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

Ludmila Arruda de Assis

Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em *Leishmania infantum*

Recife
2015

Ludmila Arruda de Assis

Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em *Leishmania infantum*

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

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Coorientador : Dra. Tamara De Carli da Costa Lima

Recife
2015

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Assis, Ludmila Arruda de
Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em *Leishmania infantum* / Ludmila Arruda de Assis. – Recife: O Autor, 2015.

91 f.: il.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo, Tamara de Carli da Costa Lima
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2015.
Inclui referências e anexos

1. Protozoário 2. Leishmania 3. Genética I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orient.) II. Lima, Tamara de Carli da Costa III. Título.

593 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2015-214

Ludmila Arruda de Assis

Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em *Leishmania infantum*

Aprovado em 11 / 03 / 15

Banca Examinadora:

_____

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

_____

Antônio Roberto Lucena de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Danilo Elias Xavier
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

_____

Fabrício Klerynton Marchini
Instituto Carlos Chagas/ Fundação Oswaldo Cruz

Recife
2015

Dedico ao meu raio de sol, minha sobrinha Maria Beatriz

Agradecimentos

Ao Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto por todo conhecimento compartilhado ao longo dos anos e principalmente pela orientação e confiança para a realização deste trabalho.

A Dra Tamara De' Carli da Costa Lima, minha co-orientadora desde a iniciação cientifica, obrigada por toda dedicação e amizade.

Aos órgãos de fomento pelo apoio financeiro a pesquisa, ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infra-estrutura de seus laboratórios e ao Instituto Carlos Chagas pela colaboração.

A todos os amigos do Departamento de Microbiologia pelo companheirismo do dia-a-dia e momentos de alegria. Especialmente para o grupo BioMolTrip: Ada, Amaranta, Antônio, Artur, Camila, Christian, Dani, Diego, Éden, Gustavo, Irassandra, Jeyse, João, Kleison, Larissa, Maria, Marília, Rodrigo, Rômulo e Wagner.

Aos mestrandos, futuros mestres: Cami, Carol, Rômulo e Wagner pois o mestrado foi nível hard para todos nós.

Aos Hot Polares: Artur, Carol, Felipe, Jana, Marília, Nathaly, Rodrigo, Rômulo e Wagner, porque vocês arrasam e fazem bem a minha nerdice.

As minhas exageradas: Buh, Pati e Ray, por todo carinho e paciência, e por nunca deixarem de acreditar e torcer por mim.

A toda minha querida família pelo carinho, compreensão e apoio.

Every man must decide whether he will walk in the light of creative altruism or in the darkness of destructive selfishness

Martin Luther King

Resumo

A iniciação da síntese protéica em eucariotos depende da ação dos chamados fatores de iniciação da tradução ou eIFs. Dentre esses, destacam-se dois complexos: eIF4F, formado pelos eIF4A, eIF4E e eIF4G; e eIF3, que em mamíferos compreende 13 subunidades (eIF3a até eIF3m). Suas ações permitem o reconhecimento dos mRNAs, via eIF4E, e o recrutamento do ribosomo, mediado pelo eIF3 que por sua vez interage com o eIF4F. Em espécies de *Leishmania* seis homólogos de eIF4E foram identificados (EIF4E1 a 6) que parecem divergir funcionalmente enquanto o complexo eIF3 ainda é pouco caracterizado. Este trabalho buscou avaliar a presença, composição e função do eIF3 em *Leishmania*. Um total de 11 subunidades do complexo foram confirmadas a partir de ensaios de imunoprecipitação (IP) e espectrometria de massa utilizando soro direcionado a subunidade EIF3E. Visando uma melhor caracterização, seis dessas subunidades tiveram seus genes clonados e foram expressas em *L. infantum*, fusionadas ao peptídeo HA. Quatro destas proteínas heterólogas foram utilizados em novas IPs, com soro anti-HA, onde se avaliou sua capacidade de copurificar com o EIF3E. Todas mostraram essa interação, confirmando sua presença em complexos eIF3 íntegros. Homólogos de eIF4E de *L. infantum* também foram expressos fusionados a HA e utilizados em IPs semelhantes. Dois destes, EIF4E2 e EIF4E3, mostraram uma associação, direta ou indireta, com a subunidade EIF3E do complexo eIF3, indicando um papel relevante na tradução.

Palavras-chave: eIF3; eIF4F; tripanosomatídeos; imunoprecipitação.

Abstract

The initiation of protein synthesis in eukaryotes depends on the action of the translation initiation factors or eIFs. Among these, two major complexes are: eIF4F, formed by eIF4A, eIF4E and eIF4G; and eIF3, which comprises 13 subunits in mammals (eIF3a to eIF3m). Their actions allow the recognition of mRNAs via eIF4E, and the recruitment of the ribosome, mediated by eIF3 which interacts with eIF4F. In *Leishmania* species, six eIF4E homologues have been identified (EIF4E1 to 6) that seem to differ functionally, and the eIF3 complex is not well characterized. This study aimed to evaluate the presence, composition and function of eIF3 in *Leishmania*. A total of 11 subunits from the complex were confirmed through immunoprecipitation assays (IP) and mass spectrometry using serum directed to the EIF3E subunit. For a better characterization, six of these subunits had their genes cloned and expressed in *L. infantum*, fusioned to a HA peptide. Four of the resulting heterologous proteins have been used in new IPs with anti-HA serum, which were evaluated for their ability to copurify with EIF3E. All showed this interaction, confirming their presence in intact eIF3 complexes. *L. infantum* eIF4E homologues were also expressed fusioned to HA and used in similar IPs. Two of these, EIF4E2 and EIF4E3 showed an association, direct or indirect, with the EIF3E subunit of eIF3 complex, indicating a relevant role during translation initiation.

Key words: eIF3; eIF4F; trypanosomatids; immunoprecipitation.

Lista de ilustrações

Figura 1. Morfotipos do gênero *Leishmania* 5

Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania* 7

Figura 3. As principais manifestações clínicas da Leishmaniose 9

Figura 4. Mapas da distribuição mundial das leishmanioses em 2012 11

Figura 5. Esquema representativo do processamento de mRNA em tripanosomatídeos 16

Figura 6. Esquema representativo da iniciação da tradução nos eucariotos 18

Figura 7. Complexo eIF4F, eIF4B e PABP 19

Figura 8. Estrutura tridimensional do eIF4E de camundongo 22

Figura 9. Modelo proposto para o complexo eIF3 24

Figura 10. Esquema de PCR convencional e PCR da mutagênese 43

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes de interesse 44

Figura 11. Esquema do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa 47

Figura 12. Ensaios de *Western-blot* da imunoprecipitação do EIF3E 54

Figura 13. Amplificação dos genes de interesse de *Leishmania infantum* 57

Figura 14. Construções plasmidiais dos genes de interesse em vetor da série pGEM T-easy 58

Figura 15. Ensaio de *Western-blot* dos extratos celulares expressando as proteínas fusionadas a HA 61

Figura 16. Ensaio de *Western-blot* das imunoprecipitações das proteínas de interesse fusionadas a HA . 62

Figura 17. Ensaio de *Western-blot* das imunoprecipitações das proteínas de interesse com anti-EIF3E 63

Lista de tabelas

Tabela 1. Proteínas co-imunoprecipitadas com o EIF3E em *L. infantum* 55

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Item	Definição
4E-BP	*4E Binding Protein* – Proteína de Ligação ao 4E
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BSA	*Bovine Serum Albumin* – Albumina Bovina Sérica
dATP	*Deoxyadenosine triphosphates* **–** Trifosfato de adenosina
DEAD	Ácido Aspártico (**D**) Ácido Glutâmico (**E**), Alanina (**A**), Ácido Aspártico (**D**)
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	*Desoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	*Deoxynucleotide Triphosphates* – Trifosfatos Deoxinucleiotideo.
DTT	Ditiotreitol
eIF	*eukaryotic Initiation Factor* – Fator de Iniciação Eucariótico
g	gravidade
GTP	*Guanosine Triphosphate* – Guanosina Trifosfato
HA	Hemaglutinina
HEAT	**H**untingtina (envolvida na doença de Huntington), **E**F3 (Fator de Elongação 3), PR/65**A** (subunidade A da proteína Fosfatase 2), e m**T**or/FRAP (molécula sensível à rapamicina)
HEPES	*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
His	Histidina
IgG	Imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
IPTG	Isopropil-tio-ß-D-galactopiranosídeo
IRES	*Internal ribosome entry site* – Sítio interno de entrada do ribossomo
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
Met	Metionina

Mnk	*Mitogen Activated Protein Kinases* – Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MPN	***M****pr1–****P****ad1 ****N****-terminal*
mRNA	*Messenger RNA* – RNA Mensageiro
NES	***N****uclear export sequence* – Sequência de exportação nuclear
ORF	*Open Reading Frame* - Quadro aberto de leitura.
PABP	*Poli (A) Binding Protein* – Proteína de ligação ao Poli-A
Paip	*PABP-interacting protein* – Proteína de interação com a PABP
pb	Pares de Base
PBS	*Phosphate Buffered Saline* – Tampão Fosfato Salino
PCI	***P****roteasome*, **C**OP9, ***I****nitiation factor 3*
PVDF	*Polyvinylidene fluoride* – Polivinil Fluorido
RNA	*Ribonucleic Acid* – Àcido Ribonucléico
RNA pol	RNA polimerase
RRM	*RNA Recognition Motif* - Motivo de reconhecimento do RNA
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* – Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio
SL	*Splicing Leader* – Sequência Líder
SOC	***S****uper ****O****ptimal broth with ****C****atabolite repression*
TBS	*Tris-Buffered Saline* – Tampão Tris salino
tRNAi	*Transfer RNA initiator* – RNA Transportador iniciador
UTR	*Untranslated region* – Região não traduzida
WHO	*World Health Organization* – Organização Mundial da Saúde
X-GAL	*5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside* (BCIG)

Sumário

Resumo **vi**

Abstract **vii**

Lista de ilustrações **viii**

Lista de tabelas **x**

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos **xi**

1. Introdução **1**

2. Revisão da literatura **3**

2.1 Considerações gerais sobre o gênero *Leishmania* **3**

2.1.1 Tripanosomatídeos 3

2.1.2 O gênero *Leishmania* 4

2.1.3 Ciclo biológico 6

2.1.4 Leishmaniose 8

2.1.5 Epidemiologia 10

2.1.6 Prevenção, Diagnóstico e Tratamento 12

2.2 Aspectos peculiares da biologia molecular de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos **13**

2.2.1 Organização gênomica 13

2.2.2 Transcrição e processamento dos mRNAs 14

2.3 Iniciação da tradução em eucariotos **16**

2.3.1 Complexo eIF4F 19

2.3.1.1 eIF4A – RNA helicase 19

2.3.1.2 eIF4G – proteína multidomínio do complexo eIF4F 20

2.3.1.3 eIF4E – proteína de ligação ao *cap* 21

2.3.2 Complexo eIF3 23

2.3.2.1 EIF3a 24

2.3.2.2 EIF3b 25

2.3.2.3 EIF3c 25

2.3.2.4 EIF3d 26

2.3.2.5 EIF3e 26

2.3.2.6 EIF3g 27

2.3.2.7 EIF3f e EIF3h 28

2.3.2.8 EIF3i 28

2.3.2.9 EIF3j 29

2.3.2.10 EIF3k, EIF3l e EIF3m 29

2.3.3 PABP – proteína de ligação ao poli-A 30

2.4 Fatores de iniciação da tradução em tripanosomatídeos 31

2.4.1 EIF4A 31

2.4.2 EIF4G 32

2.4.3 EIF4E 33

2.4.4 PABP 35

2.4.5 EIF3 35

3. Objetivos 41

4. Material e métodos 42

4.1 Amplificação por reação em cadeia da polimerase 42

4.2 Clonagem e subclonagem dos genes de interesse 45

4.3 Cultivo e transfecção de células de *Leishmania sp.* 47

4.4 Obtenção de extrato total e ensaios de *Western-blot* 48

4.5 Preparação de lisados celulares de *L. infantum* 50

4.6 Imunoprecipitação 50

5. Resultados **53**

5.1 Identificação dos parceiros funcionais do EIF3e 53

5.2 Amplificação dos genes de interesse 56

5.3 Clonagem em vetor da série pGEM T-easy 57

5.4 Subclonagem no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa 58

5.5 Análise da expressão das proteínas fusionadas a HA em *L. infantum* 60

5.6 Imunoprecipitação das proteínas fusionadas a HA em *L. infantum* 61

5.7 Avaliação de interação 63

6. Discussão **64**

7. Conclusões **70**

8. Referências bibliográficas **71**

9. Anexo **79**

10. Currículo *Lattes* **98**

1. Introdução

Os protozoários patogênicos pertencentes ao gênero *Leishmania* constituem, junto com as espécies de *Trypanosoma*, os organismos mais importantes, do ponto de vista médico, da família Tripanosomatidae de eucariotos unicelulares. Espécies de ambos os gêneros são causadoras de doenças negligenciadas que afetam milhões de indivíduos ao redor do mundo, principalmente em regiões tropicais. Os tripanosomatídeos divergiram muito cedo da linhagem evolutiva dos eucariotos e apresentam características que lhe são únicas, como a presença do cinetoplasto, transcrição policistrônica, *trans splicing* e ausência de promotores para a RNA pol II. Devido a ausência destes promotores o controle da expressão gênica acontece basicamente ao nível pós-transcricional, seja pelo controle da estabilidade de seus mRNAs ou por eventos da tradução. Em eucariotos a tradução pode ser dividida em quatro fases (iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos), sendo que a iniciação é a principal etapa de controle deste processo, uma vez que envolve tanto as subunidades ribossomais como um grande número de proteínas acessórias.

Na maioria dos eucariotos, a tradução começa quando a subunidade ribossomal menor, junto ao tRNA iniciador, interage com o mRNA através da estrutura *cap* presente na extremidade 5' deste. A partir disso ocorre o rastreamento pelo mRNA em busca do códon de iniciação da tradução, o que leva a associação com a subunidade maior iniciando a síntese proteica. Participam deste processo diversas proteínas acessórias conhecidas como fatores de iniciação da tradução (eIF, *eukaryotic initiation factor*). Dentre esses, se destacam dois complexos: o eIF4F, formado pelas proteínas eIF4A, eIF4E e eIF4G; e o

eIF3, que em mamíferos compreende 13 subunidades (eIF3a até eIF3m). O complexo eIF4F reconhece os mRNAs através da ligação do eIF4E ao *cap* na extremidade 5', e também interage com o complexo eIF3 para o recrutamento da subunidade menor ribossomal. A tradução é bem descrita e caracterizada em eucariotos modelos como leveduras, plantas e mamíferos. No entanto, este processo é menos conhecido em organismos mais divergentes e ainda vem sendo descrito para os tripanosomatideos. Nestes últimos foram identificados seis homólogos para a subunidade eIF4E (EIF4E1 a 6) e cinco para a subunidade eIF4G (EIF4G1 a 5) do complexo eIF4F, que parecem divergir quanto ao seu papel na tradução e apresentam propriedades ainda não descritas em outros organismos. No caso do complexo eIF3, este ainda é pouco caracterizado.

Como objetivo de contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos que envolvem a síntese de proteínas em tripanosomatídeos, este trabalho procurou caracterizar primeiramente a presença e a composição do complexo eIF3 em *L. infantum, f*azendo uso da disponibilidade de soro policlonal dirigido contra a subunidade EIF3E deste patógeno. Em continuidade, buscou-se analisar a interação deste complexo com homólogos de eIF4E, a partir da expressão de forma heteróloga de proteínas selecionadas em *L. infantum*, seguido de sua utilização em ensaios de co-precipitação *in vivo*.

2. Revisão da literatura

2.1 Considerações gerais sobre o gênero *Leishmania*

2.1.1 Tripanosomatídeos

Protozoários patogênicos pertencentes ao gênero *Leishmania* constituem um grupos de organismos geneticamente próximos e que são taxonomicamente classificados dentro da Família Tripanosomatidae, da Ordem Kinetoplastida. Esta ordem compreende uma variedade de espécies de vida livre e alguns patógenos de invertebrados, vertebrados e até mesmo de plantas. A Família Tripanosomatidae compreende apenas organismos parasitas de outros eucariotos e dos nove gêneros conhecidos apenas dois, *Trypanosoma* e *Leishmania*, possuem importância médica (Simpson *et al.,* 2006). Dentre os agentes etiológicos mais estudados estão *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono; *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas; e as várias espécies de *Leishmania*, que causam os diferentes tipos de leishmanioses (Field *et al.,* 2007). Estas doenças são em grande parte endêmicas para países em desenvolvimento, onde elas têm efeitos negativos significativos na saúde pública (WHO, 2014).

Os tripanosomatídeos representam um ramo inicial da árvore evolutiva dos eucariotos e características únicas morfológicas, bioquímicas, nutricionais e ultraestruturais distinguem o grupo (Lopes *et al.,* 2010). A biologia celular destes organismos é em sua maioria similar, na qual se destaca a presença do cinetoplasto, uma região rica em DNA contida em sua única e grande mitocôndria, bem como a presença de um flagelo único originado a partir de uma bolsa flagelar na membrana celular, localizada próximo a mitocôndria (Stuart *et al.,* 2008). Estes

organismos podem apresentar diversos morfotipos dependendo da forma da célula, das dimensões e da posição relativa do cinetoplasto e bolsa flagelar em relação ao núcleo. Estes morfotipos podem ser alterados consideravelmente dependendo do ambiente, das condições de cultivo e da adição de drogas Os morfotipos mais comuns são: promastigota, amastigota, opistomastigota, epimastigota, tripomastigota, coanomastigota e esferomastigota (Lopes *et al.,* 2010). Além destas características celulares, os tripanosomatídeos possuem uma variedade de aspectos peculiares em sua biologia molecular que também os distinguem dos demais eucariotos.

2.1.2 O gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* possui cerca de 30 espécies conhecidas até o momento, das quais aproximadamente 20 são patogênicas aos seres humanos (Dantas-Torres, 2007). Atualmente o gênero é subdivido em três subgêneros, são eles: *Leishmania*, *Vianna e Sauroleishmania.* As principais espécies de cada subgênero são: *L.* (*L.*) *donovani, L.* (*L.*) *infantum, L.* (*L.*) *mexicana, L.* (*L.*) *amazonensis, L.* (*L.*) *venezuelensis*, *L.* (*L.*) *tropica, L.* (*L.*) *major, L.* (*L.*) *aethiopica, L.* (*V.*) *braziliensis, L.* (*V.*) *guyanensis, L.* (*V.*) *panamensis, L.* (*V.*) *peruviana, L.* (*S.*) *tarentolae* e *L.* (*S.*) *gymnodactyli* (Bates, 2007).

A transmissão das espécies de *Leishmania* ocorre através da picada de insetos dípteros dos gêneros *Phlebotomus*, no chamado Velho Mundo (Europa, Ásia e África), e *Lutzomya*, no Novo Mundo (as Américas). Estes protozoários também são capazes de se multiplicar em várias espécies de hospedeiros vertebrados, dentre estes os mais comuns são mamíferos, incluindo humanos,

roedores, cachorros, lobos, e raposas. Repteis e anfíbios são reservatórios menos frequentes (Neuber, 2008).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são organismos heteroxênicos ou digenéticos, pois possuem seu ciclo biológico realizado em dois hospedeiros: um vertebrado e um invertebrado. No primeiro, estes são encontrados na forma amastigota, arredondada e com um flagelo curto que não se exterioriza, medindo entre 1,5 - 3 µm por 3 - 6,5 µm; e no segundo na forma promastigota, extracelular alongada e flagelada, medindo entre 16 e 40 µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de largura (Michalick, 2005). A forma promastigota que se divide e não é infectiva em mamífero é chamadas de procíclica enquanto que a forma infectante, que não se divide, é dita metacíclica (Besteiro *et al.,* 2007), como observado na Figura 1.

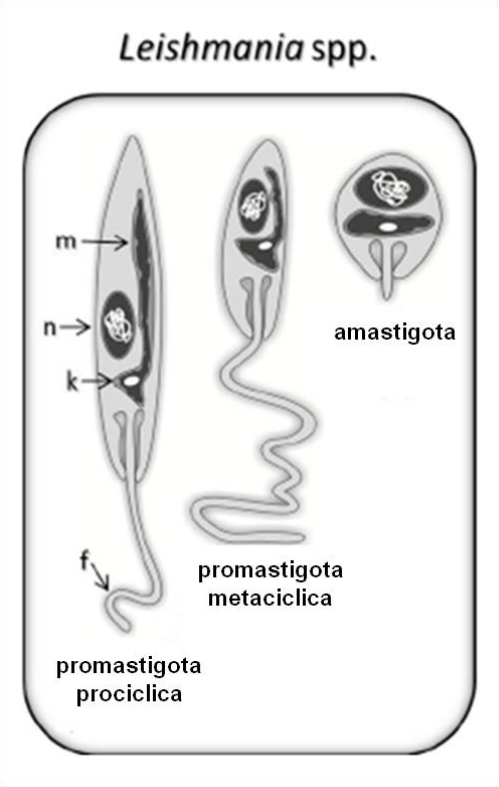


Figura 1. Morfotipos do gênero *Leishmania.* As formas dos tripanossomatideos são definidas com base no ponto onde o flagelo (f) emerge e a posição do cinetoplasto (k) em relação ao núcleo (n). Uma única mitocôndria (m) é observada nas três formas da *Leishmania*: promastigota prociclica (a esquerda), forma encontrada no inseto vetor; promastigota metaciclica (central), forma infectante do parasita, e amastigota (a direita), forma encontrada no hospedeiro mamífero. Fonte: Adaptado de (Santos *et al.,* 2013).

2.1.3 Ciclo biológico

Durante o repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicos de *Leishmania* presentes na válvula estomodeal do intestino médio do inseto vetor são regurgitados, juntamente com imunomoduladores e vários componentes salivares (Kaye e Scott, 2011). Uma vez inoculados no hospedeiro vertebrado, os parasitas são fagocitados por macrófagos através de endocitose gerando fagossomos aos quais se fundem vesículas lisossomais, formando os fagolisossomos. Ocorre então a diferenciação dos parasitas em amastigotas, diferenciação esta que é estimulada pela mudança nas condições de vida entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado, como o aumento da temperatura, microambiente rico em aminoácidos, disponibilidade de oxigênio e diminuição do pH (Besteiro *et al.,* 2007; McConville *et al.,* 2007). As formas amastigotas se multiplicam intensamente por divisão binária até o rompimento das células. Desta maneira se disseminam pela corrente sanguínea, permitindo a reinfecção de novas células e tecidos. (Stuart *et al.,* 2008).

O ciclo de transmissão da *Leishmania* é concluído quando os macrófagos parasitados com as formas amastigotas são ingeridos pelo inseto vetor, durante a alimentação sanguínea de mamíferos infectados (Kaye e Scott, 2011). No intestino médio do inseto, as mudanças nos ambientes entre o mamífero e o hospedeiro invertebrado (diminuição da temperatura e aumento do pH) desencadeiam uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas capazes de satisfazer as exigências para o desenvolvimento do parasita no vetor. Desta forma os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicos, que também se reproduzem por sucessivos ciclos de divisão binária. Após alguns dias os

parasitas começam a se replicar mais lentamente e se especializam nas formas promastigotas metacíclicas (infectivas), processo denominado de metaciclogênese (Figura 2) (Bates, 2007; Besteiro *et al.,* 2007)

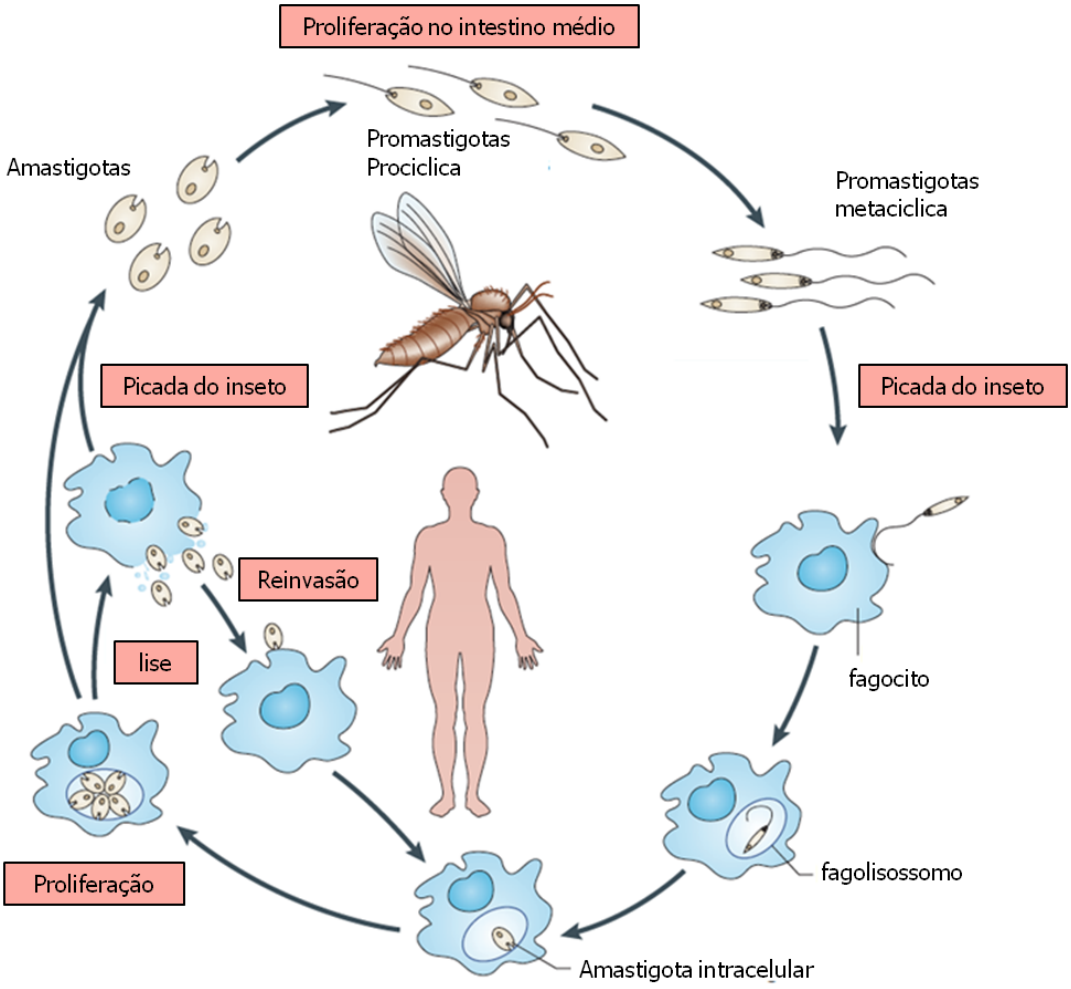


Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania*. O inseto infecta o hospedeiro com as formas promastigotas metaciclicas do parasita. Estas formas são fagocitadas por macrófagos que se fundem com vesículas lisossomais, formandos os fagolisossomos. Nestes ocorre a diferenciação em amastigotas que se multiplicam até romper a célula e serem fagocitadas por novos macrófagos. Durante a alimentação sanguínea, o inseto ingere macrófagos com as formas amastigotas que quando liberadas se transformam em formas promastigotas no intestino médio. Estas se proliferam e diferenciam nas formas infectantes. Fonte: Adaptado de (Kaye e Scott 2011).

2.1.4 Leishmaniose

Os protozoários parasitas do gênero *Leishmania* são responsáveis pelas leishmanioses, um grupo de doenças com diversos padrões epidemiológicos e clínicos de manifestação (Figura 3), com prevalência em áreas tropicais e subtropicais do mundo. São consideradas doenças negligenciadas, considerando os limitados recursos investidos em diagnóstico, tratamento e controle e estando fortemente associadas com a pobreza. As leishmanioses apresentam três principais formas – a visceral (conhecida com Calazar e a forma mais séria da doença), a cutânea (a mais comum) e a mucosa cutânea (WHO, 2014).

A leishmaniose visceral, ou Calazar, é a forma mais grave da doença e é geralmente causada pelas espécies *L. donovani e L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi* na America do Sul). É a forma crônica da doença que acomete os órgãos internos, sendo caracterizada pelo crescimento dos parasitos em células retículo endoteliais, infiltrando predominantemente os tecidos do baço, medula óssea, fígado e linfonodos (van Griensven e Diro 2012). Os principais sintomas são febre, perda de peso, fraqueza, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, e que se não tratados pode levar a morte (Neuber, 2008). Em alguns casos mesmo após tratamento pode ocorrer uma complicação da doença pelo aparecimento de erupções crônicas na pele. Esta manifestação é conhecida como leishmaniose dérmica pós calazar (Zijlstra *et al.,* 2003).

A leishmaniose cutânea pode ser causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica, L. aethiopica*, *L. mexicana, L. braziliensis, e L. amazonensis.* A picada do inseto causa inicialmente eritema e edema no local de inoculação que se desenvolve em úlceras indolores com bordas salientes e intumescidas. As úlceras

são encontradas em partes expostas da pele como mãos, rosto, e pernas (Neuber, 2008). A leishmaniose mucosa cutânea é uma forma mais severa da cutânea, em que os pacientes sofrem de ulcerações progressivamente destrutivas da mucosa, que se estendem do nariz e da boca até a faringe e laringe. A *L. braziliensis* é responsável pela maioria dos casos da leishmaniose mucosa cutânea (Chappuis *et al.,* 2007). No Brasil é conhecida mais uma forma de leishmaniose tegumentar, chamada cutânea difusa. É causada pela *L. amazonensis* e constitui uma forma clínica rara, porém grave em que uma lesão única, com má resposta ao tratamento, evolui lentamente com formação de múltiplas nodulações não ulceradas, recobrindo grandes extensões da pele (Brasil, 2009).

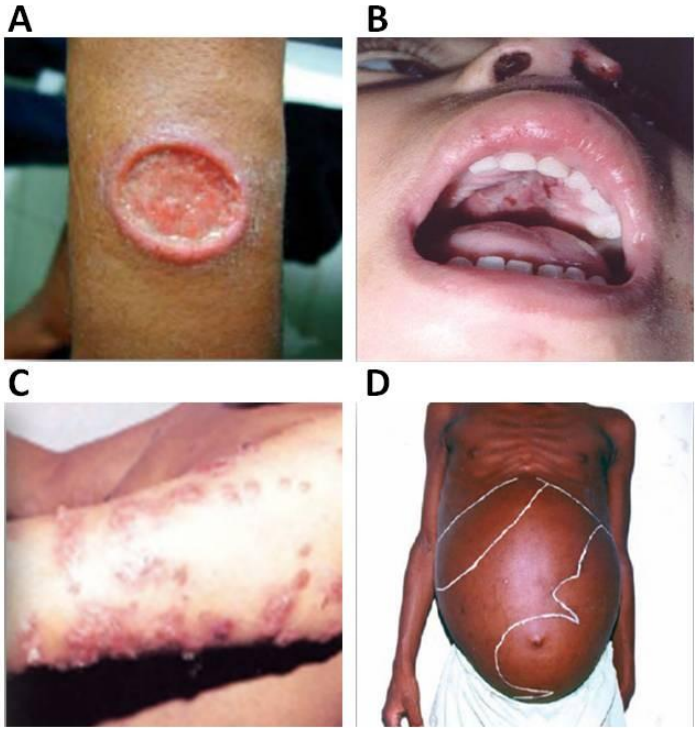


Figura 3. As principais manifestações clínicas da Leishmaniose. Leishmaniose cutânea (A); leishmaniose mucocutânea (B), leishmaniose cutânea difusa (C) e leishmaniose visceral (D). Fonte: adaptado de (Brasil, 2006; Velozo *et al.,* 2006; Brasil, 2007).

2.1.5 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, atualmente as leishmanioses são consideradas endêmicas em 88 países, com cerca de 350 milhões de pessoas com risco de desenvolver uma das formas da doença. Uma estimativa de 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente. A Figura 4 mostra o mapa de distribuição mundial das leishmanioses, no qual 95% de todos os casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Uma estimativa de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente e destes, dois terços ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Ira e República Árabe da Síria. A leishmaniose visceral é altamente endêmica no subcontinente indiano e no leste da África, com uma estimativa de 200 000 a 400 000 de novos casos ocorrendo no mundo a cada ano (WHO, 2014)

No Brasil, a leishmaniose cutânea é uma endemia em expansão devido ao desmatamento e pelo contato do homem com focos zoonóticos (Pontes 2009). De acordo com o Ministério da Saúde em média, são registrados cerca de 21.000 casos/ano, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes nos últimos cinco anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente (54,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (22,9 casos/100.000 habitantes) e Nordeste (14,2 casos/100.000 habitantes). Para a leishmaniose visceral, cerca de 3.500 novos casos são registrados anualmente e o coeficiente de incidência é de 2,0 casos/100.000 habitantes. Nos últimos anos, a letalidade desta doença vem aumentando gradativamente, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (Brasil, 2014).

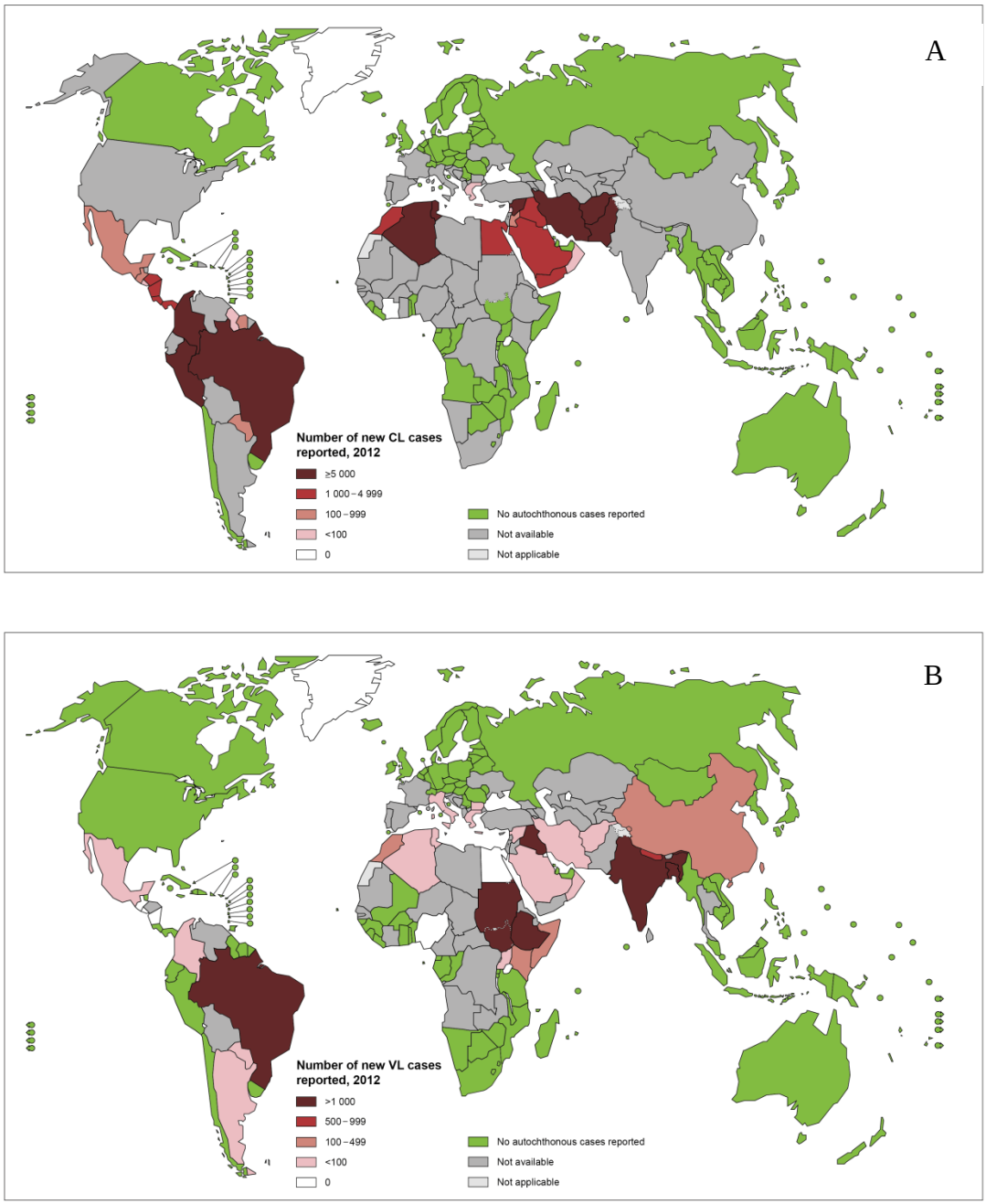


Figura 4. Mapas da distribuição mundial das leishmanioses em 2012. (A) Distribuição mundial da leishmaniose cutânea e (B) distribuição mundial da leishmaniose visceral. Fonte: Adaptado de (WHO, 2014).

2.1.6 Prevenção, diagnóstico e tratamento.

As estratégias utilizadas para o controle das leishmanioses estão centradas: no diagnóstico precoce e tratamento eficaz dos casos, reduzindo a prevalência da doença e prevenindo deformidades e morte; no controle da população de insetos vetores e animais reservatórios, que ajuda a reduzir ou interromper a transmissão; e na mobilização social através de educação em saúde (WHO, 2014).

O diagnóstico das leishmanioses abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Estes últimos requerem a visualização do parasita através de métodos parasitológicos. Para a leishmaniose cutânea é realizado o exame direto das formas amastigotas obtidas a partir da aspiração, escarificação ou biopsia da lesão (Gontijo, 2003). Para a leishmaniose visceral pode ser feita biópsia ou punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. Além da pesquisa parasitológica, também são realizados diagnósticos imunológicos, dentre os quais se destacam os testes de aglutinação direta, reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático (Gontijo e Melo, 2004).

Para o tratamento das leishmanioses no Brasil, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes. Estas drogas são consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania.* Como segunda opção, em caso de resposta não satisfatória é utilizada a anfotericina B. Esta droga é a mais potente disponível comercialmente, com ação em formas promastigotas e amastigotas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sua alta toxicidade, contudo, pode ocasionar a morte ou o comprometimento de funções vitais dos pacientes em tratamento (Brasil, 2009).

2.2 Aspectos peculiares da biologia molecular de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos

A biologia molecular dos tripanosomatídeos difere dos demais eucariotos em vários aspectos, como na forma em que seu genoma é organizado em agrupamentos de genes policistrônicos, na sua maquinaria de transcrição simplificada, e no processamento em *trans* (*trans-splicing*) do mRNA acoplado com a poliadenilação (Ivens *et al.,* 2005). Na maioria dos eucariotos a regulação da expressão gênica ocorre a nível transcricional, porém em tripanosomatídeos há uma escassez de promotores para a RNA polimerase II, indicando que a regulação da sua expressão gênica deve acontecer, basicamente, ao nível pós-transcricional (Clayton, 2002; Haile e Papadopoulou, 2007). Entre os mecanismos propostos para essa regulação estão o controle da estabilidade de mRNAs maduros e o controle da sua tradução em proteínas (Clayton e Shapira, 2007).

2.2.1 Organização genômica

Os genomas dos protozoários *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, referidos como TriTryps, apresentam uma notável conservação na organização dos genes (Ghedin *et al. ,*2004), assim como um grande número de genes em comum (El-Sayed *et al.,* 2005; Kissinger, 2006). De todos os genes identificados, 94% dos ortólogos estão em sintenia, ou seja, esses blocos gênicos se encontram dispostos na mesma organização no contexto genômico entre organismos distintos (El-Sayed *et al.,* 2005).

As análises dos três genomas dos TriTryps revelaram que as espécies, *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major,* possuem aproximadamente 9.086, 12.000 e 8.311 genes, respectivamente e identificaram também a existência de 6.158 grupamentos gênicos ortólogos comuns aos três patógenos. Especula-se que o alto grau de conservação genômica entre os diferentes tripanosomatídeos seja devido a algum tipo de pressão seletiva que deva restringir o rearranjo dos genes, tais como a incidência relativamente baixa de recombinação sexual, a organização policistrônica ou a replicação, porém a razão de tal fenômeno ainda não está bem clara (Ghedin *et al.,* 2004; El-Sayed *et al.,* 2005). Apesar do alto grau de conservação entre as três espécies, foram encontrados 910 genes específicos de *L. major*, 1.392 genes específicos de *T. brucei* e 3.736 genes exclusivos de *T. cruzi.* Quase metade das quebras de sintenia entre *T. brucei* e *L. major* ocorrem muito perto ou dentro das regiões de troca de fita que separa grupos de genes direcionais, outra característica única dos genomas de tripanosomatídeos (Kissinger, 2006).

2.2.2 Transcrição e processamento dos mRNAs

Nos eucariotos em geral os genes que codificam proteínas são transcritos em unidades monocistrônicas sob o controle de sequências promotoras específicas. Em tripanosomatídeos, com base em estudos genômicos de uma região presente no cromossomo 1 de *L. major*, observou-se que uma região promotora poderia dirigir a transcrição de 79 genes deste cromossomo. Esta transcrição se daria em unidades policistrônicas, de forma constitutiva e bidirecional, com 50 ORFs orientadas para uma direção e as outras 29 ORFs

orientadas na direção oposta (Martínez-Calvillo *et al.,* 2003; Campbell *et al.,* 2003). Muitos experimentos subsequentes confirmaram que estes genes que estão um ao lado do outro e compartilham uma orientação comum são co-transcritos, semelhante aos operons bacterianos, ou seja, com uma única região promotora sendo utilizada para transcrição de múltiplos genes. Porém, geralmente esses genes transcritos juntos não codificam proteínas funcionalmente relacionadas, o que os diferem dos operons bacterianos (Martínez-Calvillo *et al.,* 2010).

Os pré-mRNAs eucarióticos são processados pelo mecanismo denominado *cis-splicing*, onde as sequências não codificantes, denominadas de *introns*, são removidas. Nos tripanossomatideos praticamente não ocorre *cis-splicing,* sendo todos os seus mRNAs precursores policistrônicos processados pelo mecanismo de *trans-splicing* (Liang *et al.,* 2003). Esta maturação de mRNAs individuais a partir de pré-mRNAs policistrônicos envolve dois processos. No primeiro destes, o *trans-splicing* propriamente, uma sequência de RNA contendo entre 39 a 41 nucleotídeos, chamada de sequência lider (SL), é adicionada a extremidade 5' do mRNA. Esta SL possui em sua extremidade 5' um *cap* modificado denominado de *cap4*. O segundo evento é o de poliadenilação dos mRNAs em sua extremidade 3', na qual é adicionada uma cauda de poliadenosinas e os mRNAs clivados. Ambos os processos ocorrem de forma acoplada e são dependentes de uma sequência comum rica em polipirimidinas. Em conjunto estes processos permitem que o mRNA policistrônico precursor gere mRNAs monocistrônicos maduros, como observado na Figura 5 (Clayton, 2002; Haile e Papadopoulou, 2007; Martínez-Calvillo *et al.,* 2010)

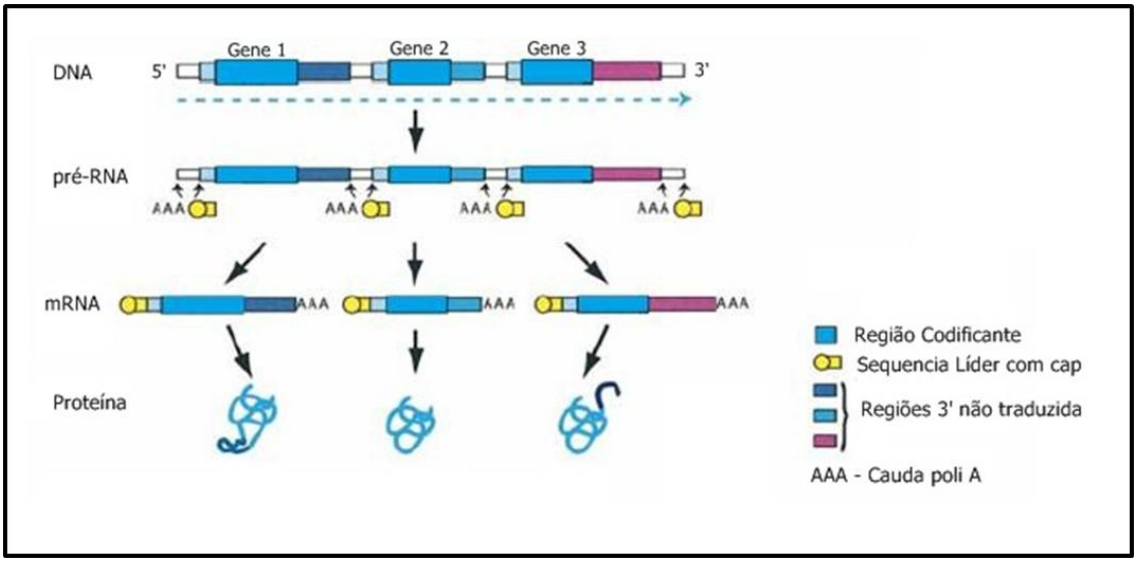


Figura 5. Esquema representativo do processamento de mRNAs em tripanosomatídeos. Os genes são transcritos em unidades policistrônicas e a maturação destes transcritos é feita por *trans-splicing,* no qual é adicionada uma sequência líder contendo o *cap* a extremidade 5' e uma cauda poli-A a extremidade 3' do mRNA. Fonte: Adaptado de (Clayton, 2002).

2.3 Iniciação da tradução em eucariotos

A tradução é o processo no qual a informação genética contida nos RNAs mensageiros (mRNAs) sob a forma de uma sequência de nucleotídeos é traduzida em sequências de aminoácidos – constituintes das proteínas. O processo de tradução pode ser dividido em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A iniciação da tradução é a principal etapa de regulação, uma vez que nesta ocorre eventos importantes como a montagem do ribossomo, reconhecimento do mRNA e identificação do códon AUG de iniciação da tradução (Sonenberg e Hinnebusch, 2009; Jackson *et al.,* 2010). Para que a iniciação da tradução ocorra é necessário a participação de diversas proteínas auxiliares denominadas de fatores de iniciação eucarióticos (eIF de *eukaryotic Initiation Factors*), proteínas individuais ou complexo proteicos sem os quais o processo de síntese de proteínas não ocorre. Em mamíferos são

descritos vários fatores tais como, eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4B, eIF4F, eIF5, eIF5B e eIF6 (Pestova *et al.,* 2001; Prévôt *et al.,* 2003).

De uma forma geral a tradução se inicia após a montagem do ribossomo 80S junto aos mRNAs, a partir da interação entre o tRNA iniciador (tRNAi), mRNA e as subunidade ribossomais 40 e 60S. As principais etapas para que este processo ocorra corretamente estão representadas na Figura 6 e são descritas a seguir:

1) Formação de um complexo ternário entre o eIF2, uma molécula de GTP e um metionil-tRNA iniciador (eIF2-GTP-Met-tRNAi). Este complexo por sua vez interage com a subunidade ribossomal 40S através de outros fatores de tradução, como os eIF1, eIF1A e eIF3, formando o complexo de pré-iniciação 43S.

2) Recrutamento do complexo 43S por ação das subunidade eIF4E e eIF4G, pertencentes ao complexo denominado eIF4F. O eIF4E se liga ao mRNA por meio do *cap* (m7GTP) presente na extremidade 5’ do mRNA, enquanto o eIF4G recruta o complexo 43S via interação com o eIF3, associado a subunidade menor ribossomal, formando o complexo de iniciação 48S.

3) Movimentação da subunidade 40S e fatores associados, dentro do complexo 48S, ao longo da região 5’ não traduzida do mRNA, até alcançar o códon AUG que sinaliza o inicio da sequência codificante. Nesta etapa atuam o eIF4A, outra subunidade do complexo eIF4F, que com ajuda do eIF4B possui atividade helicase e remove estruturas secundarias do mRNA. Ao alcançar o códon AUG, este é identificado por meio do pareamento de suas bases com as bases do anticódon do tRNAi.

4) Liberação dos fatores do complexo 48S, através da ação do fator eIF5. Este desencadeia a hidrólise do GTP-eIF2 resultando na dissociação da maioria dos fatores associados ao complexo. Isto permite que a subunidade ribossomal maior 60S seja recrutada para formação do ribossomo 80S, deixando o tRNAi no sitio P ribossomal. Esta última etapa é mediada pelo eIF5B e requer a hidrólise de mais uma molécula de GTP (Prévôt *et al.,* 2003; Hinnebusch, 2014).

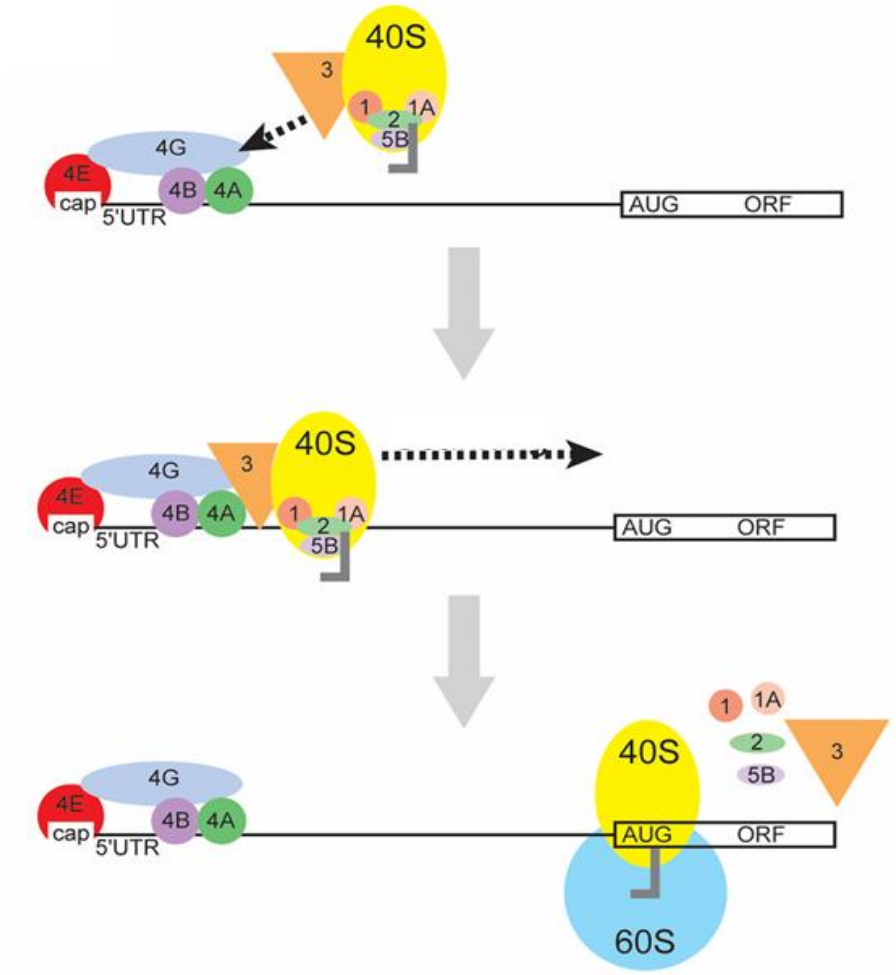


Figura 6. Esquema representativo da iniciação da tradução nos eucariotos em geral. No inicio da tradução *cap*-dependente, o *cap* m7GTP está ligado ao eIF4E (vermelho) e este por sua vez interage com outros fatores de iniciação adicionais. O recrutamento da subunidade menor ribossomal (amarelo) e associação aos fatores ocorre através da interação do eIF4G com o eIF3 (laranja). A subunidade 40S contendo o complexo de pré-iniciação então procura o códon de iniciação da tradução AUG. O reconhecimento do códon de iniciação e a hidrólise de duas moléculas de GTP permitem que os fatores de iniciação se dissociem e a subunidade maior (azul) se junte a menor, criando um ribossomo 80S competente para a tradução. Fonte: adaptado de (Plank e Kieft, 2012)

2.3.1 Complexo eIF4F

O complexo eIF4F, com o apoio do fator eIF4B, desempenha funções críticas durante a iniciação da tradução, que parecem depender da sua interação com a PABP (proteína de ligação ao poli-A ou *Poly-A Binding Protein*) (Figura 7). O eIF4F atua no desenrolamento da região 5′-UTR do mRNA através de sua função helicase, uma função estimulada pelo eIF4B. Além disso, media a ligação do complexo 43S ao mRNA e auxilia no rastreamento da região 5′-UTR em busca do códon de iniciação da tradução (Jackson *et al.,* 2010; Hinnebusch, 2014). Este complexo é composto por três proteínas, o eIF4A, eIF4E e eIF4G. As funções de cada um dos componentes deste complexo vêm sendo bem estabelecidas por estudos em vários organismos e sistemas (Tuteja, 2009).

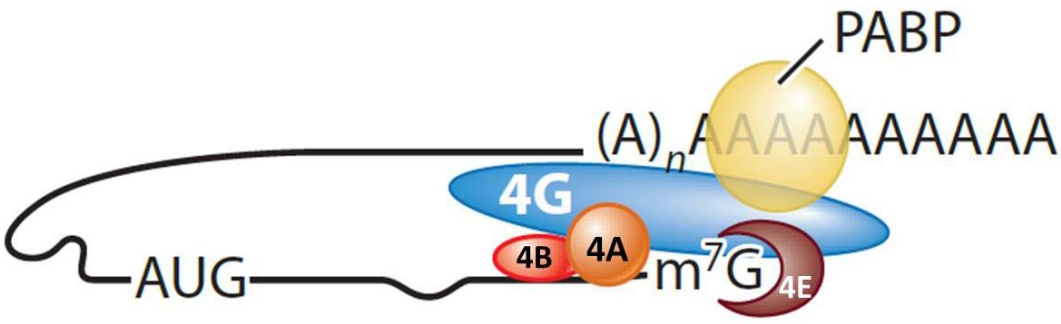


Figura 7. Complexo eIF4F, eIF4B e PABP. O esquema representa a atuação do complexo eIF4F junto com os parceiros eIF4B e PABP durante a iniciação da tradução. O complexo eIF4F é composto pela união dos fatores eIF4E, eIF4A e eIF4G. Os nomes dos fatores estão abreviados, onde 4E: eIF4E, 4A: eIF4A, 4G: eIF4G e 4B: eIF4B. Fonte: adaptado de (Hinnebusch, 2014).

2.3.1.1 eIF4A – RNA helicase

O eIF4A é uma RNA helicase com atividade dependente de ATP, pertencente à família DEAD-box da superfamília das helicases II. Estas são RNA helicases que contem o domínio DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ou DExD/H (Asp-Glu-

X-Asp-His), onde X representa qualquer aminoácido (Jackson *et al.,* 2010). O eIF4A típico é uma proteína de cerca de 46 kDa que é responsável por desenrolar estruturas secundárias do mRNA, contribuindo assim para a ligação da subunidade ribossomal 40S na região proximal a estrutura *cap*. Durante o rastreamento do complexo de iniciação 43S pelo mRNA até o códon de iniciação o eIF4A é indispensável se existirem elementos de estruturas secundárias na região 5' UTR do mRNA a ser traduzido (Marintchev e Wagner, 2004). A atividade helicase e ATPase do eIF4A livre é baixa, mas é altamente estimulada quando o eIF4A é parte de um complexo multiproteico com os fatores eIF4G, eIF4E, eIF4B e eIF4H (Marintchev *et al.,* 2009).

2.3.1.2 eIF4G – proteína multidomínio do complexo eIF4F

No centro do complexo eIF4F está o eIF4G, uma proteína grande que fornece a plataforma para ligação de vários fatores de iniciação. O eIF4G recruta a subunidade ribossomal menor ao mRNA através de interações com o eIF4E e o complexo eIF3. Também promove a circularização do mRNA através da interação com a proteína de ligação ao poli-A, a PABP (Marintchev *et al.,* 2009). Desempenha não só papel central na coordenação destes fatores como também aumenta suas atividades durante as primeiras etapas da iniciação da tradução. Desta forma, o eIF4G estimula a atividade de ligação ao *cap* pelo eIF4E, a atividade de RNA helicase do eIF4A e a atividade de ligação a cauda poli (A) da PABP (Pestova e Hellen, 2000). Diversos sítios de ligação são encontrados no eIF4G: na região N-terminal, estão localizados os sítios para a PABP e para o eIF4E; esta região é seguida por domínio HEAT envolvido na ligação ao eIF4A,

mRNA e eIF3 (Marintchev e Wagner, 2004). Em humano, o eIF4G contém três domínios repetitivos HEAT. Os dois primeiros deles, HEAT-1/MIF4G e HEAT-2/MA3 ligam a eIF4A. O HEAT-1 estimula a atividade helicase do eIF4A, enquanto HEAT-2 tem apenas um papel modulatório. O HEAT-3/W2 possui um sítio de ligação para a proteína quinase do eIF4E (Mnk1) e, junto com o HEAT-2, está na região C-terminal da proteína (Preiss e Hentze, 2003; Marintchev *et al.,* 2009).

2.3.1.3 eIF4E – proteína de ligação ao *cap*

O eIF4E é uma fosfoproteína pequena com cerca de 24 kDa que exibe elevada afinidade pela estrutura *cap* presente na extremidade 5' de praticamente todos os mRNAs eucarióticos (Prévôt *et al.,* 2003). As proteínas da família eIF4E são encontradas em diversos organismos, normalmente com múltiplos homólogos por espécie, sendo pelo menos um destes homólogos envolvido com a síntese proteica e os demais relacionados a outras funções (Joshi *et al.,* 2005; Rhoads 2009). Esta proteína tem uma estrutura côncava-convexa com a região de ligação ao *cap* na superfície côncava. Em mamíferos, o reconhecimento específico desta estrutura ocorre pela interação entre dois dos resíduos altamente conservados de triptofano, encontrados nas posições 56 e 102, que empacotam a guanosina metilada do *cap*. A maioria dos parceiros funcionais do eIF4E se ligam na superfície convexa da estrutura, como o eIF4G por exemplo, no qual envolve outro resíduo de triptofano, o W73 (Figura 8) (revisado por (Goodfellow e Roberts, 2011))

A proteína eIF4E pode ter sua função regulada por fosforilação. Em mamíferos, essa regulação ocorre através da fosforilação da serina 209 pelas quinases Mnk1e Mnk2. As Mnks interagem com o eIF4G, através de seu domínio C-terminal, que funciona como sítio de ancoragem para as quinases permitindo que as mesmas se posicionem próximas ao seu substrato principal, o eIF4E (Gingras *et al.,* 1999). Esta é uma das razões para que a interação entre eIF4G e eIF4E aumente consideravelmente a afinidade do eIF4E pela estrutura *cap* (Prévôt *et al.,* 2003). As proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BP) também regulam esta proteína, pois competem com o eIF4G pela ligação ao eIF4E, e uma vez ligadas, inibem a tradução, pois sequestram o eIF4E e evitam assim a interação eIF4E-eIF4G (Marintchev e Wagner, 2004).

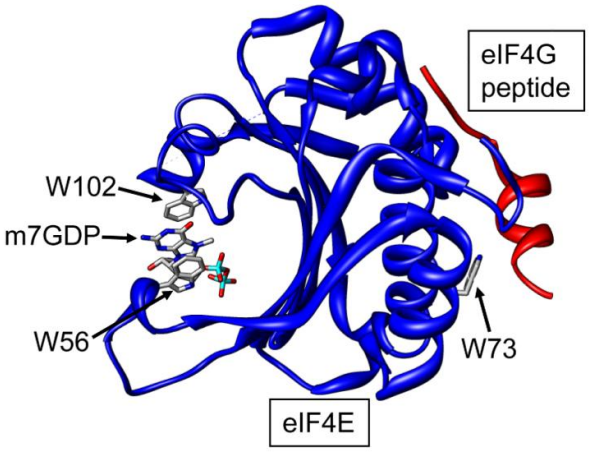


Figura 8. Estrutura tridimensional do eIF4E de camundongo. A estrutura representa o eIF4E em complexo com a estrutura *cap* (m7GDP) e um peptídeo do eIF4G (vermelho). Resíduos importantes para ligação ao *cap* (W56 e W102) e ligação ao eIF4G (W73) estão apontados pelas setas. Fonte: Adaptado de (Goodfellow e Roberts, 2011).

2.3.5 Complexo eIF3

O eIF3 é o maior dos fatores de iniciação, tanto em tamanho quanto em número de subunidades. Em mamíferos este complexo é formado por treze

subunidades, nomeadas de -a até -m de acordo com o peso molecular decrescente de cada uma das subunidades. Em contraste, em *Saccharomyces cerevisae* este complexo é composto por cinco subunidades essenciais (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g e eIF3i) e a subunidade não essencial eIF3j. As cinco subunidades essenciais de *S. cerevisae* são definidas como “núcleo conservado”, pois parecem ser conservadas em todos os eucariotos (revisado por ((Lefebvre *et al.,* 2006; Dong e Zhang 2006; Hinnebusch 2006; Valasek, 2012)).

O complexo eIF3 se encontra ativo durante várias etapas do processo de iniciação da tradução e apresenta uma variedade de funções. Dentre estas o eIF3 é capaz de (I) interagir com a subunidade menor ribossomal (40S) e com outros fatores de iniciação da tradução como o eIF1, eIF4G e o eIF5; (II) estimular a ligação do complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNAi) a subunidade 40S; (III) promover a ligação do complexo de pré iniciação (43S) ao mRNA e o subsequente rastreamento do códon de iniciação; e (IV) possuir atividade de dissociação e anti-associação dos ribossomos, evitando a associação prematura das subunidades 40S e 60S (Jackson *et al.,* 2010)

O complexo eIF3 humano compartilha uma homologia com dois outros complexos que não apresentam funções relatadas: o signalossoma COP9 e o proteassoma 19S. Todos os três complexos consistem de seis subunidades com domínios PCI (Proteasome, COP9, eIF3) e duas com domínio MPN (Mpr1-Pad1 N-terminal). O eIF3 ainda possui cinco subunidades não-PCI/MPN (Figura 9). Estudos de dissociação e análises de espectrometria de massa mostraram que o eIF3 de mamíferos possivelmente consiste de três subcomplexos estáveis: (I) formado pelas subunidade eIF3a, eIF3b, eIF3i e eIF3g; (II) formado pelas subunidade eIF3c, eIF3d, eIF3e, eIF3l e eIF3k e (III) formado pelas subunidade

eIF3f, eIF3h e eIF3m que possivelmente interagem através dos domínios PCI/MPN (Zhou *et al.,* 2008).

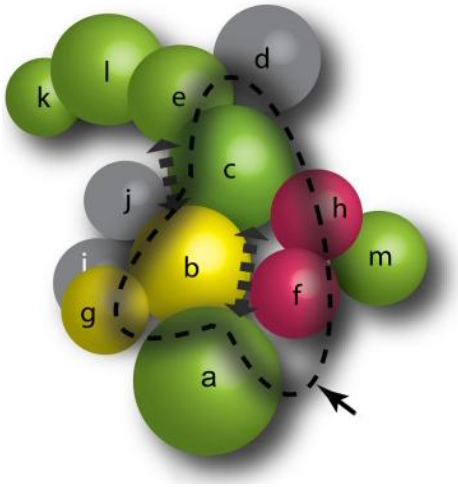


Figura 9. Modelo proposto para o complexo eIF3. O modelo mostra a organização das subunidades (a-m) por cores de acordo com os diversos domínios contidos nas mesmas. Em verde, as que contêm domínio PCI; em vermelho, as que contem domínios MPN e em amarelo, as que contem motivos para reconhecimento de RNA (RRM). As subunidades que não tem nenhum domínio comum são mostradas em cinza. A linha pontilhada representa as subunidades capazes de interagir com a sequência IRES nas traduções cap-independente. Fonte: Adaptado de (Zhou *et al.,* 2008).

2.3.2.1 eIF3a

O eIF3a, a maior subunidade do complexo eIF3, é caracterizada pela presença de um domínio PCI seguido por um domínio espectrina, típico das proteínas de ligação a actina, (revisado por (Saletta *et al.,* 2010)) e um domínio repetitivo de 10 aminoácidos (Pincheira *et al.,* 2001)**.** O domínio espectrina foi recentemente visto mediando a ligação com eIF3a ao eIF3b e ao eIF3i humano (Dong *et al.,* 2013). Em *S. cerevisae* a subunidade eIF3a interage com o eIF1 (Asano *et al.,* 2000; Valásek *et al.,* 2004) e em mamíferos este domínio repetitivo contribui para a interação com o eIF4B (Méthot *et al.,* 1996; Vornlocher *et al.,* 1999). Além do papel na iniciação da tradução e a regulação da tradução dos

mRNAs, o eIF3a tem mostrado importante papel em vários outros processos celulares (Dong e Zhang, 2006; Dong *et al.,* 2009).

2.3.2.2 eIF3b

O eIF3b é uma proteína estruturadora dentro do complexo eIF3, caracterizada pela presença de um domínio RRM não canônico (revisado por (Dong e Zhang, 2006)). Sua região C-terminal consiste de um longo segmento contendo domínios repetitivos WD, que servem com uma plataforma onde as proteínas interagem e participam na formação do complexo multiproteico (Smith *et al.,* 1999). O RRM do eIF3b está envolvido em várias interações proteina-proteina como com os eIF3a, eIF3j e eIF3e (Shalev *et al.,* 2001; Dong e Zhang, 2006; Elantak *et al.,* 2007). Em contraste o domínio repetitivo WD em *S. cerevisae* tem sido mostrado envolvido na ligação ao eIF3g e ao eIF3i (Herrmannová *et al.,* 2012).

2.3.2.3 eIF3c

A subunidade conservada e essencial eIF3c interage com eIF3a e as duas proteínas formam um dímero central no complexo eIF3 que interage com o subcomplexo conservado eIF3b/eIF3g/eIF3i (Sun *et al.,* 2011). Em leveduras, além da interação com o eIF3a (Dong e Zhang, 2006), o eIF3c também é capaz de interagir com outros fatores de iniciação das tradução. Dentre estes, se destaca a interação com o eIF5 (Asano *et al.,* 2000; Valásek *et al.,* 2004) e as interações com eIF1 ou eIF1A, as quais foram identificadas tanto em leveduras

(Asano *et al.,* 2000) quanto em humanos (Sun *et al.,* 2011; Sokabe e Fraser, 2014).

2.3.2.4 eIF3d

O eIF3d é uma das subunidades que não pertencem ao chamado núcleo conservado. Em mamíferos estudos anteriores mostram que este fator é capaz de ligar ao 18S RNA (Nygard e Westermannt, 1982). Em *S. pombe* o homólogo do eIF3d, Moe1, é requerido para associação estável do complexo (Bandyopadhyay *et al.,* 2002). Em humanos, o fator eIF4G interage com os fatores eIF3c, eIF3d e eIF3e para promover o recrutamento do mRNA ao ribossomo (Villa *et al.,* 2013) e estudos para reconstituir o complexo eIF3 mostram que a presença do eIF3d é necessária para promover uma alta afinidade na interação com o eIF4G (Sun *et al.,* 2011).

2.3.2.5 eIF3e

O eIF3e também não pertence ao núcleo conservado do eIF3 e é caracterizado por possuir um domínio PCI e também uma sequência de exportação nuclear (NES) no domínio N-terminal (Dong e Zhang, 2006). Em ambos os domínios os 20 primeiros aminoácidos são conservados (Nunes *et al.,* 2008). Em humanos a sublocalização celular do eIF3e é dependente da fase do ciclo celular e do estado de transformação. Esta variação na localização entre compartimentos celulares indica que a regulação da sua função acontece durante a progressão do ciclo celular (Dong e Zhang, 2006). O eIF3e controla a

fosforilação do eIF4E regulando o recrutamento da quinase Mnk1 ao complexo eIF4F. Isso ocorre independentemente das vias de sinalização do Mnk1 e demonstra que eIF3 não é requerido apenas para recrutar o 40S ao eIF4F como também regular sua atividade (Walsh e Mohr, 2014)**.** Além disso, a subunidade eIF3e seria a responsável pela interação direta do eIF3 e a isoforma eIF4GI de mamíferos, sendo esta interação essencial para trazer o mRNA e todas as proteínas associadas ao eIF4G ao complexo de pré-iniciação da tradução 43S (Lefebvre *et al.,* 2006).

2.3.2.6 eIF3g

Esta proteína pertence ao núcleo conservado do complexo eIF3 em *S. cerevisiae*, sendo essencial para brotamento e fissão das espécies de leveduras (revisado por (Dong e Zhang, 2006; Hinnebusch, 2006). Em plantas, a região N-terminal do eIF3g esta envolvida na ligação ao eIF3i (Park *et al.,* 2004). Além disso, o eIF3g também possui um domínio do tipo “Dedos de Zinco” que esta envolvido na interação com o eIF4B e com a proteína transativadora viral (TAV) do Caulimovírus (Park *et al.,* 2001; Park *et al.,* 2004). Em humanos foi sugerido que o eIF3a media diretamente a ligação com eIF3b e eIF3i para formação do subcomplexo eIF3a/eIF3b/eIF3i/eIF3g, entretanto a associação do eIF3g ao subcomplexo é mediada pelo eIF3b (Dong *et al.,* 2013)

2.3.2.7 eIF3f e eIF3h

Estas duas subunidades não pertencem ao núcleo conservado do eIF3 e estão associadas como um dímero que parece interagir com o eIF3m, formando o terceiro subcomplexo estável do eIF3: eIF3f/eIF3h/eIF3m (Zhou *et al.,* 2008). Estas proteínas são caracterizadas pela presença do domínio MPN, contendo subunidades filogeneticamente relacionadas a proteínas do proteassoma (Rpn11, Rpn8) e do signalossoma COP9 (Csn5, Csn6). O eIF3f está mais relacionado com a subunidade Rpn8 do proteassoma e subunidade Csn6 do signalossoma, enquanto eIF3h está mais relacionado com a subunidade Rpn11 do proteassoma e subunidade Csn5 do signalossoma (revisado por (Kim *et al.,* 2001)).

2.3.2.8 eIF3i

O eIF3i é outro componente do núcleo conservado e também essencial para a tradução (revisado por (Hinnebusch, 2006; Valasek, 2012). Este é caracterizado pela presença do domínio repetitivo WD, bem conservado nas diferentes espécies de eucariotos, e que parecem ser importante para interação com outras subunidades e para a estabilidade do complexo (Asano *et al.,* 1998). Além deste domínio, vários outros resíduos de aminoácidos mapeados na região C-terminal do eIF3i de leveduras participam na interação com eIF3b (Herrmannová *et al.,* 2012). Em leveduras de brotamento, o eIF3i é capaz de interagir com o eIF3g porém a ligação é fraca comparada a capacidade do eIF3i se associar com o eIF3a e do eIF3g com o eIF3b (Wagner *et al.,* 2014).

2.3.2.9 eIF3j

O eIF3j é uma subunidade não é essencial em leveduras, altamente conservada e que está frouxamente associada ao complexo eIF3, tendo um importante papel mediando a ligação à subunidade 40S (revisado por (Dong e Zhang, 2006; Hinnebusch, 2006; Valasek 2012)). Tanto em mamíferos quanto em *S. cerevisiae* o complexo eIF3 interage com a subunidade ribossomal 40S através da subunidade eIF3j, juntamente com o eIF3b (Fraser *et al.,* 2004; Nielsen *et al.,* 2004). O eIF3j estabiliza o complexo eIF3 na subunidade 40S (Sokabe e Fraser, 2014), porém este facilmente se dissocia do complexo eIF3 durante a purificação, com isto se assume que esta proteína não é uma parte integral do eIF3 ou do 43S (Fraser *et al.,* 2007).

2.3.2.10 eIF3k, eIF3l e eIF3m

Estas são as subunidades do eIF3 que foram caracterizadas mais recentemente. Todas as três possuem o domínio PCI e são encontradas em animais, plantas e fungos filamentosos, porém as duas primeiras (eIF3k e eIF3l) estão ausentes em *S. pombe* e *S. cerevisae* (Burks *et al.,* 2001), o que pode indicar um papel regulador especializado para o complexo eIF3 de eucariotos mais superiores (Mayeur *et al.,* 2003). A subunidade eIF3m, apesar de ausente em *S. cerevisae*, é essencial para a tradução em leveduras de fissão, indicando que subunidades mesmo não pertencentes ao núcleo conservado podem ser requeridas para atividades do eIF3 ou para executar funções regulatórias essenciais para viabilidade (Zhou *et al.,* 2005).

2.3.3 A proteína de ligação ao poli-A (PABP)

A proteína de ligação ao poli-A (PABP) participa de praticamente todos os eventos mRNA-dependentes, uma consequência de sua alta afinidade às sequências de adenosina presentes nos mRNAs. Além de mRNAs, as PABPs interagem com muitas outras proteínas, promovendo assim o seu envolvimento em vários eventos celulares. No núcleo, as PABPs desempenham um papel na poliadenilação, determinando o comprimento da cauda poli-A e podem estar envolvidas na exportação de mRNAs. No citoplasma, participam na iniciação da tradução através da interação com o complexo eIF4F. Também agem combatendo a degradação dos mRNAs, através da ligação a sua cauda poli-A, ou estimulando seu decaimento, através de interações do mRNA com complexos proteicos com função de deadenilase (revisado por (Eliseeva *et al.,* 2013)).

A estrutura da PABP pode ser dividida em: uma porção N-terminal, a qual possui quatro domínios de ligação ao RNA (RRMs) altamente conservados que estão envolvidos na ligação específica ao poli-A e ao eIF4G; e uma porção C-terminal que contém um domínio de interação proteína-proteína também conservado (PABC), onde ocorre interação com fatores de terminação e proteínas de interação a PABP, Paip1 e Paip2 (Uchida *et al.,* 2002). Entre esses dois domínios a PABP possui ainda uma região de conexão não tão conservada que, entretanto, parece estar envolvido em processos de multimerização, onde moléculas de PABP se associam umas às outras presas à cauda poli-A dos mRNAs (Melo *et al.,* 2003)

2.4 Fatores de iniciação da tradução em tripanosomatídeos

Com o avanço da biologia molecular e a finalização dos genomas do TriTryps, a caracterização da síntese proteica nos tripanosomatídeos vem sendo alvos de várias pesquisas. Contudo, ainda falta muito a ser estudado, haja vista a grande complexidade desses organismos e sua divergência em relação a outros eucariotos mais conhecidos. O estudo da iniciação da tradução nos tripanosomatídeos pode não apenas ajudar a definir características divergentes específicas, úteis na identificação de potenciais alvos terapêuticos, mas também pode melhorar a compreensão sobre a evolução e conservação de todo o processo ao longo das linhagens eucarióticas (Rezende *et al.,* 2014). Diversas sequências homólogas foram encontradas para a maioria das proteinas envolvidas na iniciação da tradução presentes nos demais eucariotos, e aquelas relevantes para o estudo atual serão discutidas a seguir.

2.4.1 EIF4A

Dois homólogos de eIF4A foram descritos em tripanosomatídeos, tanto em *L. major* quanto em *T. brucei*. Estes foram denominados de EIF4AI e EIF4AIII, por conta de terem sido identificados como ortólogos dos eIF4Ai e eIF4AIII de mamíferos, possuem 403 e 389 aminoácidos e 59% e 52% de similaridade com a proteína eIF4AI de humano, respectivamente. Os estudos realizados confirmaram que apenas um dos dois homólogos identificados nos tripanosomatideos, o EIF4AI, está envolvido na tradução. Estas proteínas diferem em abundância, na sua localização subcelular e apenas o EIF4AI, citoplasmático, se liga

especificamente ao domínio HEAT de um dos homólogos de EIF4G de *Leishmania* (Dhalia *et al.,* 2005; Dhalia *et al.,* 2006)

2.4.2 EIF4G

No caso do EIF4G, foram encontrados e caracterizados cinco homólogos, tanto em *L. major* quanto em *T. brucei* (EIF4G1-5) (Dhalia *et al.,* 2005; Yoffe *et al.,* 2006; Yoffe *et al.,* 2009). Através de ensaios de interação foi avaliada a capacidade de dois homólogos do EIF4G de se ligar a homólogos de EIF4E e EIF4A. Assim, foi observado que os EIF4G3 e EIF4G4 reconhecem especificamente o EIF4AI e que ocorre interação entre o EIF4G4 e o EIF4E3 e entre o EIF4G3 e o EIF4E4 (Dhalia *et al.,* 2005; Freire *et al.,* 2011). Com isso foram inicialmente confirmados dois complexos do tipo eIF4F, EIF4E3/EIF4G4/EIF4AI e EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI.

Em *T. brucei,* foi visto que o silenciamento do EIF4G3 afeta tanto o crescimento das células quanto a síntese protéica, enquanto que o silenciamento do EIF4G4 não tem impacto significativo na tradução. Contudo, a perda de viabilidade celular após o EIF4G4 ser silenciado e as similaridades de sequência e estruturas com o EIF4G3, são indicativos de uma função essencial para sobrevivência das células. É sugerido então que o complexo formado por EIF4G4/EIF4E3 tenha um papel mais seletivo na tradução, como por exemplo, a tradução de mRNAs específicos. Com isso, o complexo EIF4G3/EIF4E4, teria função principal na tradução (Moura *et al.,* 2015). É válido ressaltar que os outros homólogos do EIF4G (EIF4G1, EIF4G2 e EIF4G3) parecem participar de outros

complexos com outros homólogos do EIF4E e que estes não têm papel central no processo de tradução (Freire *et al.,* 2014b; Freire *et al.,* 2014a).

2.4.3 EIF4E

Para o fator de ligação ao *cap* foram identificados e caracterizados seis homólogos tanto em *L. major* quanto em *T. brucei* (EIF4E1 a EIF4E6) (Yoffe *et al.,* 2004; Dhalia *et al.,* 2005; Yoffe *et al.,* 2006; Freire *et al.,* 2014b). Os homólogos de EIF4E4 de ambas as espécies variam em tamanho, quanto a capacidade de ligação ao *cap,* localização subcelular e na importância para viabilidade celular (Jagus *et al.,* 2012; Zinoviev *et al.,* 2012).

Os quatro primeiros homólogos de eIF4E de tripanosomatídeos foram os mais bem caracterizados nos tripanosomatídeos. Ensaios de ligação ao *cap* mostraram que EIF4E1 e EIF4E4 de *Leishmania* tem a capacidade de se ligar especificamente tanto ao *cap* tetrametilado (*cap4*) de tripanosomatídeos quanto ao *cap* monometilado clássico (Dhalia *et al.,* 2005; Yoffe *et al.,* 2006). Esses mesmos homólogos não são capazes de interagir com a eIF4E-BP1 de mamíferos (Yoffe *et al.,* 2006). Estudos utilizando RNAi para investigar a viabilidade destes quatro homólogos de *T. brucei* separaram estas proteínas em dois grupos. Os homólogos EIF4E1 e 2 não estariam diretamente envolvidos na tradução, mas com funções essenciais para a viabilidade celular. Já os homólogos EIF4E3 e EIF4E4, que são mais abundantes e citoplasmáticos, provavelmente estariam envolvidos na iniciação da tradução. Além disso, em ensaios de interação proteína-proteína foi possível observar as seguintes

interações com homólogos do eIF4G: EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3 (Freire *et al.,* 2011).

Recentemente foi observado através de espectrometria de massa que o EIF4E4 em *L. amazonenses* interage com homólogos de outros fatores de iniciação da tradução, além do EIF4G3, como homólogos de eIF5, eIF5B, subunidades dos eIF3 e eIF2, além das PABP1 e 2 e algumas proteínas ribossomais (Zinoviev *et al.,* 2011). Outro estudo com *L. amazonensis* mostrou que o EIF4E3 interage com o EIF4G4, porém dificilmente se liga ao *cap4*. Além disso, o EIF4G4 não migra com os polissomas em gradientes de sacarose e o EIF4E3 só é capaz de migrar em algumas situações. Por esta razão provavelmente não atuam na iniciação da tradução global (Zinoviev *et al.,* 2012). Visto isto o fator EIF4E4 parece ser o principal candidato a atuar na iniciação da tradução, o que é reforçado por sua ligação ao EIF4G3 e pelo papel observado deste último na tradução (Moura *et al.,* 2015).

Em relação aos homólogos EIF4E5 e EIF4E6, identificados mais recentemente e melhor caracterizados em *T. brucei,* foi visto que ambos são capazes de se ligar a *cap,* contudo não são essenciais para a sobrevivência da célula. O EIF4E5 interage com os homólogos EIF4G1 e EIF4G2, enquanto que o EIF4E6 interage com EIF4G5. Ambos interagem ainda com outras proteínas hipotéticas, porém com homologia a enzimas associadas a formação do *cap* (Freire *et al.,* 2014b; Freire *et al.,* 2014a).

2.4.4 PABP

Os primeiros homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* foram identificados de uma forma pioneira ainda antes da elucidação dos genomas destes tripanosomatídeos (Batista *et al.,* 1994; Pitula *et al.,* 1998; Bates *et al.,* 2000). Com a conclusão do sequênciamento destes genomas, três homólogos desta proteína foram encontrados nas sequências do genoma de *L. major* (PABP1, PABP2 e PABP3) com apenas as duas primeiras conservadas em *T. cruzi* e *T. brucei*. Os estudos das PABPs em *Leishmania* indicam que a PABP1, participa do complexo principal formado pelo EIF4G3/EIF4E4/EI4AI e parece desempenhar as funções já definidas para PABP na tradução. Já as PABPs 2 e 3, proteínas abundantes e constitutivamente expressas mas que se ligam aos mesmos mRNAs, distintos daqueles onde se liga a PABP1, podem ter funções diferenciadas em relação ao que se conhece nos demais eucariotos. Na presença de inibidores transcricionais as PABPs 2 e 3 migram para o núcleo enquanto a PABP1 permanece predominantemente no citoplasma (da Costa Lima *et al.,* 2010).

2.4.5 eIF3

Várias ferramentas de bioinformática foram aplicadas para uma pesquisa sistemática nos genomas dos tripanosomatídeos e de outros protozoários pertencentes ao supergrupo Excavata (*Trichomonas* e *Giardia* sp.) visando identificar homólogos das várias subunidades do eIF3 (Rezende *et al.,* 2014). Os principais alvos foram os genomas dos tripanosomatideos *L. major* (Ivens *et al.,*

2005) e *T. brucei* (Berriman *et al.,* 2005), e também sequências de *Giardia duodenalis* (Plutzer *et al.,* 2010) e de *Trichomonas vaginalis*. Nestas análises onze subunidades de ortólogos para eIF3 foram encontrados em *L. major* e *T. brucei* e a presença de um complexo eIF3 quase completo em tripanosomatideos (com exceção do eIF3f e eIF3m), sugere que este seria estruturalmente semelhante ao eIF3 de humano. Isto contrasta com a redução substancial do número de subunidades eIF3 encontradas em outros protozoários, sendo apenas cinco subunidades encontradas para *T. vaginalis* (eIF3c, eIF3h, eIF3b, eIF3d e eIF3i) e quatro para *G. duodenalis* (eIF3c, eIF3b, eIF3i e eIF3j). Com isso, os resultados indicam que apesar de um elevado grau de conservação das subunidades eIF3 na maior parte dos eucariotos, há vários indícios da simplificação do complexo. A presença das subunidades eIF3b, eIF3c e eIF3i em todos os protozoários do estudo sugere ainda um provável papel central para estas subunidades na função do eIF3 (Rezende *et al.,* 2014). Com base nestas análises de bioinformática realizadas, segue-se uma breve descrição do que se conseguiu definir a respeito de cada uma das subunidades do complexo eIF3 de tripanosomatídeos e outros protozoários:

eIF3a - Foram identificados ortólogos do eIF3a em tripanosomatideos, mas com um baixo grau de similaridade com o eIF3a humano. Quando alinhados com múltiplos ortólogos de outras espécies, entretanto é observado vários aminoácidos conservados assim como domínios PCI e espectrina preditos. A similaridade entre as diferentes sequências é maior na região N- terminal o que implica uma maior conservação na propriedade de ligação ao 40S, eIF3c e eIFs envolvidos no reconhecimento do códon AUG, todos associados com a região N-

terminal do eIF3a. Em protozoários como *T. vaginalis* e *G. duodenalis* nenhuma sequência equivalente foi encontrada do eIF3a.

eIF3b - Ortólogos do eIF3b foram claramente identificados em tripanosomatídeos. A conservação das sequências quando comparadas com os eucariotos multicelulares é mais evidente nos domínios repetitivos WD da região C-terminal enquanto a conservação do domínio RRM é mais restrita na região final do N-terminal. Também foi encontrado prováveis ortólogos do eIF3b para *T. vaginalis e G. duodenalis,* com as duas proteínas contendo domínios repetitivos WD e RRM, mas compartilhando pouca identidade com outros homólogos do eIF3b.

eIF3c - Ortólogos do eIF3c também foram claramente encontrado em tripanosomatídeos. Comparando com outras proteínas do complexo eIF3, a eIF3c é mais conservada do que a eIF3a porém menos conservada do que eIF3b. A região com maior grau de conservação engloba o domínio PCI. Outras características observadas é uma região rica em glicina na porção C-terminal assim como no eIF3c de plantas (e em humanos porém com número de glicinas reduzido) e ausente em fungos, e também duas fenilalaninas consecutivas conservadas na região N-terminal. Prováveis ortólogos para esta subunidade foram identificados em *T. vaginalis* e *G. duodenalis* anotados apenas como proteínas hipotéticas.

eIF3d - Apesar da ausência em organismos como, por exemplo, em *S. cerevisae*, o eIF3d esta presente nos tripanosomatideos. Em adição, um candidato para *T. vaginalis* foi encontrado, embora nenhum ortólogo do eIF3d em *G. duodenalis* foi identificado. Um alinhamento de várias sequências revelou a existência de muitas regiões conservada distribuídas ao longo da sua extensão

que são bons candidatos para investigar a função do eIF3d. Este inclui vários resíduos de aminoácidos na região N-terminal que talvez estejam envolvidas na interação com o RNA, assim como a ácida região C-terminal.

eIF3e - Ortólogos de eIF3e foram encontrados em tripanosomatídeos que são em geral mais conservados do que as subunidades previamente descritas. O alinhamento entre as sequências de tripanosomatideos com outros eucariotos revelou vários elementos conservados dentro do domínio PCI. Todos os ortólogos compartilham seguimentos conservados que coincide com a região N-terminal da proteína de humano e onde uma sequência de localização nuclear (NES) foi mapeada (Guo e Sem, 2000). Apesar de sua conservação em tripanosomatídeos, nenhum ortólogo de eIF3e foi encontrado para *T. vaginalis* e *G. duodenalis*.

eIF3f e eIF3h - Para estas subunidades foi encontrada certa dificuldade nas análises através do BLAST dos principais bancos de dados genômicos de *T. brucei* e *L. major*, visto que estas proteínas possuem elevada homologia com proteínas encontradas no proteassoma e no signalossoma. No entanto, através de uma ferrramenta usada para procurar por proteínas distantemente relacionadas dentro do proteossoma de vários organismos, foram encontrados dois genes vizinhos codificando para proteínas ortólogas do eIF3h em tripanosomatídeos. As análises em *T. vaginalis* e *G. duodenalis* em busca de ortólogos também encontrou proteínas do proteassoma, mas para *T. vaginalis*, um destes foi identificado como provável ortólogo do eIF3h.

eIF3g - Ortólogos do eIF3g foram encontrado em *T. brucei* e em *L. major*, mas não foram encontrados em organismos como *T. vaginalis* ou *G. duodenalis,* o que sugere que a função do complexo eIF3 pode ocorrer na ausência dessa subunidade. O alinhamento com outros eucariotos mostrou que a conservação

dentro dos tripanosomatideos é principalmente restrita ao domínio RRM na região C-terminal. Isso mostra que o eIF3g é requerido para atividade de ligação ao RNA (Hanachi *et al.,* 1999; Block *et al.,* 1999). No entanto, também é observada similaridade na região N-terminal, que está envolvida na ligação ao eIF3i (Park *et al.,* 2004).

eIF3i - Os ortólogos do eIF3i em tripanosomatideos são claramente identificados pelo tamanho e características similares as demais sequências de eucariotos mas com maior conservação no final da regiões N- e C-terminal. De um total de 12 resíduos envolvidos na ligação eIF3i-eIF3b, oito são conservados em tripanosomatideos. Além disso, também foram identificados ortólogos em *T. vaginalis* e *G. duodenalis* e um possível ortólogo na Arqueobactéria *Methanocaldococcus jannaschii*. Visto isso o eIF3i foi a única subunidade eIF3 do qual um ortólogo representante foi encontrado para o organismo Arqueano. Estas análises sugerem uma maior importância para esta subunidade que tem sido negligenciada até o momento.

eIF3j - Homólogos do eIF3j foram encontrados nos tripanosomatideos bem como em *G. duodenalis,* embora nenhum homólogo tenha sido identificado em *T. vaginalis.* Estes, entretanto possuem um baixo nível de identidade quando comparados com o bem caracterizado eIF3j de mamíferos e fungos, sendo todas as proteínas ainda anotadas como hipotéticas. A presença de homólogos eIF3j em eucariotos divergentes mostra que este deve desempenhar um papel importante na iniciação da tradução, apesar de sua natureza não-essencial em *S. cerevisiae*.

eIF3k, eIF3l e eIF3m - O eIF3k é a menor subunidade e é encontrada em tripanosomatideos, com tamanho similar a observados em outros organismos. A

similaridade entre os ortólogos de eIF3k e a proteína humana é baixa mas a sequência é conservados dentro da família Tripanosomatidae. O eIF3l também foi encontrado em tripanosomatídeos com tamanhos e características similares ao demais eucariotos. Em contraste, não foi clara a presença de ortólogos do eIF3m nas sequências de *T. brucei e L. major*, constituindo, junto com o eIF3f, uma das duas únicas subunidade de eIF3 não encontrada nos tripanosomatídeos por meio das análises de bioinformática. Não foram encontrados ortólogos para nenhuma destas três subunidades em *T. vaginalis* ou *G. duodenalis*.

Com intuito avaliar a constituição e função do complexo de iniciação da tradução eIF3 em tripanossomatídeos, este trabalho procurou identificar as subunidades componentes do complexo, criando ferramentas que permitam a análise de interações deste com complexos de iniciação das tradução do tipo eIF4F, reconhecendo semelhanças e diferenças deste processo entre tripanossomatídeos e eucariotos mais complexos.

3. Objetivos

3.1 Geral

Contribuir na identificação e caracterização do modo de ação *in vivo* do complexo eIF3 investigando sua associação com subunidades do complexo eIF4F de iniciação da tradução.

3.2 Específicos

1 - Avaliar a composição do complexo eIF3 em *L. infantum*.

2 - Expandir o número de fatores de iniciação da tradução superexpressos em *L. infantum*, como homólogos de subunidades do complexo eIF3 e homólogos de eIF4E;

3 – Avaliar o potencial de subunidades de eIF3 superexpressas fusionadas ao peptídeo HA de formarem o complexo nativo *in vivo*;

4 - Investigar a associação diferencial *in vivo* de homólogos de eIF4E de *L. infantum* com o complexo eIF3.

4. Material e métodos

4.1 Amplificação por reação em cadeia da polimerase

Os genes *EIF4E1, EIF4E2, EIF3A, EIF3D, EIF3E, EIF3G, EIF3I* e *EIF3J* foram amplificados por PCR utilizando como molde o DNA total de *Leishmania infantum*. Para isso, foram desenhados dois oligonucleotídeos específicos para cada gene, anelando na sua extremidade 5' (ou *foward*), contendo o códon AUG com os sítios de restrição *Bam*HI ou *Xba*I, ou na sua extremidade 3' (ou *reverse*), contendo o sitio de *Hind*III e sem o códon de terminação de tradução (Quadro 1). A amplificação foi obtida com 0,02 U/ml da enzima *Phusion*® *High-Fidelity DNA Polymerase*, com seu tampão *Phusion*®GC, 0,5 mM de $MgCl_2$, 3% de DMSO e 0,2 mM de dNTPs, para uma reação final de 20 µl. As condições de reação foram: 10 ciclos de 98 °C por 1 minuto (para desnaturação do DNA), 30 segundos por 70 °C (para anelamento dos *primers*) e 72 °C por 30 segundos (para extensão do fragmento) seguidos de 30 ciclos de 98 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Na primeira etapa de 10 ciclos, a cada ciclo a temperatura de anelamento decrescia 1 ºC, enquanto na segunda etapa, esta temperatura era mantida durante os 30 ciclos. Esta variação nas temperaturas permite um anelamento mais especifico para cada conjunto de oligonucleotídeos e a obtenção de uma maior quantidade de fragmentos.

Para a maioria dos genes foi realizada a PCR convencional na qual oligonucleotídeos que se anelaram nas extremidades 5' e 3' de cada região codificadora permitiram a amplificação do gene completo. Para os genes *EIF4E2* e *EIF3E*, foi realizada a chamada PCR da mutagênese. Esta última consiste de

duas reações: a primeira utilizando um oligonucleotídeo capaz de se anelar a uma das extremidades, como já descrito acima, com um segundo oligonucleotídeo anelando internamente e contendo uma mutação de forma a eliminar o sítio de restrição de *HindIII* contido dentro da sequência (Quadro 1); e uma segunda reação para amplificação do gene completo, no qual o produto da primeira PCR é utilizado como um *megaprimer* juntamente com um oligonucleotídeo anelando a segunda extremidade do gene (Figura 10).

Todos os fragmentos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com *Syber® safe* e as bandas de cada fragmento foram visualizadas em transiluminador. Estas bandas foram então purificadas através do "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (da GE Heathcare) conforme recomendação do fabricante.

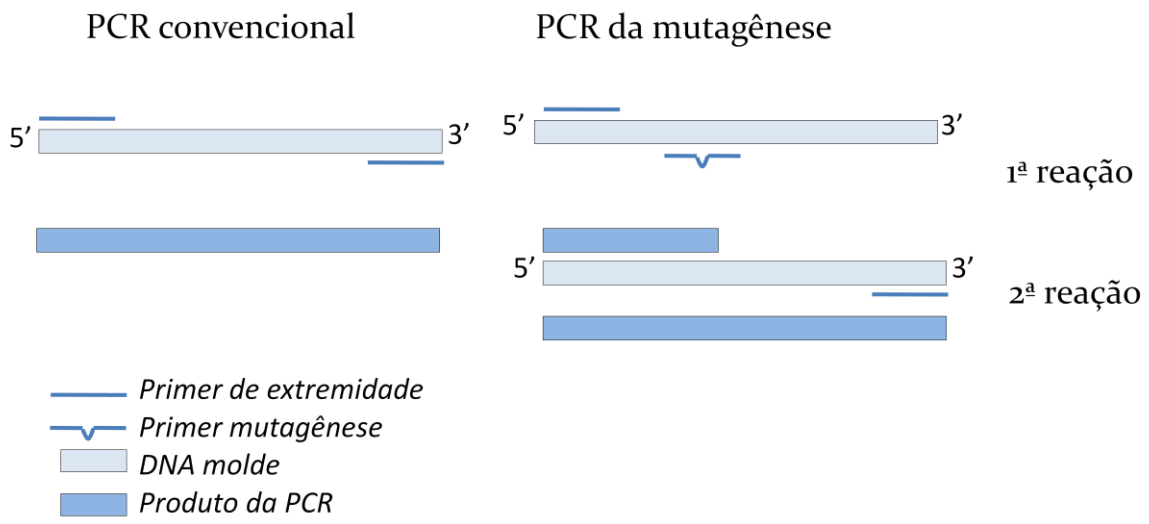


Figura 10. Esquema de PCR convencional e PCR da mutagênese. Na PCR convencional são utilizados dois oligonucleotídeos anelando às extremidades do gene (região codificadora) a ser amplificado e apenas uma reação é necessária para se amplificar o gene completo. Na PCR da mutagênese, na primeira reação, um oligonucleotídeo se anela a uma das extremidade e um outro anela internamente, contendo uma mutação específica, para amplificar parte do gene. O produto obtido é utilizado como *megaprimer* numa segunda reação, e juntamente com o oligonucleotídeo anelando na segunda extremidade, amplifica o gene completo.

Quadro 1. Sequências de oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes de interesse: As bases sublinhadas representam o sítio de restrição *Bam*HI (GGATCC), *Xba*I (TCTAGA) ou *Hind*III (AAGCTT) e mutações pontuais; As em negrito representam o códon de iniciação da tradução. O sentido do oligonucleotídeos pode ser *foward* (5'->3) ou *reverse* (3'->5'). Os oligonucleotídeos internos são denominados "seq" para sequenciamento e "mut" para mutagênese. Todos os oligonucleotídeos descritos estão na orientação 5'->3'

Gene	**Sentido**	**Sequência**
EIF4E1	*Foward*	CAAGGATCC**ATG**TCAGCCCCATCTTCAGTTCCT
EIF4E1	*Reverse*	AAGCTTAGACGCCTCGCCGTGTTTTGTGAA
EIF4E2	*Foward*	GGATCC**ATG**GACCCGAATAGATGTGCCCCG
EIF4E2	*Reverse*	AAGCTTCACAGCTTCACCCCTCACATCGAT
EIF3A	*Foward*	GGATCC**ATG**GATCGTGCAGCAACCTCCGAC
EIF3A	*Reverse*	AAGCTTTTCGCCCCCGAGACGGCGCATTTC
EIF3D	*Foward*	TCTAGA**ATG**TCTTTTGAGCTTCCCGAG
EIF3D	*Reverse*	AAGCTTCTCGTCGTCCTTGTCATCGCC
EIF3E	*Foward*	CAAGGATCC**ATG**GACATGCTAACGAAGCTGTTG
EIF3E	*Reverse*	AAGCTTACGCATAACGGTGTCTAGCTTGTC
EIF3G	*Foward*	TCTAGA**ATG**TCGAACTGGGCAGATGCC
EIF3G	*Reverse*	AAGCTTCGTGCGGGTCTCGGCACG
EIF3I	*Foward*	CAAGGATCC**ATG**ACGGCCGCCGTGGATCTC
EIF3I	*Reverse*	AAGCTTCAGCGTCCACAGAGGCTGCG
EIF3J	*Foward*	CAAGGATCC**ATG**GACGACTATCACGACGAT
EIF3J	*Reverse*	AAGCTTCCAGCCCGTCTCGTCCTCGTT
EIF4E2 mut	*Foward*	TAAGTGAGTGGAAACTTTGCCTGTGGACTC
EIF3E mut	*Reverse*	GTAGTAGAGATACGCCAGCTTGTACAACGC
EIF3D seq	*Reverse*	ACTGCTTTTCAATGTTGCTGTCCTCGCCCT
EIF3D seq	*Foward*	ACATTGAAAAGCAGTGGGTGAGCGAGACGG
EIF3A seq	*Reverse*	ATTGAGCAGGCAGCACAGCGTCTCCACTGT
EIF3A seq	*Foward*	GCTGCCTGCTCAATGACATCTGCAGCCTGC
EIF3A seq	*Reverse*	ACGTTTGCAACGATCTTGTTAAAGTAGCTC
EIF3A seq	*Foward*	GATCGTTGCAAACGTGGACACTGTCCCCGC

4.2 Clonagem e subclonagem dos genes de interesse

Os fragmentos de PCR purificados foram inicialmente tratados com a enzima Taq Polimerase para adição de dATP nas extremidades. Em seguida foram submetidos a reação de ligação, feita utilizando o *pGEM®-T Easy Vector Systems* (da Promega®), conforme recomendações do fabricante. O período da reação foi de 16 horas a 4 °C. Cepas de *Escherichia coli* Top 10 foram transformadas através da técnica de choque térmico, onde se acrescentou 5 µl da ligação a 50 µl de células quimiocompetentes, submetendo o conjunto a 30 minutos no gelo seguido de 5 minutos a 37 ºC. Em seguida foram adicionados 800 µl de meio SOC (2% Bacto-triptona/0,5% Bacto-yeast extract/10 mM NaCl/2,5 mM KCl/10 mM $MgCl_2$/10 mM $MgSO_4$/20 mM Glicose), que permitiu a recuperação das bactérias quando incubadas a 28 °C, sob agitação por 1 hora. A solução foi semeada em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml) previamente acrescido de X-GAL/IPTG, sendo a placa incubada a 37 °C por 16 horas. As colônias formadas na placa foram utilizadas para se obter DNA plasmidial através do *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (da Sigma®) segundo recomendações do fabricante. Para a confirmação da clonagem, os DNAs extraídos foram submetidos à digestão a 37 ºC com a enzima *Eco*RI, por 4 horas.

As amostras enviadas ao sequenciamento automático ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e os sequenciamentos foram analisados nos programas do pacote DNASTAR (Lasergene): SeqMan (para junção dos *contigs* obtidos no sequenciamento), EditSeq (para edição desses *contigs* obtidos, bem como da sequência consensual

gerada) e BioEdit (para alinhamento das seqüências finais resultantes com aquelas depositadas no TritrypDB).

Após as análises do sequenciamento, as construções plasmidiais foram submetidas a digestão com as enzimas *BamH*I e *Hind*III ou *Xba*I e *Hind*III. O fragmento liberado foi purificado através do *GE Healthcare Life Sciences PCR DNA and Band Purification Kit* conforme recomendação do fabricante. Em seguida, o fragmento foi ligado ao plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA (Figura 11) previamente digerido com as mesmas enzimas numa proporção de 1:1 de inserto e plasmídeo, com 0,5 µL da enzima T4 DNA Ligase (400,000 U/mL, New England Biolabs), 1 µL do tampão (10x) de ligação da enzima e água para completar um volume final de 10 µL por ligação. A reação foi então mantida a 18 ºC por 16 horas. Da mesma forma que para a clonagem, cepas de *E. coli* Top10 foram transformadas por choque térmico e as bactérias semeadas em meio LB sólido contendo ampicilina. As colônias formadas na placa foram utilizadas para extração de DNA plasmidial através do *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (da Sigma®) conforme a orientação do fabricante. A confirmação da clonagem foi obtida através da digestão a 37 °C com as enzimas específicas citadas acima, por 3 horas e os DNAs foram quantificados no Nanodrop 2000c (ThermoFisher).

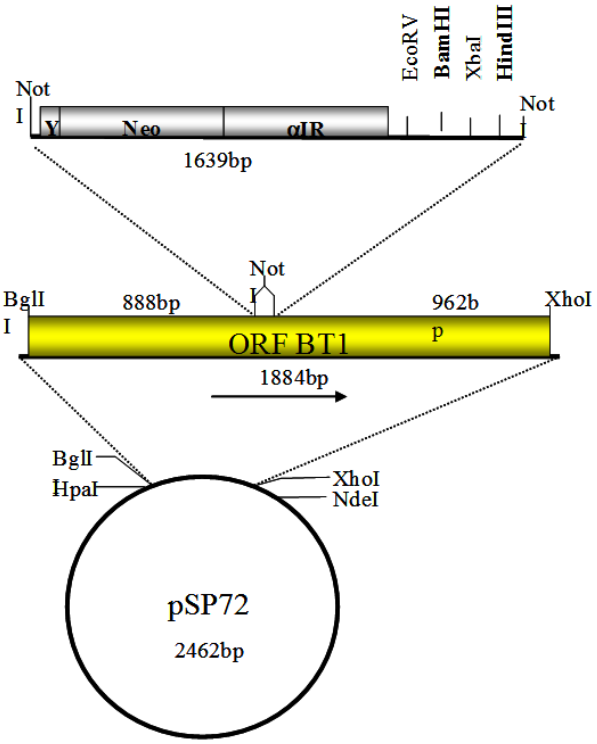


Figura 11. Esquema do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa. Modificado a partir do vetor pSP72, no qual foi inserido a ORF BT1 contendo o gene de resistência a Neomicina. Neste estudo, a sequência que codifica para o peptídeo HA foi inserido logo após o sitio de restrição *Hind*III. Fonte: Adaptado de (Padmanabhan *et al.,* 2012)

4.3 Cultivo e transfecção de células de *Leishmania sp.*

As células de *Leishmania infantum*, nas suas formas promastigotas, foram cultivadas a 26 ºC em meio Schneider, pH 7,2, suplementados com 10% de soro fetal bovino, 0,2% de hemina e 1% de penicilina e estreptomicina. Para a seleção e manutenção das linhagens transgênicas foi necessária a adição de 80 µg/ml do antibiótico Neomicina (G418 da Sigma®). O crescimento dos parasitas foi monitorado por contagem em câmara de Neubauer sendo os parasitas mantidos em fase exponencial de crescimento por meio de repasses sucessivos.

Para transfecção, aproximadamente 2,5 x 10^8 células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos. O

sedimento foi ressuspendido em 1 mL de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES pH 7,05/ 137 mM NaCl/ 5 mM KCl/ 0,7 mM Na_2HPO_4 / 6 mM glicose) e a etapa de centrifugação foi repetida nas condições citadas. O sedimento foi então ressuspedido em 400 µl do tampão HEPES-NaCl e transferido para cuvetas de 0,2 mm, as quais continha DNA plasmidial (gene de interesse + vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA) numa quantidade de 1 a 2 µg. Para controle negativo foi adicionado apenas os parasitas a curveta, sem a presença de DNA. As cuvetas permaneceram no gelo por um período de 15 minutos.

O conjunto foi submentido a eletroporação, sendo utilizado o aparelho *BioRad Gene Pulser II*, com pulso elétrico de 450 V com capacitância de 500 µF (*microfarads*). Após o choque, o material foi transferido para garrafa de cultura contendo meio de cultura Schneider pH 7,2 e incubado a 26ºC, por 24 horas. Em seguida, foi feita a pré-seleção adicionando a metade da quantidade de antibiotico Neomicina necessário para manutenção da linhagem (2 µg/ml). A cultura foi incubada novamente a 26 ºC por 24 horas. Na etapa de seleção 1 ml da cultura foi transferida para nova garrafa contendo 9 ml de meio Schneider pH 7,2, juntamente com 80 µg/ml de Neomicina. As culturas foram incubadas em estufa a 26 ºC por aproximadamente 10 a 15 dias, até se tornarem viáveis para um repasse celular.

4.4 Obtenção de extrato total e ensaios de *Western-blot*

A fim de avaliar a expressão das proteínas heterólogas fusionadas ao HA foram feitos extratos totais das linhagens transgênicas de *L. infantum*. Para isso, aproximadamente 2 x 10^6 células/mL de cada linhagem teve seu crescimento

acompanhado por cerca de 48 horas até atingir 10^7 células/mL. Destas, 10 mL (10^8 células) foram centrifugados nas condições citadas no tópico 4.3. O sedimento foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) e ressuspendido em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 µl/mL de 2-mercaptoetanol) para concentração final de 5 x 10^5 célula/µl.

Os extratos foram fracionados em SDS-PAGE 15% (5 x 10^6) e transferidos para membrana de PVDF (Immobilon-P – Millipore®). A membrana foi bloqueada em solução de leite 5% em TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5) a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo comercial anti-HA (Abcam ®) na diluição de 1:2500 por 16 horas em solução de leite 5% em TBS-Tween 20. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween 20, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo (anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase), numa diluição de 1:3000, na mesma solução que a incubação anterior por 1 hora, seguida de novas lavagens com TBS-Tween. A membrana foi então banhada com solução quimioluminescente composta por 25 mL de luminol (1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1M, pH 8,5), adicionado de iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio para 0,03%. Após secagem em papel filtro, a membrana foi exposta a filme autorradiográfico e revelada em solução Dektol 1:2 (Kodak®) até saturação, por cerca de 3 minutos. A reação foi interrompida com acido acético, por 1 minuto e fixada em solução fixadora por 2 minutos.

4.5. Preparação de lisados celulares de *L. infantum*

Para a obtenção da fração citoplasmática de células de *L. infantum*, os lisados celulares, cerca de 2 x 10^8 promastigotas foram coletadas por centrifugação e lavadas com PBS suplementado com 10% de inibidores de protease (Roche®). Em seguida estas células foram ressuspensas em 500 µl tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH 7,4/ 75 mM acetato de potássio/ 4 mM de acetato de magnésio/ 2 mM de DTT, suplementado com inibidores da protease). A lise foi realisada através de 10 ciclos de congelamento e descongelamento, sendo a ruptura celular monitorada por microscopia ótica. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 5 minutos para remover restos celulares e o sobrenadante armazenado a -80 ºC. Alíquotas foram separadas para análise dos lisados por *Western-blot* com anticorpo anti-HA. Uma vez confirmados, os lisados foram quantificados no *Protein A280 do Nanodrop 2000c* (ThermoFisher).

4.6 Imunoprecipitação

Primeiramente foi realizada a imunoprecipitação (IP) da proteína EIF3E. Para isso, cerca de 60 mg da resina proteína A-sefarose (GE Healthcare) foi inicialmente hidratada em água mili-Q seguido de lavagem com 10 ml de PBS. Cerca de 30 µl desta resina (50% p/v em PBS) foi então incubada com anticorpo purificado anti-*Lm*EIF3E e com soro pré-imune como controle negativo (aproximadamente 70 µg de IgG total em ambos), acrescidos de 0,4 ml de PBS e mantidos sob agitação a 4 ºC por 16 horas.. A resina foi então lavada por três

vezes com o tampão de lise (20 mM HEPES KOH pH 7,4, 75 mM de acetato de potássio, 4 mM de acetato de magnésio, 2 mM de DTT) e incubada com 0,1 ml de lisado celular de *L. infantum* por 2 horas a 4 ºC sob agitação. Em seguida foi separado o sobrenadante e armazenado a -80 ºC (fração depletado do lisado). Após a resina ser lavada mais três vezes com tampão de lise, a eluição das proteínas retidas foi realisada em tampão de amostra para gel de SDS-PAGE. Alíquotas dos produtos da imunoprecipitação (IP, depletado (D-), tanto do EIF3E quanto do controle juntamente com lisado de *L. infantum*) foram fracionados em gel SDS-PAGE 15%, e realizados ensaios de *Western-blot* utilizando anti-EIF3E numa diluição de 1:500, e segundo anticorpo de coelho 1:10000. Para espectrometria de massa, o restante das IPs (EIF3E e controle) foram novamente fracionadas em gel SDS-PAGE 15% até atingir a linha limite entre as duas fases do gel. O gel foi corado com azul de Comassive Blue 250-R e depois descorado com etanol, o *pool* de proteínas foi excisado do gel e mandado em água para a plataforma tecnológica de Espectrometria de Massa do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná.

Todas as proteínas de interesse fusionadas a HA obtidas neste estudo são reconhecidas pelo anti-HA da marca Abcam®, contudo não foi possível uma padronização da imunoprecipitação com este anticorpo em tempo viável. O anticorpo da marca Sigma® por sua vez reconhece sete das dez proteínas do estudo, e por isso foi dada continuidade aos experimentos de imunoprecipitação com as proteínas EIF3A, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3. Para isso, cerca de 40 µl da resina ligada ao anti-HA da Sigma, *Monoclonal anti HA agarose* (Sigma®), foi lavada cinco vezes com solução de PBS suplementado de inibidores de protease. Em seguida a resina foi bloqueada com 100 µl da solução

composta por PBS, inibidores de protease e 10% de BSA (10mg/ml) por 30 minutos. Foi então feita a incubação com lisados celulares de *L. infantum* por 1 hora a 4 °C. Os lisados foram todos incubados numa mesma proporção e para controle negativo foi utilizado lisado de *L. infantum* nativa não transfectada. Após a incubação, o sobrenadante foi guardado e a resina foi lavada quatro vezes com PBS suplementado de inibidores de proteases (sem adição de BSA). As proteínas co-imunoprecipitadas juntamente com a resina foram eluídas em tampão de amostra para SDS-PAGE e analisadas por *Western-blot* com anticorpo monoclonal anti-HA (Sigma®) numa diluição de 1:3000. Após confirmação da imunoprecipitação, as IPs das proteínas do complexo eIF3 (EIF3A, EIF3D, EIF3G e EIF3I*)* e dos homólogos do eIF4E (EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3), juntamente com a IP do controle negativo foram submetidos a outro ensaio de *Western-blot* utilizando anticorpo policlonal anti-EIF3E, numa diluição de 1:500, e segundo anticorpo anti IgG de coelho 1:10000.

5. Resultados

5.1 Identificação dos parceiros funcionais do EIF3E

Em estudos realizados anteriormente que precedeu este trabalho de dissertação de mestrado, foi produzido e testado um soro policlonal dirigido contra a subunidade EIF3E de *Leishmania major* (Assis, 2013). Com o intuito de então dar continuidade a caracterização do complexo eIF3 de tripanosomatídeos, iniciada a partir das análises de bioinformática previamente descritas, foram realizados ensaios de imunoprecipitação (IP) em *L. infantum* da proteína EIF3E com o referido soro. O produto desta reação foi então inicialmente analisado por meio de SDS-PAGE e *Western-blot* com o mesmo soro policlonal utilizado na IP (Figura 12). Como resultado preliminar podemos então observar a proteína presente como produto do seu próprio imunoprecipitado, confirmando a eficiência do procedimento.

Em um segundo momento, as reações de IP com o soro anti-EIF3E foram repetidas em maior escala e o produto destas reações enviado para a análise em espectrômetro de massas. Os dados da espectrometria, resumidos na Tabela 1, revelaram a presença de 10 subunidades do complexo eIF3 co-precipitando com a subunidade EIF3E, definindo o complexo eIF3 de *Leishmania*. Este resultado foi importante para confirmar a identidade de várias das subunidades do eIF3 que estavam anotadas apenas como proteínas hipotéticas. Das proteínas preditas como subunidades de eIF3 com base nas análises de bioinformática previamente realizadas, apenas a subunidade EIF3J não foi identificada nos imunoprecipitados de *L. infantum* ao passo que um ortólogo de eIF3f, não identificado por

bioinformática, foi mapeado após a análise dos produtos das IPs. Desta forma o complexo eIF3 de identificado parece ser composto de 11 subunidades: EIF3A, EIF3B, EIF3C, EIF3D, EIF3E, EIF3F, EIF3G, EIF3H, EIF3I, EIF3K e EIF3L.

Nas análises de espectrometria de massa realizadas, a proteína ribossomal S4 foi encontrada associada ao EIF3E, o que era esperado já que esta proteína faz parte da subunidade 40S a qual o complexo eIF3 está associada. Também foi observada a interação a co-precipitação do EIF1, proteína parceira do eIF3 no complexo 43S de pré-iniciação da tradução. O EIF4G1, um dos cinco homólogos do eIF4G de tripanosomatídeos foi o único homólogo de subunidade do complexo eIF4F encontrado nos imunoprecipitados. Ainda podemos observar a existência de RNA helicases que também são encontradas se ligando a PABP1. Um possível indício da interação entre a PABP1 e o eIF3, embora a própria PABP1 não tenha sido detectada no imunoprecipitado. No mais, o fator de elongação 1 alfa, proteínas relacionadas ao estresse celular, e ao metabolismo de carboidratos bem como algumas proteínas hipotéticas também se encontram presentes nas análises do imunoprecipitado do fator EIF3E.

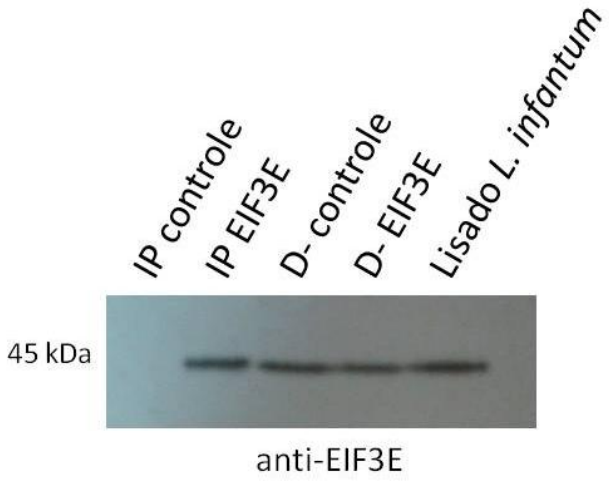


Figura 12. Ensaios de *Western-blot* da imunoprecipitação do EIF3E. Observa-se que a proteína EIF3E mesmo não sendo totalmente depletada do lisado de *L. infantum* (D-EIF3E) encontra-se presente na fração da imunoprecipitação do EIF3E (IP EIF3E). O soro pré-imune foi utilizado como controle negativo.

Tabela 1. Proteínas co-imunoprecipitadas com o EIF3E em *L. infantum*

	Proteínas identificadas	Número de acesso	EIF3E
Subunidades do complexo EIF3	EIF3A	LinJ.17.0010	24
	EIF3B	LinJ.17.1390	19
	EIF3C	LinJ.36.7320	16
	EIF3D	LinJ.30.3080	9
	EIF3E	LinJ.28.2480	15
	EIF3F	LinJ.25.1670	5
	EIF3G	LinJ.34.2530	3
	EIF3H	LinJ.07.0710	9
	EIF3I	LinJ.36.4070	10
	EIF3K	LinJ.32.2330	8
	EIF3L	LinJ.36.0270	16
Fatores de inciação da tradução	EIF1	LinJ.24.1240	3
	EIF4G1	LinJ.15.0060	2
Proteína ribossomais	40S ribosomal protein S4, putative	LinJ.13.1120	1
RNA helicase	RNA helicase, provável	LinJ.21.1820	4
	RNA helicase DEAD-box ATP dependente, provável	LinJ.35.0370	1
	Homólogo Ded1p-1	LinJ.32.0410	3
Proteínas relacionadas ao estresse	Chaperona, subunidade alfa, provável	LinJ.32.3470	4
	Proteína T-complexo 1, subunidade beta, provável	LinJ.35.3900	1
Metabolismo de carboidratos e enzimas	Glicose-6-fosfato desidrogenase, provável.	LinJ.34.0080	4
	Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase, glicossomal	LinJ.30.3000	1
	Glutamato desidrogenase	LinJ.15.1070	2
	Orotidina-5-fosfato descarboxilase	LinJ.16.0560	1
Proteínas hipotéticas	Proteína hipotética, conservada	LinJ.13.0270	2
	Proteína hipotética, conservada	LinJ.15.1560	1
	Proteína hipotética, conservada	LinJ.02.0550	1

Um dos objetivos da análise de espectrometria de massa realizada era a identificação da associação do complexo eIF3 com as proteínas de complexos eIF4F de tripanosomatídeos melhor caracterizados. Entretanto, a exceção do EIF4G1, nenhum homólogo de subunidade de eIF4F ou de PABP foi identificado nos imunoprecipitados e mesmo outras proteína esperadas, como proteínas ribosomais, foram pouco evidenciadas nas amostras. Visando melhor caracterizar esses parceiros do eIF3, e investigar melhor sua interação com subunidades do complexo eIF4F, uma segunda abordagem de estudo foi iniciada. Foram então escolhidas seis subunidades do eIF3 (EIF3A, EIF3D, EIF3E, EIF3G, EIF3I e EIF3J) e dois homólogos de eIF4E menos estudados em tripanosomatídeos (EIF4E1 e EIF4E2) para serem avaliados dessa forma, como descrito a seguir.

5.2 Amplificação dos genes de interesse

Inicialmente os genes dos dois primeiros homólogos de eIF4E, *EIF4E1 e EIF4E2*, e das seis subunidades do complexo eIF3 selecionados para este estudo, *EIF3A, EIF3D, EIF3E, EIF3G, EIF3I* e *EIF3J*, foram amplificados e o resultado foi o esperado para as condições previstas na PCR. Para os genes *EIF4E2* e *EIF3E* foram obtidos fragmentos parciais de 345 e 381 pb, respectivamente, os quais foram utilizados em uma segunda reação de PCR visando abolir sítios internos de restrição que inviabilizariam as etapas subsequentes de clonagem. A amplificação final de cada gene produziu seus respectivos fragmentos em tamanho esperado (*EIF4E1* – 645 pb; *EIF4E2* – 846 pb; *EIF3A* – 2325 pb; *EIF3D* – 1579 pb, *EIF3E* – 1218 pb, *EIF3G* – 768 pb, *EIF3I* – 1071 pb; *EIF3J* – 639 pb), como observado na Figura 13. Em seguida, a

purificação de cada fragmento possibilitou a remoção de contaminantes bem como dos fragmentos inespecíficos.

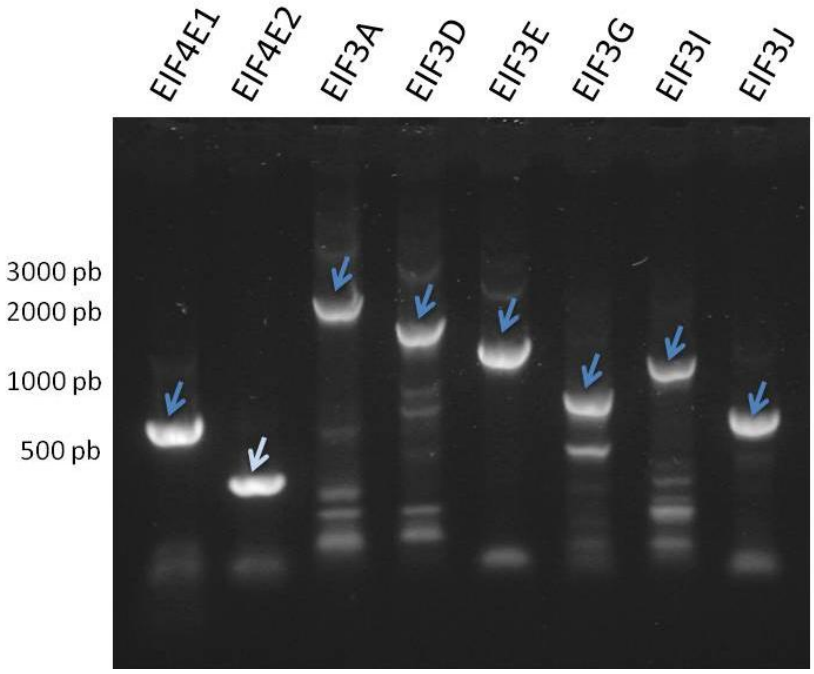


Figura 13. Amplificação dos genes de interesse de *Leishmania infantum.* Gel de agarose 1% mostrando os fragmentos completos dos genes *EIF4E1, EIF3A*, *EIF3D*, EIF3E, *EIF3G*, *EIF3I* e *EIF3J*(seta azul) e o fragmento parcial do gene *EIF4E2* (seta branca), amplificados a partir do DNA total de *L. infantum*. O marcador de peso molecular utilizado foi o *1 Kb DNA Ladder* (©Promega).

5.3 Clonagem em vetor da série pGEM T-easy

A clonagem dos genes *EIF4E1, EIF4E2, EIF3A, EIF3D, EIF3E, EIF3G, EIF3I, EIF3J* no vetor pGEM T-easy, foi confirmada primeiramente por digestão utilizando a enzima *Eco*RI. Este plasmídeo possui sítios de *Eco*RI flanqueando a região onde o gene será inserido, assim quando submetido a digestão com esta enzima ocorre a liberação de fragmentos no tamanhos dos genes citados, como pode ser observado na Figura 14. Em seguida as amostras quantificadas foram enviadas para sequenciamento com objetivo de identificar possíveis mutações que pudessem afetar a superexpressão das proteínas estudadas. Essa

preocupação é maior, pois como os genes são relativamente grandes, a revisão das polimerases nem sempre é eficiente a ponto de evitar mutações induzidas pela PCR. O resultado do sequenciamento comprovou a integridade de todas as sequências e, no caso do *EIF4E2* e do *EIF3E,* a mutagênese com eliminação do sítio interno de restrição.

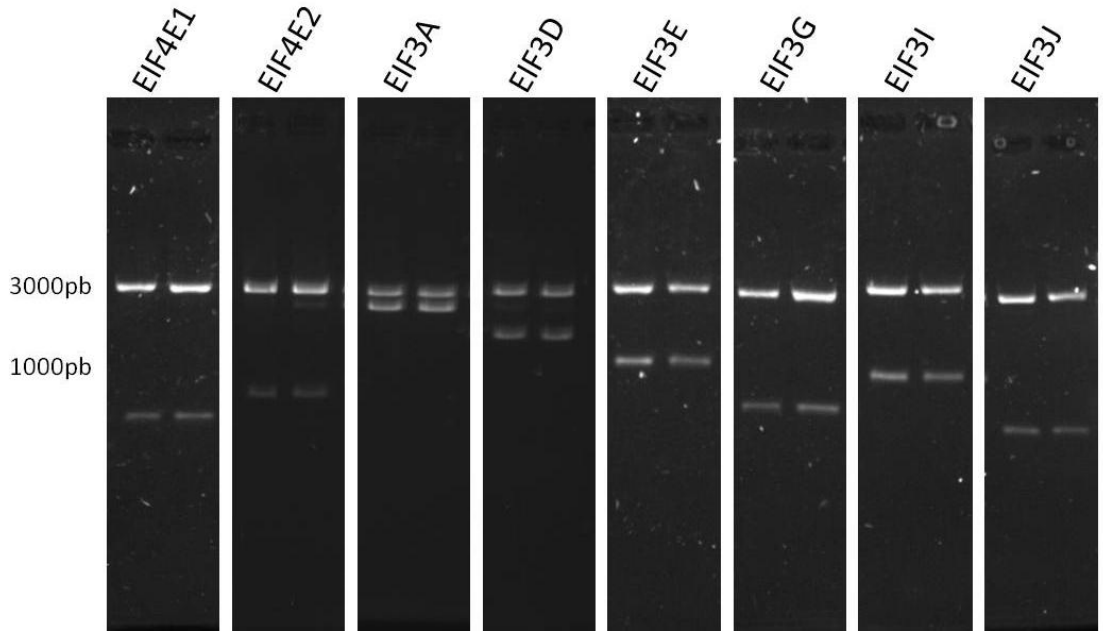


Figura 14. Construções plasmidiais dos genes de interesse em vetor da série pGEMT-easy. Gel de agarose 1% mostrando a digestão de duas construções plasmidias de cada gene (*EIF4E1*, *EIF4E2*, *EIF3A*, *EIF3D*, EIF3E, *EIF3G*, *EIF3I* e *EIF3J*) com a enzima EcoRI. No gel, a digestão é confirmada pelo aparecimento de uma banda de 3000 pb que representa o plasmidio pGEM T-easy e uma outra banda correspondente ao gene. O marcador de peso molecular utilizado foi o *1 Kb DNA Plus Ladder* (©Invitrogen).

5.4 Subclonagem no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa

A superexpressão das proteínas de interesse em *L. infantum* foi realizada utilizando um plasmídeo derivado do vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa (Padmanabhan *et al.,* 2012), modificado pela inserção de oligonucleotídeos codificando para o peptídeo HA imediatamente após o sítio de *Hind*III. Este plasmídeo permite a

clonagem de genes cujo sítio *Hind*III tenha sido adicionado imediatamente antes do códon de parada. O referido vetor permite a integração de genes heterólogos dentro do gene BT1 de *L. infantum*, conferindo resistência à neomicina e expressão constitutiva das proteínas de interesses. Assim, as células de *L. infantum* transfectadas expressam tanto as proteínas endógenas quanto as proteínas contendo a sequência marcadora HA.

A subclonagem dos genes de interesse entre os sítios *BamH*I/*Hind*III do vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA permitiu a obtenção das seguintes construções plasmidiais: pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF4E1*, pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF4E2*, pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF3A*, pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF3D*, pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF3E*, pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF3G*, pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF3I* e pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*EIF3J*. Estas foram confirmadas por digestão utilizando as enzimas *Bam*HI/*Hind*III, liberando assim os fragmentos esperados. As amostras quantificadas foram mais uma vez enviadas para o sequenciamento de DNA para confirmar a identidade e qualidade das sequências.

Outras construções necessárias para estudo como pSP-BT1-Y-Neo-alfa/ *EIF4E3* e pSP-BT1-Y-Neo-alfa/ *EIF4E4* já estavam disponíveis no laboratório. Após a confirmação de que os insertos foram adequadamente adicionados ao vetor de expressão, o passo seguinte foi a obtenção e seleção das linhagens transgênicas que se deu entre 7 e 14 dias após a eletroporação.

5.5 Análise da expressão das proteínas fusionadas a HA em *L. infantum*

O plasmídeo episssomal pSP-BT1-Y-Neo-alfa permite a expressão constitutiva das respectivas proteínas em níveis significativos. Células promastigotas na fase exponencial foram utilizadas na preparação de extratos celulares, para fracionamento em gel SDS-PAGE e lisados para uso nos ensaios de imunoprecipitação. A avaliação dos extratos celulares utilizando anticorpo contra o marcador HA, anti-HA (Abcam®) confirmou a expressão de todas as proteínas de interesse, nos tamanhos semelhantes aos preditos (Figura 15). Através da imunodetecção ainda podemos observar diferença nos níveis de expressão entre as proteínas. Aparentemente as proteínas EIF3A-HA, EIF3D-HA e EIF4E3-HA foram expressas em maior quantidade do que as outras.

Quando os mesmos extratos analisados na Figura 15 foram testados com um segundo soro comercial anti-HA, da marca Sigma®, só foi possível a visualização das proteínas EIF3A, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3 (dados não mostrados). Este teste foi realizado tendo em vista os experimentos seguintes de imunoprecipitação, onde a imunoprecipitação utilizando o soro anti-HA da Abcam® não foi possível de ser realizada devido a problemas de ligação inespecífica à resina disponível para uso com esse anticorpo. Já o anticorpo anti-HA da Sigma é o mesmo presente em resina comercial, onde a resina já é poduzida ligada ao anticorpo. Desta forma para os ensaios que se seguem apenas as proteínas reconhecidas pelo anti-HA Sigma® foram utilizadas.

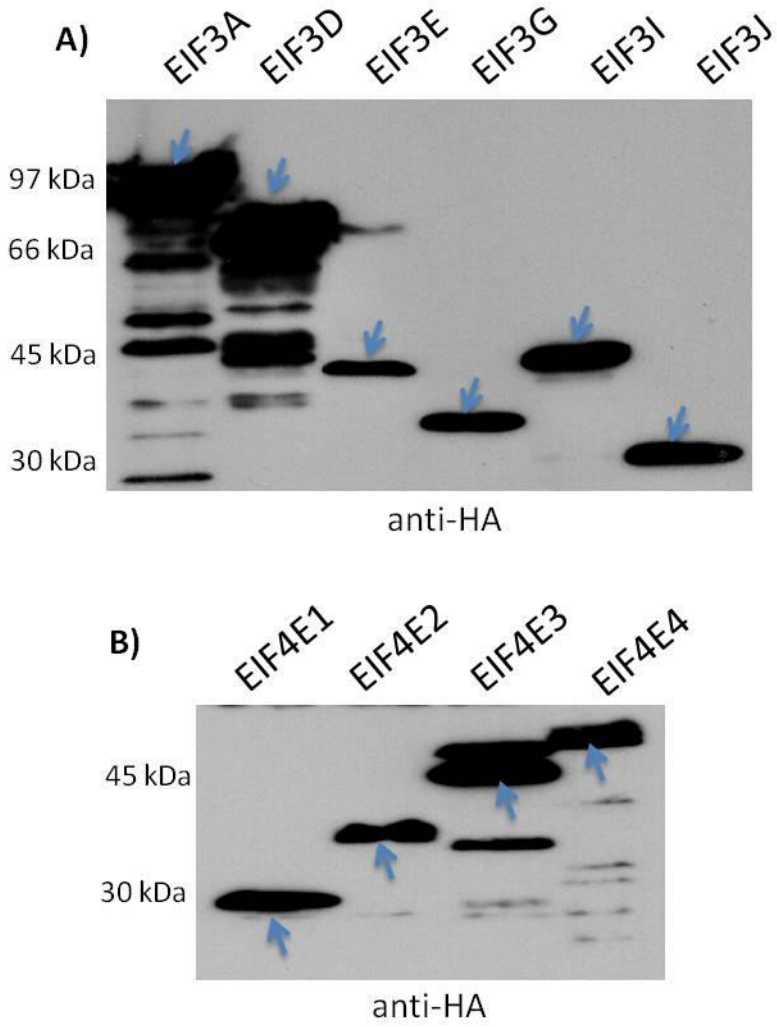


Figura 15. Ensaio de *Western-blot* dos extratos celulares expressando as proteínas fusionadas a HA. O anticorpo monoclonal comercia anti-HA (abcam®) diluído 1:2500 reconheceu as proteínas do complexo EIF3 (A) e os homólogos do EIF4E (B), acima de seus tamanhos preditos (seta azul).

5.6 Imunoprecipitação das proteínas fusionadas a HA em *L. infantum*

Os lisados celulares gerados a partir das células expressando as proteínas selecionadas para os experimentos subsequentes foram inicialmente fracionados em SDS-PAGE, para avaliar a susceptibilidade das proteínas alvo a eventos de degradação durante o processo de lise. Uma vez confirmada a integridade das proteínas presentes nos lisados (dados não mostrados), estes foram

quantificados e utilizados em ensaio de imunoprecipitação. Primeiramente, o produto deste ensaio foi imunodectado com anti-HA para confirmar a presença das proteínas marcadas no imunoprecipitado. Como podemos observar, as proteínas (EIF3A, EIF3D, EIF3G EIF3I, EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3) foram detectadas no próprio imunoprecipitado como esperado, em seus tamanhos esperados. As bandas inespecíficas (de aproximadamente 66 e 30 kDa) representam as cadeias pesadas e leves da IgG que são reconhecidas pelo anti-igG de camundongo e também podem ser observadas no controle negativo, no qual foi utilizado lisado de *L. infantum* selvagem expressando apenas as proteínas nativas do parasita (Figura 16).

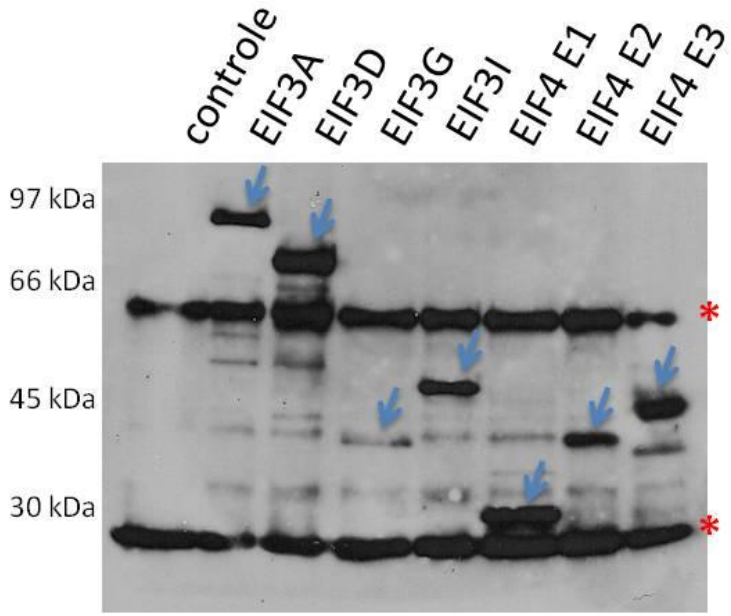


Figura 16. Ensaio de *Western-blot* das imunoprecipitações das proteínas de interesse fusionadas a HA. O anticorpo monoclonal comercia anti-HA, diluído 1:2500, reconheceu as proteínas (EIF3A, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3), em seus tamanhos esperados (setas) no produto dos seus respectivos imunoprecipitado. As bandas correspondentes as IgG estão representadas pelo asterisco vermelho (*).

5.7 Avaliação de interação

Para avaliar as interações das subunidades do EIF3 entre si e deste complexo com os homólogos de eIF4E disponíveis, os produto das imunoprecipitações das proteínas EIF3A, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3, foram testados quanto a presença da subunidade EIF3E. Pode ser observado na Figura 17, que o anti-EIF3E reconheceu a proteína alvo em imunoprecipitados de todas as subunidades do eIF3 testadas (EIF3A, EIF3D, EIF3G e EIF3I) e de dois homólogos do EIF4E (EIF4E2 e EIF4E3), mas não foi reconhecida na fração da imunoprecipitação do EIF4E1.

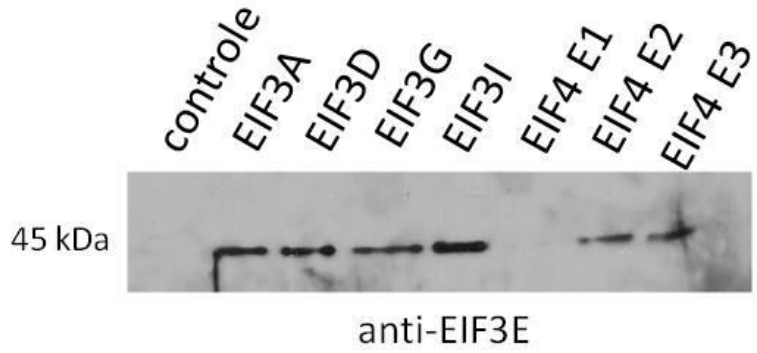


Figura 17. Ensaios de *Western-blot* das imunoprecipitações das proteínas de interesse com anti-EIF3E. O anticorpo policlonal anti-EIF3E, diluído 1:500, reconheceu a subunidade EIF3E presente no imunoprecipitado de todas as subunidades do EIF3 testadas (EIF3A, EIF3D, EIF3G e EIF3I) e de dois homólogos do EIF4E (EIF4E2 e EIF4E3) mas não foi reconhecida na IP do homologo EIF4E1.

6. Discussão

Este trabalho teve como objetivo inicial avançar na caracterização do complexo eIF3 de tripanosomatídeos através da co-purificação de parceiros ligantes e análises por espectrometria de massa. A identificação da maioria das subunidades confirma a presença de um complexo praticamente completo nos tripanosomatideos. Contudo, versões mais simplificadas deste complexo são encontradas em outros protozoários do grupo Excavata, indicando para estes últimos um complexo mais primitivo ou uma perda secundária de subunidades selecionadas, como também poder ser observado em alguns fungos (Rezende *et al.,* 2014).

Das onze subunidades identificadas por espectrometria de massa, algumas destas merecem destaque. Um exemplo é o eIF3a, que em humanos parece ser uma subunidade crítica para a formação e estabilidade das restantes das subunidades do complexo eIF3 (Wagner *et al.,* 2014), logo sua função parece ser essencial para qualquer função eIF3. Além disso, a presença do eIF3b e eIF3c, subunidades que parecem ser encontradas em todos os eucariotos, indicam que estas também podem ter um papel central dentro do complexo. Em leveduras, um subcomplexo formado por eIF3b, eIF3i e eIF3g, interage com o eIF3c e eIF3a (Khoshnevis *et al.,* 2012) e que também é confirmado em mamíferos (Zhou *et al.,* 2008; Dong *et al.,* 2013).

A interação do eIF3 com o parceiro eIF4G é critica para recrutamento do ribossomo ao mRNA (revisado por (Valasek, 2012) e em humanos esta interação é mediada pela ligação direta do eIF4G às subunidades eIF3c, eIF3d e eIF3e (Villa *et al.,* 2013), estas duas últimas também confirmadas em

tripanosomatídeos. Contudo, em leveduras esta interação é indireta através do eIF5 (Asano *et al.,* 2001), indicando uma certa flexibilidade na função do eIF3 que pode ser extrapolada para diferentes organismos. A caracterização bioquímica do complexo eIF3 de *Leishmania* também encontrou um provável ortólogo para a subunidade eIF3f o que foi importante para confirmar os dados produzidos pelas análises de bioinformática (Rezende *et al.,* 2014). Esta analise identificou proteínas ortólogas ao eIF3f anotadas como hipotéticas que apesar de possuir elementos conservados, não continham o domínio MPN claramente identificável.

O eIF3i é a mais conservada subunidade do eIF3, indicando não só um papel ancestral na iniciação da tradução como também a conservação de funções criticas para o complexo eIF3 (Rezende *et al.,* 2014). Contudo esta informação esta em desacordo com os estudos que indicam que o eIF3i e eIF3g são dispensáveis para funções chaves do eIF3 na iniciação da tradução de leveduras (Phan *et al.,* 2001) e que esta subunidade não é requerida para ativação do complexo em mamíferos (Masutani *et al.,* 2007). Para ajudar a resolver esta discrepância, a confirmação da presença do eIF3i em organismos tão divergentes foi apenas o passo inicial e uma melhor caracterização desta subunidade deve ser feita.

Dentre outras proteínas importantes identificadas na análise por espectrometria de massa da imunoprecipitação do eIF3, vale ressaltar a presença da proteína ribossomal S4 associada ao EIF3E, o que era esperado uma vez que esta proteína faz parte da subunidade 40S a qual o complexo EIF3 está associado (Hinnebusch, 2006). Também foi observada uma possível interação do EIF3E com EIF4G1, um dos cinco homólogos do EIF4G de tripanosomatídeos e em mamíferos, o eIF4G interage com o eIF3 via subunidade eIF3e (Lefebvre *et*

al., 2006). Ainda pode ser observada a existência de RNAs helicases que também são encontradas se ligando a PABP1 (da Costa Lima, 2012), um possível indício da interação entre a PABP1 e o eIF3, embora a própria PABP1 não tenha sido detectada no imunoprecipitado. Foi visto que em mamíferos a tradução pode ser estimulada em caso do complexo PABP-Paip1-eIF3 ser formado (Martineau *et al.,* 2014). Considerando a falta de informações sobre a estrutura e função eIF3 em eucariotos mais divergentes, a caracterização bioquímica do eIF3 juntamente com a bioinformática ajudou não só a identificar as diferentes subunidades do complexo, algumas destas até então consideradas pouco relevantes mas que precisam de uma investigação adequada, como também iniciou o processo de identificação de seus parceiros funcionais em *Leishmania*. O conjunto de resultados obtidos com as análises por espectrometria de massa foram incluídos no manuscrito publicado na revista *BMC Genomics* em dezembro de 2014 (Rezende *et al.,* 2014).

Um dos objetivos das análises de espectrometria foi a identificação da interação do complexo eIF3 com proteínas de complexos do tipo eIF4F, já melhores caracterizados nos tripanosomatídeos. Entretanto, a exceção do EIF4G1, que embora seja homólogo de eIF4G, não se enquadra entre aqueles diretamente implicados no processo de tradução (Freire et al 2014b; Moura *et al.,* 2015), nenhum outro homólogo de subunidade de eIF4F, ou mesmo de PABP foi identificado nos imunoprecipitados. Outras proteínas esperadas, como proteínas ribosomais, também foram pouco evidenciadas nas amostras. Visando melhor caracterizar esses parceiros do eIF3, e investigar melhor sua interação com subunidades do complexo eIF4F, uma segunda abordagem de estudo foi iniciada com seis subunidades do eIF3 (EIF3A, EIF3D, EIF3E, EIF3G, EIF3I e EIF3J) e

dois homólogos de eIF4E menos estudados em tripanosomatídeos (EIF4E1 e EIF4E2). Posteriormente os bem caracterizados EIF4E3 e EIF4E4 também foram incluídos nas análises. Estas proteínas foram todas expressas em *L. infantum,* contudo devido a problemas de ligação inespecífica a resina, a qual foi utilizada para ensaios de imunoprecipitação com anti-HA Abcam®, só foi possível dar continuidade ao trabalho com as proteínas que são reconhecidas pelo anti-HA Sigma® (EIF3A, EIF3D, EIF3G, EIF3I, EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3). Estas diferenças no reconhecimento de proteínas fusionadas a HA por diferentes marcas de anticorpo comercial anti-HA podem estar correlacionadas com a sequência das extremidades C-terminais das proteínas ainda não claramente definidas (Silva, 2014), mas inviabilizam a utilização dos produtos da Sigma® para um subconjunto importante das proteínas em estudo.

Através da segunda abordagem para avaliar as interações entre as subunidades do EIF3, o soro anti-EIF3E reconheceu a proteína EIF3E nas frações das imunoprecipitações das subunidades EIF3A, EIF3D, EIF3G e EIF3I. Isso é indicativo das interações entre estas subunidades, que podem ser diretas, ou indiretas através de outra subunidade co-imunoprecipitada. Em levedura, análises de espectrometria de massa mapearam as interações entre as subunidades do eIF3. Nestas análises o eIF3e interage diretamente com a subunidade eIF3d, e também com o eIF3c. Esta ultima interage com eIF3b que por sua vez interage com outras subunidades do complexo incluindo eIF3a, eIF3g e eIF3i (Zhou *et al.,* 2008). Em humanos, um modelo similar foi proposto, contudo neste, o eIF3e interage indiretamente com eIF3d via eIF3c e este ultimo também interage com eIF3b, e assim como em leveduras, é capaz de interagir com eIF3a, eIF3g e eIF3i (Dong *et al.,* 2013; Villa *et al.,* 2013). Logo, com base nos modelos propostos,

todas as interações visualizadas do eIF3e com eIF3d, eIF3a, eIF3g e eIF3i, devem ocorrer de forma indireta através de outra subunidade como eIF3b e eIF3c, que como já discutido, são subunidades que parecem ter um papel central no complexo de leveduras e mamíferos.

Neste trabalho foi iniciada ainda a avaliação das interações entre os complexos eIF3 e eIF4F em *Leishmania*, através da imunoprecipitação dos homólogos EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3 seguidos de ensaios de imunodetecção com soro contra a subunidade EIF3E. Este reconheceu a proteína EIF3E co-precipitando com os EIF4E2 e EIF4E3, mas não foi capaz de detectar sua presença nas amostras do EIF4E1. Esse resultado também é um indicativo da interação do eIF3 com o complexo eIF4F, podendo ocorrer diretamente através dos homólogos de eIF4E ou indiretamente através de outros fatores. A interação do EIF4E1 de *Leishmania* com subunidades do eIF3 foi investigada através de analise de espectrometria de massa do EIF4E1, expresso e purificado a partir de células nas formas amastigotas e promastigotas. A subunidade EIF3E foi encontrada associada ao EIF4E1 apenas quando este último era expresso em células na forma amastigota (Zinoviev *et al.,* 2011). Aqui, não foi observada interação do EIF3E e EIF4E1, o qual foi expresso e purificado a partir de células na forma promastigota. Esse resultado pode ser um indício de que esta interação seja estágio-específica.

O EIF4E2 que não atua diretamente na tradução, mas é importante para a viabilidade celular, é o menos conservado dentre os homólogos dos tripanosomatídeos. As diferenças observadas parecem estar relacionadas a inserções na sequência do EIF4E2 de *Leishmania* que são inexistentes em seu ortólogo de *T. brucei* e *T. cruzi* (Freire *et al.,* 2011). Esta divergência única implica

que o EIF4E2 tenha uma função mais especifica e a avaliação das interações deste homólogo com possíveis parceiros proteicos, como a interação vista aqui com o EIF3E, por exemplo, é um passo para entender melhor a sua função.

A interação entre o EIF4E3 e o EIF3E já havia sido observada tanto em *L. infantum* quanto em *L. amazonensis* em trabalho anterior (Pereira, 2013), e os dados obtidos aqui confirmam esta interação. Em tripanosomatídeos o EIF4E3 interage com o EIF4G4 e EIF4AI e formam um complexo do tipo EIF4F e apesar de não atuar na iniciação da tradução global (Zinoviev, Manor e Shapira, 2012), é sugerido que este complexo participe da tradução de mRNAs específicos (Moura *et al.,* 2015). A interação do EIF3E com o EIF4E3 pode estar ocorrendo via EIF4G4, visto que, em humanos, subunidades do complexo eIF3, incluindo eIF3e, interage com eIF4G para recrutamento do ribossomo ao mRNA (Villa *et al.,* 2013)

Como perspectivas para este trabalho, uma análise comparativa entre todos os seis homólogos de eIF4E ainda deve ser feita, principalmente com o EIF4E4, que é o principal candidato a desempenhar as funções do eIF4E em tripanosomatídeos. A caracterização por espectrometria das proteínas co-precipitadas com as diferentes subunidades de eIF3 também poderão facilitar a identificação de interações entre este complexo e homólogos específicos de eIF4E e eIF4G, bem como um melhor entendimento de como se dá a organização desse complexo em *Leishmania* e outros tripanosomatídeos. Abordagens experimentais subsequentes para investigar e validar as diferenças encontradas em comparação com organismos mais conhecidos serão bastante úteis para a compreensão dos aspectos únicos da iniciação da tradução e sua regulação nos eucariotos divergentes, como também contribuirão para a compreensão de todo o processo, e como ele pode variar entre diferentes grupos taxonômicos.

7. Conclusões

1. A proteína EIF3E de *Leishmania infantum* integra um complexo EIF3 clássico muito semelhante ao complexo dos mamíferos.

2. As construções plasmidiais obtidas são viáveis e os produtos clonados são expressos em *L. infantum.*

3. A subunidade EIF3E interage, *in vivo,* com outras subunidades do EIF3, como EIF3A, EIF3D, EIF3G e EIF3I.

4. O complexo eIF3 interage, *in vivo,* com dois homólogos de eIF4E de *Leishmania*, os EIF4E2 e EIF4E3, mas não interage com um terceiro homólogo, o EIF4E1.

8. Referências bibliográficas

Asano K, Clayton J, Shalev A and Hinnebusch AG (2000) A multifactor complex of eukaryotic and initiator tRNA Met is an important translation initiation intermediate in vivo. Genes Dev 14:2534–2546.

Asano K, Phan L, Anderson J and Hinnebusch a G (1998) Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 273:18573–18585.

Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Donahue TF and Hinnebusch AG (2001) Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. EMBO J 20:2326–2337.

Assis LA (2013) Caracterização Preliminar e desenvolvimento de ferramentas moleculares para o estudo dos fatores de iniciação da tradução EIF3e, EIF4B e EIF5 em Leishmania major (Trabalhão de Conclusão de Curso).

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.

Bates PA (2007) Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 37:1097–1106.

Batista JAN, Texeira SMR, Donelson JE, Kirchhoff LV and Sá CM De (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 and Blandin (2005) The Genome of the African Trypanosome Trypanosoma brucei. Science 309:416–422.

Besteiro S, Williams R a M, Coombs GH and Mottram JC (2007) Protein turnover and differentiation in Leishmania. Int J Parasitol 37:1063–1075.

Block KL, Vornlocher HP and Hershey JWB (1999) Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3. J Biol Chem 273:31901–31908.

Brasil MS (2009) Guia de Vigilância Epidemiólogica. 7ª ed. Editora MS, Brasilia-DF, 813 pp.

Brasil MS (2006) Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. 1ª ed. Editora MS, Brasilia-DF, 120 pp.

Brasil MS (2007) Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar americana. 2ª ed. Editora MS, Brasilia-DF, 184 pp

Brasil MS. Secretária da Vigilância em Saúde. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/> Acessado em Dezembro de 2014.

Burks EA, Bezerra PP, Le H, Gallie DR and Browning KS (2001) Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. J Biol Chem 276:2122–2131.

Campbell D a., Thomas S and Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: Why be normal? Microbes Infect 5:1231–1240.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J and Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol 5:873–882.

Clayton C and Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol Biochem Parasitol 156:93–101.

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

Da Costa Lima TD (2012) Abordagens moleculares voltadas a caracterização funcional dos homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) em espécies de Leishmania sp (Tese de doutorado).

Da Costa Lima TD, Moura DMN, Reis CRS, Vasconcelos JRC, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RCBQ and de Melo Neto OP (2010) Functional characterization of three Leishmania poly(A) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. Eukaryot Cell 9:1484–1494.

Dantas-Torres F (2007) The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. Vet Parasitol 149:139–146.

Dhalia R, Marinsek N, Reis CRS, Katz R, Muniz JRC, 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 CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, 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.

Dong Z, Liu Z, Cui P, Pincheira R, Yang Y, Liu J and Zhang JT (2009) Role of eIF3a in regulating cell cycle progression. Exp Cell Res 315:1889–1894.

Dong Z, Qi J, Peng H, Liu J and Zhang JT (2013) Spectrin domain of eukaryotic initiation factor 3a is the docking site for formation of the a:b:i:g subcomplex. J Biol Chem 288:27951–27959.

Dong Z and Zhang JT (2006) Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer. Crit Rev Oncol Hematol 59:169–180.

Elantak L, Tzakos AG, Locker N and Lukavsky PJ (2007) Structure of eIF3b RNA recognition motif and its interaction with eIF3j: Structural insights into the recruitment of eIF3b to the 40 S ribosomal subunit. J Biol Chem 282:8165–8174.

Eliseeva I a, Lyabin DN and Ovchinnikov LP (2013) Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. Biochem Biokhimiia 78:1377–91.

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

Field MC, Natesan SKA, Gabernet-Castello C and Lila Koumandou V (2007) Intracellular trafficking in the trypanosomatids. Traffic 8:629–639.

Fraser CS, Berry KE, Hershey JWB and Doudna J a. (2007) eIF3j Is Located in the Decoding Center of the Human 40S Ribosomal Subunit. Mol Cell 26:811–819.

Fraser CS, Lee JY, Mayeur GL, Bushell M, Doudna JA and Hershey JWB (2004) The j-Subunit of Human Translation Initiation Factor eIF3 Is Required for the Stable Binding of eIF3 and Its Subcomplexes to 40 S Ribosomal Subunits in Vitro. J Biol Chem 279:8946–8956.

Freire ER, Dhalia R, Moura DMN, Da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CRS, Hughes K, Figueiredo RCBQ, Standart N, Carrington M *et al.,* (2011) The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with

distinct features in primary sequence and biological properties. Mol Biochem Parasitol 176:25–36.

Freire ER, Malvezzi AM, Vashisht A a, Zuberek J, Saada EA, Langousis G, Nascimento JDF, Moura D, Darzynkiewicz E, Hill K *et al.,* (2014a) Trypanosoma brucei translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. Eukaryot Cell 13:896–908.

Freire ER, Vashisht AA, Malvezzi AM, Zuberek J, Langousis G, Saada E a, Nascimento JDF, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Hill K *et al.,* (2014b) eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in Trypanosoma brucei. RNA 20:1272–1286.

Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, Myler P, Berriman M, Ivens A, Andersson B, Bontempi E, Eisen J, Angiuoli S *et al.,* (2004) Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol 134:183–191.

Gingras A, 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.

Gontijo B (2003) Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop 36:71–80.

Gontijo CMF and Melo MN (2004) Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 7:338–349.

Goodfellow IG and Roberts LO (2011) Molecules in Focus Eukaryotic initiation factor 4E. Eur PMC Funders Gr 40:2675–2680.

Guo J and Sen GC (2000) Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus. J Virol 74:1892–1899.

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

Hanachi P, Hershey JWB and Vornlocher HP (1999) Characterization of the p33 subunit of eukaryotic translation initiation factor-3 from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 274:8546–8553.

Herrmannová A, Daujotyte D, Yang JC, Cuchalová L, Gorrec F, Wagner S, Dányi I, Lukavsky PJ and Valášek LS (2012) Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-initiation complex assembly. Nucleic Acids Res 40:2294–2311.

Hinnebusch AG (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. Annu Rev Biochem 83:779–812.

Hinnebusch AG (2006) eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. Trends Biochem Sci 31:553–562.

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

Jackson RJ, Hellen CUT and Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat Rev Mol Cell Biol 11:113–127.

Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B and Place AR (2012) Diversity of eukaryotic translational initiation factor eIF4E in protists. Comp Funct Genomics 2012:134839.

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

Kaye P and Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol 9:604–615.

Khoshnevis S, Hauer F, Milón P, Stark H and Ficner R (2012) Novel insights into the architecture and protein interaction network of yeast eIF3. RNA 18:2306–19.

Kim TH, Hofmann K, von Arnim AG and Chamovitz D a. (2001) PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. Trends Plant Sci 6:379–386.

Kissinger JC (2006) A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. Trends Parasitol 22:238–240.

Lefebvre AK, Korneeva NL, Trutschl M, Cvek U, Duzan RD, Bradley C a, Hershey JW and Rhoads RE (2006) Translation Initiation Factor eIF4G-1 Binds to eIF3 through the eIF3ε Subunit. J Biol Chem 281:22917–22932.

Liang X, Haritan A, Uliel S and Michaeli S (2003) trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. Eukaryot Cell 2:830–840.

Lopes AH, Souto-Padron T, Dias FA, Gomes MT, Rodrigues GC, Zimmermann LT, Alves e Silva TL and Vermelho AB (2010) Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. Open Parasitol J 4:30–59.

Marintchev A, Edmonds K a, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N and Wagner G (2009) Complex in Translation Initiation. Cell 136:447–460.

Marintchev A and Wagner G (2004) Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. Q Rev Biophys 37:197–284.

Martineau Y, Wang X, Alain T, Petroulakis E, Shahbazian D, Fabre B, Bousquet-Dubouch M-P, Monsarrat B, Pyronnet S and Sonenberg N (2014) Control of Paip1-eukayrotic translation initiation factor 3 interaction by amino acids through S6 kinase. Mol Cell Biol 34:1046–53.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-De-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG and Figueroa-Angulo EE (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. J Biomed Biotechnol 2010:525241.

Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K and Myler PJ (2003) Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. Mol Cell 11:1291–1299.

Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S and Imataka H (2007) Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. EMBO J 26:3373–83.

Mayeur GL, Fraser CS, Peiretti F, Block KL and Hershey JWB (2003) Characterization of eIF3k - A newly discovered subunit of mammalian translation initiation factor eIF3. Eur J Biochem 270:4133–4139.

McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic V a. and Naderer T (2007) Living in a phagolysosome; metabolism of Leishmania amastigotes. Trends Parasitol 23:368–375.

Melo EO, Dhalia R, De Sa CM, Standart N and De Melo Neto OP (2003) Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP

interaction domain: Role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. J Biol Chem 278:46357–46368.

Méthot N, Song MS and Sonenberg N (1996) A region rich in aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine (DRYG) mediates eukaryotic initiation factor 4B (eIF4B) self-association and interaction with eIF3. Mol Cell Biol 16:5328–5334.

Michalick MSM (2005) Ciclo evolutivo da Leishmania. Parasitologia humana, 11ª ed. Atheneu, pp 41–46

Moura DMN, Reis CRS, Xavier CC, da Costa Lima TD, Lima RP, Carrington M and De Melo Neto OP (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. RNA Biol (artigo aceito para publicação).

Neuber H (2008) Leishmaniasis. J Ger Soc Dermatology 6:754–65.

Nielsen KH, Szamecz B, Valásek L, Jivotovskaya A, Shin BS and Hinnebusch AG (2004) Functions of eIF3 downstream of 48S assembly impact AUG recognition and GCN4 translational control. EMBO J 23:1166–1177.

Nunes EC, Freire ER and de Melo Neto OP (2008) Identificação de possíveis parceiros funcionais do fator de iniciação da tradução EIF4G de tripanosomatídeos utilizando ferramentas de bioinformática. In: Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética, pp 270.

Nygard O and Westermannt P (1982) Specific interaction of one subunit of eukaryotic initiation factor eIF-3 with 18S ribosomal RNA within the binary complex, eIF-3 small ribosomal subunit, as shown by cross-linking experiments. Nucleic Acids Res 10:1327–1334.

Padmanabhan PK, Dumas C, Samant M, Rochette A, Simard MJ and Papadopoulou B (2012) Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan Leishmania. PLoS One 7:e52612.

Park H, Himmelbach A, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA, Miescher-institute F and Box PO (2001) A Plant Viral " Reinitiation " Factor Interacts with the Host Translational Machinery University of Texas at Austin. Cell 106:723–733.

Park H-S, Browning KS, Hohn T and Ryabova LA (2004) Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor. EMBO J 23:1381–1391.

Pereira MMC (2013) Identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em Leishmania (Tese de doutorado)

Pestova TV and Hellen CUT (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic. Cell Mol Life Sci 57:651–674.

Pestova T V, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko E V, Shatsky IN, Agol VI and Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. Proc Natl Acad Sci USA 98:7029–7036.

Phan L, Schoenfeld LW and Nielsen KH (2001) A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA iMet. EMBO J 20:2954–2965.

Pincheira R, Chen Q and Zhang JT (2001) Identification of a 170-kDa protein over-expressed in lung cancers. Br J Cancer 84:1520–1527.

Pitula J, Ruyechan WT and Williams N (1998) Trypanosoma brucei : Identification and Purification of a Poly (A) -Binding Protein. Exp Parasitol 160:157–160.

Plank T-DM and Kieft JS (2012) The structures of non-protein coding RNAs that drive IRES function. NHI Public Acess 3:195–212.

Plutzer J, Ongerth J and Karanis P (2010) Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. Int J Hyg Environ Health 213:321–33.

Pontes F (2009) Doenças negligenciadas – ainda matam 1 milhão por ano no mundo. Inovação em Pauta 69–73.

Preiss T and Hentze MW (2003) Starting the protein synthesis machine: Eukaryotic translation initiation. BioEssays 25:1201–1211.

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

Rezende AM, Assis LA, Nunes EC, da Costa Lima TD, Marchini FK, Freire ER, Reis CR and de Melo Neto OP (2014) The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates - identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. BMC Genomics 15:1175.

Rhoads RE (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. J Biol Chem 284:16711–5.

Saletta F, Rahmanto YS and Richardson DR (2010) The translational regulator eIF3a: The tricky eIF3 subunit! Biochim Biophys Acta - Rev Cancer 1806:275–286.

Santos LO, Garcia-Gomes a S, Catanho M, Sodre CL, Santos a LS, Branquinha MH and d'Avila-Levy CM (2013) Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. Curr Med Chem 20:3116–33.

Shalev A, Valášek L, Pise-Masison C a., Radonovich M, Phan L, Clayton J, He H, Brady JN, Hinnebusch AG and Asano K (2001) Saccharomyces cerevisiae Protein Pci8p and Human Protein eIF3e/Int-6 Interact with the eIF3 Core Complex by Binding to Cognate eIF3b Subunits. J Biol Chem 276:34948–34957.

Silva JR da C (2014) Análise da expressão heteróloga de proteinas com dominio de ligação a RNA em Leishmania infantum (Dissertação de mestrado).

Simpson AGB, Stevens JR and Lukeš J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol 22:168–174.

Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K and Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. Trends Biochem Sci 24:181–185.

Sokabe M and Fraser CS (2014) Human Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAi Ternary Complex and eIF3 Stabilize the 43 S Preinitiation Complex. J Biol Chem 289:31827–36.

Sonenberg N and Hinnebusch AG (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. Cell 136:731–745.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S and Tarleton R (2008) Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. J Clin Invest 118:1301–1310.

Sun C, Todorovic A, Querol-Audí J, Bai Y, Villa N, Snyder M, Ashchyan J, Lewis CS, Hartland A, Gradia S *et al.,* (2011) Functional reconstitution of human eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3). Proc Natl Acad Sci U S A 108:20473–8.

Tuteja R (2009) Identification and bioinformatics characterization of translation initiation complex eIF4F components and poly(A)-binding protein from Plasmodium falciparum. Commun Integr Biol 2:245–260.

Uchida N, Hoshino SI, Imataka H, Sonenberg N and Katada T (2002) A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation. J Biol Chem 277:50286–50292.

Valásek L, Nielsen KH, Zhang F, Fekete C a and Hinnebusch AG (2004) Interactions of eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit NIP1/c with eIF1 and eIF5 promote preinitiation complex assembly and regulate start codon selection. Mol Cell Biol 24:9437–9455.

Valasek LS (2012) " Ribozoomin " – Translation Initiation from the Perspective of the Ribosome-bound Eukaryotic Initiation Factors (eIFs). Curr Protein Pept Sci 12:305–330.

Van Griensven J and Diro E (2012) Visceral leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am 26:309–22.

Velozo D, Ribeiro MCM, Costa ICC, Cabral A, da Motta J de OC and Sampaio RNR (2006) Case Report Leishmaniose mucosa fatal em criança. An Bras Dermatol 81:255–259.

Villa N, Do A, Hershey JWB and Fraser CS (2013) Human eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, -d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome. J Biol Chem 288:32932–32940.

Vornlocher HP, Hanachi P, Ribeiro S and Hershey JWB (1999) A 110-kilodalton subunit of translation initiation factor eIF3 and an associated 135-kilodalton protein are encoded by the Saccharomyces cerevisiae TIF32 and TIF31 genes. J Biol Chem 274:16802–16812.

Wagner S, Herrmannová A, Malík R, Peclinovská L and Valášek LS (2014) Functional and biochemical characterization of human eukaryotic translation initiation factor 3 in living cells. Mol Cell Biol 34:3041–52.

Walsh D and Mohr I (2014) Coupling 40S ribosome recruitment to modification of a cap-binding initiation factor by eIF3 subunit e. Genes Dev 28:835–840.

WHO, World Heath Organization. Leishmaniasis. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
Acessado em dezembro em 2014.

Yoffe Y, Léger M, Zinoviev A, Zuberek J, Darzynkiewicz E, Wagner G and Shapira M (2009) Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. Nucleic Acids Res 37:3243–3253.

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

Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira Z, Keasar C, Orr-Dahan I, Jankowska-Anyszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E and Shapira M (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from Leishmania. RNA 10:1764–1775.

Zhou C, Arslan F, Wee S, Krishnan S, Ivanov AR, Oliva A, Leatherwood J and Wolf D a (2005) PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes. BMC Biol 3:14.

Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, Schenauer MR, Yokoi-Fong T, Barsky D, Leary J a, Hershey JW *et al.,* (2008) Mass

spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3. PNAS 105:18139–18144.
Zijlstra EE, Musa a. M, Khalil EAG, El Hassan IM and El-Hassan AM (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. Lancet Infect Dis 3:87–98.
Zinoviev A, Léger M, Wagner G and Shapira M (2011) A novel 4E-interacting protein in Leishmania is involved in stage-specific translation pathways. Nucleic Acids Res 39:8404–8415.
Zinoviev A, Manor S and Shapira M (2012) Nutritional stress affects an atypical cap-binding protein in Leishmania. RNA Biol 9:1450–60.

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates – identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis

Antonio M Rezende[1], Ludmila A Assis[1], Eduardo C Nunes[1], Tamara D da Costa Lima[1], Fabricio K Marchini[2], Eden R Freire[1], Christian RS Reis[1] and Osvaldo P de Melo Neto[1*]

Abstract

Background: The initiation of translation in eukaryotes is supported by the action of several eukaryotic Initiation Factors (eIFs). The largest of these is eIF3, comprising of up to thirteen polypeptides (eIF3a through eIF3m), involved in multiple stages of the initiation process. eIF3 has been better characterized from model organisms, but is poorly known from more diverged groups, including unicellular lineages represented by known human pathogens. These include the trypanosomatids (*Trypanosoma* and *Leishmania*) and other protists belonging to the taxonomic supergroup Excavata (*Trichomonas* and *Giardia* sp.).

Results: An in depth bioinformatic search was carried out to recover the full content of eIF3 subunits from the available genomes of *L. major*, *T. brucei*, *T. vaginalis* and *G. duodenalis*. The protein sequences recovered were then submitted to homology analysis and alignments comparing them with orthologues from representative eukaryotes. Eleven putative eIF3 subunits were found from both trypanosomatids whilst only five and four subunits were identified from *T. vaginalis* and *G. duodenalis*, respectively. Only three subunits were found in all eukaryotes investigated, eIF3b, eIF3c and eIF3i. The single subunit found to have a related Archaean homologue was eIF3i, the most conserved of the eIF3 subunits. The sequence alignments revealed several strongly conserved residues/region within various eIF3 subunits of possible functional relevance. Subsequent biochemical characterization of the *Leishmania* eIF3 complex validated the bioinformatic search and yielded a twelfth eIF3 subunit in trypanosomatids, eIF3f (the single unidentified subunit in trypanosomatids was then eIF3m). The biochemical data indicates a lack of association of the eIF3j subunit to the complex whilst highlighting the strong interaction between eIF3 and eIF1.

Conclusions: The presence of most eIF3 subunits in trypanosomatids is consistent with an early evolution of a fully functional complex. Simplified versions in other excavates might indicate a primordial complex or secondary loss of selected subunits, as seen for some fungal lineages. The conservation in eIF3i sequence might indicate critical functions within eIF3 which have been overlooked. The identification of eIF3 subunits from distantly related eukaryotes provides then a basis for the study of conserved/divergent aspects of eIF3 function, leading to a better understanding of eukaryotic translation initiation.

Keywords: Translation initiation factor, Protein synthesis, eIF3, Protozoa

* Correspondence: opmn@cpqam.fiocruz.br
[1]Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Rezende et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

The initiation stage of protein synthesis in eukaryotes is a complicated process, which involves a great number of different macromolecules and requires the action of multiple eukaryotic Initiation Factors, eIFs. Many eIFs from model organisms such as *Drosophila*, budding yeast, mouse and *Arabidopsis*, have been well characterized and their role in translation initiation described. Some of these are single polypeptide factors whilst others are complexes of multiple subunits which can be very large and perform various roles in translation (more recently reviewed in [1-3]).

eIF3 is the largest of the initiation factors, both in size and in number of subunits, being active during multiple steps of the translation initiation process. In mammals, it is composed of 13 subunits (eIF3a through eIF3m) whilst in the budding yeast *S. cerevisae*, a reduced eIF3 is present composed of five essential subunits (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g and eIF3i) and the non-essential eIF3j (reviewed in [2,4-6]). The essential *S. cerevisae* subunits defined the core eIF3 complex present in all eukaryotes investigated so far. Nevertheless, *in vitro* reconstitution of mammalian eIF3 have implicated three conserved subunits (eIF3a, eIF3b, eIF3c) and three non-conserved subunits (eIF3e, eIF3f and eIF3h) as being required for eIF3 function, and constituting a functional mammalian eIF3 core, whilst indicating that the two conserved subunits eIF3g and eIF3i might be dispensable [7]. Indeed eIF3a, eIF3b and eIF3c have been proposed to occupy a central position in the overall mammalian eIF3 structure. In the absence of the loosely associated eIF3j, the mammalian complex seems to be organized in three stable modules: the first (module i), formed by the eIF3a, eIF3b, eIF3g and eIF3i subunits, resembling the budding yeast eIF3 core; a second module (ii), formed by subunits eIF3c, eIF3d, eIF3e, eIF3k and eIF3l; and a third smaller module (iii), formed by subunits eIF3f, eIF3h and eIF3m [8,9]. Cryo-electron microscopic reconstruction of eIF3 has revealed that its subunits are organized in an anthropomorphic shape with five appendages and which shows surface complementarity to the platform of the 40S ribosomal subunit [10].

To accomplish its function, many of the eIF3 subunits participate in direct protein-protein interactions with other eIFs as well as ribosomal proteins, and also bind directly to RNA (reviewed in [2,5]). Six of the mammalian eIF3 subunits (eIF3a, eIF3c, eIF3e, eIF3k, eIF3l and eIF3m) contain a PCI domain, a hallmark of related protein complexes such as the lid of the 19S regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome, which is involved in protein-protein interactions ([11,12]; reviewed in [13]). Recent evidence has also implicated the PCI domain in the binding of two distinct yeast eIF3 subunits (eIF3a and eIF3c) to RNA [14,15] although in humans the same subunits were found to bind to RNA (HCV IRES) through independent RNA-binding HLH motifs [16]. Two other eIF3 subunits (eIF3f and eIF3h), containing the MPN domain, are members of a second family of proteins which also include subunits of the 26S proteasome and the signalosome, reflecting a common evolutionary origin for all three complexes ([11,12,17]; also reviewed in [13]). It has been proposed that the six PCI and two MPN containing subunits constitute a structural core which binds to other eIF3 subunits, translation initiation factors and the 40S ribosomal subunit [18,19]. Indeed a functional reconstitution of the human eIF3 has shown that these subunits can form a stable octameric complex [18], pointing out to a spontaneous assembly pathway for the eIF3 complex which, nevertheless, is compatible with the three modules concept described above.

Most of what is known in regard to eIF3 and its role in translation initiation within eukaryotes is derived from very few organisms, despite the fact that a remarkable diversity within the translation apparatus has been noticed across the different eukaryotic groups [20]. Not many studies, however, have been carried out focusing on excavates, unicellular protists which diverged very early from better studied unicellular and multicellular eukaryotes. These include many pathogenic species of medical and veterinary importance, such as those belonging to the family Trypanosomatidae (genus *Leishmania* and *Trypanosoma*) and even more divergent eukaryotes. The trypanosomatids have been seen to display unique biological characteristics rarely seen in eukaryotes. These include a scarcity of promoters for the protein coding genes, transcription of mRNAs in long polycystronic units, *trans* splicing of these polycystronic messages into monocystronic mature mRNAs and a lack of transcriptional control of their gene expression (recently reviewed in [21-24]). Regarding translation initiation, the study in trypanosomatids of eIF4E and eIF4G, two other initiation factors known to partner with eIF3 in the recruitment of mRNA by the ribosome, has highlighted novel and conserved events when compared to other eukaryotes (reviewed in [25,26]). However, little is known regarding the eIF3 subunits of trypanosomatids and to what degree they are conserved in sequence or function when compared to better known eukaryotes.

The availability of complete or nearly complete genomic sequences for several selected trypanosomatids [27-29], as well as for other excavates of medical importance, such as *Giardia* sp. [30] and *Trychomonas* sp. [31], has generated new opportunities to investigate basic biological processes in pathogenic organisms which are distantly placed within the eukaryotic lineage. Studying translation initiation in these organisms may not only help define divergent features in specific stages, useful in the identification of potential therapeutical targets, but may also enhance the

understanding regarding the evolution and conservation of the whole process throughout the eukaryotic lineages. Here, various bioinformatic tools were applied in order to perform a systematic search of the genomes of selected organisms for homologues of the various eIF3 subunits. The main targets were the two most complete trypanosomatid genomes available, those from *Leishmania major* [27] and *Trypanosoma brucei* [28], but studies were also carried out using the *Giardia duodenalis* (*synonymous* to *G. lamblia* and *G. intestinalis* – [32] and *Trichomonas vaginalis* sequences, as well as those from model eukaryotic and prokaryotic organisms. Sequences identified were validated through different approaches, including the biochemical purification of the *Leishmania* eIF3 complex followed by subsequent proteomic analysis, and used to investigate conserved and divergent features. Our results indicate a substantial degree of conservation of the eIF3 subunits in most eukaryotes whilst highlighting the occurrence of multiple instances of complex simplification. It also suggests a likely central role for the eIF3b, eIF3c and eIF3i subunits in eIF3 function.

Results

Bioinformatic identification of eIF3 subunits within selected genome sequences

A detailed *de novo* search was carried out for sequences corresponding to eIF3 subunits present within the proteomes of the four unicellular pathogens chosen for this study (*T. brucei*, *L. major*, *T. vaginalis* and *G. duodenalis*), as well as representative organisms used for comparison (described in the Methods section). Identification of these sequences was validated using as reference the annotated human eIF3 subunits. This validation generated the results shown in Table 1, providing an overview on the conservation of individual subunits throughout representative eukaryotic lineages. The human eIF3 subunits were also used for pair-wise comparisons aiming to evaluate the degree of identity/similarity between the sequences identified from the four target organisms and their mammalian counterparts, summarized in Table 2.

Orthologues to all thirteen subunits were found in lineages representing the three major groups of multicellular eukaryotes, metazoans (*Homo sapiens*), plants (*Arabidopsis thaliana*) and filamentous fungi (*Aspergillus niger*), confirming a substantial degree of conservation for the eIF3 complex. Using the bioinformatics approach, eleven orthologues for eIF3 subunits were found in both *L. major* and *T. brucei*, missing one PCI (eIF3m) and one MPN subunit (eIF3f) when compared to higher eukaryotes. A likely eIF3f orthologue was found experimentally in *Leishmania*, as discussed later in the text, and both *L. major* and *T. brucei* orthologues were included in Tables 1 and 2. The presence of a nearly complete eIF3 complex in trypanosomatids suggests that it would be structurally similar to the human eIF3 and contrasts with the substantial reduction in the number of eIF3 subunits found in *T. vaginalis* and *G. duodenalis*. Only five eIF3 subunits were found in *T. vaginalis* including eIF3b, eIF3d and eIF3i plus one subunit each with a PCI (eIF3c) and MPN (eIF3h) domain, comprising subunits from all three described mammalian eIF3 modules [8]. A similar result was also generated from the analysis with the *G. duodenalis* sequences, where only four subunits were identified. A minimal eIF3 then seems to be present in this organism, consisting of subunits eIF3b and eIF3i of the first mammalian eIF3 module plus a single PCI subunit (eIF3c) and, somewhat unexpectedly, an eIF3j

Table 1 Summary of the search data for eIF3 subunits from the twelve organisms selected for this study

Subunit	*H. sapiens*	*C. elegans*	*A. thaliana*	*A. niger*	*S. pombe*	*S. cerevisae*	*L. major*	*T. brucei*	*T. vaginalis*	*G. duodenalis*	*M. jannaschii*	*E. coli*
eIF3a	X	X	X	X	X	X	X	X				
eIF3b	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
eIF3c	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
eIF3d	X	X	X	X	X		X	X	X			
eIF3e	X	X	X	X	X		X	X				
eIF3f	X	X	X	X	X		X^+	X^+				
eIF3g	X	X	X	X	X	X	X	X				
eIF3h	X	X	X	X	X		X	X	X			
eIF3i	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
eIF3j	X	X	X	X	X	X	X	X		X		
eIF3k	X	X	X	X			X	X				
eIF3l	X	X	X	X			X	X				
eIF3m	X	X	X	X	X							

The letter X means presence while empty box means absence in the various species, according to the bioinformatic analysis. X^+ symbol indicates the eIF3f homologues identified only after the biochemical analysis of the *Leishmania* eIF3 complex.

Table 2 General features for each eIF3 subunit found from *L. major*, *T. brucei*, *T. vaginalis* and *G. duodenalis*

eIF3 subunit	(TriTrypDB) accession	Size (MW –KDa)	Comparison with human homologue		Gene product description at TriTrypDB
			% Identity (similarity)	% Query coverage	
eIF3a	LmjF.17.0010	774 (87.6)	20 (38)	51	Hypothetical protein, conserved
	Tb927.7.6090	762 (88.2)	22 (43)	61	Hypothetical protein, conserved
eIF3b	LmjF.17.1290	709 (80.8)	25 (42)	64	Translation initiation factor, putative
	Tb927.5.2570	696 (79.8)	22 (39)	91	Translation initiation factor, putative (EIF3B)
	TVAG_333940	608 (68.2)	19 (40)	96	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative
	GL50803_15495	871 (98.5)	19 (37)	55	Hypothetical protein
eIF3c	LmjF.36.6980	731 (82.0)	24 (46)	44	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative
	Tb927.10.8270/ Tb927.10.8290	740 (84.3)	24 (44)	74	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8, putative
	TVAG_184380	773 (90.0)	26 (47)	48	Hypothetical protein
	GL50803_24279	793 (89.5)	19 (39)	21	Hypothetical protein
eIF3d	LmjF.30.3040	531 (60.6)	24 (40)	90	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like, putative
	[1] Tb927.6.4370	506 (57.9)	29 (46)	75	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like, putative
	TVAG_062640	464 (52.8)	25 (45)	63	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative
eIF3e	LmjF.28.2310	405 (46.4)	28 (47)	93	Eukaryotic translation initiation factor subunit, putative
	Tb927.11.11590	413 (46.7)	27 (47)	72	Eukaryotic translation initiation factor subunit, putative
eIF3f	LmjF.25.1610	326 (36.7)	29 (50)	27	Hypothetical protein, conserved
	Tb927.3.1680	318 (35.1)	[2]~	10	Hypothetical protein, conserved
eIF3g	LmjF.34.2700	255 (28.8)	26 (47)	57	Hypothetical protein, conserved
	Tb927.4.1930	272 (31.3)	23 (42)	86	RNA-binding protein, putative (EIF3D)
eIF3h	LmjF.07.0640	335 (37.9)	21 (45)	65	Hypothetical protein, conserved
	Tb927.8.1170/ Tb927.8.1190	331 (36.4)	22 (40)	50	Hypothetical protein, conserved
	TVAG_105990	329 (38.0)	24 (44)	82	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative
eIF3i	[1]LmjF.36.3880	352 (38.2)	29 (50)	96	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2, putative
	Tb927.11.9610	342 (37.7)	38 (57)	95	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2, putative (eIF-3 beta)
	TVAG_114460	371 (41.5)	27 (42)	88	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative
	GL50803_13661	350 (38.4)	24 (43)	91	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2
eIF3j	LmjF.25.2120	211 (23.5)	22 (37)	79	Hypothetical protein, conserved
	Tb927.3.2220	220 (23.8)	25 (43)	53	Hypothetical protein, conserved
	GL50803_15546	261 (29.2)	23 (40)	98	Hypothetical protein
eIF3k	LmjF.32.2180	233 (26.3)	28 (39)	59	Hypothetical protein, conserved
	Tb927.11.15420	205 (23.1)	25 (46)	90	Hypothetical protein, conserved
eIF3l	LmjF.36.0250	633 (72.6)	25 (45)	65	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, putative
	Tb927.10.4640	488 (55.6)	25 (43)	87	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L, putative

In addition, a comparison against *H. sapiens* eIF3 subunits was performed.
[1]In the TriTrypDB database the AUG from these sequences were likely misidentified since they generate peptides missing from orthologues in related species and were removed here.
[2]The Identity (Similarity) levels for this protein were not significant and were omitted from the table.

orthologue. Another relevant observation is the identification of a putative eIF3i homologue from *M. jannaschii*, with this being the single eIF3 subunit which is found to have an Archaean homologue. Specific results generated in this study from the bioinformatic analysis of each eIF3 subunit are presented separately below.

eIF3a

The largest eIF3 subunit, eIF3a (also known as TIF32/RPG1), is characterized by the presence of a centrally localized PCI domain followed by a Spectrin repeat domain, typical of the Spectrin family of Actin-binding proteins (reviewed in [33]). eIF3a orthologues were identified from both *L. major* or *T. brucei* (named EIF3A), although only after searches carried out using the HMMs based approach, with both trypanosomatid polypeptides found being annotated as hypothetical proteins within the TriTrypDB database (Table 1). No equivalent sequences were found from either *G. duodenalis* or *T. vaginalis*, despite extensive searches using different bioinformatics approaches. When compared with the human eIF3a, the putative trypanosomatid orthologues display a low level of overall similarity (Table 2), but when they were included in a multiple alignment with other eIF3a orthologues a number of conserved amino acids, spaced throughout their length, are observed, as well as the characteristic PCI and Spectrin repeat domains (Additional file 1: Figure S1). Noteworthy is the presence of an extended C-terminus in the human protein, which is missing from the trypanosomatid orthologues and is much reduced in eIF3a sequences from other eukaryotes. Overall similarity between the different sequences is greater within their N-terminuses, implying a greater conservation in binding properties to the 40S subunit, eIF3c and eIFs involved in start codon recognition, all of which are associated with the N-terminal half of eIF3a [34,35]. Conservation within the C-terminal halves, which include the PCI and Spectrin domains, is less pronounced (Figure 1A and B), although one of the longest conserved motifs in the alignment is found within the Spectrin domain, with seven out of ten amino acids strictly conserved between the trypanosomatid and human sequences. This Spectrin domain has recently been shown to mediate binding of human eIF3a to eIF3b and eIF3i [36] but, apart from the single phenylalanine residue (F760 in human eIF3a), shown to participate in the interaction with eIF3b and also found in the two trypanosomatid sequences, the overall similarity within the segment already implicated in binding to eIF3b and eIF3i is very low.

eIF3b

Also known as PRT1, eIF3b (reviewed in [4]) is a large scaffolding protein within the eIF3 complex, characterized by the presence of a non-canonical RRM domain [37]. The C-terminus of eIF3b consists of a very large segment defined as a WD repeat domain, which serves as a platform where proteins interact and participates in the formation of multiprotein complexes [38]. This WD repeat domain assumes a structure which has been recently solved and consists of a nine bladed β-propeller which interacts with the 40S ribosomal subunit [39]. As previously described [40], and in contrast to eIF3a, eIF3b orthologues are clearly identifiable in both *L. major* and *T. brucei*. The HMMs search also returned putative eIF3b orthologues for *T. vaginalis* and *G. duodenalis*, with the two proteins containing both RRM and WD repeat domains, but sharing little overall sequence identity with other homologues (Tables 1 and 2). When these proteins were analyzed by a multiple alignment, the conservation in sequence between the protozoa eIF3b orthologues and those from multicellular eukaryotes (fungi, mammals and plants) is more pronounced at the C-terminal WD repeat domain and within the protein's center, whilst the conservation within the RRM domain is more restricted to its N-terminal end (Figure 2A and B and Additional file 1: Figure S2). The RRM of eIF3b has been involved in several protein-protein interactions required for eIF3b function, such as binding to eIF3a, eIF3j and eIF3e [37,41,42]. In contrast, its extreme C-terminus, including the end of the WD repeat domain, has been shown in *S. cerevisiae* to be involved in binding to eIF3g and eIF3i, with the interaction between eIF3b and eIF3i characterized in more detail [43,44]. In the various protozoan homologues investigated here, and with the exception of a single aromatic residue implicated in this interaction (W713 in the yeast protein in the Figure) and found to be conserved in all eIF3b orthologues aligned, the C-terminus of eIF3b implicated in the interaction with eIF3i is poorly conserved.

eIF3c

The third eIF3 subunit, eIF3c (NIP1), interacts with eIF3a and the two proteins form a dimer which is central to the eIF3 complex, since together they interact with each of the remaining PCI and MPN domain-containing subunits in human eIF3, as well as with the conserved eIF3b/eIF3g/eIF3i subcomplex [18]. eIF3c orthologues were clearly found in both trypanosomatids investigated, with two identical genes observed encoding the *T. brucei* protein. In contrast, putative orthologues for this eIF3 subunit from *T. vaginalis* and *G. duodenalis* were only identified through the HMM search and both are annotated as hypothetical proteins (Tables 1 and 2). When compared with the other two large eIF3 subunits, eIF3c is more conserved than eIF3a but not as much as eIF3b, although the degree of conservation is still low. Through the multiple alignment analysis, overall conservation between the various eIF3c homologues can be seen to be more concentrated at their last third, encompassing the PCI domain (Additional file 1: Figure S3), with little conservation within the segment which in yeast eIF3c has been implicated in the interaction with eIF3a (residues 157–370 of the yeast protein – [34]). A noteworthy feature for both trypanosomatid orthologues is the very glycine rich region

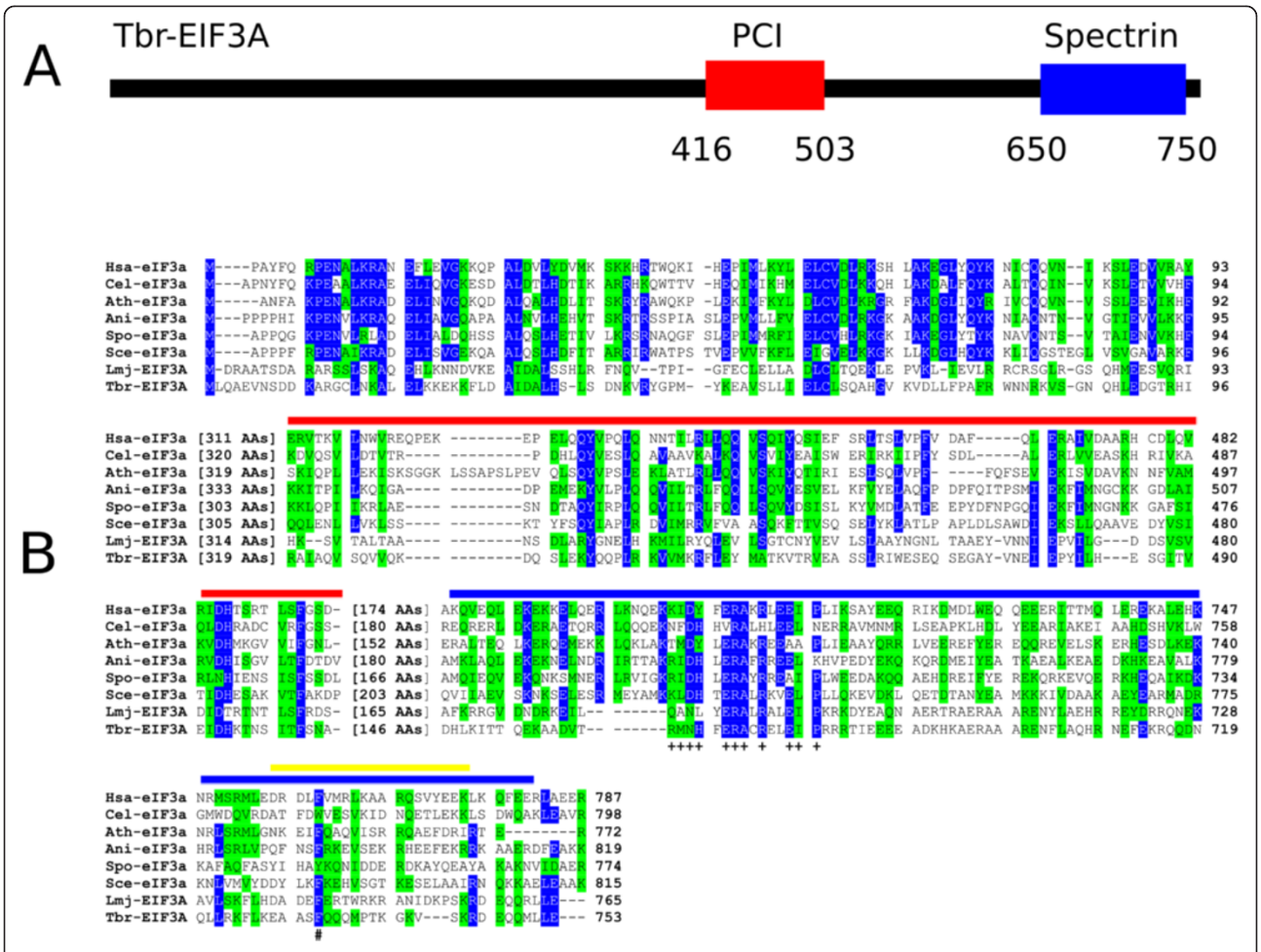


Figure 1 Conserved and diverged features between the trypanosomatid EIF3As and various eukaryotic orthologues. A Schematic representation of *T. brucei* EIF3A highlighting the PCI and Spectrin domains (red and blue boxes, respectively). **B** Amino acid sequence alignment comparing the N-terminus and the PCI and Spectrin domains from the various eIF3a homologues selected for this study. Amino acids identical in more than 60% of the sequences are shown with a blue background, while amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, in more than 60% of the sequences are highlighted with a green background. The red and blue lines define the PCI and Spectrin domains, respectively, whilst the yellow line indicates the segment implicated in the binding of human eIF3a to eIF3b and eIF3i [36]. The conserved residues within the Spectrin domain mentioned in the text are marked with "+", whilst the "#" symbol marks the position of the conserved phenylalanine residue required for the interaction with human eIF3b.

at their C-terminuses, present also in plant eIF3c (and also in the human protein but with a reduced number of glycines), but missing from the fungi proteins as well as from the orthologues from *T. vaginalis* and *G. duodenalis*. Also of interest is the conservation of the N-terminal ends of most eIF3c orthologues, with two consecutive phenylalanines strictly conserved in all eIF3c sequences, with the exception of the *G. duodenalis* homologue. In yeast, the eIF3c N-terminus has been implicated in its binding to eIF5 [45,46], so the conservation observed may highlight residues involved in this interaction. Likewise, conserved residues found within the segment implicated in binding to eIF1 in all eIF3c homologues studied, again with the exception of the *G. duodenalis* homologue, may pinpoint residues involved in this interaction (Figure 3A and B).

eIF3d

The non-core subunit eIF3d (also called Moe1 or p66), from mammals, was studied very early on and seen to be able to cross-link to 18S RNA [47], with the protein's segment responsible for the binding to RNA been mapped to within its first 120 residues [17]. Despite its absence in *S. cerevisae*, clear eIF3d orthologues are present in trypanosomatids with overall conservation similar to that observed for the previous subunits (Table 2). In addition a candidate for *T. vaginalis* was found during the HMMs search analysis, although no *G. duodenalis* eIF3d orthologue was identified. An alignment of the various eIF3d sequences reveals the existence of several sets of conserved amino acids distributed throughout their length which are good candidates for studies

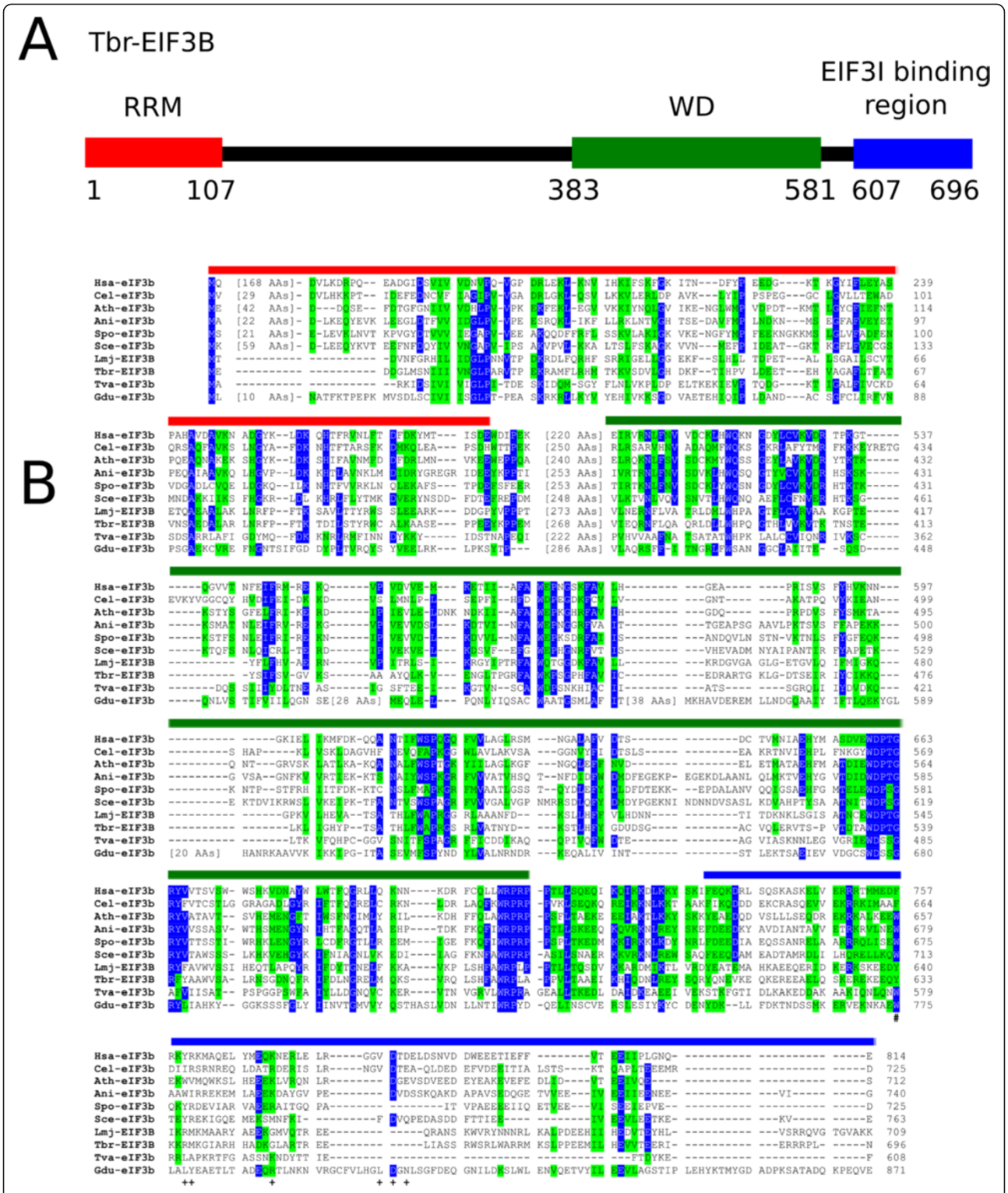


Figure 2 Conserved and diverged features between eIF3b orthologues from various protozoan and multicellular organisms. A Schematic representation of *T. brucei* EIF3B. The RRM and WD domains and the putative eIF3i binding region are indicated by red, green and blue boxes, respectively. **B** Amino acid sequence alignment comparing the RRM and WD domains and eIF3i binding region from eIF3b homologue from various protozoan and multicellular eukaryotes. The alignment was carried out as described for Figure 1 and the three segments analyzed are indicated by the red, green and blue lines, respectively. The "#" symbol marks the position of the conserved aromatic residue required for the interaction with yeast eIF3i [44], whilst the position of other residues seen to be involved in the interaction of eIF3b with eIF3i in yeast are indicated by the "+" symbol.

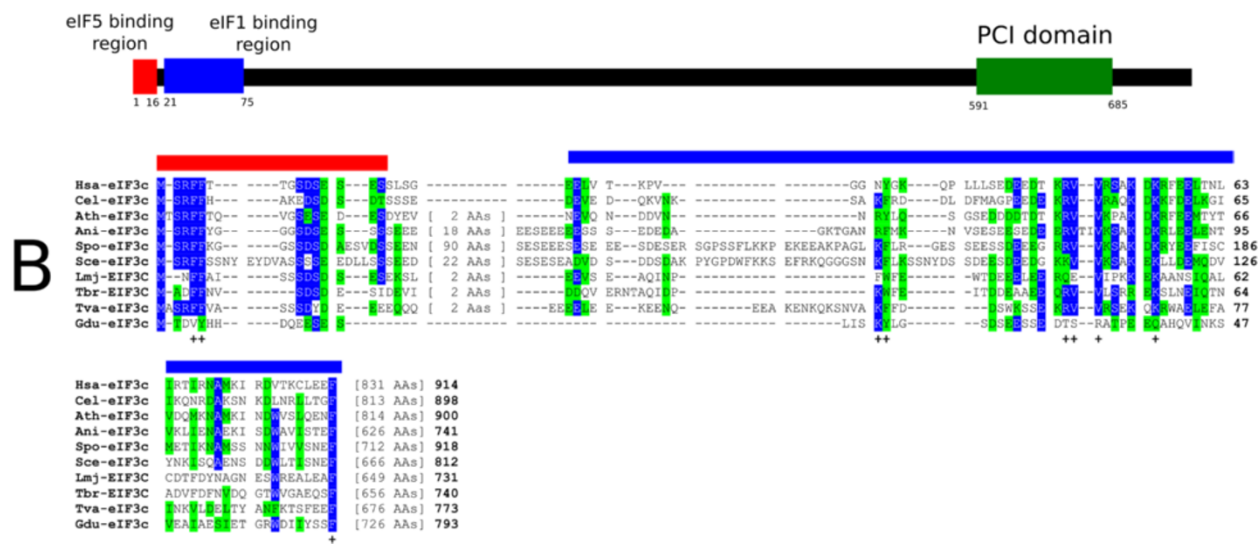


Figure 3 Conserved elements at the N-terminal ends of eIF3c orthologues. A Schematic representation of *T. brucei* EIF3C. The regions homologous to the eIF5 and eIF1 binding regions from yeast eIF3c and the PCI domain are indicated by red, blue and green boxes, respectively. **B** Amino acid sequence alignment comparing the putative eIF5 and eIF1 binding regions of eIF3c (according to [46]), carried out as described for Figure 1. The two regions are indicated by red and blue lines, respectively, and conserved positions are marked with the "+" symbol.

investigating eIF3d function (Additional file 1: Figure S4). These include various residues at the proteins' N-terminal ends which, with the exception of the *T. vaginalis* orthologue, are strictly conserved and might be involved in the interaction with RNA, as well as the acidic C-terminus, absent from the *S. pombe* orthologue. eIF3d orthologues have been previously reported from trypanosomatids [40], but those in fact are possibly eIF3g orthologues (see below), containing a RRM domain, and do not align with true eIF3d proteins.

eIF3e

eIF3e (p48, Int-6) is another non-core eIF3 subunit, characterized by a carboxi-terminal PCI domain (reviewed in [4,48]), and which may have a role in regulating eIF3 function ([49]; reviewed in [50]). It was first identified as the protein product of a gene which is the site of frequent integration of the mouse mammary tumor virus (*int-6*) and only later identified as an eIF3 subunit [51,52]. eIF3e orthologues were also found in *L. major* and *T. brucei* which are in general more conserved than the previous eIF3 subunits (Table 2), but no orthologues could be found in either *T. vaginalis* or *G. duodenalis*. The comparison between the trypanosomatid sequences with other eukaryotic eIF3e orthologues reveals various conserved elements, within the PCI domain but also in the protein's N-terminal half (Additional file 1: Figure S5). All orthologues share a very conserved segment which coincides with the N-terminus of the human protein (Figure 4) and where a previously reported Nuclear Export Signal (NES) has been mapped [53].

eIF3f/eIF3h

The two eIF3 subunits containing the MPN domain, eIF3f and eIF3h, associate as a dimmer and both seem to interact with eIF3m, forming the third stable eIF3 module [8]. These two eIF3 subunits are each more closely related to the two MPN containing proteasome and COP9 signalosome subunits than to each other. eIF3f is more related to the proteasome subunit Rpn8 (also known as Mov34, p40 or subunit 7) and signalosome subunit Csn6, whilst eIF3h is more related to proteasomal subunit Rpn11 (also known as pad1 or p47) and signalosome subunit Csn5 (reviewed in [50]). In *S. cerevisae* these two eIF3 subunits are absent although the equivalent proteasomal subunits can be identified as well as a Csn5 homologue; in *S. pombe*, both eIF3 and proteasomal subunits are present as well as the signalosome Csn5; and in plants and animals both the eIF3 subunits and their two proteasomal and signalosome counterparts are found (also reviewed in [4,5,54-56]). BLAST searches of the *L. major* and *T. brucei* genome databases with the sequences of either eIF3f or eIF3h yielded proteins which were annotated as proteasomal subunits, with eIF3f finding as best hit a putative Rpn8 orthologue whilst eIF3h found a candidate Rpn11 orthologue. Nevertheless, through the HMMs

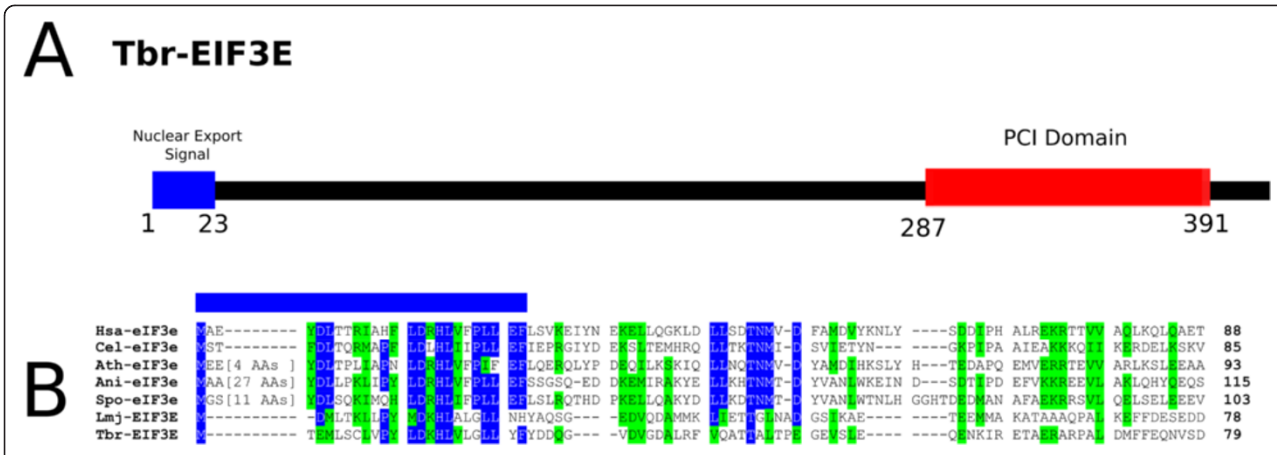


Figure 4 Conservation of the human Nuclear Export Signal (NES) within various eIF3e orthologues. A Schematic representation of *T. brucei* EIF3E. The NES and PCI domain are indicated by blue and red boxes, respectively. **B** Amino acid sequence alignment comparing the previously described NES, mapped to the very N-terminus of human eIF3e, and neighboring sequences, with similar sequences from trypanosomatids and other EIF3E orthologues.

search approach applied here, candidate eIF3h orthologues were found from both *L. major* and *T. brucei* (encoded by two neighboring genes), annotated as hypothetical proteins. As described below, the biochemical characterization of the *Leishmania* eIF3 yielded yet another conserved hypothetical protein which, upon blast searches against the non-redundant protein sequence databases from GenBank, displayed similarities against eIF3f orthologues. Despite not having an identifiable MPN domain it was considered a likely eIF3f orthologue and included in the analysis below. HMMs searches carried out for *T. vaginalis* and *G. duodenalis* yielded only two MPN containing homologues from *G. duodenalis*, annotated as potential proteasome subunits, and three from *T. vaginalis*, one of which was identified as a putative eIF3h orthologue.

Considering the high degree of similarity in sequence between the various MPN proteins, and to better evaluate their true relationships, a phylogenetic tree was built based on the alignment of multiple MPN containing proteins from the organisms chosen for this study. Sequences from both eIF3 subunits were included and compared with their putative trypanosomatid (eIF3f and eIF3h) and *T. vaginalis* (eIF3h only) orthologues, as well as with known orthologues from their counterparts found in the 26S proteasome and COP9 signalosome complexes and less defined MPN-containing proteins from the four protozoan genomes studied here. As shown in Figure 5, most of the eIF3f orthologues, including the putative trypanosomatid proteins, loosely group together as part of a large group which also includes the Rpn8/Rpn7 and Csn6 orthologues from various organisms. The latter proteins seem to be more conserved and form more robust subgroups which include likely Rpn8/Rpn7 orthologues from both trypanosomatids and *T. vaginalis* plus a less conserved MPN-containing homologue from *G. duodenalis* (Gdu-RPN7 in the figure). The various eIF3f sequences seem to be more divergent and their grouping is accompanied by low bootstraps, but an alignment carried out comparing known and putative eIF3f orthologues confirm the presence of conserved elements shared by all proteins and supporting their identification (Additional file 1: Figure S6A). For the eIF3h orthologues, they also group together, as part of a larger group which includes the various known Rpn11 and Csn5 orthologues as well as MPN containing Rpn11 orthologues from all four protozoans. Overall conservation for these proteins is greater than that observed for the eIF3f orthologues and related proteins and the grouping is validated by more robust bootstraps which includes the *T. vaginalis* eIF3h. The trypanosomatid eIF3h orthologues are more divergent and their positioning with the Rpn11/Csn5/eIF3h group has a low bootstrap, but when the various eIF3h sequences were aligned conserved elements were found throughout their lengths which substantiate their identification (Additional file 1: Figure S6B). Based on the evidence presented, Tables 1 and 2 include both trypanosomatid eIF3f and eIF3h orthologues and the *T. vaginalis* eIF3h in the comparisons carried out with the other parasite eIF3 subunits. Additional file 1: Figure S7 also provides a scheme for both *T. brucei* orthologues, highlighting the position of the MPN domain.

eIF3g

The fourth subunit of the *S. cerevisiae* eIF3 core complex, eIF3g (TIF35 or p44 in humans), is an essential protein in both budding and fission yeasts species which has been implicated as a participant in translation reinitiation (reviewed in [4,5]) and seen to be required for the scanning phase of the process [57]. Putative eIF3g orthologues were found in *T. brucei* and in *L. major* using the HMM search (Tables 1 and 2 - a schematic representation of the

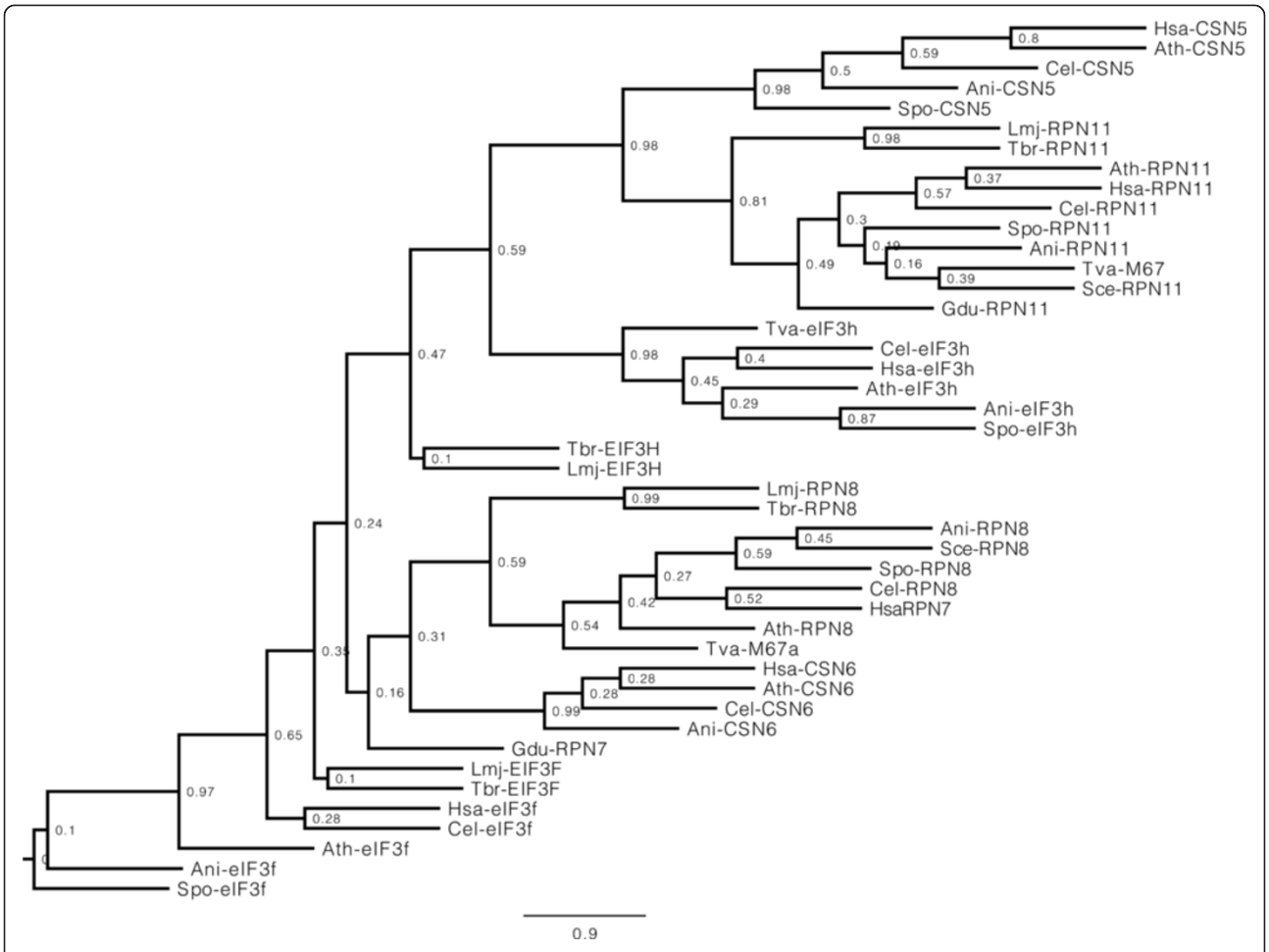


Figure 5 Evolutionary relationship of the protozoan MPN containing proteins. Maximum Likelihood tree based on the alignment of the MPN containing subunits from eIF3, proteasome and signalosome complexes from different eukaryotes, and the different MPN containing proteins identified in *L. major*, *T. brucei*, *T. vaginalis* and *G. duodenalis*. Bootstrap values are shown next to the respective branches (1,000 replicates).

T. brucei orthologue is shown in Additional file 1: Figure S7), but none were identified from either *T. vaginalis* or *G. duodenalis*, implying that functional eIF3-like complexes may occur in the absence of this otherwise essential subunit. The two trypanosomatid proteins have been previously reported as possible eIF3d homologues [40] but this was likely a nomenclature error. The alignment with other eukaryotic eIF3g homologues (Additional file 1: Figure S8) shows that the conservation within the trypanosomatid sequences is mainly restricted to their C-terminal RRM domain, the major eIF3g feature, shown to be required for its RNA binding activity and for the protein's role in mRNA scanning in yeast [57-59]. Nevertheless, minor segments of similarity are also observed within their N-terminal half, previously implicated in binding to eIF3i [60]. Noteworthy is the absence in the trypanosomatid proteins of the region encompassing the Zinc-Finger motif, previously implicated in the ability of plant's eIF3g to bind to partners such as eIF4B and the viral Transactivator protein (TAV) of caulimoviruses [60,61].

eIF3i

eIF3i (p36/TRIP1 in humans and TIF34/Sum1 in yeast) is another eIF3 core component conserved between yeast and humans, and thus also essential for translation *in vivo* (reviewed in [2,5]). It is characterized by the presence of a WD repeat domain (as described for eIF3b), consisting of seven defined WD repeats which cover nearly all of its length and which are mostly conserved in different eukaryotic species [43]. eIF3i orthologues in trypanosomatids are clearly identifiable with size and features similar to other eukaryotic sequences and their similarity with the human protein is the highest among the eIF3 subunits (Table 2). *T. vaginalis* and *G. duodenalis* orthologues were also identified and, by using the HMM search, a putative *M. jannaschii* eIF3i orthologue was also found (Table 1). eIF3i then was the single eIF3 subunit from which a representative orthologue was found for this Archean organism and, with exception of *E. coli*, all other organisms investigated in this study were found to have eIF3i orthologues. The *M. jannaschii* homologue is only found in a restricted

number of Archaen species and differs greatly in size and sequence from all other eukaryotic eIF3i orthologues but a phylogenetic tree built comparing these with their nearest WD containing homologues from various organisms shows a grouping with eIF3i (Figure 6A), although it is not clear at this stage if this grouping has any relevant implications regarding its function. Aligning the various eukaryotic eIF3i sequences reveal that they all have similar size and segments of similarities are seen throughout the sequences but the conservation is increased near the proteins' N- and C-terminal ends (Additional file 1: Figure S9). The various amino acid residues mapped to the C-terminal end of yeast eIF3i and found to mediate the interaction with eIF3b [44] were also investigated (Figure 6B and C). From a total of twelve residues involved in the eIF3i-eIF3b interaction, highlighted in the Figure, eight are conserved in the eIF3i of trypanosomatids, most of which are not found in either of the *T. vaginalis* or *G. duodenalis* orthologues. Likewise, two residues implicated in the interaction with eIF3g [43] are also conserved in the trypanosomatid eIF3i orthologues.

eIF3j

eIF3j (also called p35 in humans and HCR1 in *S. cerevisiae*) is the only non-core, non-essential eIF3 subunit found in *S. cerevisiae*. It is a highly conserved subunit which is loosely associated to the eIF3 complex and might play a role in mediating its binding to the 40S ribosomal subunit (reviewed in [2,4,5]). More recently eIF3j has been confirmed as non-essential in human cells [9] and has been implicated in events associated with control of translation termination and stop codon read-through in yeast [62]. Putative eIF3j homologues were found not only in both trypanosomatids investigated (annotated as hypothetical proteins) but also in *G. duodenalis* although no homologue was identified from *T. vaginalis* (Table 1). These eIF3j orthologues, however, display a very low level of identity when compared with better characterized eukaryotic eiF3j orthologues from mammals and yeast (Additional file 1: Figure S10), and they are all annotated as hypothetical proteins. A distinctive feature is the much conserved, negatively charged, C-terminal end in all proteins, which is somewhat more diverged in the *L. major* orthologue. The presence of eIF3j homologues in divergent eukaryotes highlight the relevant role it plays in translation initiation despite its non-essential nature in *S. cerevisae*.

eIF3k, eIF3l and eIF3m

These are the most recently characterized of the eIF3 subunits, all three harboring a PCI domain and found in animal, plant and filamentous fungi species, but with two of them (eIF3l and eIF3k) absent from *S. cerevisae* and *S. pombe* [63] and the third, eIF3m (first called GA-17 in humans and Csn7b in *S. pombe*), missing from *S. cerevisae* but otherwise essential for translation in fission yeast [64]. eIF3k, the smallest non-core eIF3 subunit, is found in both trypanosomatid species studied, with sizes similar to those observed for this protein from other organisms, although no candidate *T. vaginalis* and *G. duodenalis* eIF3k sequences were identified (Tables 1 and 2). The conservation between the protozoan eIF3k orthologues and the human protein is very low but the sequences are conserved within the trypanosomatid family, encompassing its PCI domain, and the alignment with other eukaryotic proteins confirms the low similarity between the sequences (Additional file 1: Figures S7 and S11A). Clear orthologues in both *L. major* and *T. brucei* were also found for eIF3l (originally called HSPC021 in humans) with sizes and features similar to those present in other eukaryotes and overall conservation comparable to those observed for other eIF3 subunits (Tables 1 and 2). As for eIF3k, no likely orthologues were found in either *T. vaginalis* or *G. duodenalis* but the alignment of the trypanosomatid proteins with other eIF3l sequences reveals conserved elements throughout their length (Additional file 1: Figures S7 and S11B), including the previously described tetratricopeptide (TPR) repeat and PCI domain regions [65]. In contrast to the other PCI containing eIF3 subunits, no clear eIF3m orthologues were found within the trypanosomatid sequences and no *T. vaginalis* or *G. duodenalis* orthologues were found either. Using the HMM search, a single eIF3m homologue for both *T. brucei* and *L. major* was found (Tb927.10.15720 and LmjF.19.1120, respectively), which, however, clustered with 26S proteasome subunits upon sequence alignment and phylogenetic tree building with related sequences (data not shown).

Biochemical characterization of the *Leishmania* eIF3 complex

To validate the bioinformatic characterization of the various trypanosomatid eIF3 subunits, the sequence encoding the *L. major* EIF3E was amplified, cloned and expressed as an N-terminally his-tagged protein in *E. coli*. The resultant recombinant protein was then used to immunize rabbits and produce a specific polyclonal anti-serum which recognizes a single band of ~45 kDa in whole protein extracts of *L. major* and also *L. infantum* (not shown). Considering the high degree of conservation within the N-terminus of the various eukaryotic eIF3e orthologues (see Figure 4), and the postulated role for this segment in mediating the nuclear localization of the human protein [53], this anti-serum was first used to confirm the subcelullar localization of its orthologue in *L. major* promastigotas. As shown in Figure 7A, the *Leishmania* protein was found to strictly localize to the cellular cytoplasm, ruling out any nuclear localization but compatible with its role in translation initiation. The anti-serum was then used in immunoprecipitation assays, this time using total cell extracts from *L.*

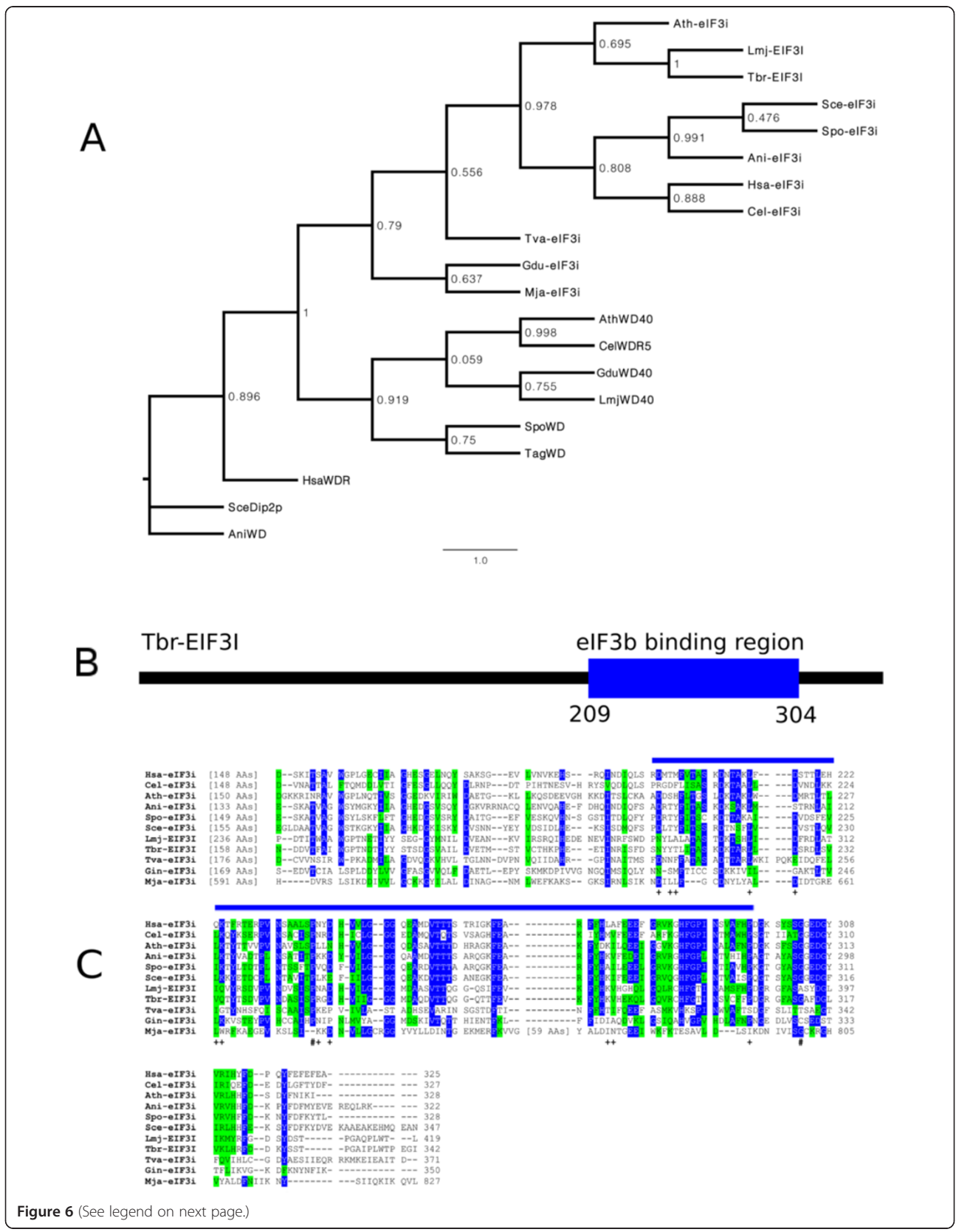


Figure 6 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)
Figure 6 Evolutionary relationship of selected eIF3i orthologues and conservation of the its eIF3b and eIF3g interacting elements. **A** Maximum Likelihood tree based on the alignment of several eIF3i orthologues plus WD containing proteins from various protozoan and multicellular eukaryotes. **B** Schematic representation of *T. brucei* EIF3I. The position of the segment implicated in the binding to eIF3b [44] is indicated by a blue box. **C** Amino acid sequence alignment comparing the C-terminal half of eIF3i orthologues from the organisms selected for this study. The alignment was carried out as described for the previous figures. Residues seen to be involved in the interaction of eIF3i with eIF3b in yeast [44] are indicated by the "+" symbol, whilst residues which, when mutated, interfered in the interaction with eIF3g [43] are marked with "#".

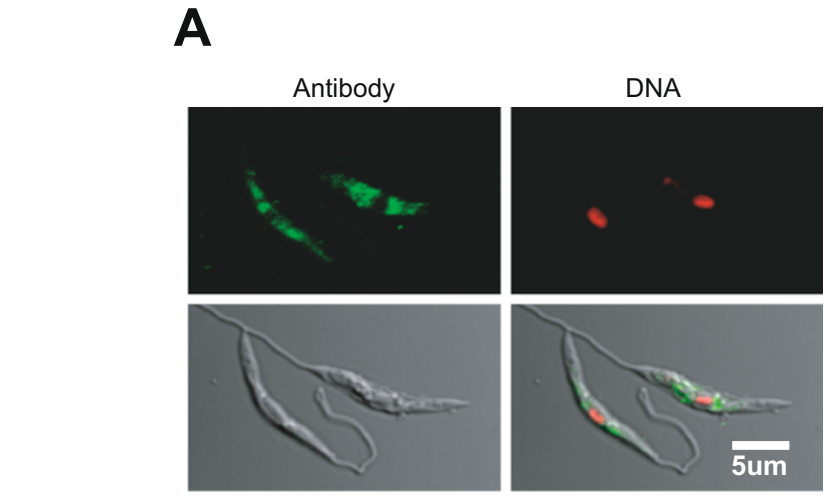
infantum, aiming to purify the whole eIF3 complex. An analysis of the precipitated samples through western-blots with the same serum confirmed the efficiency of the procedure for the eIF3e orthologue with none of it coming down in a control immunoprecipitation carried out with the pre-immune serum (Figure 7B). These samples were then submitted to mass spectrometry analysis in order to confirm the subunit composition of the *Leishmania* eIF3. Figure 7C summarizes the results derived from the mass spectrometry analysis of three sets of replicates comparing the anti-EIF3E antibodies with the pre-immune control. These results confirm the presence of 10 of the eIF3 subunits identified by the bioinformatic analysis and indicate the presence of a candidate eIF3f orthologue which cannot be identified by the HMMs based searches. They also highlight the strong association between the eIF3 complex and eIF1, the single other translation initiation factor which co-precipitated in this assay, whilst confirming the lack of association of the putative eIF3j orthologue with the trypanosomatid eIF3 complex.

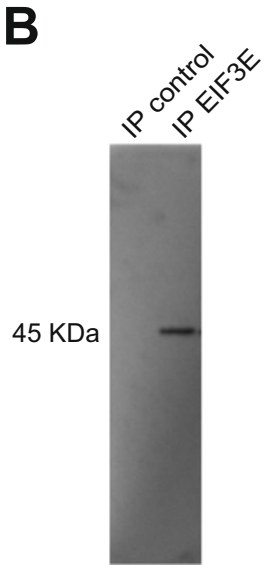
Discussion

The results from both *Leishmania* and *Trypanosoma* species are consistent with an early appearance of a fully functional eIF3 complex during the evolution of the eukaryotic lineages. The lack of identifiable orthologues to selected eIF3 subunits from *T. vaginalis* and *G. duodenalis* might be, at least in some cases, a consequence of too much divergence in sequence which prevented their proper identification purely through bioinformatic analysis. Indeed the identification, through biochemical approaches, of a putative eIF3f orthologue in trypanosomatids which was overlooked by the bioinformatic search supports this hypothesis. When compared with their *Leishmania* and *Trypanosoma* orthologues, the sequences of the eIF3 subunits found for *T. vaginalis* and *G. duodenalis* are in general less conserved, which is consistent with an earlier divergence from the main line of eukaryotic evolution or a faster evolution divergence rate for these organisms, as indicated by their classification within the supergroup Excavata [66]. Nevertheless, considering the lack of evidence for some of the most conserved eIF3 subunits (such as eIF3e or eIF3g) in both *T. vaginalis* and *G. duodenalis*, possibly a consequence of a secondary loss of subunits rather than reflecting an earlier evolutionary stage, the evidence presented indicates a much simplified eIF3 complex for these organisms. The absence of an eIF3a orthologue in these two protists is nonetheless striking, considering that it is the largest of the eIF3 subunits and the large number of interactions in which it is involved and which are critical for eIF3 function. Since an eIF3j orthologue is found in *G. duodenalis*, and considering the limited but consistent homology seen between the entire length of eIF3j and part of eIF3a [67], plus some functional overlap observed between the two proteins [68], a possible explanation would be for the *G. duodenalis* eIF3j to perform some or most of the functions carried out by the eIF3a subunit in other eukaryotes. For this organism at least, a simplification in some roles has been seen for other biological processes [69] and the data shown here is consistent with a simplified eIF3 complex based mainly on the eIF3b, eIF3c and eIF3i subunits.

A secondary loss of selected subunits from the eIF3 complex definitely seems to have happened for the budding yeast *S. cerevisae*, which lacks several subunits found in more primitive organisms (eIF3d, eIF3e, eIF3h, eIF3k and eIF3l) and appears to have suffered a drastic reduction in complexity during its evolution. Even the eIF3 from the fission yeast *S. pombe* seems to be in an intermediate situation between the *S. cerevisae* and filamentous fungi, since it includes five subunits (eIF3d, eIF3e, eIF3f, eIF3h and eIF3m) absent from the budding yeast eIF3 but is missing two subunits (eIF3k and eIF3l) which are present in most eukaryotes, including *A. niger* and both trypanosomatid lineages. Critical differences in eIF3 function between the *S. cerevisae* and human complexes have already been seen in the way it interacts with its eIF4G partner, an interaction critical for the mRNA recruitment by the ribosome (reviewed in [2]). In humans this interaction is mediated by a direct binding between eIF4G and three eIF3 subunits (eIF3c, eIF3d and eIF3e) [70] whilst in yeast this is done indirectly, through eIF5 [71]. Overall these results indicate a substantial flexibility in eIF3 function which has been differentially exploited by different organisms.

eIF3i has been shown to localize to the periphery of the eIF3 complex [8,72], but is the most conserved eIF3 subunit, indicating both an ancient role in translation initiation (and an origin which may precede the evolution of early eukaryotes) and also a conservation of critical functions as part of the eIF3 complex. The presence of putative eIF3b and eIF3c orthologues in all eukaryotic





C

Description	$\log_2\left(\frac{\text{average intensity anti-EIF3E}}{\text{avergage intentity ctrl serum}}\right)$	t-Test
EIF3A	10,21	0,0019
EIF3B	9,50	0,0305
EIF3C	10,10	0,0074
EIF3D	9,03	0,0300
EIF3E	7,54	0,0308
EIF3F	8,80	0,0015
EIF3G	11,06	0,0154
EIF3H	8,73	0,0057
EIF3I	8,95	0,0019
EIF3K	7,96	0,0036
EIF3L	9,17	0,0013
EIF1	13,46	0,0005
G6PD	8,26	0,0388

Figure 7 Biochemical characterization of *Leishmania* EIF3. A Subcellular localization of *Leishmania* EIF3E. The experiment was carried out through indirect immunofluorescence using the affinity purified anti-EIF3E antibodies. Where indicated, the cells were counterstained with TOTO-3 to locate the nuclear and kinetoplast DNA. **B** Immunoprecipitation (IP) of native EIF3E. IP reactions were set up using total *L. infantum* cytoplasmic extract and the affinity purified antibodies directed against *Leishmania* EIF3E, as well as the respective pre-immune control serum (IP Control). Precipitated immunocomplexes were then used in Western blot assays with the same anti-EIF3E antibodies used for the IP. **C** Summary of the mass-spectrometry analysis of the precipitated samples. A total of 13 polypeptides are shown which were specifically co-precipitated with the anti-EIF3E antibodies. The parameters shown in the table used to determine specificity for the IP reactions using the anti-EIF3E antibodies, always compared with the control IPs, are described in the Methods section. EIF1: translation initiation factor sui1. G6PD: Glucose-6-Phosphate 1-Dehydrogenase.

organisms investigated thus far also highlights the central role that these proteins are likely to have within the eIF3 complex. In yeast, eIF3b-eIF3i-eIF3g form a ternary complex that interacts with eIF3c and eIF3a [73] and which has also been confirmed in mammalian cells [8,36]. The ternary complex lacks any of the proteins belonging to the PCI/MPN octamer core of eIF3 but with eIF3a it forms the mammalian module i of eIF3, capable of maintaining on its own the ability to promote mRNA recruitment to the ribosomes [9]. Within this module, eIF3a seems to be critical for the formation and stability of the remaining eIF3 subunits and its function would have seem to be essential for any eIF3 function. Nevertheless, provided that it is indeed missing from *G. duodenalis* or *T. vaginalis*, the resulting eIF3 complex in these organisms would have to be stabilized solely by direct interactions between eIF3b and eIF3i and between eIF3b and eIF3c. Indeed the lack of conservation of residues in eIF3b which are involved in its

interaction with eIF3i (despite a conservation of the eIF3b binding residues in eIF3i) might indicate significant divergence in this interaction in different organisms. Under this scenario, it might be possible that during its evolution the eIF3 complex started with a single PCI subunit (eIF3c) and no subunit containing a MPN domain. Other proteins with these specific domains were then acquired, with some at least deriving from the proteasome lid or signalsome subunits since four eIF3 subunits (eIF3f, eIF3h, eIF3k, eIF3l) have clear counterparts within these two complexes [13]. This model implies a significant contribution of eIF3i for the function of the whole eIF3 complex, at least in more primitive eukaryotes, however it is in disagreement with early evidence indicating that eIF3i and eIF3g are dispensable for several key functions of eIF3 in translation initiation in yeast [74] and that neither subunit is required for active complex formation in mammals [7], a discrepancy which needs to be resolved.

Conclusion

The *in silico* and experimental data presented here highlight very relevant features regarding the eIF3 complex and its conservation in most, if not all eukaryotic lineages. The systematic approach carried out aiming to properly identify the different eIF3 subunits in two distinct trypanosomatid lineages, and also in *T. vaginalis* and *G. duodenalis*, provides a framework for future studies focusing on unique aspects of the translation machinery in these pathogens. Considering the lack of information regarding eIF3 structure and function in more divergent eukaryotes, the sequence analysis performed here can also help pinpoint conserved elements, in different subunits, so far overlooked but which might have relevant functional roles and are in need of a proper investigation. Subsequent experimental approaches to investigate and validate relevant differences found in comparison with other eukaryotes will be very useful not only to understand unique aspects of translation initiation, and its regulation, in these divergent eukaryotes but also may contribute to the understanding of the whole process, and how it can vary between different groups.

Methods

Organisms and sequences

In order to identify orthologues to subunits of the eIF3 complex in Trypanosomatids and lower eukaryotes, a range of predicted proteomes were downloaded for twelve organisms in February 25, 2013 including: *Homo sapiens* [taxid: 9606], *Caenorhabditis elegans* [taxid: 6239], *Arabidopsis thaliana* [taxid: 3702], *Aspergilus niger* [taxid: 425011], *Schizosaccharomyces pombe* [taxid: 284812], *Saccharomyces cerevisiae* [taxid: 559292], *Leishmania major* [taxid: 347515], *Trypanosoma brucei* [taxid: 185431], *Trichomonas vaginalis* [taxid: 412133], *Giardia duodenalis* [taxid: 5741], *Methanocaldococcus jannaschii* [taxid: 2190] and *Escherichia coli* [taxid: 1010810]. Within these organisms, four of them are excavates, two trypanosomatids (*L. major* and *T. brucei*) plus *T. vaginalis* and *G. duodenalis*. An Archea (*M. jannaschii*) and a bacterium (*E. coli*) species were also included, with the bacterium to be used as negative controls. Both trypanosomatid proteomes were downloaded from TritrypDB, whilst the *T. vaginalis* and *G. duodenalis* proteomes were downloaded from TrichDB and GiardiaDB, respectively, and all other proteomes were downloaded from NCBI ftp site. All accession numbers for the sequences included in the alignments and in the phylogenetic analysis described below (including not only the various orthologues to the eIF3 subunits but also other relevant sequences) are discriminated in Additional file 2: Table S1.

All likely eIF3 subunits from trypanosomatid species were named in capital letters following the proposed nomenclature for trypanosomatid proteins [75]. Abbreviations for the various organisms investigated are as follows: Hsa – *Homo sapiens*; Cel – *Caenorhabditis elegans*; Ath – *Arabidopsis thaliana*; Ani – *Aspergillus niger*; Spo – *Schizosaccharomyces pombe*; Sce – *Saccharomyces cerevisae*; Lmj – *Leishmania major*; Tbr – *Trypanosoma brucei*, Tva – *Trichomonas vaginalis*; Gdu– *Giardia duodenalis*, Mje – *Methanocaldococcus jannaschii*.

Search for eIF3 subunits using Hidden Markov Models

To identify the eIF3 subunits within the proteomes of the selected organisms, all proteins derived from each chosen organism were clustered into orthologue groups. The OrthoMCL program [76], which uses the MCL (Markov Cluster) algorithm [77], was employed for this task. The human (*H. sapiens*) predicted proteome was then used as reference to search for the thirteen subunits of human eIF3 complex, and these proteins were used to recover the orthologue groups defined by the OrthoMCL tool. From a total of 213,686 protein sequences derived from the selected genome sequences, 23,271 orthologue groups were predicted based on OrthMCL analysis. When a search was made for subunits of the human eIF3 complex, 20 proteins were returned, and they were distributed into 13 orthologue groups.

All protein sequences present in each orthologue group were extracted, and these were used as input for the multiple alignment tool called MAFFT [78] (default settings). The alignments were manually inspected, and proteins, which were decreasing the alignment quality, were taken off from the data. Finally a multiple alignment of each orthologue group was used as input to *hmmbuild*, a program from the HMMER package, version 3.0 [79]. HMMER was used to build Hidden Markov Models (HMMs) based on multiple alignments, and the HMMs used to search for distantly related proteins within the various organisms' proteomes using the *hmmsearch* tool

(part of the HMMER package). A cutoff of 0.001 for hit significance (*e-value* < = 0.001) was used.

Phylogenetic analysis of eIF3 subunits

In order to define how the identified orthologues for selected subunits (eIF3f, eIF3h and eIF3i) relate to each other as well as to closely related homologues, proteins recovered by the HMM searches were aligned by MAFFT (default settings). The alignments were automatically edited by Trimal [80] to keep just phylogenetically informative sites. The evolutionary model which best fits for each alignment was predicted by ProtTest [81]. Subsequently, the phylogenetic trees were built with PhyML tool using the Maximum Likelihood method [82]. The branch support for each tree was given by non-parametric bootstrap analysis using 1000 replicates.

Cloning and protein expression methods

The *L. major* DNA fragment coding for its eIF3e orthologue was amplified by PCR from total genomic DNA flanked by restriction sites for the enzymes *BamH* I and *Xho* I (5′ primer - GTG *GGA TCC* ATG GAC ATG CTA ACG AAG CTG; 3′ primer - TG*C TCG AG*T TAA CGC ATA ACG GTG TCT AGC TT; restriction sites in italic) and cloned into the same sites of the expression plasmid pRSETa (Life Technologies®). Recombinant *L. major* EIF3E was expressed with an N-terminal histidine tag in *Escherichia coli* BL-21star cells (Life Technologies®) followed by purification with Ni-NTA Agarose beads (QIAGEN®) and quantification as previously described [83].

Serum production and immunological procedures

The rabbit anti-serum generated against *L. major* EIF3E was produced through the immunization of a New Zealand white rabbit with the recombinant his-tagged protein using standard procedures. All the experimental procedures required for this immunization were approved by the "Ethics Committee for the Use of Animals on Research" from the Fundacao Oswaldo Cruz (CEUA-FIOCRUZ), license number L-053/08 to work with *Oryctolagus cuniculus*, and follow the ethical principles on animal experimentation defined by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). The serum generated was tested against both the recombinant protein and native *Leishmania* extracts through western-blotting and validated by comparison with the pre-immune serum. Antibodies derived from this serum, affinity purified against recombinant EIF3E, were then used to perform indirect immunofluorescence assays. These were carried out using the anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 as secondary antibody (Life Technologies®) and exponentially grown *L. major* promastigote cells, as described [84].

Immunoprecipitation and proteomic analysis of *Leishmania* eIF3 subunits

Cytoplasmic extracts prepared from exponentially grown *Leishmania infantum* promastigotes were used in immunoprecipitation (IP) assays carried out with the affinity purified anti-EIF3E antibodies and the pre-immune serum used as negative control. Extract preparation and IPs were essentially performed as previously described [84], using 30 μl of protein A sepharose pre-incubated with either anti-EIF3E antibodies or the pre-immune serum (roughly 70 μg of total IgG in both), prior to the incubation with 200 μl (0.5 to 1.0 ODs at 260 nm) of the cytoplasmic extract. Proteins bound to the beads were eluted in SDS-PAGE and an aliquot validated for the presence/absence of *Leishmania* EIF3E through western blotting using the anti-EIF3E serum. For mass spectrometry (MS) both sets of eluted proteins were loaded unto 15% SDS-PAGE gels and allowed to migrate into the resolving gel, when the electrophoresis was interrupted. Gel slices containing the whole protein content loaded were excised and submitted to an in-gel tryptic digestion, followed by peptide elution and desalting at a homemade C18 stage-tip [85]. The peptides were analyzed by electrospray tandem mass spectrometry (ESI MS/MS), performed with an EASY nLC 1000 (Thermo Scientific), using a 15-cm fused silica emitter (75 μm inner diameter) in-house packed with reversed-phase ReproSil-Pur C18-AQ 3 μm resin (Dr. Maisch GmbH), connected to a LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) (mass spectrometry facility RPT02H PDTIS/Carlos Chagas Institute - Fiocruz Parana) mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source (Phoenix S&T). For data analyses, the MaxQuant platform (version 1.4.1.2) [86] was used for peak list picking, protein identification and validation. Protein identification was based on the *L. infantum* protein sequence databases (*L. infantum* JPCM5, version 6 from September 11, 2013 available at TriTrypDB). For validation, a minimum of six amino acids for peptide length and two peptides per protein were required. In addition, a false discovery rate (FDR) threshold of 0.01 (using the decoy database approach) was applied at both peptide and protein levels. To confirm the specificity of the IP assays, for each polypeptide, the ratio between the average intensities (from three independent experiments) generated for the anti-EIF3E and control IPs was first determined. The base 2 logarithms of the values produced were then calculated and only those >5 were considered. In addition, in order to have a statistical support for the results found, a t-Test was performed comparing the natural logarithm of the signal intensities from the triplicate experiments for the anti-EIF3E and control IPs and only those polypeptides having p-values <0.05 were considered.

Availability of supporting data

The data sets supporting the results from this article are included within the main manuscript and within its two additional file(s).

Additional files

Additional file 1: Figure S1. Protein sequence alignment of eIF3a orthologues. Red and blue boxes represent the PCI and Spectrin domains, respectively. **Figure S2.** Protein sequence alignment of eIF3b orthologues. Red, green and blue boxes represent the RRM and WD domains and the eIF3i binding region, respectively. **Figure S3.** Protein sequence alignment of eIF3c orthologues. Red, blue and green boxes represent the eIF5 and eIF1 binding regions and the PCI domain, respectively. **Figure S4.** Protein sequence alignment of eIF3d orthologues. **Figure S5.** Protein sequence alignment of eIF3e orthologues. Blue and red boxes represent the NES and PCI domain, respectively. **Figure S6.** Protein sequence alignment of eIF3f and eIF3h orthologues. (A) Alignment of eIF3f orthologues. (B) Alignment of eIF3h orthologues. The red box represents the MPN domain. **Figure S7.** Schematic representation of the T. brucei EIF3F, EIF3G, EIF3H, EIF3K and EIF3L subunits. The domains/motifs are boxed and colored blue (EIF4F and EIF3H MPN domains), yellow (EIF3G RRM domain), red (EIF3K and EIF3L PCI domains) and brown (EIF3L TPR region). **Figure S8.** Protein sequence alignment of eIF3g orthologues. The red box represents the RRM domain. The Zinc Finger motif, when found, is highlighted (blue box). **Figure S9.** Protein sequence alignment of eIF3i orthologues. The red box represents the eIF3b binding region. **Figure S10.** Protein sequence alignment of eIF3j orthologues. **Figure S11.** Protein sequence alignment of eIF3k and eIF3l orthologues. (A) Alignment of the eIF3k orthologues. (B) Alignment of the eIF3l orthologues. The conserved TPR region and PCI domains are also highlighted (blue and red boxes, respectively).

Additional file 2: Table S1. Accession numbers for the various protein sequences used.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AMR did most of the final data analysis and did part of the writing of the manuscript. LAA, ECN and TDCL were responsible for the various experiments associated with cloning and expression of the *Leishmania* EIF3E, antibody production, immunolocalization and IPs. FKM performed the analysis by mass spectrometry of the immunoprecipitated samples. ERF and CRSR contributed with the original work design and with the sequence analysis of the eIF3 subunits. OPDMN contributed during most stages of the work design and execution and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

Work in OPDMN's lab was funded with grants provided by the Brazilian funding agencies FACEPE (APQ-0239-2.02/12) and CNPq (475471/2008-3 and 480899/2013-4). LAA, ECN, TDCL, ERF, RK and CRSR received studentships from CNPq, FACEPE or CAPES. The authors thank the Program for Technical Development of Health Inputs-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities, the mass spectrometry facility RPT02H, at the Carlos Chagas Institute – Fiocruz Parana, and the automatic sequencing facility RPT01C, at the Research Center Aggeu Magalhaes – Fiocruz Pernambuco.

Author details

[1]Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-420, Brazil. [2]Functional Genomics Laboratory, Carlos Chagas Institute, Fiocruz, R. Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775, Curitiba, PR 81350-010, Brazil.

Received: 24 July 2014 Accepted: 16 December 2014
Published: 23 December 2014

References

1. Aitken CE, Lorsch JR: **A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes.** *Nat Struct Mol Biol* 2012, **19:**568–576.
2. Valasek LS: **'Ribozoomin'–translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs).** *Curr Protein Pept Sci* 2012, **13:**305–330.
3. Hinnebusch AG: **The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation.** *Annu Rev Biochem* 2014, **83:**779–812.
4. Dong Z, Zhang JT: **Initiation factor eIF3 and regulation of mRNA translation, cell growth, and cancer.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2006, **59:**169–180.
5. Hinnebusch AG: **eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes.** *Trends Biochem Sci* 2006, **31:**553–562.
6. Marchione R, Leibovitch SA, Lenormand JL: **The translational factor eIF3f: the ambivalent eIF3 subunit.** *Cell Mol Life Sci* 2013, **70:**3603–3616.
7. Masutani M, Sonenberg N, Yokoyama S, Imataka H: **Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3.** *EMBO J* 2007, **26:**3373–3383.
8. Zhou M, Sandercock AM, Fraser CS, Ridlova G, Stephens E, Schenauer MR, Yokoi-Fong T, Barsky D, Leary JA, Hershey JW, Doudna JA, Robinson CV: **Mass spectrometry reveals modularity and a complete subunit interaction map of the eukaryotic translation factor eIF3.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105:**18139–18144.
9. Wagner S, Herrmannova A, Malik R, Peclinovska L, Valasek LS: **Functional and biochemical characterization of human eIF3 in living cells.** *Mol Cell Biol* 2014, **34**(16):3041-3052.
10. Siridechadilok B, Fraser CS, Hall RJ, Doudna JA, Nogales E: **Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis.** *Science* 2005, **310:**1513–1515.
11. Hofmann K, Bucher P: **The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes.** *Trends Biochem Sci* 1998, **23:**204–205.
12. Aravind L, Ponting CP: **Homologues of 26S proteasome subunits are regulators of transcription and translation.** *Protein Sci* 1998, **7:**1250–1254.
13. Pick E, Hofmann K, Glickman MH: **PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika.** *Mol Cell* 2009, **35:**260–264.
14. Kouba T, Rutkai E, Karaskova M, Valasek L: **The eIF3c/NIP1 PCI domain interacts with RNA and RACK1/ASC1 and promotes assembly of translation preinitiation complexes.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40:**2683–2699.
15. Khoshnevis S, Gunišová S, Vlčková V, Kouba T, Neumann P, Beznosková P, Ficner R, Valášek LS: **Structural integrity of the PCI domain of eIF3a/TIF32 is required for mRNA recruitment to the 43S pre-initiation complexes.** *Nucleic Acids Res* 2014, **42:**4123–4139.
16. Sun C, Querol-Audí J, Mortimer SA, Arias-Palomo E, Doudna JA, Nogales E, Cate JH: **Two RNA-binding motifs in eIF3 direct HCV IRES-dependent translation.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41:**7512–7521.
17. Asano K, Vornlocher HP, Richter-Cook NJ, Merrick WC, Hinnebusch AG, Hershey JW: **Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits. Possible roles in RNA binding and macromolecular assembly.** *J Biol Chem* 1997, **272:**27042–27052.
18. Sun C, Todorovic A, Querol-Audí J, Bai Y, Villa N, Snyder M, Ashchyan J, Lewis CS, Hartland A, Gradia S, Fraser CS, Doudna JA, Nogales E, Cate JH: **Functional reconstitution of human eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108:**20473–20478.
19. Querol-Audi J, Sun C, Vogan JM, Smith MD, Gu Y, Cate JH, Nogales E: **Architecture of human translation initiation factor 3.** *Structure* 2013, **21:**920–928.
20. Hernandez G, Proud CG, Preiss T, Parsyan A: **On the diversification of the translation apparatus across eukaryotes.** *Comp Funct Genomics* 2012, **2012:**256848.
21. Fernandez-Moya SM, Estevez AM: **Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites.** *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010, **1:**34–46.
22. Alsford S, du Bois K, Horn D, Field MC: **Epigenetic mechanisms, nuclear architecture and the control of gene expression in trypanosomes.** *Expert Rev Mol Med* 2012, **14:**e13.
23. Kramer S: **Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids.** *Mol Biochem Parasitol* 2012, **181:**61–72.
24. Clayton CE: **Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*.** *Mol Biochem Parasitol* 2014, **195**(2):96-106.
25. Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B, Place AR: **Diversity of eukaryotic translational Initiation Factor eIF4E in protists.** *Comp Funct Genomics* 2012, **2012:**134839.

26. Zinoviev A, Shapira M: **Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids.** *Comp Funct Genomics* 2012, **2012:**813718.
27. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchettin G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J: **The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major.** *Science* 2005, **309:**436–442.
28. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A: **The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei.** *Science* 2005, **309:**416–422.
29. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC: **Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa.** *Science* 2005, **309:**404–409.
30. Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML: **Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*.** *Science* 2007, **317:**1921–1926.
31. Carlton JM, Hirt RP, Silva JC, Delcher AL, Schatz M, Zhao Q, Wortman JR, Bidwell SL, Alsmark UC, Besteiro S, Sicheritz-Ponten T, Noel CJ, Dacks JB, Foster PG, Simillion C, Van de Peer Y, Miranda-Saavedra D, Barton GJ, Westrop GD, Müller S, Dessi D, Fiori PL, Ren Q, Paulsen I, Zhang H, Bastida-Corcuera FD, Simoes-Barbosa A, Brown MT, Hayes RD, Mukherjee M: **Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*.** *Science* 2007, **315:**207–212.
32. Plutzer J, Ongerth J, Karanis P: ***Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions.** *Int J Hyg Environ Health* 2010, **213:**321–333.
33. Saletta F, Suryo RY, Richardson DR: **The translational regulator eIF3a: the tricky eIF3 subunit!** *Biochim Biophys Acta* 1806, **2010:**275–286.
34. Valasek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG: **Direct eIF2-eIF3 contact in the multifactor complex is important for translation initiation in vivo.** *EMBO J* 2002, **21:**5886–5898.
35. Valasek L, Mathew AA, Shin BS, Nielsen KH, Szamecz B, Hinnebusch AG: **The yeast eIF3 subunits TIF32/a, NIP1/c, and eIF5 make critical connections with the 40S ribosome in vivo.** *Genes Dev* 2003, **17:**786–799.
36. Dong Z, Qi J, Peng H, Liu J, Zhang JT: **Spectrin domain of eukaryotic Initiation Factor 3a is the docking site for formation of the a:b:i:g subcomplex.** *J Biol Chem* 2013, **288:**27951–27959.
37. ElAntak L, Tzakos AG, Locker N, Lukavsky PJ: **Structure of eIF3b RNA recognition motif and its interaction with eIF3j: structural insights into the recruitment of eIF3b to the 40 S ribosomal subunit.** *J Biol Chem* 2007, **282:**8165–8174.
38. Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K, Neer EJ: **The WD repeat: a common architecture for diverse functions.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24:**181–185.
39. Liu Y, Neumann P, Kuhle B, Monecke T, Schell S, Chari A, Ficner R: **Translation initiation factor eIF3b contains a nine-bladed beta-propeller and interacts with the 40S ribosomal subunit.** *Structure* 2014, **22:**923–930.
40. De Gaudenzi J, Frasch AC, Clayton C: **RNA-binding domain proteins in Kinetoplastids: a comparative analysis.** *Eukaryot Cell* 2005, **4:**2106–2114.
41. Nielsen KH, Valasek L, Sykes C, Jivotovskaya A, Hinnebusch AG: **Interaction of the RNP1 motif in PRT1 with HCR1 promotes 40S binding of eukaryotic initiation factor 3 in yeast.** *Mol Cell Biol* 2006, **26:**2984–2998.
42. Shalev A, Valásek L, Pise-Masison CA, Radonovich M, Phan L, Clayton J, He H, Brady JN, Hinnebusch AG, Asano K: ***Saccharomyces cerevisiae* protein Pci8p and human protein eIF3e/Int-6 interact with the eIF3 core complex by binding to cognate eIF3b subunits.** *J Biol Chem* 2001, **276:**34948–34957.
43. Asano K, Phan L, Anderson J, Hinnebusch AG: **Complex formation by all five homologues of mammalian translation initiation factor 3 subunits from yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 1998, **273:**18573–18585.
44. Herrmannová A, Daujotyte D, Yang JC, Cuchalová L, Gorrec F, Wagner S, Dányi I, Lukavsky PJ, Valásek LS: **Structural analysis of an eIF3 subcomplex reveals conserved interactions required for a stable and proper translation pre-initiation complex assembly.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40:**2294–2311.
45. Asano K, Clayton J, Shalev A, Hinnebusch AG: **A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo.** *Genes Dev* 2000, **14:**2534–2546.
46. Karaskova M, Gunisova S, Herrmannova A, Wagner S, Munzarova V, Valasek L: **Functional characterization of the role of the N-terminal domain of the c/Nip1 subunit of eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) in AUG recognition.** *J Biol Chem* 2012, **287:**28420–28434.
47. Nygard O, Westermann P: **Specific interaction of one subunit of eukaryotic initiation factor eIF-3 with 18S ribosomal RNA within the binary complex, eIF-3 small ribosomal subunit, as shown by cross-linking experiments.** *Nucleic Acids Res* 1982, **10:**1327–1334.
48. von Arnim AG, Chamovitz DA: **Protein homeostasis: a degrading role for Int6/eIF3e.** *Curr Biol* 2003, **13:**R323–R325.
49. Yahalom A, Kim TH, Roy B, Singer R, von Arnim AG, Chamovitz DA: ***Arabidopsis* eIF3e is regulated by the COP9 signalosome and has an impact on development and protein translation.** *Plant J* 2008, **53:**300–311.
50. Kim T, Hofmann K, von Arnim AG, Chamovitz DA: **PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways.** *Trends Plant Sci* 2001, **6:**379–386.
51. Marchetti A, Buttitta F, Miyazaki S, Gallahan D, Smith GH, Callahan R: **Int-6, a highly conserved, widely expressed gene, is mutated by mouse mammary tumor virus in mammary preneoplasia.** *J Virol* 1995, **69:**1932–1938.
52. Asano K, Kinzy TG, Merrick WC, Hershey JW: **Conservation and diversity of eukaryotic translation initiation factor eIF3.** *J Biol Chem* 1997, **272:**1101–1109.
53. Guo J, Sen GC: **Characterization of the interaction between the interferon-induced protein P56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus.** *J Virol* 2000, **74:**1892–1899.
54. Browning KS, Gallie DR, Hershey JW, Hinnebusch AG, Maitra U, Merrick WC, Norbury C: **Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3.** *Trends Biochem Sci* 2001, **26:**284.
55. Schwechheimer C: **The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1695:**45–54.
56. Wei N, Serino G, Deng XW: **The COP9 signalosome: more than a protease.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33:**592–600.
57. Cuchalova L, Kouba T, Herrmannova A, Danyi I, Chiu WL, Valasek L: **The RNA recognition motif of eukaryotic translation initiation factor 3 g (eIF3g) is required for resumption of scanning of posttermination ribosomes for reinitiation on GCN4 and together with eIF3i stimulates linear scanning.** *Mol Cell Biol* 2010, **30:**4671–4686.
58. Block KL, Vornlocher HP, Hershey JW: **Characterization of cDNAs encoding the p44 and p35 subunits of human translation initiation factor eIF3.** *J Biol Chem* 1998, **273:**31901–31908.
59. Hanachi P, Hershey JW, Vornlocher HP: **Characterization of the p33 subunit of eukaryotic translation initiation factor-3 from *Saccharomyces cerevisiae*.** *J Biol Chem* 1999, **274:**8546–8553.
60. Park HS, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA: **Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor.** *EMBO J* 2004, **23:**1381–1391.
61. Park HS, Himmelbach A, Browning KS, Hohn T, Ryabova LA: **A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery.** *Cell* 2001, **106:**723–733.
62. Beznoskova P, Cuchalova L, Wagner S, Shoemaker CJ, Gunisova S, von der HT: **Translation Initiation Factors eIF3 and HCR1 control translation termination and stop codon read-through in yeast cells.** *PLoS Genet* 2013, **9:**e1003962.
63. Burks EA, Bezerra PP, Le H, Gallie DR, Browning KS: **Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit.** *J Biol Chem* 2001, **276:**2122–2131.
64. Zhou C, Arslan F, Wee S, Krishnan S, Ivanov AR, Oliva A, *et al*: **PCI proteins eIF3e and eIF3m define distinct translation initiation factor 3 complexes.** *BMC Biol* 2005, **3:**14.
65. Morris-Desbois C, Rety S, Ferro M, Garin J, Jalinot P: **The human protein HSPC021 interacts with Int-6 and is associated with eukaryotic translation initiation factor 3.** *J Biol Chem* 2001, **276:**45988–45995.

66. Walker G, Dorrell RG, Schlacht A, Dacks JB: **Eukaryotic systematics: a user's guide for cell biologists and parasitologists.** *Parasitology* 2011, **138:**1638–1663.
67. Valasek L, Phan L, Schoenfeld LW, Valaskova V, Hinnebusch AG: **Related eIF3 subunits TIF32 and HCR1 interact with an RNA recognition motif in PRT1 required for eIF3 integrity and ribosome binding.** *EMBO J* 2001, **20:**891–904.
68. Chiu WL, Wagner S, Herrmannova A, Burela L, Zhang F, Saini AK, *et al*: **The C-terminal region of eukaryotic translation initiation factor 3a (eIF3a) promotes mRNA recruitment, scanning, and, together with eIF3j and the eIF3b RNA recognition motif, selection of AUG start codons.** *Mol Cell Biol* 2010, **30:**4415–4434.
69. Ankarklev J, Jerlstrom-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svard SG: **Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species.** *Nat Rev Microbiol* 2010, **8:**413–422.
70. Villa N, Do A, Hershey JW, Fraser CS: **Human eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, –d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome.** *J Biol Chem* 2013, **288:**32932–32940.
71. Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Valásek L, Donahue TF, Hinnebusch AG: **Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation.** *EMBO J* 2001, **20:**2326–2337.
72. Damoc E, Fraser CS, Zhou M, Videler H, Mayeur GL, Hershey JW, Doudna JA, Robinson CV, Leary JA: **Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry.** *Mol Cell Proteomics* 2007, **6:**1135–1146.
73. Khoshnevis S, Hauer F, Milon P, Stark H, Ficner R: **Novel insights into the architecture and protein interaction network of yeast eIF3.** *RNA* 2012, **18:**2306–2319.
74. Phan L, Schoenfeld LW, Valasek L, Nielsen KH, Hinnebusch AG: **A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met.** *EMBO J* 2001, **20:**2954–2965.
75. Clayton C, Adams M, Almeida R, Baltz T, Barrett M, Bastien P, Belli S, Beverley S, Biteau N, Blackwell J, Blaineau C, Boshart M, Bringaud F, Cross G, Cruz A, Degrave W, Donelson J, El-Sayed N, Fu G, Ersfeld K, Gibson W, Gull K, Ivens A, Kelly J, Vanhamme L, Myler P: **Genetic nomenclature for *Trypanosoma and Leishmania*.** *Mol Biochem Parasitol* 1998, **97:**221–224.
76. Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS: **OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes.** *Genome Res* 2003, **13:**2178–2189.
77. Enright AJ, Van DS, Ouzounis CA: **An efficient algorithm for large-scale detection of protein families.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30:**1575–1584.
78. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T: **MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30:**3059–3066.
79. Eddy SR: **Profile hidden Markov models.** *Bioinformatics* 1998, **14:**755–763.
80. Capella-Gutierrez S, Silla-Martinez JM, Gabaldon T: **trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses.** *Bioinformatics* 2009, **25:**1972–1973.
81. Abascal F, Zardoya R, Posada D: **ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution.** *Bioinformatics* 2005, **21:**2104–2105.
82. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O: **New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0.** *Syst Biol* 2010, **59:**307–321.
83. Dhalia R, Reis CR, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JR, Standart N, de Melo Neto OP: **Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues.** *Mol Biochem Parasitol* 2005, **140:**23–41.
84. da Costa Lima TD, Moura DM, Reis CR, Vasconcelos JR, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RC, de Melo Neto OP: **Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners.** *Eukaryot Cell* 2010, **9:**1484–1494.
85. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M: **Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics.** *Anal Chem* 2003, **75:**663–670.
86. Cox J, Mann M: **MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.** *Nat Biotechnol* 2008, **26:**1367–1372.

doi:10.1186/1471-2164-15-1175
Cite this article as: Rezende *et al.*: The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates – identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. *BMC Genomics* 2014 **15**:1175.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Ludmila Arruda de Assis

Curriculum Vitae

2015

Identificação

Ludmila Arruda de Assis ASSIS, L. A.

Formação acadêmica, Histórico escolar do Mestrado

Conceito A

Artigos aceitos para publicação

REZENDE, A. M., **ASSIS, L. A.,** NUNES, E. C., DA COSTA LIMA, T. D. C., MARCHINI, F. K., FREIRE, E. R., REIS, C. R. S., DE MELO NETO, O. P. The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. BMC Genomics JCR, 2015.

Resumo publicados em Anais de Congresso

ASSIS, L. A., REZENDE, A. M., NUNES, E. C., DA COSTA LIMA, T. D. C., MARCHINI, F. K., FREIRE, E. R., REIS, C. R. S., DE MELO NETO, O. P. Biochemical characterization of the translation initiation complex eIF3 in Leishmania. In: **XXX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology**, 2014, Caxambu.

ASSIS, L. A., DA COSTA LIMA, T. D. C., DE MELO NETO, O. P. Identificação e caracterização do complexo eIF3 de *Leishmania* bem como de outros parceiros associados ao complexo eIF4F de iniciação da tradução In: **II Jornada Científica da Fiocruz PE**, 2014, Recife.

CAVALCANTI, I. R. P. U., **ASSIS, L. A.**, DA COSTA LIMA, T. D. C., DE MELO NETO, O. P. Análise da expressão e função dos fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 em *Leishmania sp*. In: **22ª Reunião Anual de Iniciação Científica**, 2014, Recife.

ASSIS, L. A., DA COSTA LIMA, T. D. C., DE MELO NETO, O. P. Identificação de novas interações entre dois homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania sp*. e diferentes componentes da sua maquinaria de síntese proteica In: **III Jornada de Pós Graduação em Genética**, 2013, Recife.

CAVALCANTI, I. R. P. U., **ASSIS, L. A.**, DA COSTA LIMA, T. D. C., DE MELO NETO, O. P. Análise da expressão e função dos fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 em *Leishmania major* In**: 21ª Reunião Anual de Iniciação científica**, 2013, Recife.

Atividades didáticas

Monitoria na disciplina Biologia Molecular no 1° semestre/2014, oferecida pelo do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, sob a coordenação do Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto. Carga horária: 16 horas

Orientações

Co-orientação da bolsista PIBIC-Fiocruz **Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino,** no período de 01/08/2013 até a presente data, no projeto intitulado “Identificação de interações entre os fatores de iniciação da tradução

eIF4B e eIF5 de *Leishmania sp.* com homólogos de diferentes componentes da maquinaria proteica" sob coordenação de Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Eventos

- XXX Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. Biochemical characterization of the translation initiation complex eIF3 in Leishmania. 2014 (Congresso)
- II Jornada Cientifica da Fiocruz PE. Identificação e caracterização do complexo eIF3 de Leishmania e de outros parceiros associados ao complexo eIF4F de iniciação da tradução. 2014 (Simpósio).
- Worldleish 5 - Fifth World Congress on Leishmaniasis. 2013 (Congresso).
- GE DAY / Microarray. 2013 (Seminário).
- III Jornada de Pós Graduação em Genética da UFPE.Identificação de novas interações entre dois homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de Leishmania sp. e diferentes componentes da sua maquinaria de síntese protéica. 2013 (Encontro).

Prêmios

Prêmio Menção honrosa "Identificação de novas interações entre dois homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania sp*. e diferentes componentes da sua maquinaria de síntese proteica", III Jornada de Pós Graduação em Genética.