TbEIF4G4* e *TcEIF4G4*, com esta última apresentando ainda vários resíduos de histidina na mesma inserção. O grande número de resíduos de glutamina no *TbEIF4G4* é referente a

uma região com repetições da trinca nucleotídica GAA, identificada a partir do seqüenciamento deste gene realizado numa das etapas desse trabalho (resultado não mostrado). Além disso, foi identificado um possível polimorfismo do gene, pois algumas das seqüências amplificadas apresentaram, após análise por seqüenciamento, uma segunda inserção de 16 aminoácidos (QQQQQPQQQPQQQQQ) nessa mesma região. Apesar dessas características, não foi possível esclarecer se essas inserções teriam alguma função importante nestas proteínas.

3.3 Localização celular das proteínas *TbEIF4G3-5*

Para identificar a localização celular dos homólogos, os genes *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* e *TbEIF4G5* foram subclonados no vetor de transfecção p2216 que permite a expressão das proteínas em fusão à proteína fluorescente EYFP na porção C-terminal. Neste cassete de expressão, os genes foram inseridos sob o controle de um promotor regulado por tetraciclina, com integração na região de rDNA. Parasitas na forma procíclica (cepa 29-13) foram então transfectados com estas construções. A expressão das proteínas de fusão fluorescentes foi induzida pela adição de tetraciclina ao meio de cultura.

As células transfectadas foram analisadas por microscopia confocal, mostrando que as proteínas se apresentavam localizadas no citoplasma das células de *T. brucei*, enquanto que a região referente ao núcleo não emitiu sinais de fluorescência (Figura 3). Com esse resultado, elimina-se a possibilidade dessas proteínas atuarem em alguma função nuclear específica, como por exemplo, no processamento e/ ou transporte de RNAs, ao menos durante a fase procíclica do parasita.

3.4 Expressão de proteínas recombinantes *TbEIF4G3-5* e produção de anticorpos policlonais

Para a produção de anticorpos específicos que pudessem reconhecer as proteínas de interesse em extratos protéicos de *T. brucei*, fazia-se necessária a obtenção de proteínas recombinantes que pudessem ser utilizadas na imunização de coelhos. Para isso, fragmentos referentes ao domínio HEAT dos genes *TbEIF4G3-5* foram clonados no vetor pET21a, para permitir a expressão de proteínas em fusão a uma seqüência de histidinas. Uma vez confirmadas as clonagens, o próximo passo se deu com a expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*, e posterior purificação como citado na metodologia. As proteínas obtidas apresentaram tamanhos aproximados de 30 kDa, 40 kDa e 50 kDa, respectivamente (Figura 4).

As proteínas recombinantes purificadas foram utilizadas para a produção de soros policlonais, os quais seriam utilizados em ensaios de *Western blot*. Os anticorpos foram testados contra extratos protéicos da fase procíclica de *T. brucei* e contra as proteínas recombinantes purificadas, onde se mostraram específicos (Figura 5). Assim como visto anteriormente em *L. major*, os ensaios de *Western blot* com as proteínas *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* mostraram que ambas apresentaram um perfil de duas bandas nos extratos de *T. brucei*, sendo uma delas (a mais alta), a possível presença de uma forma fosforilada destas proteínas.

3.5 RNAi dos homólogos *TbEIF4G3-5*

Para avaliar a viabilidade celular dos parasitas, na ausência de cada um dos homólogos do eIF4G de *T. brucei*, foi aplicada a técnica de interferência de RNA para cada um deles. Para isso, os genes *TbEIF4G3-5* foram clonados no vetor de transfecção p2T7-177, sob o

controle de dois promotores da T7 RNA polimerase dispostos em orientação reversa (ambos regulados por tetraciclina). Os parasitas transfectados foram selecionados pela resistência à fleomicina e, posteriormente, o efeito da interferência de RNA foi analisado através de curvas de crescimento do parasita, na presença e ausência de tetraciclina. Todos os experimentos foram repetidos por no mínimo uma vez. As três proteínas se mostraram essenciais à viabilidade das células, mas as culturas induzidas apresentaram perfis de crescimento diferenciados.

3.5.1 RNAi do *TbEIF4G3*

No caso do RNAi do *TbEIF4G3*, ocorreu um rápido declínio da densidade celular, visualizado logo após o 1º dia de indução da produção dos dsRNAs, quando comparado com a cultura controle (-TET) (Figura 6). Apesar do resultado visto com a curva de crescimento, não houve redução aparente nos níveis protéicos do *TbEIF4G3*, ou a diminuição ocorreu de forma muito sutil, de modo que não pôde ser avaliada pelo Western-blot. Esse resultado inesperado, de fenótipo rápido e letal, é sugestivo que a proteína *TbEIF4G3* deva possuir um papel fundamental no metabolismo do parasita.

3.5.2 RNAi do *TbEIF4G4*

De forma diferente do *TbEIF4G3*, as células expressando *TbEIF4G4*-dsRNAs apresentaram redução de crescimento a partir do 2º dia de indução. Esse perfil se mostrou compatível com o resultado do Western-blot, onde foi vista a diminuição da expressão da proteína para níveis não-detectáveis a partir deste mesmo dia. Esse retardo de crescimento prolongou-se até o 5º dia da curva, com a morte das células ocorrendo em seguida (Figura 7). Para verificar se a indução do RNAi do *TbEIF4G4* alteraria de alguma forma a expressão do homólogo

TbEIF4G3, foi realizado um ensaio de Western-blot com o anticorpo anti-*TbEIF4G3* nos mesmos extratos recolhidos ao longo da curva de crescimento. Assim, foi possível verificar que os níveis do *TbEIF4G3* mantiveram-se constantes, mostrando que a depleção do *TbEIF4G4* em nada alterou a expressão do outro homólogo.

O RNAi do *TbEIF4G4* resultou também em mudança na morfologia do parasita (Figura 8). As células expressando *TbEIF4G4*-dsRNAs mostraram-se arredondadas a partir do 3º dia de indução pela tetraciclina, mantendo-se assim até o final da curva. Apesar de não ter sido aplicado nenhum método quantitativo específico durante esta observação, estimou-se que a mudança da morfologia tenha ocorrido em mais de 60% dos parasitas, pois algumas células com a morfologia conservada ainda estavam presentes em cultura.

3.5.3 RNAi do *TbEIF4G5*

O RNAi do *TbEIF4G5* apresentou uma curva de crescimento mais prolongada, onde o efeito da interferência de RNA só foi visto mais tardiamente. As culturas controle e induzida apresentaram densidades celulares equivalentes até o 4º dia, e a partir daí a cultura induzida mostrou retardo de crescimento, com morte das células em seguida. As análises por Western-blot confirmaram a depleção da proteína já no 1º dia de indução do RNAi (Figura 9). Analisando os resultados obtidos com os três homólogos, foi possível identificar que o *knock-down* resultou num efeito mais rápido pra o *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, sendo isto um indicativo que a função dessas proteínas é essencial para a viabilidade das células de *T. brucei*. Possivelmente, o efeito mais retardado visto com o *TbEIF4G5* pode ser resultado de uma função secundária ou apenas modulatória desta proteína no metabolismo celular do parasita.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi iniciada a caracterização *in vivo* de homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4G identificados no parasita *T. brucei*. Assim como foi visto em *L. major*, as cinco seqüências dos homólogos ao eIF4G de *T. brucei* se apresentaram sem grandes correlações entre si [7], com exceção do *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*, que mostraram semelhanças ao longo de sua estrutura, especificamente um possível sítio de ligação ao eIF4E na região N-terminal e uma porção C-terminal conservada, com a presença de possíveis domínios MA3 e W2. O grande número de homólogos às subunidades constituintes do complexo eIF4F identificados em tripanosomatídeos, dentre estes cinco ao eIF4G, pode refletir uma maior complexidade durante os eventos de regulação metabólica nesses organismos, principalmente por estes apresentarem diferentes formas celulares durante seu ciclo de vida [7]. Mesmo em humanos, onde são descritos apenas dois homólogos funcionais do eIF4G (eIF4GI e eIF4GII), já foi demonstrado que, apesar de possuírem funções complementares e realizarem interações proteína-proteína e proteína-RNA similares, eles podem exibir propriedades específicas, já que apresentam um recrutamento diferenciado à estrutura cap, dependente da diferenciação celular [12]. Além disso, estudos sugerem a existência de até cinco isoformas do eIF4GI, geradas por sítios alternativos de iniciação da tradução, entretanto, pouco se sabe da função dessas diferentes isoformas nas células [13].

A localização citoplasmática das proteínas *TbEIF4G3-5* identificada neste trabalho é compatível com seu possível papel de interação com mRNAs durante a iniciação da tradução. Resultados obtidos para o fator eIF4G de humano [14] também mostram o eIF4G apresentando localização citoplasmática, com distribuição periférica e também na região perinuclear (rica em retículo endoplasmático). 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 pode vir associados a ribossomos, a mRNAs específicos e a componentes do citoesqueleto da célula [15-17]. E, de forma mais surpreendente, alguns desses fatores também podem ser encontrados no núcleo; como por exemplo, o eIF4E [18] e, em alguns casos o eIF4G, onde a localização nuclear deste último é encarada devido a um possível papel no processamento de mRNAs [19,20] e/ou numa etapa inicial de tradução de mRNAs recém-sintetizados, que ocorreria ainda no núcleo [21]. A localização subcelular de dois homólogos ao eIF4A identificados em *T. brucei* foi fundamental para a distinção entre os papéis das duas proteínas no parasita [22]. Através dela, foi possível identificar que apenas o *TbEIF4AI* atuaria como fator de iniciação da tradução, apresentando-se exclusivamente no citoplasma da célula; enquanto que a localização nuclear do *TbEIF4AIII*, juntamente com os demais resultados obtidos para esta proteína, inferiu uma função no metabolismo de RNA, mas que não fosse diretamente ligada à tradução. Desta forma, a localização citoplasmática das proteínas *TbEIF4G3-5* elimina a possibilidade de atuarem em alguma função nuclear específica, como por exemplo, no processamento e/ ou transporte de RNAs, ao menos durante a fase procíclica do parasita.

O *knock-down* realizado para os três homólogos *TbEIF4G3-5* resultou em perfis de sobrevivência diferentes após a indução da interferência de RNA, mas nos três casos foi possível verificar que as três proteínas são essenciais à viabilidade de *T. brucei*. Dentre os resultados obtidos, destacaram-se os fenótipos de morte rápida das culturas que sofreram o *knock-down* do *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4*. Este

último, além de resultar em morte rápida da cultura, levou à mudança na morfologia celular, resultando em parasitas com formas arredondadas. Dados coletados com a realização do *knock-down* de 197 ORFs do cromossomo I de *T. brucei* mostraram que 33% deles resultaram em fenótipo significativo. Houve também uma alta frequência de defeitos no crescimento e no ciclo celular (23%). Em contraste, poucos genes resultaram em alterações na morfologia celular e/ ou organelar, mas estes geralmente estavam associados com defeitos no crescimento e no ciclo celular [23]. A mudança de morfologia em *T. brucei* devido a efeitos causados pelo RNAi foi inicialmente observado num trabalho que utilizava o plasmídeo PGFPFAT, que direcionava a interferência à 5'UTR do RNA da α -tubulina [24]. Nesse trabalho, que utilizou a expressão transiente do plasmídeo pGFPFAT em culturas procíclicas de *T. brucei rhodesiense*, foram observadas células com morfologia alterada e com acúmulo de núcleos e cinetoplastos. As células se apresentaram arredondadas e com a superfície ondulada, e este fenótipo foi designado de células FAT. Essas observações sugeriram que a expressão do plasmídeo em questão estava interferindo na citocinese e na organização do citoesqueleto da célula e por ser transiente, a porcentagem de células com fenótipo FAT aumentava linearmente com o aumento do RNA transfetado. O RNAi do único eIF4G do nemátoda *Caenorhabditis elegans* resultou em alteração de morfologia e alta letalidade dos embriões e também foi responsável pela esterilidade dos vermes submetidos à depleção da proteína, mostrando-se extremamente necessária ao desenvolvimento da espécie [25]. Num modelo de estudo dos membros da família eIF4G em humanos [26], foi estudada a proteína p97, também conhecida como eIF4G2. Ela apresenta alta homologia ao eIF4GI, com exceção da ausência do domínio N-terminal de ligação ao eIF4E e seu papel na tradução foi avaliado através da interferência de RNA, dentre outros ensaios. Foi visto que o RNAi da p97 levou à uma diminuição dos seus níveis protéicos e a densidade celular foi diminuída substancialmente,

quando testado em vários tipos celulares humanos. A diminuição nos níveis protéicos da p97 também teve uma correlação direta com uma diminuição na taxa de síntese protéica global nas células. Da mesma forma, a interferência de RNA realizada para o homólogo ao fator eIF4A de *T. brucei* (*TbEIF4AI*) resultou em diminuição da densidade celular e morte, apresentando um fenótipo de resposta rápida, juntamente com uma diminuição global da síntese [22].

Por fim, o estudo de comparação dos genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* indicaram que, excluindo os sistemas patógeno-específicos, como variação antigênica e mecanismos de invasão celular, há um importante nível de conservação das funções e na arquitetura dos genes dessas espécies, onde 76% dos genes de *T. brucei* dividem similaridades com os de *T. cruzi* e *L. major* [27]. Deste modo, o estudo de função gênica em *T. brucei* contribui significativamente para a análise funcional nas outras espécies de tripanosomatídeos. Este trabalho foi importante por viabilizar o estudo *in vivo* de alguns dos homólogos ao eIF4G de *T. brucei*, reunindo resultados sobre viabilidade celular e localização citoplasmática e indicando o *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* como candidatos a desempenhar o papel real de fatores de iniciação da tradução. Entretanto, a utilização de outras técnicas de análise *in vivo*, incluindo a imunoprecipitação e a análise da superexpressão, juntamente com a realização de ensaios de interação proteína-proteína (*pull down*) e mapeamento de domínios de ligação presentes nesses homólogos se faz necessária para uma melhor caracterização das funções específicas dessas proteínas nos tripanosomatídeos.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 2003;5:1231-40.
- [2] 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: 33-88.
- [3] 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.
- [4] Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 2003;95:141-56.
- [5] Imataka H, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 1997;17:6940-7.
- [6] Morino S, Imataka H, Svitkin YV, 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* 2000;20:468-77.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] de Melo Neto OP, Standart N, Martins de SC. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 1995;23:2198-205.

- [11] Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, et al. A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol Cell* 2001;7:193-203.
- [12] Caron S, Charon M, Cramer E, 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* 2004;24:4920-8.
- [13] Coldwell MJ, Hashemzadeh-Bonehi L, Hinton TM, et al. Expression of fragments of translation initiation factor eIF4GI reveals a nuclear localisation signal within the N-terminal apoptotic cleavage fragment N-FAG. *J Cell Sci* 2004;117:2545-55.
- [14] Willett M, Flint SA, Morley SJ, et al. Compartmentalisation and localisation of the translation initiation factor (eIF) 4F complex in normally growing fibroblasts. *Exp Cell Res* 2006;312:2942-53.
- [15] Bassell GJ, Oleynikov Y, Singer RH. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J* 1999;13:447-54.
- [16] Hesketh JE. Sorting of messenger RNAs in the cytoplasm: mRNA localization and the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1996;225:219-36.
- [17] Jansen RP. RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* 1999;13:455-66.
- [18] 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.
- [19] Kedersha N, Chen S, Gilks N, et al. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell* 2002;13:195-210.
- [20] Kimball SR, Horetsky RL, Ron D, et al. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C273-C284.
- [21] McKendrick L, Thompson E, Ferreira J, et al. Interaction of eukaryotic translation initiation factor 4G with the nuclear cap-binding complex provides a link between nuclear and cytoplasmic functions of the m(7) guanosine cap. *Mol Cell Biol* 2001;21:3632-41.

- [22] 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.
- [23] Subramaniam C, Veazey P, Redmond S, et al. Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the african trypanosome. *Eukaryot Cell* 2006;5:1539-49.
- [24] Ngo H, Tschudi C, Gull K, et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14687-92.
- [25] Lall S, Piano F, Davis RE. Caenorhabditis elegans decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis. *Mol Biol Cell* 2005;16:5880-90.
- [26] Lee SH, 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* 2006;25:4008-19.
- [27] El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005;309:404-9.

Tabela 1. Sumário das seqüências dos vários homólogos da subunidade eIF4G em *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, descrevendo as similaridades com as seqüências de humano.

Seqüência	Número de identificação no GeneDB	Tamanho (Nº de aminoácidos)	Massa molecular predita (kDa)	Localização cromossômica	Identidade (similaridade) ao homólogo humano [‡]
<i>TbEIF4G1</i>	Tb927.5.1490	1118	122.1	5	24% (47)
<i>TbEIF4G2</i>	Tb09.160.3980	878	97.3	9	23% (50)
<i>TbEIF4G3</i>	Tb927.8.4820	622	69.3	8	29% (48)
<i>TbEIF4G4</i>	Tb11.01.2330	697	79.7	11	31% (50)
<i>TbEIF4G5</i>	Tb927.8.4500	749	84.5	8	24% (42)
<i>LmEIF4G1</i>	LmjF15.0060	1016	114	15	25% (43)
<i>LmEIF4G2</i>	LmjF15.1320	1425	145.9	15	21% (37)
<i>LmEIF4G3</i>	LmjF16.1600	635	71.2	16	26% (39)
<i>LmEIF4G4</i>	LmjF36.6060	765	84.6	36	22% (38)
<i>LmEIF4G5</i>	LmjF10.1080	782	88.8	10	21% (37)
<i>TcEIF4G1</i>	Tc00.104705350 6739.10	1086	120.4	ND	27% (48)
<i>TcEIF4G2</i>	Tc00.104705350 8277.340	1013	113	ND	25% (52)
<i>TcEIF4G3</i>	Tc00.104705351 1383.40	614	69.3	ND	30% (49)
<i>TcEIF4G4</i>	Tc00.104705350 4827.130	675	77.5	ND	27% (49)
<i>TcEIF4G5</i>	Tc00.104705350 8989.90	738	84.5	ND	22% (42)

* Estas seqüências mostram similaridade à seqüência humana apenas ao nível do domínio central HEAT. ND = não determinado.

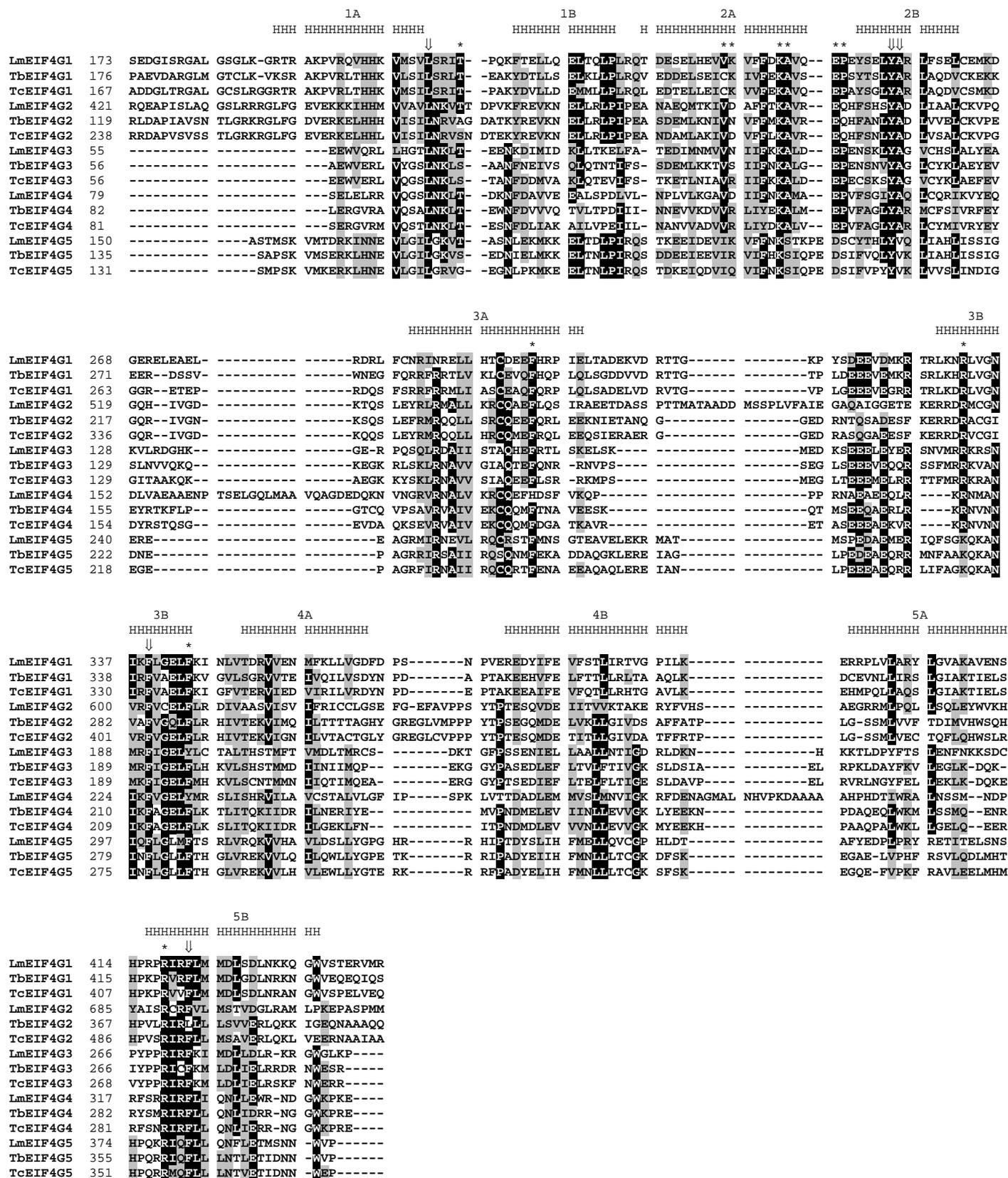


Figura 1. Alinhamento múltiplo comparando a região do domínio HEAT dos homólogos ao fator eIF4G identificados em *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. O alinhamento mostra regiões de conservação entre as seqüências dos 3 organismos, com destaque para as regiões indicativas das repetições HEAT (1-5, A e B). Os principais resíduos de aminoácidos conservados envolvidos na ligação ao eIF4A estão indicados por setas duplas, enquanto que os asteriscos evidenciam os resíduos conservados, mas que não estão envolvidos na ligação ao eIF4A.



Figura 2. Alinhamento múltiplo comparando as seqüências dos homólogos *TbeIF4G3* e *TbeIF4G4* com seus ortólogos de *T. cruzi* e *L. major*. Presença do motivo FSLXXX 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 HEAT, comum aos 5 homólogos identificados. O outro possível domínio MA3, presente apenas no *TbeIF4G3* e *TbeIF4G4* e seus ortólogos em *T. cruzi* e *L. major* está destacado na caixa em preto, caracterizando outra região conservada, presente apenas nas seqüências desses homólogos. Por fim, destaque também para os resíduos de triptofano encontrados na região C-terminal, como possíveis constituintes de um domínio W2 (setas duplas).

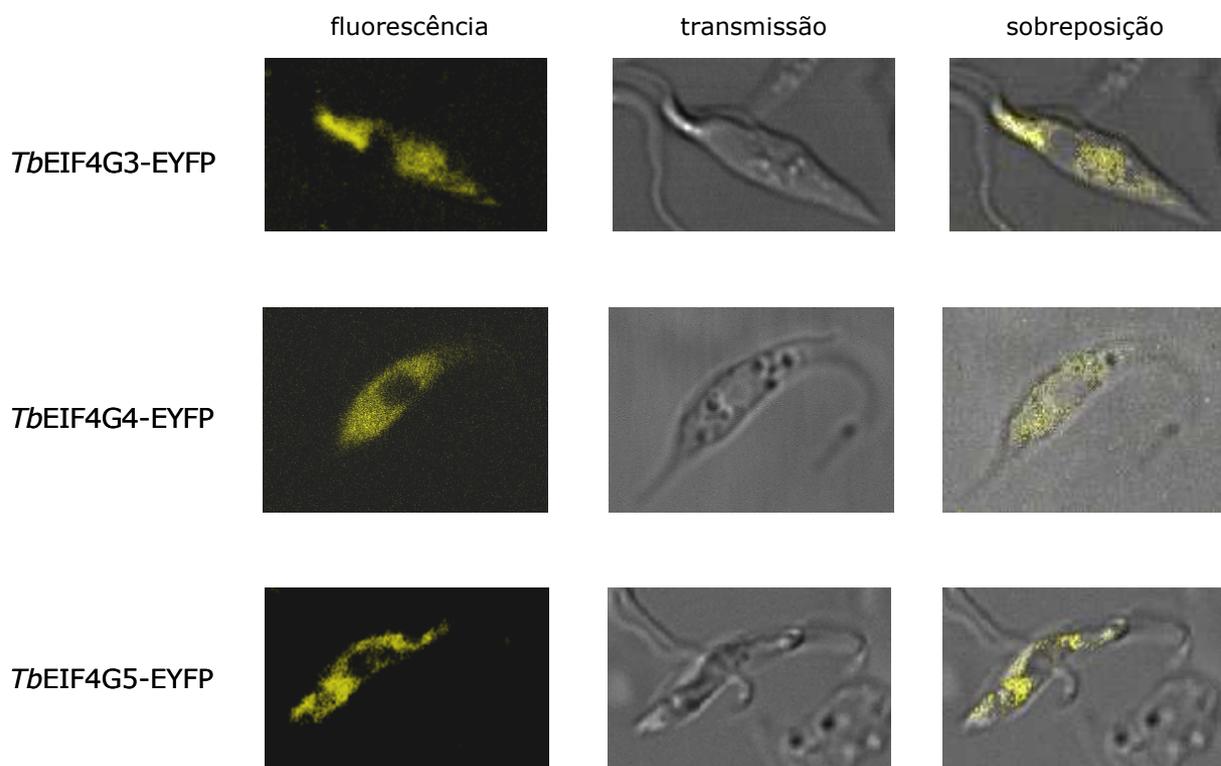


Figura 3: Localização celular dos homólogos *TbEIF4G3-5* por fluorescência direta. Células transfectadas de *T. brucei* superexpressando *TbEIF4G3-EYFP*, *TbEIF4G4-EYFP* e *TbEIF4G5-EYFP*, indicando a localização citoplasmática das três proteínas. A porção de cada célula sem detecção de fluorescência corresponde ao núcleo, o que pode ser melhor evidenciado na sobreposição das imagens.

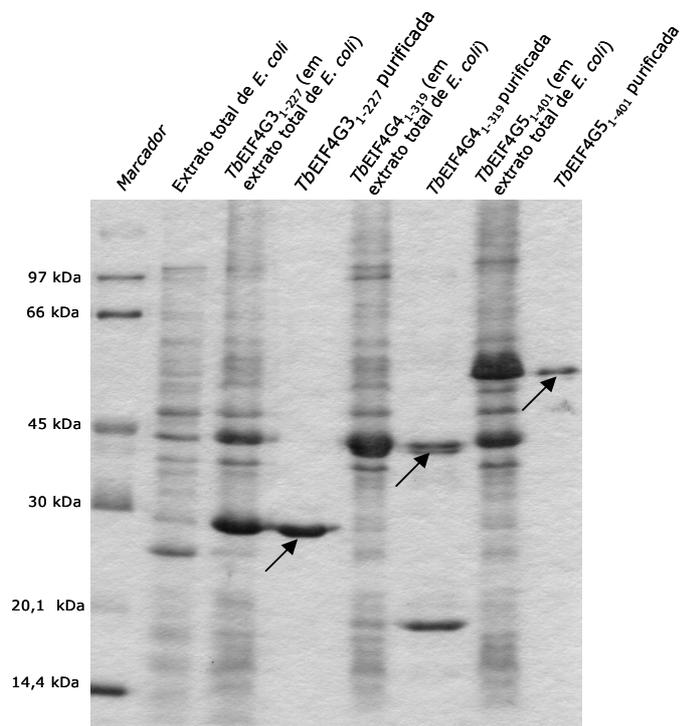


Figura 4: Proteínas *TbEIF4G3-5* recombinantes. Gel SDS-PAGE 15%, mostrando alíquotas das proteínas recombinantes *TbEIF4G3-5*, em extrato total de *E. coli* e após purificação. O marcador utilizado foi o LMW-SDS marker (GE Healthcare).

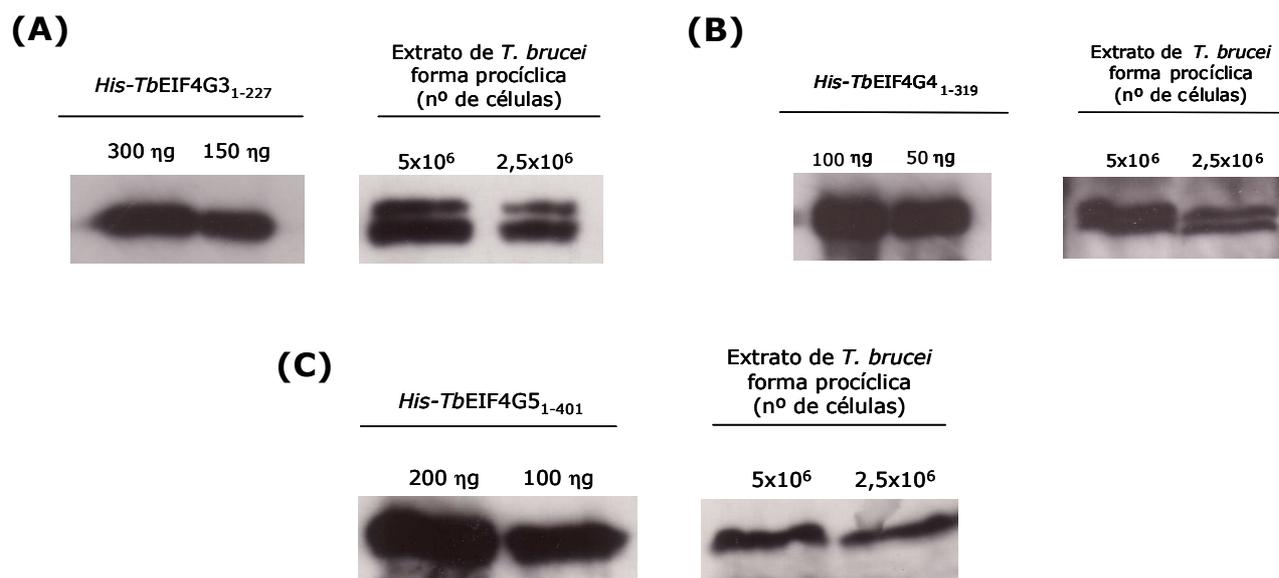


Figura 5: Reconhecimento dos anticorpos anti-*TbEIF4G3-5*. Ensaios de *Western blot* foram realizados utilizando diluições tanto das proteínas recombinantes quanto de extratos protéicos de *T. brucei* na sua fase procíclica. As concentrações de proteínas utilizadas variaram de acordo com a capacidade de reconhecimento dos anticorpos. Já a diluição dos extratos permaneceu a mesma para as três proteínas estudadas. (A) anti-*TbEIF4G3*, (B) anti-*TbEIF4G4* e (C) anti-*TbEIF4G5*.

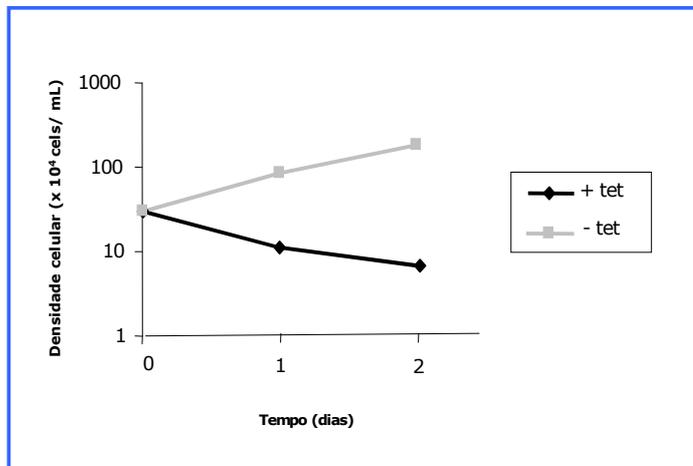
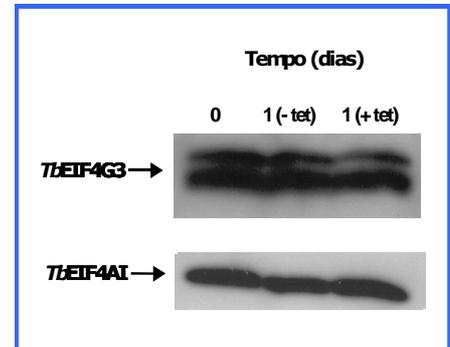
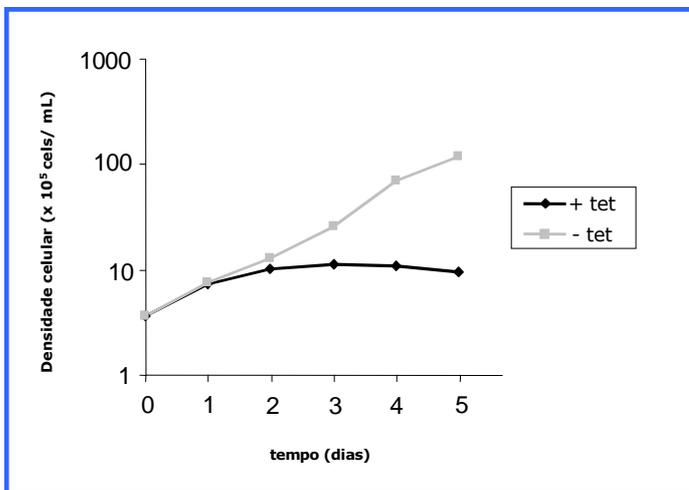
(A)**(B)**

Figura 6. RNAi do *TbEIF4G3*. **(A)** Curva de crescimento de *T. brucei* mostrando a rápida diminuição da densidade celular na cultura induzida quando comparada ao controle. **(B)** A análise através de Western-blot mostrou que aparentemente não houve redução dos níveis protéicos do *TbEIF4G3*, mesmo após indução de RNAi. A proteína *TbEIF4AI* foi utilizada como controle da concentração dos extratos protéicos de *T. brucei* utilizados, visto que sua expressão já foi descrita como constante durante a curva de crescimento do parasita [22].

(A)



(B)

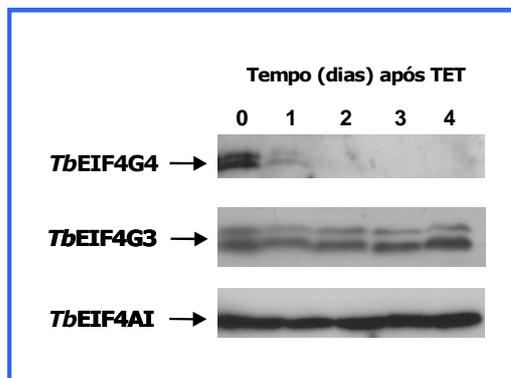


Figura 7. RNAi do *TbEIF4G4*. **(A)** Curva de crescimento de *T. brucei*, onde se pode visualizar a parada no crescimento celular na cultura induzida a partir do 3º dia de adição de tetraciclina e morte celular a partir do 5º dia. **(B)** A análise através de Western-blot confirmou a depleção da proteína *TbEIF4G4* depois do 2º dia da curva. A mesma membrana foi tratada também com anti-*TbEIF4G3*, onde se pôde verificar que sua expressão não foi alterada pelo RNAi do *TbEIF4G4*. A proteína *TbEIF4AI* foi utilizada como controle da densidade celular.

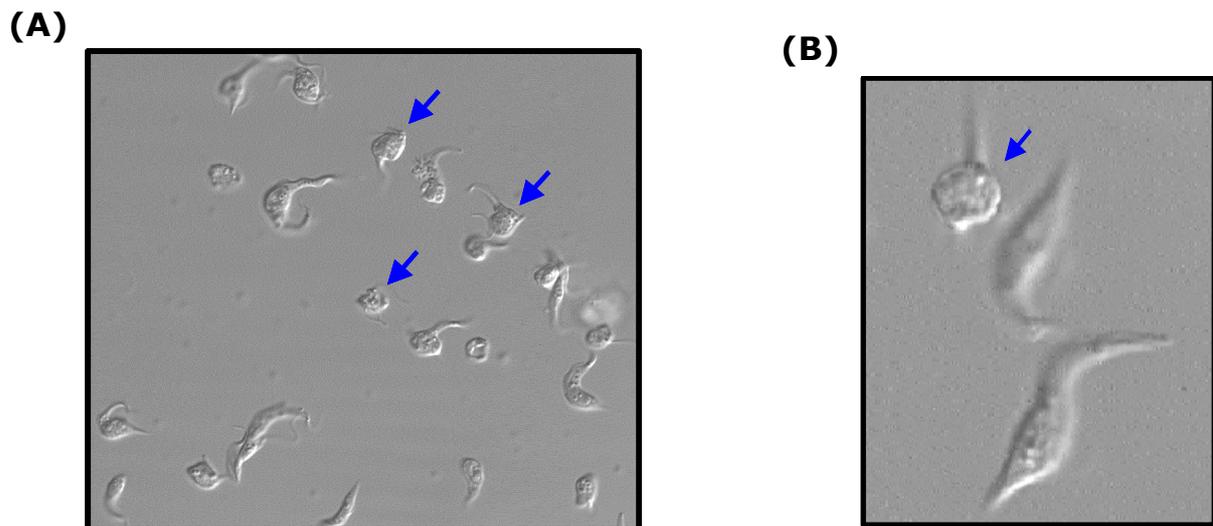
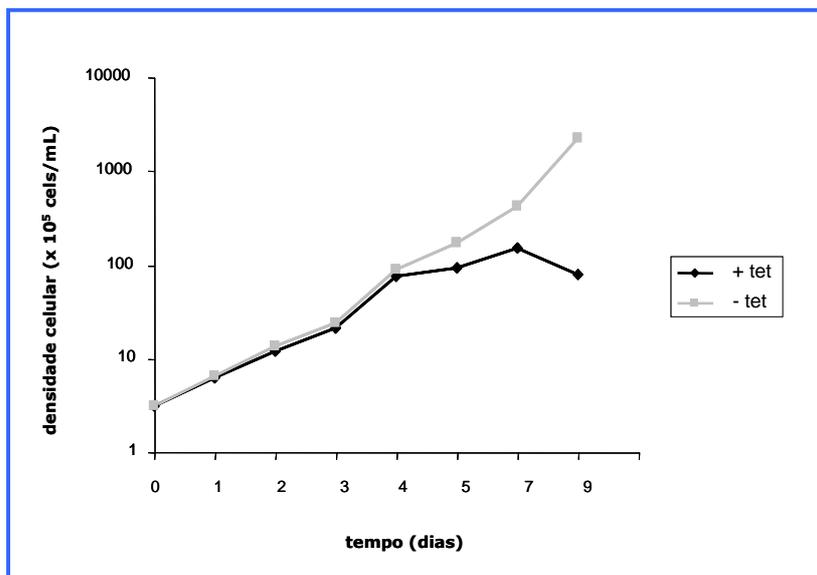


Figura 8. Efeito do RNAi do *TbEIF4G4* na morfologia de *T. brucei*. As células expressando *TbEIF4G4*-dsRNAs apresentaram mudança na morfologia a partir do 3º dia de indução por tetraciclina. **(A)** Células de *T. brucei* apresentando formas arredondadas (setas). **(B)** Outra imagem da mesma cultura, onde uma célula de morfologia alterada (seta) pode ser comparada a uma célula normal.

(A)



(B)

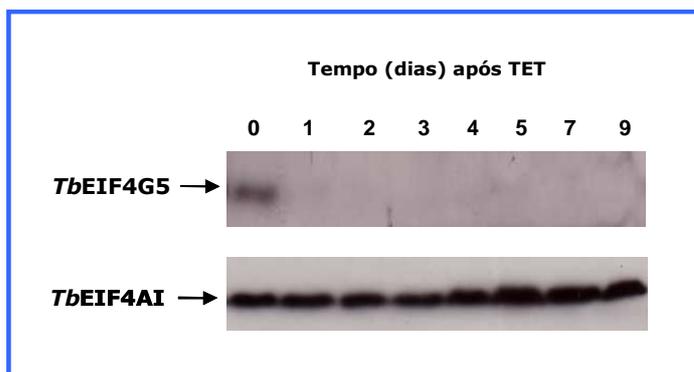


Figura 9. RNAi do *TbEIF4G5*. (A) Curva de crescimento de *T. brucei*, onde se pode visualizar a diminuição da densidade celular da cultura induzida a partir do 4^o dia de indução e declínio da curva a partir do 7^o dia. (B) A análise através de *Western blot* mostra a depleção da proteína *TbEIF4G5* já no 1^o dia após indução da interferência de RNA. A proteína *TbEIF4AI* foi utilizada como controle.

6. CONCLUSÕES

- As proteínas *TbEIF4G3*, *TbEIF4G4* e *TbEIF4G5* apresentam localização citoplasmática e por isso não devem desempenhar nenhuma função nuclear nos parasitas;
- Os homólogos *TbEIF4G3-5* se mostraram essenciais à viabilidade de *T. brucei*, mas as culturas induzidas apresentaram perfis de sobrevivência diferenciados após a indução da interferência de RNA;
- A morte celular rápida apresentada após indução do RNAi do *TbEIF4G3* e *TbEIF4G4* é indicativa que essas proteínas desempenham um papel importante no metabolismo de *T. brucei*;
- A expressão do *TbEIF4G4* é importante para a integridade da morfologia de *T. brucei*.

7. ABSTRACT

In higher eukaryotes, protein synthesis starts with the binding of the translation initiation complex eIF4F to the mRNA. This complex (formed by the eIF4A, eIF4E and eIF4G subunits) allows the recognition of the mRNA by the 40S ribosomal subunit and the initiation of translation. The eIF4G subunit is a large scaffolding protein that is responsible for the correct assembly of the eIF4F complex. So far little is known about translation initiation in trypanosomatids. To investigate this process, we have identified multiple homologues for each eIF4F subunit within the *Leishmania major* genome. Five homologues for the eIF4G factor were identified and their sequences showed different degrees of similarity to vertebrate factors. Nevertheless they were all conserved in *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. So far, these homologues, named *LmEIF4G1-5*, have been studied by several approaches, including expression analyses during the *L. major* life cycle and *pull down* assays. In order to supplement *in vitro* data, we used the *T. brucei* orthologues *TbEIF4G3-5* to perform *in vivo* analysis. The genes were amplified and cloned into different plasmids vectors, allowing protein expression in *Escherichia coli*, antibody production, RNA interference and subcellular localization through the detection of fluorescent fusion proteins. The RNA interference of the three homologues showed that they are essential for cellular viability but each one presented different growth curves after RNAi induction. Cells expressing *TbEIF4G4*-dsRNAs also exhibited reduction of mobility and change in morphology before parasite death. The *TbEIF4G3-5* antibodies were used in western blots assays to verify protein depletion after RNAi. The cellular localization of the three proteins confirmed their presence in cytoplasm of *T. brucei*.

Keywords: trypanosomatids, eIF4G and translation initiation.

8. ANEXOS

8.1 Instruções para Autores

REVISTA: Molecular and Biochemical Parasitology

Guide for Authors

Submission of a paper to *Molecular and Biochemical Parasitology*, including a revised version, implies the transfer of copyright from the author(s) to the publisher and therefore that the corresponding author has obtained the approval of all other authors to the text and that it does not contain information previously published (except as a meeting abstract or by submission of sequence data to an electronic database) and is not under consideration for publication elsewhere. Publication in *Molecular and Biochemical Parasitology* is taken to imply the authors' willingness to comply with reasonable requests to supply reagents such as recombinant clones and monoclonal antibodies, and sequence data in electronic form to persons lacking access to computer databases.

Manuscripts returned for revision should be returned to the editor within 3 months. Papers accepted for publication should be as concise as possible and should be no longer than 14 printed pages. In exceptional cases the editors will consider longer papers (never exceeding 20 printed pages) if the authors of such complex papers show to the satisfaction of the editors that the limitation in length would result in subdivision of the material into several papers and hence in an increase in the total number of pages necessary for the presentation of the work.

Online Submission Submission to this journal is now totally online. Please use the following guidelines to prepare your article. Via the online submission page

of this journal (⇒ <http://ees.elsevier.com/molbio/>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and request for revision, takes place by email and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

The above represents a brief outline of this form of submission. It can be advantageous to print this "guide for authors" from the site (⇒ <http://authors.elsevier.com/>) for reference in the subsequent stages of article preparation.

Authors' rights

As an author you (or your employer) may do the following:

- make copies (print or electronic of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through email) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an email list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such versions on such servers or sites
- post a revised version of the final text of the article (to reflect changes made

in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage on www.elsevier.com

- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to delegates attending such a meeting

- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)

- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article

- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)

- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)

- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

Protein and Nucleic Acid Sequences. Novel nucleotide or protein sequence data must be deposited in the GenBank™, EMBL or DDBJ databases and an accession number obtained before the paper can be accepted for publication. Submission to any one of the collaborating databanks is sufficient to ensure entry in all. The accession number should be included as a footnote on the title page of the manuscript:

'Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the

GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession number(s)----'. If requested the database will withhold release of data until publication. The usual method for submitting sequence data is by World Wide Web to either GenBank™ (via BankIt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>), EMBL (via WebIn: <http://www.ebi.ac.uk/subs/allsubs.html>) or to DDBJ (via SAKURA: <http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>). Special types of submissions such, as genomes, bulk submissions, segmented sets, and population/phylogenetic/mutation studies, can be more easily prepared with the Sequin programme (available from the above Web sites). Files generated by the Sequin programme may be sent via e-mail to GenBank™ (submissions: e-mail: gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov; enquiries: e-mail: info@ncbi.nlm.nih.gov, EMBL (submissions: e-mail: datasubs@ebi.ac.uk; enquiries: e-mail: datalib@ebi.ac.uk) or DDBJ (submissions: e-mail: ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp; enquiries: e-mail: sakura-admin@ddbj.nig.jp). Submitters without Web or e-mail access should write to one of the following addresses to obtain a hard copy submission form (GenBank Submissions, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Building 38A, Room 8N-805, Bethesda, MD 20894, USA. EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute, Hinxton Hall, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, UK. DNA Data Bank of Japan, Center for Information Biology, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan). Authors are encouraged by the databases to update their entries as the need arises.

DNA sequences and GenBank Accession numbers

Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the

following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "Note:GenBank accession nos. **AI631510** , **AI631511** , **AI632198** , and **BF223228**) , a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**) , and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article , the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "Note:GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy , the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no.

AA361117)".

Manuscripts Manuscripts should be in English on numbered pages with double-spaced typing throughout (including tables, legends and reference lists) on one side of the paper only with margins of a least 3cm all round. They should be divided into: (1) title page - include a succinct title (which should not normally exceed 100 characters and should not contain any subtitles or abbreviations), the names of all authors, including a given name for each, the institutions with city, state and country where the work was performed, the name and complete address (including telephone, telefax and e-mail) of the corresponding author, a list of abbreviations and a list of addresses of authors who have moved from the institutions where the work was performed. (2) abstract - maximum 250 words, (3) keywords (3-6 indexing terms), (4) introduction, (5) materials and methods, (6) results, (7) discussion, (8) acknowledgements (grant support and technical support to be listed here), (9) references, (10) tables and (11) figure legends. A recent issue of the journal should be consulted for details. In the interests of clarity and brevity, it may sometimes be advantageous to combine the results and discussion into a single section. Everyone makes minor modifications to standard methods. Do not describe standard materials and methods or modifications unless they have significant and demonstrable utility. Do not duplicate descriptions of methodology in the figure legends. Generic and species names should be typed out in full the first time mentioned - in the title, the summary and the text - and thereafter the generic name should be abbreviated. Words or letters to be printed in italics should either be in italics or underlined. The metric system should be used throughout.

Short communications These are intended for the publication of brief definitive reports, primarily to complete DNA sequence data, methods, biochemical or immunochemical data, that do not merit a full-length publication. Short communications are no more than four pages long including everything, with maximally two figures, one table and a maximum of 20 references . A single

page contains about 900 words. Only the salient points of a long DNA sequence should be published, as the whole sequence will be available for a computer database. The title, authorship and affiliations will be in the standard format of the journal. The text should not be sectioned, except for references. Essential experimental details may be incorporated into a figure legend. To facilitate rapid publication, authors will be expected to supply high-quality copy and expedite any necessary revisions, although decisions will normally be yes or no, based on the quality and appropriateness of the initial submission.

Minireviews. Minireviews are by invitation only. Potential topics of general current interest should be submitted to the senior editor for consideration. Reviews should be short, current, specific and potentially provocative. They should provide a balanced synthesis from the available data rather than a comprehensive regurgitation of the literature. If possible, they should provide new concepts and ideas extending across different parasite systems. Reviews are restricted to about 4000 words, at most three display items including figures and tables and a list of references of not more than 50. The text can be divided into simple subsections with a succinct abstract. Minireviews will undergo the established review process at MBP, and will be published by an accelerated schedule if accepted.

References In the text, references should be numbered singly in square brackets in order of their citation, e.g. [2,3,5-7]. In the list, references should be numbered in the order of citation in the text, not in alphabetical order. Unpublished data, personal communications and papers in preparation or 'submitted' should not be listed in the references (but may be incorporated at the appropriate place in the text); work 'in press' may be listed only if it has been accepted for publication. Personal communications must be accompanied by a letter from the named person(s) giving permission to quote such information. Abstracts (whether published or not), theses and similar material are not to be quoted in the list. If necessary, they can be referred to in the text

in parentheses. Periodicals [1], books [2] and edited books [3] should accord with the following examples:

[1] Furuya T, Zhong L, Meyer-Fernandes JR, Lu H, Moreno SNJ, Docampo R. Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. *Mol Biochem Parasitol* 1988;92:339-48.

[2] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.

[3] Borst P, Bitter W, Blundell PA, et al. The expression sites for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei*. In: Hide G, Mottram JC, Coombs GH, Holmes PH, editors. *Trypanosomiasis and Leishmaniasis: Biology and Control*. Oxford: CAB International, 1997;7:109-31.

Abbreviations of journal titles should conform to those adopted by the List of Serial Title Word abbreviations, ISDS International Centre, 20, rue Bachaumont, 75002 Paris, France (ISBN 2-904938-02-8).

Tables Each table should be typed double-spaced on a separate sheet and have a short descriptive title. A legend may be placed under table. Footnotes should be identified in the table by a, b, c, etc.

Figures Figures must be in a form and condition suitable for high quality reproduction. Lettering should be clear and of adequate size to be legible after reduction. Consider the printed page and column proportions when preparing figures. If figures are not to be reduced their format should not exceed 16 x 20 cm. Multiple panels of a single figure must be mounted together. Each DNA sequence figure must fit on a single sheet of paper. Place numbering at one end of each line, not on separate lines, and avoid excessive line spacing.

Consider placing nucleotide and protein data in separate panels, using single-letter amino acid abbreviations for the protein sequence and grouping nucleotides either continuously or in blocks of ten separated by one space (90 to 120 nt per line). Over 10 000 bp can legibly fit on each journal page in this format (see, e.g., *Mol. Biochem. Parasitol.* 95:141-146). Preferably use a sans-serif font. Upper case is standard, except that introns or other features can be usefully distinguished by lower case. Provide sharp laser-printer or imagesetter copy. Nucleotide sequences of long coding regions, where the amino acid sequence is the primary feature, and long DNA sequences, may, at the editor's discretion, be omitted from the printed paper. They can be obtained from electronic databases or from the authors. Half-tone illustrations may be included. They should be submitted as black-and-white prints on glossy paper and have as much contrast as possible. A scale should appear on photomicrographs. Colour plates will be published free of charge if colour contributes to the understanding of the information. In all other cases, the author should be prepared to pay the extra costs of 635 EUR for the first page and 318 EUR for following pages of colour. Figures legends should be typed double spaced at the end of the text, not on the figures. Figures should be checked extremely carefully, particularly after revisions. No changes to figures will be possible after acceptance of the manuscript.

Detailed instructions Abbreviations, symbols, chemical and biochemical nomenclature, etc., should follow the recommendations given in the *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 272, pp. 28165-28170; <http://www.jbc.org>). Avoid abbreviations which are not in common use across the field of molecular and biochemical parasitology. Those used should be defined in the text on first usage and listed as a footnote on the title page. Do not introduce abbreviations unless they are used at least 4 times.

Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania* should follow the guidelines proposed by Clayton et al (1998), *Mol Biochem Parasitol*

1998;97:221-224 (✉)

<http://www.elsevier.nl/cas/tree/store/molbio/free/1998/97/1-2/3178.pdf>).

Author enquiries For enquiries relating to the submission of articles please visit Elsevier's Author Gateway at ✉ <http://authors.elsevier.com> The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up email alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Proofreading One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding Author. (If we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from ✉ <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or send by post. Proofs should be read carefully and returned within 2 days of receipt. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to

ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Language Polishing For authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information, please refer to our terms and conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting/ "Public Access Policy"

Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://publicaccess.nih.gov/>) by submitting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, immediately after formal publication. Please e-mail us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH grant/project number(s), as well as the name and e-mail address of the Principal Investigator(s)) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for public access posting 12 months after the final publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited (although Elsevier will not request that manuscripts authored and

posted by US government employees should be taken down from PubMed Central). Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Editors

C.E. Clayton Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg, Im Neuerheimer Feld 282, D-69120 Heidelberg, Germany Tel: +49 6221 546876 Fax: +49 6221 545894 E-mail: cclayton@zmbh.uni-heidelberg.de

A.P. Waters Department of Parasitology, L4-Q, Leiden University Medical Center, Albinusdreef 2, 2333 ZA Leiden, The Netherlands. Tel.: +31 71 5265069; Fax +31 71 52668907; e-mail: a.p.waters@lumc.nl

P.T. LoVerde, Southwest Foundation for Biomedical Research, PO BOX 760549, USA; e-mail: ploverde@sfbr.org

B. Ullman Department of Biochemistry, Oregon Health Science University, 3181 SW Sam Jackson Park Road, Portland OR 97201, USA Tel: +1 503 494 8437 Fax: +1 503 494 8393 E-mail: ullmanb@ohsu.edu

Reviews Editor

Alister Craig, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, UK. Tel: +44 151 705 3161; Fax: +44 151 705 3371; email: agcraig@liverpool.ac.uk

Sponsored Articles:

Molecular and Biochemical Parasitology offers authors or their institutions the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms.

Moura, Danielle Maria Nascimento

Utilização de abordagens moleculares *in vivo* no estudo de homólogos do fator de iniciação da tradução 4G (eIF4G) de tripanosomatídeos./ Danielle Maria Nascimento Moura. – Recife: A Autora, 2007.

90 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado: Genética) – UFPE. CCB

1. Tripanosomatídeos 2. eIF4G 3. Iniciação da tradução
I.Título

593.161

CDU (2^a. Ed.)

UFPE

~~614.53~~

CDD (22^a. Ed.)

CCB – 2008 – 15