

EDEN RIBEIRO FREIRE

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE HOMÓLOGOS AO
FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4E DE
TRIPANOSOMATÍDEOS**

**Recife
2005**

EDEN RIBEIRO FREIRE



**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE HOMÓLOGOS AO
FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4E DE
TRIPANOSOMATÍDEOS**

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

Orientador: **Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto**, Depto. de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

**Recife, PE
Março de 2005**

Freire, Eden Ribeiro

**Caracterização funcional de homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de Tripanosomatídeos / Éden Ribeiro Freire. – Recife : O Autor, 2005.
ix, 133 folhas : il., fig., tab.**

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2005.

Inclui bibliografia e anexo.

1. Genética – Genética molecular. 2. Síntese protéica – Proteína eIF4E – Caracterização funcional. 3. Parasitologia – Tripanosomatídeos (*Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*) – Iniciação da tradução. I. Título.

**577.112
572.8**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-366**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

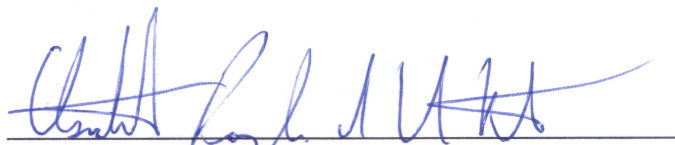
PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
EDEN RIBEIRO FREIRE

**"CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE HOMÓLOGOS AO FATOR DE
INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4E DE TRIPANOSOMATÍDEOS"**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **BIOLOGIA MOLECULAR**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do primeiro, considera o candidato EDEN RIBEIRO FREIRE como aprovado.

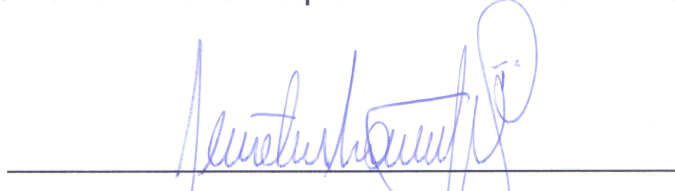
Recife, 12 Abril de 2005



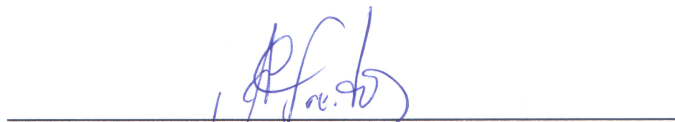
Orientador. Prof. Dr. Osvaldo P. de Melo Neto (PhD, CPqAM- FIOCRUZ)



Membro Externo: Drª Maria Raquel de Moura Coimbra (PhD, UFRPE)



Membro Externo: Dr. Demétrius Antonio Machado de Araújo (PhD, UFPB)



Membro Interno: Dr. Antonio Carlos de Freitas (PhD, UFPE)

*A Deus e a minha
família pelo apoio
constante durante todos
esses anos.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Osvaldo Pompílio de Melo Neto pela oportunidade e orientação proporcionadas.

A Christian Reis e Rafael Dhalia pela grande ajuda na execução desse trabalho.

Aos integrantes e ex-integrantes do grupo: Cheila Bedor, Danielle Moura, Eleonora Moraes, Mariana Marques, Marina Petribú, Patrícia Haver, Pollyanna Rocha, Rodolfo Katz, Rodrigo Menezes e Tamara De'Carli.

Aos integrantes do Departamento de Microbiologia: Francisco Cariri, Dr^a Nilma Cintra, Josiane Gomes e a todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente.

Aos integrantes do Departamento de Entomologia: Henrique Beltrão, Plínio Pereira, e Tatiany Romão pela ajuda prestada.

A Dr^a Maria Helena, do Departamento de Entomologia, pelo suporte material.

Ao apoio técnico: Conceição Vasconcelos, Fabiana Laura, Isaac Martins, Lucas Rocha, Edson Lemos, Raimundo Nazareno, Silvana Santos, e Yara Nakasawa.

Aos meus amigos, meus familiares e colegas de mestrado.

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife, PE, com o patrocínio do CNPq, CPqAM/FIOCRUZ e The Welcome Trust.

Muito Obrigado.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
Lista de Abreviaturas	vii
Resumo	ix
1– Introdução	1
2– Objetivos	3
3– Revisão bibliográfica	4
3.1 Tripanosomatídeos	4
3.1.1 Origem e Evolução	4
3.1.2 Biologia	6
3.1.2.1 Ciclo e vida da <i>Leishmania sp.</i>	8
3.1.2.2 Ciclo e vida do <i>Trypanosoma brucei</i>	10
3.1.3 Epidemiologia	11
3.1.3.1 Leishmanioses	11
3.1.3.2 Doença do sono	14
3.1.4 Aspectos da Biologia Molecular dos tripanosomatídeos	15
3.1.4.1 Genoma e organização gênica dos tripanosomatídeos	15
3.1.4.2 Promotores e transcrição policistrônica	17
3.1.4.3 <i>Trans-splicing</i> nos tripanosomatídeos	18
3.1.4.4 Estrutura cap e suas modificações	19
3.1.4.5 Controle pós-transcricional da expressão gênica em tripanosomatídeos	22
3.2. O processo de síntese protéica em eucariotos	25
3.2.1 eIF4A- a proteína que remove estruturas secundárias do mRNA	28
3.2.2 eIF4G - a proteína coordenadora do complexo de iniciação	30
3.2.2.1 Estrutura do eIF4GI humano	30
3.2.2.2 Interação eIF4G-eIF4E	32
3.2.3 eIF4E – a proteína de ligação ao cap	34
3.2.3.1 Interação eIF4E-Cap	35

3.2.3.2 Interação eIF4E-eIF4G	37
3.2.3.3 Controle da atividade do eIF4E	38
3.2.3.3.1 Controle transcricional do eIF4E	38
3.2.3.3.2 Controle do eIF4E por fosforilação	39
3.2.3.3.3 Controle do eIF4E por interação com as proteínas 4EBP's	40
3.2.3.4 Papel do eIF4E no controle da exportação de mRNA's e na tradução nuclear	42
3.2.3.5 Papel do eIF4E na reciclagem de mRNA's	44
3.2.4 Tradução em tripanosomatídeos	45
3.2.5 Resultados obtidos pelo grupo de estudo de Biossíntese Protéica em tripanosomatídeos.	46
4- Referências Bibliográficas	48
5- Artigos Científicos	74
Manuscrito I	75
Manuscrito II	95
6- Abstract	126
7- Conclusões	127
8- Anexo	128
8.1 Amplificação e clonagem do gene <i>LmEIF4E4</i>	128
8.2 Transcrição e tradução do gene <i>LmEIF4E4</i>	129
8.3 Expressão da proteína <i>LmEIF4E4</i> em bactérias	131
8.4 Análise da especificidade dos anticorpos <i>LmEIF4E1-3</i>	132

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Relação dos gêneros constituintes da família <i>Trypanosomatidae</i> .	5
---	---

MANUSCRITO I

Tabela 1. Sumário da análise das seqüências de vários homólogos ao eIF4F de <i>Leishmania major</i> .	80
Tabela 2. Sumário da quantificação em promastigotas de vários homólogos ao eIF4F em <i>Leishmania major</i> .	84

MANUSCRITO II

Tabela 1. Sumário da Quantificação dos Homólogos ao fator de Iniciação eIF4E de <i>Trypanosoma brucei</i> .	118
Tabela 2. Sumário da Quantificação dos Homólogos ao fator de Iniciação eIF4E de <i>Trypanosoma brucei</i> .	119

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Fig. 1. Representação da forma típica dos tripanosomatídeos.	7
Fig. 2. Células coradas demonstrando os estágios do desenvolvimento encontrados na família Trypanosomatidae.	7
Fig. 3. Diagrama da divisão celular dos tripanosomatídeos.	8
Fig. 4. A-Foto do inseto flebotomíneo, B- Foto da forma promastigota de <i>Leishmania sp.</i>	9
Fig. 5. Resumo do ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	9
Fig. 6. A- Foto da mosca Tse-tse, B- Foto da forma sanguínea do <i>Trypanosoma brucei</i> .	10
Fig. 7. Resumo do ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i> .	11
Fig. 8. Distribuição mundial das leishmanioses.	12
Fig. 9. Manifestações das leishmanioses.	13
Fig. 10. Distribuição mundial da doença do sono.	14
Fig. 11. Paciente acometido com a doença do sono.	15
Fig. 12. Organização dos genes nos cromossomos 1, 2, 3, 4 e 35 de <i>Leishmania major</i> .	16
Fig. 13. Representação esquemática do <i>trans-splicing</i> .	18
Fig. 14. Estrutura química do cap.	20
Fig. 15. Estrutura química do cap 4.	22
Fig. 16. Esquema do processo de iniciação da tradução em eucariotos.	27
Fig. 17. Representação da seqüência dos nove motivos da família DEAD Box.	29
Fig. 18. Representação da estrutura cristalizada de uma proteína da família DEAD Box.	29
Fig. 19. Representação da estrutura do eIF4GI e eIF4GII humanos.	31
Fig. 20. Circularização do mRNA.	32
Fig. 21. Interação do eIF4E com o cap.	36
Fig. 22. Representação gráfica da conformação da guanossina na	

cavidade do eIF4E.	37
Fig. 23. Representação da redução da afinidade por repulsão eletrostática do eIF4E fosforilado na Ser209.	39
Fig. 24. Regulação da formação do complexo eIF4F pela interação das 4EBP's com o eIF4E.	41

MANUSCRITO I

Fig. 1. Comparação das seqüências dos homólogos ao eIF4E putativos de <i>L. major</i> e de outros organismos.	82
Fig. 2. Análise da expressão e quantificação dos <i>LmEIF4E1-3</i> em promastigotas de <i>L. major</i> .	83
Fig. 3. Ensaio de afinidade ao cap dos homólogos <i>LmEIF4E1-3</i> .	84
Fig. 4. Modelo predito da estrutura do <i>LmEIF4E1</i> ligado a 7-metil-GDP	85
Fig. 5. Comparação das seqüências dos homólogos de eIF4A de <i>L. major</i> e de outros organismos.	86
Fig. 6. Expressão e quantificação dos homólogos <i>LmEIF4A</i>	87
Fig. 7 Comparação entre as seqüências do domínio HEAT dos homólogos putativos <i>LmEIF4G1-5</i> de <i>L. major</i> e de outros organismos	89
Fig. 8. Análise da interação entre os homólogos ao eIF4A de humanos e <i>L. major</i> com a proteína <i>LmEIF4G3</i> .	90
Fig. 9. Modelo da estrutura do domínio HEAT do <i>LmEIF4G3</i> .	91

MANUSCRITO II

Fig. 1. Alinhamento comparando as seqüências dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> com os homólogos de leveduras e de humanos	120
Fig. 2. Géis SDS-PAGE das quantificações das proteínas homólogas ao eIF4E de <i>T. brucei</i> expressas em bactérias e purificadas	122
Fig. 3. Análise da quantificação da expressão das proteínas homólogas ao eIF4E em extratos totais de <i>T. brucei</i>	123

Fig. 4. Fotografia do gel de separação eletroforética (agarose) dos RNAs dos homólogos ao fator eIF4E de <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> obtidos por transcrição <i>in vitro</i>	124
Fig. 5. Autoradiografia de separação eletroforética (SDS-PAGE) de proteínas homólogos ao fator eIF4E de <i>Leishmania major</i> e <i>Trypanosoma brucei</i> obtidas por tradução <i>in vitro</i> e marcadas com S ³²	125
Fig. 6. Autoradiografias de separação eletroforética (SDS-PAGE) dos ensaios de ligação ao cap das proteínas homólogos ao fator eIF4E	126

ANEXO

Fig. 1. Reação de amplificação por PCR do gene codificador do <i>LmEIF4E4</i> com os primers B06 e B08.	129
Fig. 2. Transcrição e <i>tradução in vitro</i> do gene <i>LmEIF4E4</i>	131
Fig. 3. Gel SDS-PAGE com as proteínas provenientes da expressão em bactérias da proteína <i>LmEIF4E4</i> fusionada à cauda de histidinas ou à GST.	132
Fig. 4. <i>Western-blot</i> demonstrando a especificidade do anticorpo do <i>LmEIF4E1</i> .	133
Fig. 5. <i>Western-blot</i> demonstrando a especificidade do anticorpo do <i>LmEIF4E2</i> .	134
Fig. 6. <i>Western-blot</i> demonstrando a especificidade do anticorpo do <i>LmEIF4E3</i> .	134

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP – Proteína de ligação à proteína 4E (*4E binding protein*)

ATP – Adenosina Trifosfato

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

cDNA – DNA complementar

DEPC – Dietil pirocarbonato

DTT – Ditioneitol

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

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

FAZ – Zona de Ligação do Flagelo (*Flagellum Attachment Zone*)

GST – Glutathione S Transferase

GTP – Guanosina trifosfato

HEAT – **H**untingtin, **E**longation factor 3, **A** subunit of protein phosphatase 2A, and **T**arget of rapamycin

IPTG – Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo

kDa – Kilodáton

LB –Luria Bertani

LmEIF4E- Fator de iniciação da tradução 4E de *Leishmania major* (*Leishmania major eukaryotic initiation factor 4E*)

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

NMR – Ressonância Molecular Nuclear (*Nuclear Molecular Resonance*)

nt- nucleotídeo

NTP – Nucleotídeo trifosfato

ORF – Seqüência aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

OD – Densidade Óptica (*Optic Density*)

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

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

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

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

PFGE – Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulse Field Gel Electrophoresis*)

p/v – Peso volume

RNA pol – RNA polimerase

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

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico

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

SL – Sequência *spliced leader* ou mini-éxon

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

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

UTR – Região não traduzível (*Untranslated Region*)

TbEIF4E – Fator de iniciação da tradução 4E de *Trypanosoma brucei* (*Trypanosoma brucei translation initiation factor 4E*)

TE – Tampão Tris-EDTA

tRNA – Ácido ribonucleico transportador

tRNAi – tRNA iniciador

RESUMO

Em eucariotos, a síntese protéica se inicia com a ligação do complexo multimérico de iniciação da tradução eIF4F (Fator de iniciação da tradução 4F) ao cap monometilado e o recrutamento da subunidade menor ribossomal à porção 5' dos mRNAs. Este complexo é composto por três subunidades: eIF4E, proteína de ligação ao nucleotídeo cap; eIF4A, uma RNA helicase; e eIF4G, que atua como montador para o complexo. Pouco é conhecido sobre os detalhes da síntese protéica em tripanosomatídeos; todavia, a presença da conservada estrutura cap modificada, cap4, e da sequência *spliced leader* na porção 5' de todos os mRNAs sugerem possíveis diferenças no recrutamento do mRNA aos ribossomos. Nosso grupo de pesquisa identificou vários homólogos a fatores de iniciação do complexo eIF4F de tripanosomatídeos em trabalhos anteriores, e objetivo deste trabalho foi caracterizar os homólogos ao eIF4E em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*. A quantificação dos homólogos ao eIF4E de *L. major* (*LmEIF4E1-3*) revelou que o *LmEIF4E1* e *LmEIF4E2* são raros e o *LmEIF4E3* é muito abundante na forma promastigota deste parasita. Dentre os homólogos de *T. brucei* (*TbEIF4E1-3*), o *TbEIF4E1* pôde ser detectado em baixos níveis nas formas procíclica e sanguínea, o *TbEIF4E2* é raro, ou não detectado, nas duas formas e o *TbEIF4E3* é muito abundante na forma procíclica e raro, ou não detectado, na forma sanguínea. Em ensaios de ligação ao cap, somente o *LmEIF4E1* e os homólogos *TbEIF4E1*, *TbEIF4E2* e *TbEIF4E4* foram capazes de se ligar às resinas de 7-metil-GTP sefarose. Conseqüentemente, os ensaios realizados revelaram que apenas um dos homólogos testados (EIF4E1) em ambos os parasitas parece ser capaz de cumprir as características esperadas de um fator de iniciação da tradução da família eIF4E. No entanto, novos ensaios são necessários para uma melhor caracterização e compreensão dos papéis das proteínas de ligação ao cap nos Tripanosomatídeos.

Palavras-chave: eIF4E; Iniciação da tradução; Tripanosomatídeos.

1 - INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae, da Ordem Kinetoplastida, compreende espécies de protozoários flagelados divididos nos gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma* e mais seis outros gêneros menos conhecidos. No gênero *Leishmania* encontram-se os agentes etiológicos das chamadas leishmanioses, que afetam cerca de 12 milhões de pessoas, com cerca de 2 milhões de novos casos por ano. No gênero *Trypanosoma* encontram-se os agentes etiológicos da doença de chagas (*Trypanosoma cruzi*), que afeta cerca de 16-18 milhões de pessoas, e com 300 mil novos casos anuais; e da doença do sono (*Trypanosoma brucei*), que afeta cerca de 2,05 milhões de pessoas, também com 300-500 mil novos casos anuais.

Além do interesse médico, os tripanosomatídeos têm atraído a atenção de parasitologistas moleculares por causa dos recentes estudos que revelam aspectos peculiares de sua biologia. É conhecido que a família Trypanosomatidae divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, tendo regras para sua biologia celular e molecular um pouco distintas quando comparadas com a maioria dos eucariotos, como transcrição policistrônica; ausência de íntrons; processamento de pré-mRNA por “*trans-splicing*” e extensivas modificações pós-transcricionais do RNA mitocondrial. Estas e outras características além de atraírem a atenção dos pesquisadores, constituem novos caminhos para futuros métodos de controle das leishmanioses e tripanosomíases.

Nesse contexto a caracterização do processo de síntese protéica nos Tripanosomatídeos, pela sua complexidade e importância biológica, se destaca como uma pergunta fundamental para o conhecimento da biologia destes parasitas com possíveis aplicações futuras no desenvolvimento de agentes quimioterápicos no seu tratamento.

Em eucariotos superiores a principal etapa de controle do mecanismo de tradução ocorre na iniciação, responsável pelo recrutamento do ribossomo ao mRNA. Nesta etapa é de fundamental

importância a participação dos fatores de iniciação do complexo eIF4F (*Eukaryotic Initiation Factor 4F*), constituído de três subunidades: eIF4E (a proteína de ligação ao cap do RNA mensageiro), eIF4A (uma RNA helicase) e eIF4G (proteína estruturadora do complexo). Em tripanosomatídeos a ausência de um controle transcricional realmente efetivo e a existência de uma estrutura cap diferente (cap4) associada a presença de vários homólogos aos fatores de iniciação do complexo eIF4F remetem a possibilidade de mecanismos de controle diferentes para a tradução nesses organismos.

Procurando-se esclarecer um pouco mais sobre o mecanismo de tradução em tripanosomatídeos, este trabalho teve como objetivo contribuir com a caracterização dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de *Leishmania major* e de *Trypanosoma brucei*, através da avaliação da expressão dos homólogos ao eIF4E durante o ciclo de vida desses parasitas e da avaliação de sua capacidade de reconhecer a estrutura cap. Inicialmente, proteínas recombinantes de três dos homólogos já clonados de *L. major* (LmEIF4E1-3) e quatro de *T. brucei* (TbEIF4E1-4) foram expressas em bactérias, purificadas e quantificadas. Em seguida essas proteínas foram utilizadas juntamente com seus respectivos anticorpos policlonais (obtidos em trabalhos anteriores) em ensaios de *Western-Blot* para a quantificação da expressão em extratos totais de *L. major* e *T. brucei*. Para a avaliação da capacidade de reconhecimento da estrutura cap, característica da família de proteínas eIF4E, os homólogos ao eIF4E identificados de *L. major* e *T. brucei* foram transcritos, purificados e traduzidos *in vitro* e, em seguida, utilizados em ensaios de avaliação da sua interação com a resina m⁷GTP-sefarose.

Os resultados referentes às quantificações dos homólogos de *L. major* foram publicados no artigo intitulado "Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues", pela revista *Molecular and Biochemical Parasitology*. Os resultados sobre as quantificações e avaliação da afinidade ao cap dos homólogos de *T. brucei* serão publicados em artigo futuro.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Caracterização funcional de homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei*.

Objetivos Específicos:

- Obter a proteína recombinante do homólogo *LmEIF4E4* de *L. major* para a obtenção de anticorpos;
- Analisar a especificidade dos anticorpos disponíveis para cada homólogo eIF4E de *L. major* ;
- Quantificar por “*Western-Blot*” os homólogos ao fator eIF4E em *L. major* e *T. brucei* utilizando os anticorpos já disponíveis;
- Investigar por cromatografia de afinidade a capacidade ligação ao cap dos homólogos ao eIF4E de *L. major* e *T. brucei* traduzidos *in vitro*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TRIPANOSOMATÍDEOS

3.1.1 Origem e Evolução

O Filo *Euglenozoa* (ao qual pertencem os tripanosomatídeos) surgiu há varias centenas de milhões de anos na linhagem eucariótica, após a diferenciação de um ancestral dos eucariotos biciliados, os Bicontes (Stechmann e Cavalier-Smith, 2002). Segundo Hannaert *et al.* (2003b) o ancestral do filo surgiu a partir da endossimbiose de uma alga verde por um eucarioto primitivo, dando origem a um organismo fotossintetizante com um cloroplasto com três membranas, semelhante aos euglenídeos atuais, como a *Euglena gracilis* (Hannaert *et al.* 2003a; Martin e Borst, 2003).

Ao filo *Euglenozoa* pertencem às ordens Euglenida (formado pelos euglenídeos, organismos de vida livre fotossintetizantes), Diplonemea (formados pelos diplonemídeos, organismos de vida livre e parasitas eventuais) e Kinetoplastida (formado pelos cinetoplastídeos) (Cavalier-Smith, 1993). Estas ordens estão agrupadas classicamente nesse filo por possuírem semelhanças citológicas, metabólicas, morfológicas e moleculares como, por exemplo, o mecanismo de *trans-splicing* e a presença da incomum base "J" no DNA (Martin e Borst, 2003; Hannaert *et al.*, 2003a).

A ordem Kinetoplastida teria surgido a partir de uma perda secundária do cloroplasto de três membranas, diferenciação dos peroxissomos em glicossomos e de modificações ocorridas na mitocôndria desses organismos originando o cinetoplasto (Hannaert *et al.* 2003a). Essa ordem é constituída pelas famílias Bodonidae (formada por organismos aquáticos biflagelados de vida livre, mas com alguns membros ectoparasitas de peixes), Cryptobiidae (formada por organismos aquáticos

biflagelados de vida livre) e Trypanosomatidae (formada por parasitas com um flagelo) (Stevens *et al.*, 2001). Os membros dessa ordem possuem o mecanismo de *Trans-splicing* (discutido mais adiante) para o processamento de todos os mRNAs de origem nuclear (Stevens *et al.*, 2001) e realizam o editoramento de mRNAs mitocondriais (revisto por Stuart e Panigrahi, 2002).

A família Trypanosomatidae é formada por dois grupos: parasitas monogenéticos ou monoxênicos (que possuem um hospedeiro) dos gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Wallaceina*; e parasitas digenéticos ou heteroxênicos (que possuem dois hospedeiros) dos gêneros *Endotrypanum*, *Phytomonas*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (Stevens *et al.*, 2001; Maslov *et al.* 2001) (Tabela1).

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

Trypanosomatídeos	Gênero	Hospedeiro	Vetor
Monogenéticos (Monoxênicos)	<i>Blastocrithidia</i>	Insetos e ácaros	-
	<i>Crithidia</i>	Insetos	-
	<i>Herpetomonas</i>	Insetos	-
	<i>Leptomonas</i>	Insetos, nematóides	-
	<i>Rhynchoidomonas</i>	Insetos dípteros	-
	<i>Wallaceina</i>	Insetos hemípteros	-
Digenéticos (Heteroxênicos)	<i>Endotrypanum</i>	Preguiças	Insetos-flebotomíneos
	<i>Phytomonas</i>	Plantas com flores	Insetos hemípteros
	<i>Leishmania</i>	Mamíferos, lagartos	Insetos-flebotomíneos
	<i>Trypanosoma</i>	Vertebrados	Artrópodes; sanguessugas

A família *Trypanosomatidae* teria surgido de um ancestral de vida livre e/ou eventual ectoparasito semelhante aos atuais Bodonídeos; e o meio de vida parasitário teria surgido na família por uma eventual adaptação dos ectoparasitas ao invadirem os tecidos internos de peixes (fenômeno também detectado em alguns dos atuais Bodonídeos), tendo sanguessugas como vetores (Stevens *et al.*, 2001), teoria chamada de “primeiro em vertebrado”. Outra teoria propõe que os tripanosomatídeos surgiram primeiro como parasitas de invertebrados (teoria do “primeiro em invertebrado”), baseada na hipótese de que os tripanosomatídeos

exclusivos de insetos (monogenéticos ou monoxênicos) teriam surgido antes e teriam dado origem aos parasitas de vertebrados e invertebrados (digenéticos ou heteroxênicos) (Baker, 1994). No entanto Fernandes *et al.* (1993) propuseram que o parasitismo digenético na família teria surgido quatro vezes durante a história evolutiva: dando origem as linhagens (1) *Leishmania/Endotrypanum*; (2) *Phytomonas*; (3) *T. cruzi* e (4) *T. brucei*.

Embora existam muitas especulações sobre a origem e evolução da família *Trypanosomatidae* muito ainda está para ser esclarecido. Atuais análises moleculares reestruturam classificações feitas apenas a partir da morfologia e estilos de vida dando novas perspectivas para a compreensão desses organismos (Maslov *et al.* 2001; Momem, 2002)

3.1.2 Biologia

A evolução divergente precoce da família *Trypanosomatidae* permitiu o desenvolvimento de uma série de particularidades na biologia desses organismos, uma dessas é refletida na forma de suas células, que possuem um arranjo singular que se modifica de acordo com os estímulos do ambiente em que se encontram (Alexander *et al.*, 1999). A forma celular dos tripanosomatídeos (Figura 1) é definida por uma gaiola de microtúbulos subpeliculares organizada em arranjo de hélices ao longo do eixo longitudinal da célula (Gull, 1999; McKean, 2003). Um único flagelo reside anexado ao corpo celular através da zona de junção do flagelo ou FAZ (*Flagelum Attachment Zone*) localizado no bolso flagelar (*Flagelar Pocket*). Junto à zona de junção do flagelo está localizado o corpo basal, importante para divisão celular; e próximo a ele reside o Cinetoplasto, localizado dentro de uma grande mitocôndria que percorre quase todo o corpo celular (McKean, 2003). Os tripanosomatídeos possuem organelas especializadas para a metabolização da glicose, os glicossomos (revisto por Michels *et al.*, 2000) e um núcleo localizado no centro da célula, que possui a característica de não sofrer disrupção do seu envelope durante a citocinese (Ogbadoyi *et al.*, 2000).

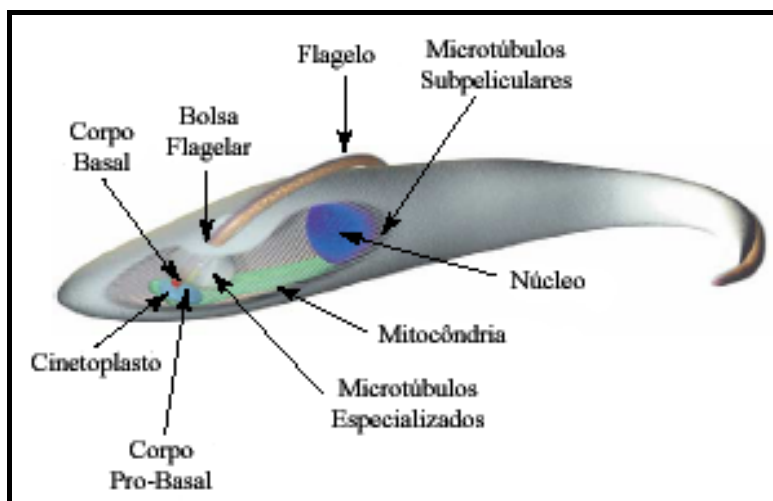


Figura 1. Representação da forma típica dos Trypanosomatídeos (*Trypanosoma brucei*) baseada em estudos de microscopia eletrônica, destacando a posição de organelas como o núcleo (azul escuro), Cinetoplasto (azul claro), mitocôndria (verde), corpo basal e pro-basal, (vermelho), e o flagelo (McKean, 2003).

A sobrevivência e multiplicação destes organismos nos hospedeiros são moduladas por profundas modificações bioquímicas e morfológicas indispensáveis para sua adaptação em meios biológicos distintos (Alexander *et al.*, 1999). Assim os tripanosomatídeos assumem várias formas morfológicas durante seu ciclo de vida, diferenciadas pelo tamanho do flagelo e pela posição da inserção deste (juntamente com o corpo basal) em relação ao núcleo. No entanto nenhum dos gêneros possui todas as formas (Figura 2).

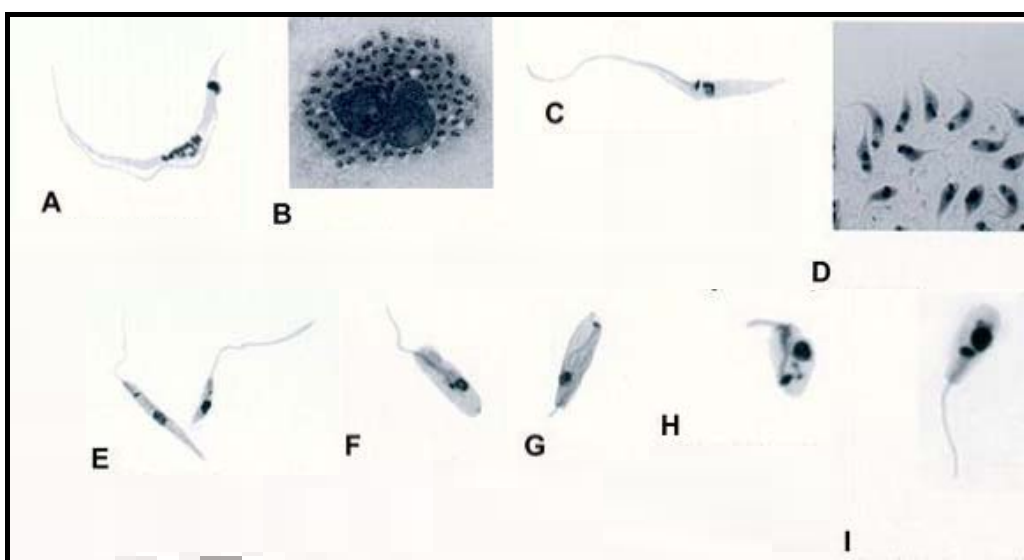


Figura. 2. Células coradas demonstrando os estágios do desenvolvimento encontrados na família *Trypanosomatidae*. A - Tripomastigota, B - Amastigota (dentro de macrófagos de vertebrados), C - Epimastigota, D - Intermediário, E - Promastigota, F -Paramastigota, G-Opistomastigota, H - Opistomorfo e I - Coanomastigota (De Souza, 2002).

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

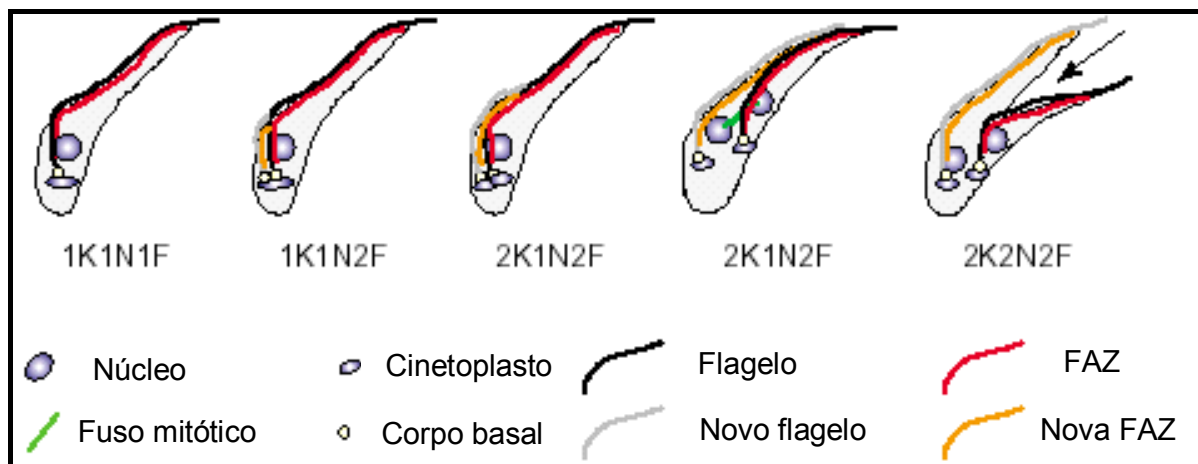


Figura 3. Diagrama da divisão celular dos tripanosomatídeos, demonstrando a formação sequencial do flagelo (F), cinetoplasto (K) e núcleo (N), seguidas da citocinese antero-posterior (McKean, 2003).

3.1.2.1 Ciclo de vida da *Leishmania* sp.

O ciclo de vida da *Leishmania* (Figura 4a) envolve a alternância entre os hospedeiros vertebrados e seus vetores, insetos dípteros da subfamília Phlebotominae. Fêmeas dos flebotomíneos (Figura 4b) infectadas com *Leishmania* sp. possuem em suas glândulas salivares os parasitas na forma de promastigota metacíclico (pequenos promastigotas com flagelo livre extenso e não replicativos) e os injetam no hospedeiro vertebrado através do repasto sanguíneo (revisado por Killick-Kendrick, 1990). Estes invadem os macrófagos do hospedeiro e dentro dos lisossomos diferenciam-se na forma amastigota (ovóide e replicativo). Dentro dos macrófagos esses amastigotas se multiplicam e provocam a lise da célula, podendo assim infectar novos macrófagos ou serem capturados em um novo repasto dos insetos. Quando o flebotomíneo pica o indivíduo infectado, ingere sangue contaminado com os parasitas. Estes, no

intestino do inseto, se diferenciam para a forma de promastigota procíclico (promastigotas pequenos, ovóides, móveis e replicativos) e se multiplicam sucessivamente. Em seguida estes se diferenciam em promastigotas nectomonados (promastigotas longos, delgados e não-replicativos) e então migram pelo trato digestivo do inseto até o intestino médio, onde se transformam na forma de promastigota leptomonado (pequenos e replicativos). Estes se multiplicam e por fim, se diferenciam na forma de promastigota metacíclico (Killick-Kendrick, 1990; Gossage *et al.*, 2003; Desjeux, 2004). A representação resumida do ciclo pode ser observada na Figura 5.

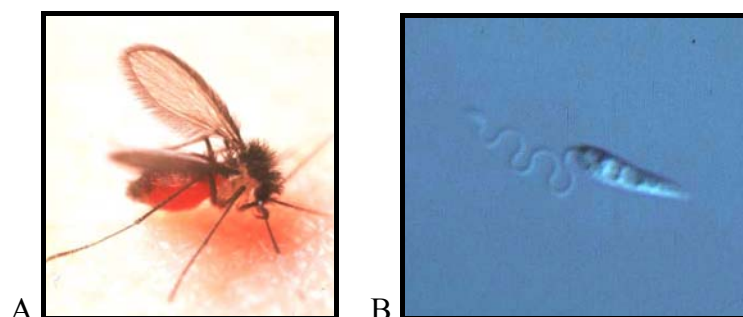


Figura 4. A - Inseto flebotomíneo, vetor da *Leishmania sp.* B - Forma promastigota da *Leishmania sp.* (WHO/TDR CD Image Library (2003); disponível também em www.who.int/tdr).

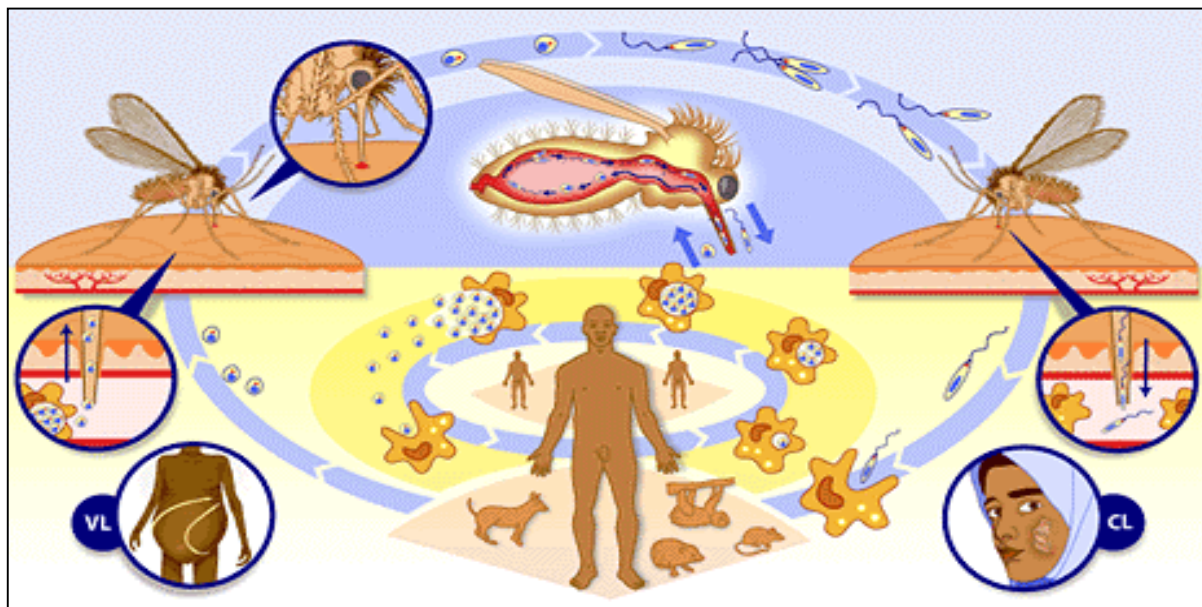


Figura 5. Resumo do ciclo de vida da *Leishmania sp.*, demonstrando a transmissão do parasita do hospedeiro invertebrado para o vertebrado e suas respectivas formas morfológicas (WHO/TDR Leishmaniasis Poster, www.who.int/tdr).

3.1.2.2 Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*.

Os parasitas da espécie *T. brucei* são transmitidos ao homem por moscas *Tse-Tse* (família Muscidae, gênero *Glossina* spp.) (Figura 6a) que durante seu repasto sanguíneo liberam parasitas procíclicos (*procyclic form*, replicativos) das suas glândulas salivares. Uma vez em contato com a corrente sanguínea, as formas procíclicas se transformam na forma sanguínea delgada (*bloodstream slender form*, replicativa) (Figura 6b) e se multiplicam assexuadamente no sangue, linfonodos e fluido espinhal, migrando para o cérebro em um estágio mais avançado da infecção. Em altos índices de parasitemia, esses parasitas diferenciam-se para uma forma sanguínea mais curta (*bloodstream stumpy form*, não replicativa) que possui características que possibilitam a sobrevivência no inseto. Estas formas sanguíneas são ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto e, no interior de seu intestino, iniciam uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas para se adaptar às condições de baixa glicose do intestino do inseto. Diferenciam-se então na forma procíclica e migram para as glândulas salivares onde se multiplicam repetidas vezes, fechando o ciclo de transmissão do parasita (Figura 7).

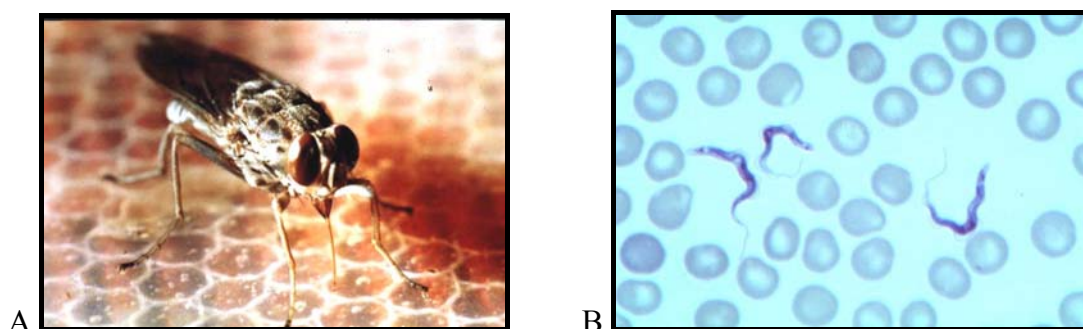


Figura 6. A - Mosca Tse-tse, vetor do *Trypanosoma brucei*. B- Forma sanguínea do *Trypanosoma brucei* (WHO/TDR CD Image Library (2003); www.who.int/tdr).

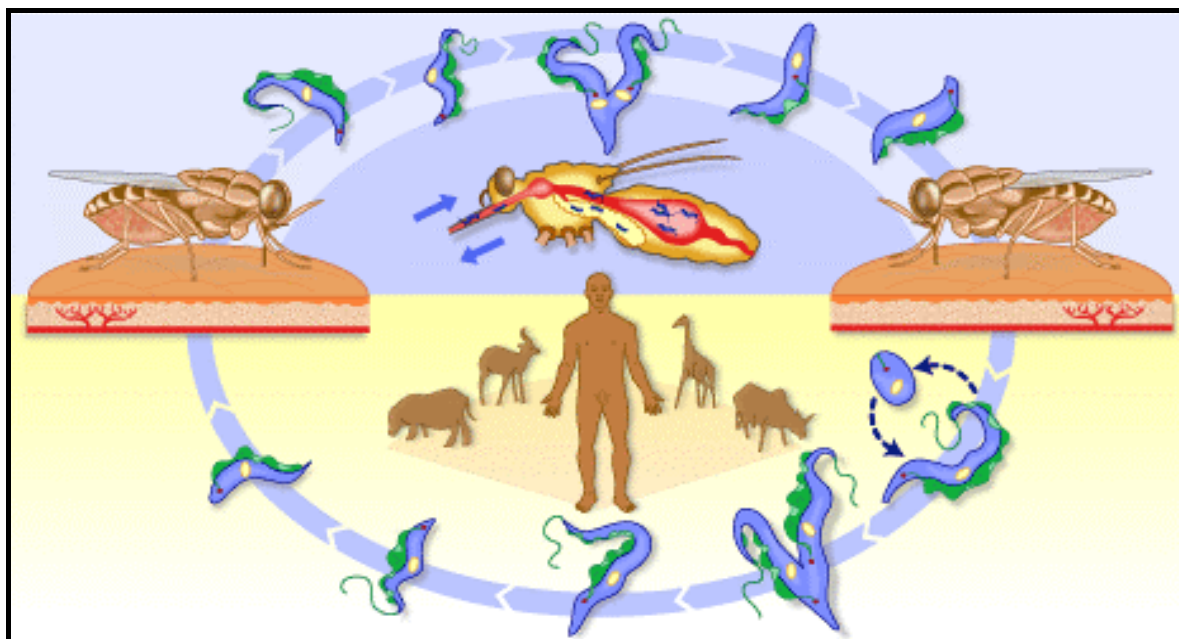


Figura 7. Resumo do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*, demonstrando a transmissão do parasita do hospedeiro invertebrado para o vertebrado e suas respectivas formas morfológicas (WHO/TDR African Trypanosomiasis Poster, www.who.int/tdr).

O principal mecanismo utilizado pelo *T. brucei* para burlar os sistemas de defesa dos hospedeiros vertebrados consiste na variação antigênica de seus antígenos glicoproteicos de superfície (VSG's) através da expressão diferencial controlada por rearranjos programados de DNA (revisto por Borst *et al.*, 1996) e por modificações pontuais específicas de bases do DNA (van Leeuwen *et al.*, 1998). No hospedeiro invertebrado esse parasita evade da ação das proteases do trato digestivo do inseto por expressar proteínas de superfície que lhe conferem proteção, chamadas de prociclinas ou PARPS (*Procyclic Acid Repetitive Proteins*) (revisto por Roditi *et al.*, 1998).

3.1.3 Epidemiologia

3.1.3.1- Leishmanioses

As Leishmanioses são doenças causadas por cerca de 20 espécies parasitas do gênero *Leishmania* e transmitidas por cerca de 30 diferentes espécies de vetores da sub-família Phlebotominae. Estas enfermidades se

caracterizam por manifestações clínicas multifacetárias e ainda hoje constituem um grave problema de saúde pública, afetando pessoas em 88 países: dentre esses 72 estão em desenvolvimento e 16 são desenvolvidos (Figura 8). (Desjeux, 1996; 2004). A incidência anual das Leishmanioses é de cerca de 1-1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e cerca de 500 mil de leishmaniose visceral, afetando um total de 12 milhões de pessoas e oferecendo risco a cerca de 350 milhões (Desjeux, 1996).



Figura 8. Distribuição mundial das leishmanioses (WHO/TDR Leishmaniasis Poster, www.who.int/tdr).

As formas clínicas são particularmente diversas representando um complexo de doenças: (1) leishmaniose cutânea (CL), (2) leishmaniose visceral, ou calazar (Kala azar) (VL), (3) leishmaniose mucocutânea, (4) leishmaniose cutânea difusa (DCL) e leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL) (Ashford, 2000).

A Leishmaniose cutânea em geral se manifesta através de lesões na pele que se curam com o tempo, mas que deixam cicatrizes (Figura 9a). Em sua forma mais severa é muito difícil de se tratar e causa estigmas desfigurantes vitalícios (Desjeux, 2004). A maioria dos casos de CL acontece em sete países: Afeganistão, Nigéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Desjeux, 1996). É causada principalmente pelas espécies: *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L.*

panamensis, *L. guyanensis*, *L. peruviana* ou *L. braziliensis*, mas podem ser causadas por qualquer espécie que infecte humanos (Ashford, 2000) (Figura 9a).

A leishmaniose visceral é a forma mais severa e é geralmente fatal quando não tratada. É caracterizada por: febre irregular, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatias e anemias (Figura 9b). Cerca de 90% dos casos acontecem em áreas rurais pobres de Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil. É principalmente causada pelas espécies: *L. donovani infantum*/*L. chagasi* e *L. (d) donovani* (Ashford, 2000; Desjeux, 2004).

A leishmaniose mucocutânea é caracterizada por uma extensiva destruição das cavidades oral-nasal e faríngea com lesões escondidas desfigurantes, mutilações na face e causando grande sofrimento (Figura 9c). É geralmente relacionada a espécies de *Leishmania* do Novo Mundo como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, mas tem sido relatadas também em infecções por *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum* (Desjeux, 2004).

A leishmaniose cutânea difusa caracteriza-se por lesões disseminadas pelo corpo (Figura 9d). Geralmente está relacionada a pacientes imunossuprimidos e causa efeitos devastadores nos pacientes. É causada por infecções de *L. aethiopica* e *L. amazonensis*. A leishmaniose dérmica pós-calazar ocorre por reincidência em pacientes curados de VL e requer um longo e caro tratamento (Figura 9e). É causada por infecções de *L. donovani* (Asford, 2000; Desjeux, 2004).



Figura 9. Manifestações das leishmanioses. (A-E) Pacientes acometidos pelas Leishmanioses cutânea, visceral, mucocutânea, cutânea difusa e dérmica pós-calazar, respectivamente. (WHO/TDR CD Image Library (2003); disponível também em www.who.int/tdr).

3.1.3.2- Doença do sono

A doença do sono ocorre no Leste e no Nordeste da África (Figura 10), principalmente no Sudão, Congo, Uganda e Angola. Acomete cerca de dois milhões de pessoas; com 300-500 mil novos casos e cerca de 66 mil mortes anualmente.



Figura 10. Distribuição da Doença do sono. (WHO/TDR African Trypanosomiasis Poster, www.who.int/tdr).

A Doença do sono é causada pelas espécies *T. brucei gambiense* e *T.b. rhodesiense*, e transmitida pela picada de fêmeas de moscas do gênero *Glossina ssp.*, comumente conhecidas como tse-tse. Os sintomas iniciais são: febre, dor de cabeça, anemia, dores nas articulações, aumento das glândulas e do baço. Sintomas avançados ocorrem por invasão do parasita no sistema nervoso e incluem: desordens endócrinas e neurológicas, deterioração mental culminando em coma e morte em alguns dias ou semanas (Figura 11) (El-Sayed *et al.*, 2000; WHO/TDR African Trypanosomiasis Poster, www.who.int/tdr).



Figura 11. Paciente acometido com a Doença do sono em seu estágio mais avançado (WHO/TDR CD Image Library (2003); disponível também em www.who.int/tdr).

3.1.4 Aspectos da Biologia molecular dos Tripanosomatídeos

3.1.4.1 Genoma e organização gênica dos Tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos possuem dois genomas, um dentro do núcleo e outro dentro da mitocôndria, denominado cinetoplasto, que constitui cerca de 10-30% do DNA total da célula (Borst, *et al.*, 1982).

A *Leishmania* é um organismo diplóide e funcionalmente assexual. A organização do seu genoma difere da maioria dos eucariotos. Contém cerca de $3,55 \times 10^7$ pares de bases (pb) e é organizado em cerca de 34-36 cromossomos que possuem regiões repetitivas nos telômeros. Os cromossomos desse parasita possuem a característica de não se condensarem durante o ciclo mitótico, e somente podem ser analisados por Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE - *Pulse Field Gel Electrophoresis*). Estes cromossomos possuem também uma "plasticidade" manifestada pela variabilidade no seu tamanho (Stiles *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 2000). Tal fenômeno pode ocorrer naturalmente ou ser provocado por stress de nutrientes ou cultivo prolongado (Rovai *et al.*, 1992; Stiles *et al.*, 1999).

O genoma nuclear do *T. brucei* tem em torno de $3,5 \times 10^7$ pb. Os mais de 100 cromossomos do *T. brucei* podem ser agrupados em três classes principais baseados na migração por PFGE: (1) 11 Mega

Cromossomos (1-6 Mb), e mais de 100 (2) Cromossomos Intermediários (200-900 Kb) e (3) Minicromossomos (50-150 Kb). Os Mega Cromossomos são diplóides no núcleo e a ploidia dos cromossomos intermediários e dos minicromossomos é incerta (Stiles *et al.*, 1999).

O conteúdo CG é geralmente alto nos tripanosomatídeos, refletido principalmente nas regiões não traduzidas, UTRs (untranslated regions) (Alonso *et al.*, 1992) e na utilização de códons preferenciais com G/C nas posições dois (80%) e três (60%), relacionada também com os níveis de expressão de certos genes. Em *Trypanosoma* spp. genes altamente expressos possuem um alto conteúdo CG, principalmente na terceira base do códon (Stiles *et al.*, 1999).

Os genes nos tripanosomatídeos são organizados em grandes grupos em um único lado da fita de DNA e sem interrupções. Blocos inteiros de genes são transcritos em um grande mRNA precursor, processo denominado "Transcrição Policistrônica" encontrado geralmente em procariotos (Myler e Stuart, 2000). O arranjo desses genes em alguns dos cromossomos de *L. major* pode ser observado na figura 12. A organização dos genes na família Trypanosomatidae parece ser bem conservada, demonstrando uma grande *sintenia* (conservação na ordem dos genes) entre *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei* (Ghedin *et al.*, 2004).

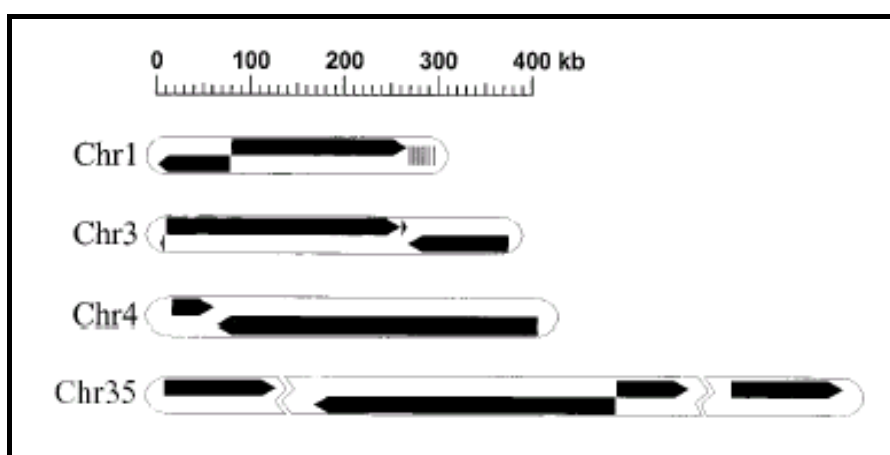


Figura 12. Organização dos genes nos Cromossomos 1, 3, 4 e 35 de *Leishmania major*. Demonstrando o sentido do policístron do mRNA (setas negras longas), repetições subteloméricas do cromossomo 1 (linhas verticais). As regiões com falhas representam partes ainda não montadas no sequenciamento (Myler *et al.*, 2001).

3.1.4.2 Promotores e Transcrição nos Tripanosomatídeos

O arranjo de genes em tripanosomatídeos se assemelha em alguns pontos aos conhecidos operons bacterianos sendo transcritos em unidades policistrônicas, onde uma única região promotora é utilizada na transcrição de múltiplos genes. Assim como em procariotos, os genes dos tripanosomatídeos não possuem íntrons, com uma única exceção até o momento, o gene da poli-A polimerase (Mair et al., 2000). No entanto ao contrário dos operons bacterianos e de nemátodas, as unidades policistrônicas dos tripanosomatídeos não aparentam codificar genes funcionalmente relacionados (Campbell *et al.*, 2003).

Na família Trypanosomatidae quatro classes de RNA polimerases são encontradas: RNAPols I, II e III, nucleares (Jess *et al.*, 1990); e uma localizada na mitocôndria, responsável pela transcrição dos maxicírculos do cinetoplasto (Grams *et al.*, 2002).

A RNA pol I é responsável pela transcrição dos RNAs ribossomais (rRNAs) e dos genes de proteínas de superfície PARP e VSG de *T. brucei* (Lee e van der Ploeg, 1997); a RNA pol II é responsável pela transcrição da maioria dos genes codantes para proteínas, pelos genes da Spliced Leader (SL) e de pequenos RNAs do nucléolo, os snRNAs (Campbell *et al.*, 2003); e a RNA pol III é responsável pela transcrição dos tRNAs, do rRNA 5S e também de snRNAs (Lee e van der Ploeg, 1997; Campbell *et al.*, 2003).

Promotores para RNA pol I e III são bem descritos na literatura (Cordingley, 1985; Campbell *et al.*, 1989; Clayton *et al.*, 2002), no entanto ainda não foram caracterizados promotores para a RNA pol II, a exceção do promotor do gene da *Spliced Leader*. Recentemente foram identificadas regiões nos cromossomos 1 e 3 de *L. major* que são fortes candidatas para promotores. Entretanto o processo de transcrição e terminação pela RNA pol II ainda está por ser caracterizado (Myler e Stuart, 2000; Clayton, 2002).

3.1.4.3 *Trans-Splicing* nos Tripanosomatídeos

A maturação do mRNA nos tripanosomatídeos difere dos processos da maioria dos eucariotos principalmente porque os genes que codificam proteínas são transcritos em policístrons e processado pelo mecanismo de *trans-splicing* ou processamento em *Trans* (Liang *et al.*, 2003).

O *trans-splicing* foi descoberto há 20 anos atrás quando foram achados diferentes mRNAs de VSGs em *T. brucei* carregando uma sequência comum de 39 nucleotídeos (nt), então nomeada *Spliced Leader* (SL) (Boothroyd e Cross, 1982). Esta sequência é proveniente de um outro RNA, o RNA precursor da SL, e são adicionados a todos os mRNAs dos tripanossomatídeos durante o processamento em *Trans* (Liang *et al.*, 2003). O RNA precursor da SL é constituído de uma estrutura formada por 3 alças, com um íntron de tamanho variável (dependente da espécie analisada) localizado após os primeiros 39 nt. Na porção 5' da SL encontra-se a estrutura cap modificada característica dos Tripanossomatídeos, o cap4 (discutido em detalhes mais adiante) (Liang *et al.*, 2003) (Figura 13).

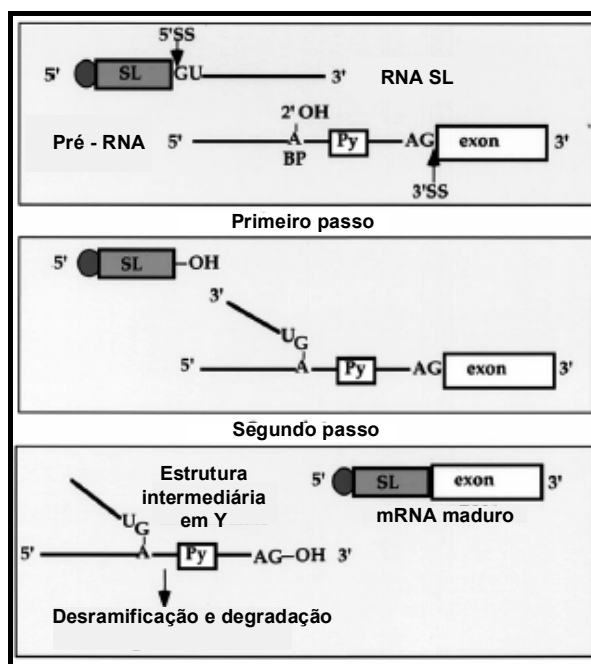


Figura. 13. Representação esquemática do *trans-splicing*. Demonstrando os sítios aceptores de *splicing* da SL (GU) e do mRNA (AG), ponto de bifurcação (BP) seguida do trato de polipirimidinas (Py). Ao final do processo a porção 5' do mRNA recebe a SL, caracterizando o mRNA maduro (Liang *et al.*, 2003).

Em tripanosomatídeos, o processamento em *trans* parece ser acoplado à clivagem da região 3' e aos eventos de poliadenilação (LeBowitz et al., 1993). Sequências presentes no RNA policistrônico conhecidas como tratos polipirimidínicos (ricas em uridinas) servem como sinais para o *trans-splicing* e parecem funcionar, na ausência de sinais típicos, na sinalização para poliadenilação (Clayton, 2002).

O *trans-splicing* também foi encontrado em trematódas (Bektesh et al., 1988); nematódas (Liou e Blumenthal, 1990 ; Maroney et al., 1995); cestódeos (Brehm et al., 2000); *Euglenídeos* (Frantz et al., 2000); e em cordados (Vandenberghe et al., 2001). No entanto até agora somente os tripanosomatídeos possuem esse tipo de processamento em todos mRNAs dos genes codantes de proteínas (Ullu e Tschudi, 1991).

3.1.4.4 Estrutura cap e suas modificações

Durante a maturação do mRNA eucariótico há a adição de uma guanosina metilada na porção 5' de todos os mRNAs. Esta, também chamada de estrutura m⁷GTP cap, é posicionada de forma invertida em uma ligação 5'-5' com o nucleotídeo adjacente (Rottman et al., 1974; Shatkin, 1976; Reddy et al., 1992). Em eucariotos a modificação da porção 5' do mRNA ocorre bem cedo na transcrição, geralmente durante a polimerização dos primeiros 20-30 nt (Orphanides e Reinberg, 2002). (Figura 14).

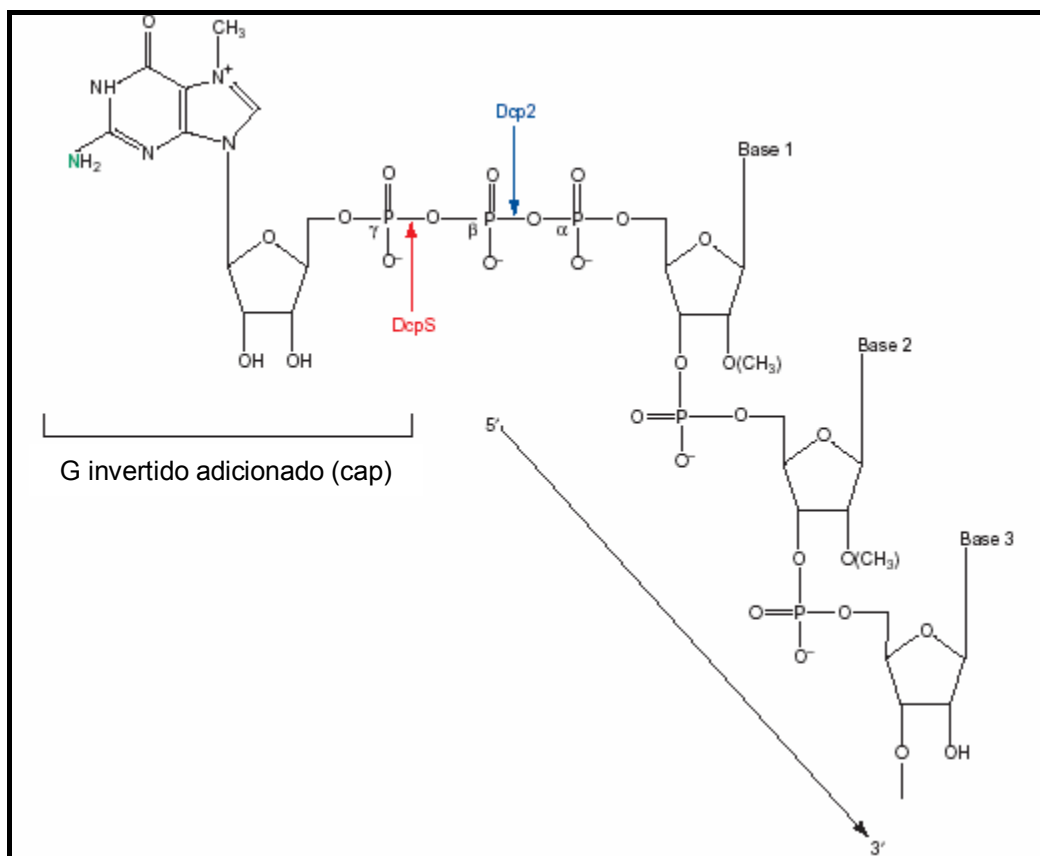


Figura 14. Estrutura química do cap. Demonstrando os três fosfatos (nomeados α , β , e γ) ligando a guanosina invertida. E os locais de clivagem das enzimas removedoras do cap, Dcp1 e Dcp2 (ver tópico "Papel do eIF4E na reciclagem dos mRNAs" para mais detalhes) (Cougot *et al.*, 2004).

A adição do cap ocorre em três passos principais: (1) A RNA 5' trifosfatase remove o fosfato da porção 5' do transcrito nascente; depois (2) a guanililtransferase acrescenta a guanosina em uma posição invertida, em sentido 5'-5'; e (3) a guanosina é metilada pela enzima N⁷Metiltransferase (Cougot *et al.*, 2004). Uma vez adicionado a extremidade 5' do RNA mensageiro, o cap atua como sinal em diversos mecanismos intracelulares como: (1) processamento de pré-mRNAs; (2) transporte de mRNAs núcleo-citoplasma; (3) degradação de mRNA; e (4) iniciação da tradução (Varani, 1997).

Diferentes tipos de cap são encontrados em mRNAs, classificados de acordo com as modificações por metilações na guanosina invertida e nos nucleotídeos adjacentes (Reddy *et al.*, 1992). Quanto as metilações na guanosina as estruturas cap podem ser: (1) m⁷GpppN (com uma metilação) encontrado na maioria dos mRNAs; (2) m^{2,7}GpppN (com duas

metilações) encontrados em alguns mRNAs; (3) $m^{2,2,7}GpppN$ (com três metilações), encontrado em muitos snRNAs (RNAs pequenos nucleares) e em alguns mRNAs; e (4) $mpppN$ (com metilação no grupo fosfato), encontrado em alguns snRNAs (revisto por Reddy *et al.*, 1992). Quanto a 2'-O-metilações nos nucleotídeos adjacentes a guanossina invertida, as estruturas cap podem ser classificadas em: *cap 0* (encontrado em leveduras, amebas e outros eucariotos inferiores), *cap 1* (encontrado em snRNAs), *cap 2* (encontrado nos mRNAs dos eucariotos superiores) e *cap 4* (característico dos Tripanosomatídeos) (Reddy *et al.*, 1992; Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998).

O cap 4 é característico da família *Trypanosomatidae* e, ao contrário dos demais eucariotos, a adição do cap ocorre em uma etapa pós-transcricional, quando a SL contendo o cap 4 é anexada ao mRNA (Mair *et al.*, 2000). A análise da estrutura da SL de *Crithidia fasciculata* e *T. brucei* revelou que na porção 5' terminal da SL o resíduo m^7GTP adicionado é seguido por quatro nucleotídeos metilados, formando a estrutura: 7-metilguanossina(5')-ppp(5')- $N^6,N^6,2'$ -O-trimetiladenosina-p-2'-O-metiladenosina-p-2'-O-metilcitosina-p- N^3 -2'-O-dimetiluridina (Bangs *et al.*, 1992; Mair *et al.*, 2000). Recentemente a estrutura do Cap 4 dos Tripanosomatídeos foi sintetizada *in vitro* e vem sendo utilizada em ensaios funcionais (Lewdorowicz *et al.*, 2004) (Figura 15).

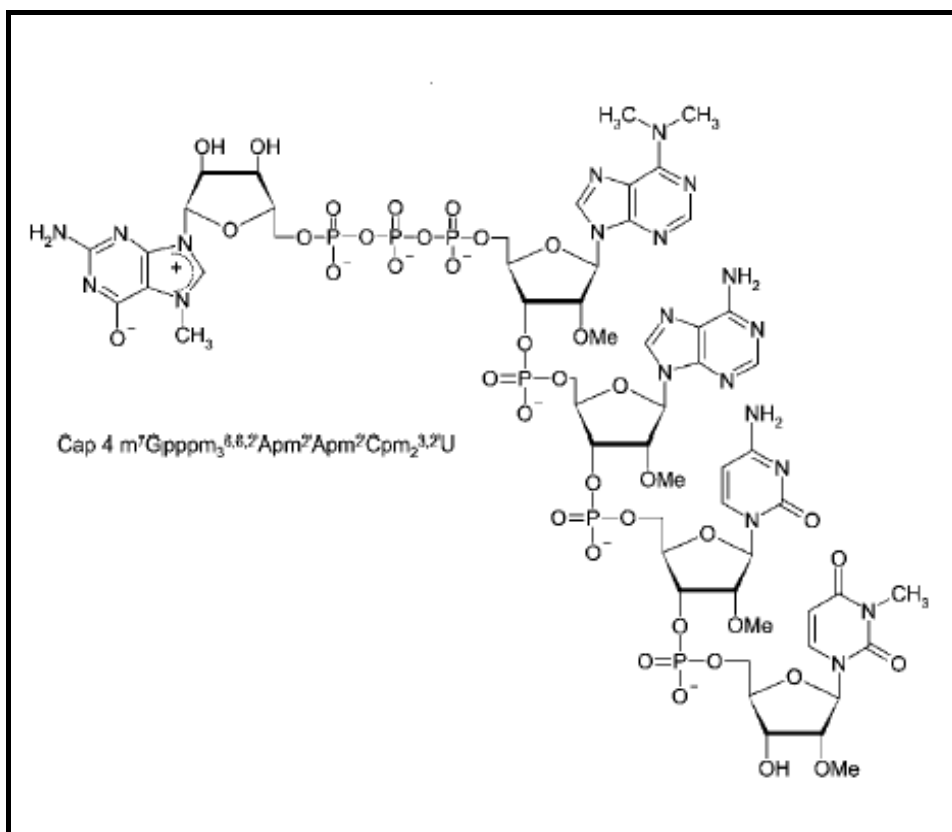


Figura 15. Estrutura química do cap 4(Lewdorowicz *et al.*, 2004).

3.1.4.5 Controle pós-transcricional da expressão gênica em tripanosomatídeos

Durante seu ciclo de transmissão os parasitas tripanosomatídeos precisam se adaptar, rapidamente, às diferentes condições dos hospedeiros vertebrados e invertebrados. Os mecanismos exatos da regulação da expressão gênica em *Leishmania* (e outros tripanosomatídeos) ainda não são claros, mas mudanças nos níveis das proteínas expressas durante o desenvolvimento desses parasitas não são geralmente acompanhadas por mudanças equivalentes na transcrição (Stiles *et al.*, 1999). Boa parte do processo de adaptação parece estar mais relacionada com o controle pós-transcricional dependente da região 3' UTR (principalmente na modulação da meia-vida de mRNAs específicos) e de regiões intergênicas. Alguns fatores importantes neste processo foram ainda descritos associados tanto com a região 5' UTR como com

regiões codificadoras de proteínas, e com o controle da tradução (D'Orso *et al.*, 2003).

Um bom exemplo de regulação pós-transcricional em tripanosomatídeos é observado na expressão do gene da fosfoglicerato quinase (PGK) de *T. brucei*. Existem três genes PGKs: o PGKA, PGKB e o PGKC; que são co-transcritos pela RNA pol II e não possuem regulação transcricional diferencial. Ao nível de proteínas, no entanto, o produto do gene PGKA é presente em baixos níveis durante todo o ciclo de vida do parasita, o PGKB é expresso somente na fase procíclica no inseto e o PGKC é quase exclusivo da fase sanguínea no hospedeiro vertebrado. Esse fenômeno é atribuído a regiões 3' UTR distintas nesses genes, que regulam a sua expressão diferencial nos dois estágios (Clayton, 2002).

Em *T. cruzi* e *T. brucei*, foram identificadas seqüências regulatórias ricas em repetições AU (AREs) na região 3'UTR dos genes que codificam para mucina (SMUG) e para a proteína procíclica estágio-específica EP (Di Noia *et al.*, 2000; D'Orso e Frasch, 2001a; Irmer e Clayton, 2001). Estas seqüências atuam no processo de desestabilização dos mRNAs, em determinada fase do ciclo de vida do parasita, sendo reconhecidas diferencialmente por fatores protéicos específicos (D'Orso e Frasch, 2001b). Além disso, foram identificadas seqüências 3'UTR regulatórias ricas em repetições G (GREs), no gene SMUG, que favorecem a estabilização de mRNAs de forma também estágio-específica (D'Orso e Frasch, 2001b). Em *Leishmania* foi identificada uma região 3' UTR conservada, de 450 nucleotídeos, envolvida na regulação de expressão gênica estágio-específica. Esta região é bastante conservada, em diversos mRNAs, sendo ativada na forma amastigota intracelular do parasita (Boucher *et al.*, 2002).

Mesmo com avanços no entendimento do controle da expressão em tripanosomatídeos, muito ainda está para ser esclarecido. O controle da tradução é provavelmente extremamente importante nesses organismos, embora este seja um aspecto que tem sido negligenciado através dos anos (Clayton, 2002). Para muitos genes, a regulação dos mRNAs

reportada não é suficiente para explicar as diferenças nos níveis dos produtos protéicos (Priest e Hadjuk, 1994; Saas *et al.*, 2000; Clayton, 2002). Assim, a compreensão precisa do sistema celular de tradução dos tripanosomatídeos é um ponto crucial para um melhor entendimento dos mecanismos moleculares desses organismos.

3.2. BIOSÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS

O processo de síntese protéica, por ser responsável pela produção de moléculas fundamentais, constitui um dos eventos essenciais para a sobrevivência de todos os seres vivos. Ele representa o passo final para a via de expressão gênica, mediando a formação do proteoma a partir da informação genômica. Esse processo pode ser dividido em três principais etapas: iniciação, elongação e terminação (Gebauer e Hentze, 2004).

A iniciação da tradução eucariótica ocorre em vários passos, e é catalizada por proteínas referidas como Fatores de Iniciação Eucarióticos (eIFs-“eukaryotic initiation factors”). Estes por sua vez podem ser compostos por diversas subunidades e isoformas. Até o momento foram identificados, em mamíferos, seis grupos de fatores de iniciação: eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5 e eIF6. Eles atuam em um processo altamente regulado onde a ausência de apenas um é suficiente para diminuir ou até mesmo impedir a síntese protéica (Hershey e Merrick, 2000). A iniciação da síntese protéica no citoplasma eucariótico é um pouco semelhante a de procariotos, mas a ordem de eventos é diferente e o número de fatores acessórios envolvidos é bem maior. Nessa etapa da síntese há o principal controle da tradução, no recrutamento do ribossomo ao mRNA e no posicionamento de forma correta no códon de iniciação AUG (Lewin, 2000; Prévôt *et al.*, 2003).

Enquanto a elongação e a terminação são assistidas por uma limitada quantidade de fatores, a iniciação da tradução é composta por mais de 25 polipeptídeos (Hershey e Merrick, 2000). A regulação da tradução é um mecanismo que é usado para modular a expressão gênica em uma gama de situações biológicas. Tal processo possui papel crucial no crescimento celular, proliferação e desenvolvimento (Gingras *et al.*, 1999).

A tradução do mRNA em proteína inicia-se após a separação das subunidades ribossomais 40S e 60S, pela ação dos fatores eIF3 e eIF6 sobre o ribossomo pré-existente 80S, e pela formação do complexo

ternário composto por eIF2/GTP/Met-tRNA_i (complexo formado pelo fator eIF2, uma molécula de GTP e RNA transportador iniciador responsável pela adição do primeiro aminoácido da proteína). A subunidade 40S e o eIF3 ligam-se então ao complexo ternário, formando o complexo de "pré-iniciação 43S". Este necessita da interação entre o eIF3 e o eIF4F, para se ligar com a porção 5' do mRNA (Gingras *et al.* 1999; Hershey e Merrick, 2000; Pestova *et al.*, 2001).

A ligação do complexo 43S ao códon AUG do mRNA, através do pareamento deste com o tRNA iniciador e a ligação dos fatores eIF1 e eIF1A, resulta na formação do complexo estável 48S (Preiss e Hentze, 2004). Nesta etapa, os fatores eIF1 e eIF5 garantem o correto início da tradução ao facilitar o reconhecimento do códon de iniciação AUG pelo Met-tRNA_i (Hershey e Merrick, 2000; Preiss e Hentze, 2004). O reconhecimento do primeiro AUG é influenciado pela existência da sequência consenso GCC(**A/G**)CCAAUGG localizada nas imediações desse códon, e mudanças nos nucleotídeos (principalmente nos marcados em negrito) provocam maiores impactos no reconhecimento do códon iniciador AUG sublinhado (Kozac, M., 1986; 1987). Dando continuidade ao processo o fator eIF5 provoca a hidrólise do eIF2 ligado ao GTP e promove o recrutamento da subunidade ribossomal 60S ao complexo de iniciação, reestruturando a unidade ribossomal 80S e liberando os demais fatores de iniciação. Ocorre então o posicionamento do tRNA_i no sítio P do ribossomo para o início da síntese proteica (Gebauer e Hentze, 2004).

Os fatores eIF4 são aparentemente exclusivos de eucariotos (Aravind e Koonin, 2000) e são responsáveis pela etapa de reconhecimento do mRNA pelo ribossomo. O fator eIF4F é um complexo heterotrimérico que é formado pelas subunidades polipeptídicas eIF4A, eIF4E, eIF4G (Haghighat *et al.*, 1995) e é auxiliado pelos fatores eIF4B, eIF4H (Richter-Cook *et al.*, 1998) e pela proteína de ligação à cauda poli-A ou PABP (Preiss e Hentze, 2004) (Figura 16).

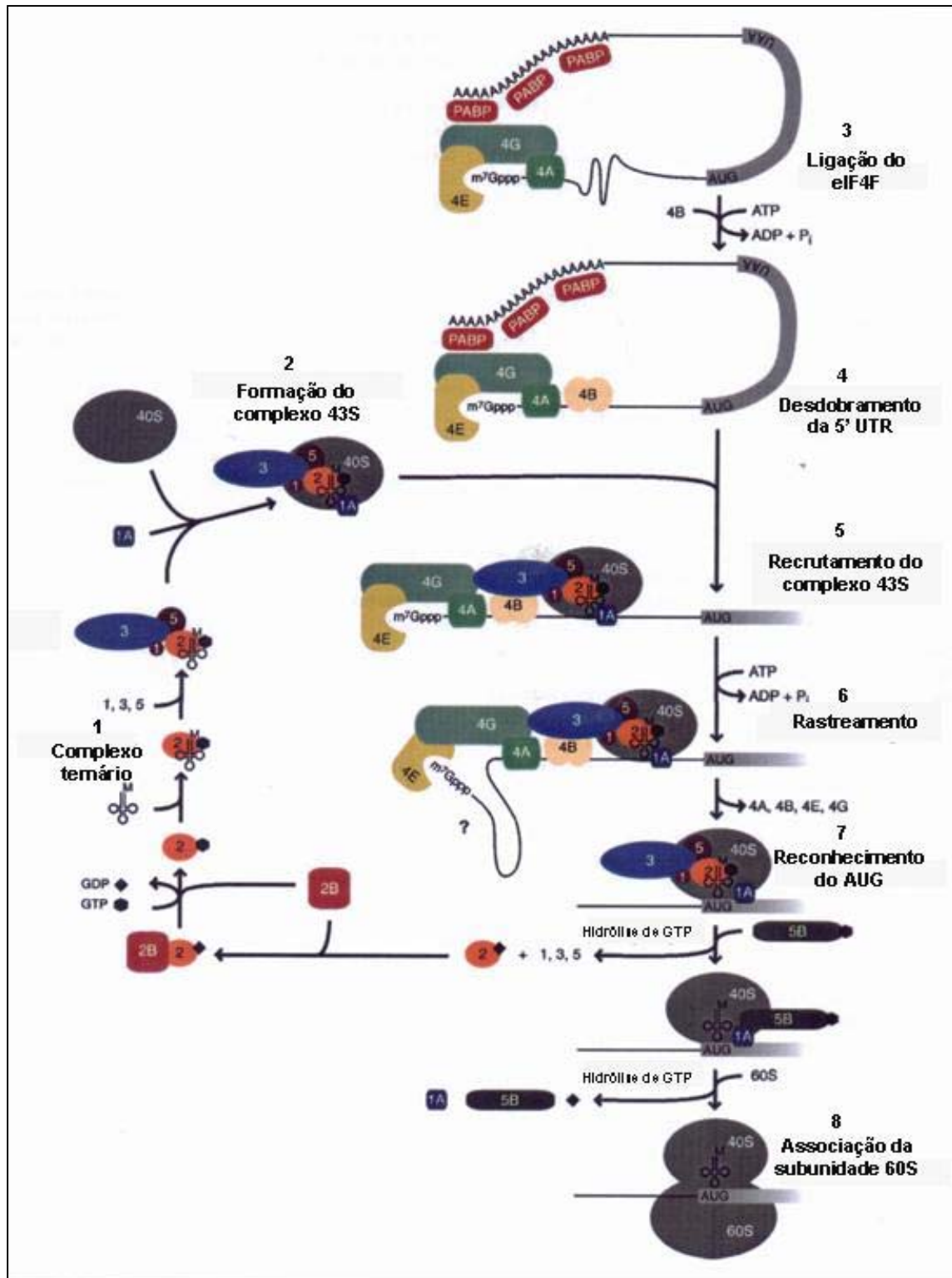


Figura 16. Esquema do processo de iniciação da tradução em eucariotos (Preiss e Hentze, 2004). Primeiro ocorre a (1) formação do complexo ternário composto pelo GTP-tRNAi-eIF2, em seguida há a associação deste a subunidade ribossomal 40S e (2) formação do complexo 43S. Ao mesmo tempo há o (3) reconhecimento do mRNA pela ligação do complexo eIF4F e, em seguida o (4) desdobramento da 5' UTR pela ação do eIF4A e eIF4B e (5) recrutamento do complexo 43S. Depois há o (6) rastreamento para o (7) reconhecimento do códon de iniciação AUG e, por fim, há a reestruturação do ribossomo pela (8) associação da subunidade ribossomal 60S, culminando na dissociação dos fatores de iniciação e início da fase de elongação.

3.2.1 eIF4A–A proteína que remove estruturas secundárias do mRNA

Para que o processo de rastreamento do ribossomo na porção 5' do mRNA possa acontecer é necessário que haja a remoção das estruturas secundárias do mRNA e das proteínas ligadas a ele. Estas etapas ocorrem pouco antes do rastreamento e são executadas por um fator de iniciação - o eIF4A, através de um processo ATP dependente (Linder, 2003).

O fator eIF4A é uma proteína de 46kDa que possui atividade helicase bidirecional dependente de ATP (Lorsch e Herschlag, 1998), potencializada por outras proteínas associadas ao complexo eIF4F: o eIF4B e o eIF4H, que estimulam a atividade do eIF4A tanto em solução como ligados ao complexo eIF4F (Rogers *et al.*, 2001b; Ganoza *et al.*, 2002). Em mamíferos três isoformas de eIF4A podem ser encontradas: eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII sendo que o eIF4AIII ao contrário do eIF4AI e eIF4AII, se situa no núcleo e não se relaciona diretamente com o processo de tradução, mas sim com o *splicing* e decaimento dos mRNAs (Ferraiuolo *et al.*, 2004).

O Fator eIF4A é tido como o protótipo de uma grande família de RNA-helicases presentes desde bactérias a mamíferos, a família “*DEAD Box*” (Linder *et al.*, 1989). Estas proteínas participam em várias funções celulares como na transcrição, processamento ou retirada de íntrons, gênese do ribossomo, transporte de RNA, decaimento do mRNA e iniciação da tradução. Esta família protéica é assim chamada por possuir o motivo característico Asp-Glu-Ala-Asp ou D-E-A-D em código (Rocak e Linder, 2004), também chamado de motivo II ou motivo Walker B, envolvido na hidrólise do ATP (Linder, 2003). Há ainda os motivos F, Q, e I, que também são relacionados à ligação e hidrólise do ATP, o motivo III é relacionado a ligação do ATP, o VI na interação com o mRNA e os motivos Ia, Ib, IV, V estão provavelmente relacionados a ligação ao mRNA, mas estão ainda sem comprovação bioquímica (Rocak e Linder, 2004) (Figura 17).

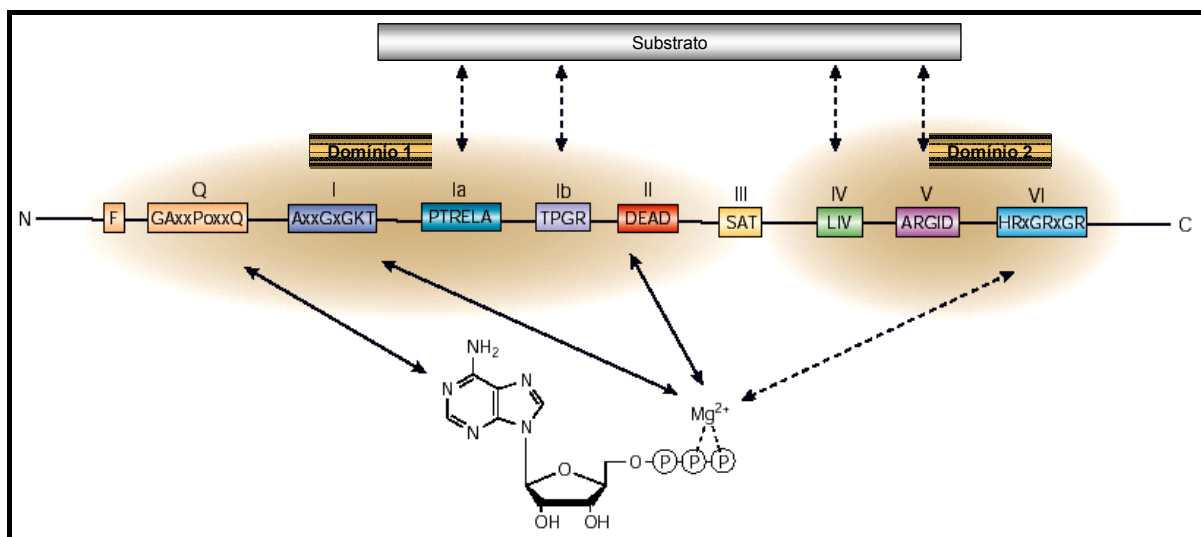


Figura 17. Representação da sequência dos nove motivos da família DEAD Box. (Rocak e Linder, 2004).

A estrutura básica das helicases da família DEAD Box apresenta-se na forma de dois grandes domínios ligados por uma região de 11 aminoácidos que formam um "halter" em que o ATP fica conectado pela região ligadora (Rocak e Linder, 2004) (Figura 18).

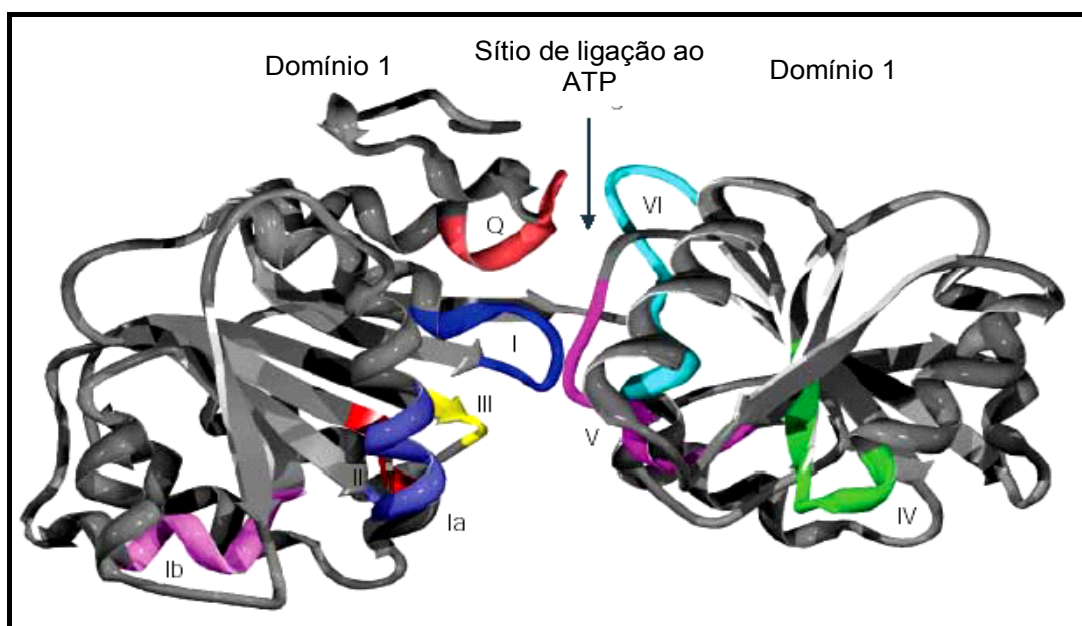


Figura 18. Representação da estrutura cristalizada de uma proteína da família DEAD box semelhante ao eIF4A de *Methanococcus janaschii* (Story et al., 2001), demonstrando a estrutura dos dois domínios flanqueando o sítio de ligação do ATP e os motivos conservados característicos da família proteica (Rocak e Linder, 2004).

3.2.2 eIF4G – A proteína coordenadora do complexo de iniciação

O fator de iniciação da tradução eIF4G (anteriormente denominado p220 ou eIF4γ) foi descoberto devido a sua propensão à clivagem proteolítica durante a infecção por poliovírus e hoje é reconhecido como a proteína organizadora central do complexo eIF4F no recrutamento do mRNA durante a iniciação da tradução (Keiper *et al.*, 1999).

Os vários homólogos do eIF4G descritos até hoje compreendem uma família protéica de isoformas com discreta homologia e propriedades bioquímicas semelhantes (Keiper *et al.*, 1999). Dentre estes se destacam: dois em humanos (eIF4GI de 220 kDa e eIF4GII) (Yan *et al.*, 1992; Gradi *et al.*, 1998), dois descritos em plantas (eIF4G e eIFiso4G) (Browning *et al.*, 1992; Gallie e Browning, 2001), dois em leveduras (TIF4631 e TIF4632) (Goyer *et al.*, 1993) e oito em *Drosophila melanogaster* (eIF4E1-8) (Hernandez, 2005).

3.2.2.1 Estrutura do eIF4G

Estruturalmente o eIF4GI pode ser dividido em três domínios: (1) o domínio N-terminal (resíduos de aminoácidos nas posições 1-634, números correspondentes ao homólogo de mamíferos), onde estão localizados os sítios de ligação ao eIF4E e à PABP (Proteína de ligação a cauda poli-A - Lamphear *et al.*, 1995; Imataka *et al.*, 1998; Marcotrigiano *et al.*, 1999); (2) o domínio central (resíduos de 635-1065, números correspondentes ao homólogo de mamíferos), onde estão localizados os sítios de ligação ao RNA (Pestova *et al.*, 1996), ao eIF4A e ao eIF3 (Imataka e Sonenberg, 1997; Korneeva *et al.*, 2001) e onde está localizado o domínio conservado HEAT (**H**unting, **E**longation 3, **A** subunit of protein phosphatase 2a, **T**arget of rapamycin) constituído por um arranjo de 10 alfa-hélices antiparalelas (Andrade e Bork, 1995; Marcotrigiano *et al.*, 2001); e (3) o domínio C-terminal, ausente em não

metazoários, que contém um segundo sítio de ligação ao eIF4A e um sítio de ligação a quinase Mnk1 (Pyronnet *et al.*, 1999) (Figura. 19).

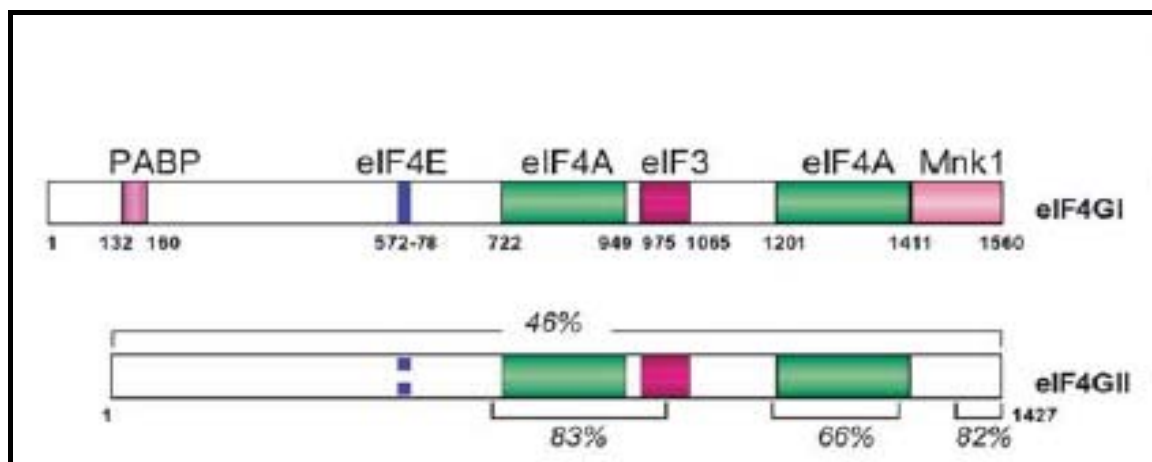


Figura 19. Representação da estrutura do eIF4GI e eIF4GII humanos, mostrando a posição dos sítios de ligação ao PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3, e Mnk (Prévôt *et al.*, 2003).

O domínio de ligação do eIF4A no eIF4G (de mamíferos) foi descrito por Lamphear *et al.* (1995), através do uso de proteases virais, localizando-o na porção carboxi-terminal do eIF4GI. Posteriormente a localização precisa do domínio foi descrita entre os resíduos 1201-1411 (Morino *et al.*, 2000). O segundo domínio de ligação foi mapeado por Imataka e Sonenberg (1997), estando precisamente entre os resíduos 722-949 (Lomakin *et al.*, 2000).

O sítio de ligação do eIF3 no eIF4G foi inicialmente mapeado no domínio central do eIF4GI (Lamphear *et al.*, 1995; Ohlmann *et al.*, 1996). Recentemente experimentos mostraram que o sítio de ligação do eIF3 se situa precisamente entre os aminoácidos 975-1065 na região central do eIF4G, uma região que não se sobrepõe ao sítio de ligação ao eIF4A. A ligação do eIF4A e do eIF3 são mutuamente cooperativas (Korneeva *et al.*, 2000) por modificações na conformação do eIF4G quando em presença desses fatores para a formação do complexo ribonucleoproteico necessário para a tradução (Prévôt *et al.*, 2003).

A interação entre o eIF4G e a PABP, associada a cauda poli-A na extremidade 3' dos mRNAs eucarióticos, promove uma ligação entre a porção 5' e a 3' do mRNA o que leva a sua circularização em algum

momento do processo de tradução (Tarun e Sachs 1996; Wells *et al.*, 1998) (Figura 20). Experimentos posteriores demonstraram que a interação eIF4G/PABP aumenta a eficiência da tradução (Gallie, 1998) e esse processo pode fazer parte de um mecanismo de “teste” para a verificação de mRNAs intactos e corretamente processados para prevenir uma produção de proteínas aberrantes (Prévôt *et al.*, 2003). Em humanos o sítio de ligação da PABP situa-se entre os resíduos 132-160, na porção N-terminal do eIF4G (Imataka *et al.*, 1998).

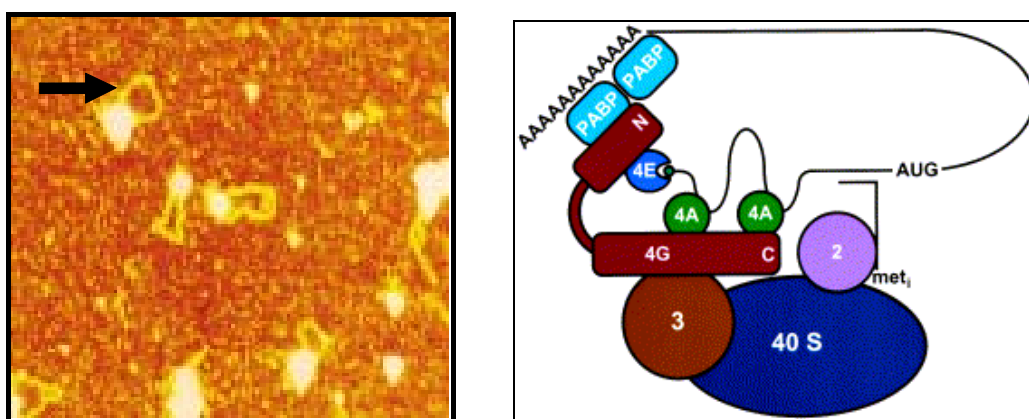


Figura 20. Circularização do mRNA. A - Visualização por microscopia de força atômica da molécula de mRNA circularizada, indicada pela seta (Wells *et al.*, 1998). B - “Alça” formada no mRNA pela interação cauda poli-a-PABP-eIF4G-eIF4E-Cap no complexo eIF4F (Keiper *et al.*, 1999). Legenda: 4E- eIF4E, 4A- eIF4A, 4G- eIF4G, N- porção aminoterminal do eIF4G, C - Porção carboxiternminal do eIF4G, PABP- proteína de ligação à cauda poli-A, 3- eIF3, 2- eIF2, e 40S- subunidade ribossomal 40S.

3.2.2.2 Interação eIFG-eIF4E

O sítio de ligação ao eIF4E foi mapeado por Lamphear *et al.* (1995), que usaram proteases de picornavírus para clivar o eIF4GI. Estudos posteriores confirmaram a localização exata dos sítios responsáveis pelas interações entre eIF4E e eIF4G através de deleções no eIF4G seguido de análise por *Farwestern-blot* (Mader *et al.*, 1995), que levou à caracterização de uma região de 49 aminoácidos no eIF4G que está presente de leveduras a mamíferos (Prévôt *et al.*, 2003). Dentro dessa seqüência existe um pequeno motivo YXXXXLΦ (onde X pode ser um aminoácido qualquer e Φ usualmente é uma leucina, mas pode também ser uma metionina ou uma fenilalanina), que é altamente conservado nos

eIF4Gs em leveduras, *Drosophila*, plantas e mamíferos. Este motivo também está presente na família de proteínas 4EBPs, que competem com o eIF4GI pela interação com o eIF4E (Mader *et al.*, 1995).

Estudos *in vitro* mostraram que a afinidade do eIF4E pelo cap aumenta cerca de 10 vezes quando este está ligado ao eIF4G (Haghighat *et al.*, 1996), estimulando a tradução cap-dependente. Isto pode ser explicado pelo fato do eIF4G, quando ligado ao eIF4E, produzir mudanças conformacionais no eIF4E que aumentam a afinidade pelo cap, através da ligação do segmento dos resíduos 393-490 do eIF4G com a parte N-terminal do eIF4E (Gross *et al.*, 2003; Pestova e Hellen, 2003). O aumento da atividade do complexo pode ser também atribuído à capacidade do eIF4G de se ligar diretamente ao mRNA (Goyer *et al.*, 1993), o que pode estabilizar o complexo na estrutura do mRNA (Prévôt *et al.*, 2003).

3.2.3 eIF4E – A proteína de ligação ao cap.

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

O fator eIF4E é um proteína conservada desde leveduras a humanos (Hershey and Merrick, 2000) e um número variado de formas desse fator tem sido encontrado em diversos organismos, dentre estes: três em *Arabidopsis thaliana* (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998), cinco em *Caenorhabditis elegans* (Keiper *et al.*, 2000), dois em *Schizosaccharomyces pombe* (Ptushkina *et al.*, 2001) e três em humanos (Joshi *et al.*, 2004). Esta multiplicidade de homólogos pode refletir uma simples redundância ou pode também refletir um papel mais complexo para o eIF4E do que o proposto previamente. Juntas, eIF4E e proteínas relacionadas, formam uma família de proteínas dentro de um dado organismo, cujo papel ainda não está plenamente compreendido. Algumas podem agir como fatores de tradução e estimular a tradução de certos RNAs ou agir de maneira inibitória (Joshi *et al.*, 2004).

O eIF4E é um fator essencial para a estabilidade do complexo eIF4F na ligação ao cap (von der Harr *et al.*, 2000) e apesar do fato de que o eIF4E ter sido identificado como fator de iniciação da tradução há mais de 25 anos atrás, e considerável esforço ter sido despendido para a elucidação de sua função, ainda permanecem várias questões não respondidas concernentes ao seu papel biológico (von der Haar *et al.*, 2004).

3.2.3.1 Interação eIF4E – cap

O eIF4E liga-se especificamente a porção 5' da estrutura cap dos mRNA's, dos quais os mais importantes são os tipos m⁷GpppNp, m⁷GpppN^mp ou m⁷GpppN^mpN^mp (onde o m denota o grupo Metil anexado ao nucleotídeo específico) (Von der Haar *et al.*, 2004). A estrutura 3D do eIF4E de leveduras foi resolvida por NMR (Nuclear Molecular Resonance) (Matsuo *et al.*, 1997), enquanto a do eIF4E de camundongos e o de humanos por cristalografia de raios-X (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Tomoo *et al.*, 2002). Esta estrutura é semelhante a uma mão arqueada, com oito folhas- β antiparalelas e três longas α -hélices no lado convexo. O sítio de ligação ao cap está localizado na cavidade hidrofóbica do corpo esférico do eIF4E entre dois dos oito resíduos de triptofanos evolucionariamente conservados (Trp 56 e Trp102 do eIF4E de camundongos e Trp58 e Trp 104 de leveduras), situados próximos das partes superior e inferior das margens dessa cavidade. Quando o análogo do cap está ligado, a guanosina é empacotada pelos dois triptofanos e imobilizada no local por interações entre os sistemas de anéis dos três componentes por um processo denominado π - π *stacking* (Figura 21). Um forte efeito estabilizador é associado à presença do grupo Metil, que induz uma carga positiva aumentando a interação de empacotamento. Adicionalmente o cap é estabilizado dentro da cavidade do eIF4E por várias ligações de van der Waals (os resíduos Trp 166 e Glu 103), pontes de hidrogênio (Glu103) e interações eletrostáticas (Arg112, Arg157 e Lys162) (números correspondentes ao homólogo de mamíferos) com os três grupos fosfatos e a ribose do análogo do cap (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Niedzwiecka *et al.*, 2002).

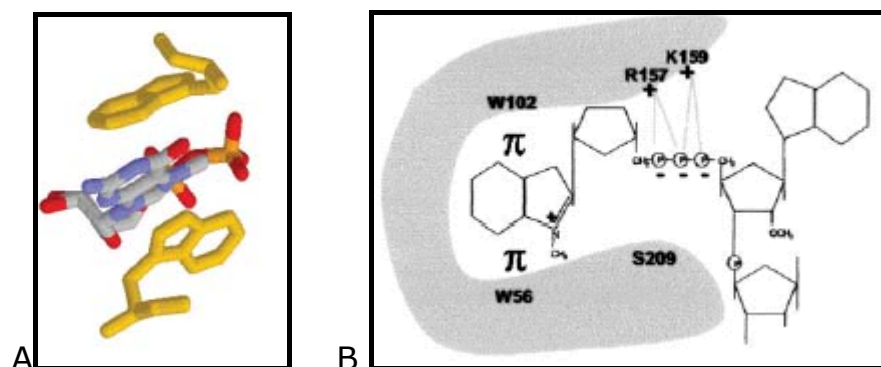


Figura 21. Interação do eIF4E com o cap. A - Representação gráfica da interação π - π *stacking* entre o m⁷GTP Cap e a proteína eIF4E. Formação da interação entre os anéis dos triptofanos (em amarelo) e a guanosina metilada do cap (colorido) (von der Haar *et al.*, 2004). B - Representação das interações dos resíduos do eIF4E com o Cap (Scheper e Proud, 2002).

Alguns organismos apresentam diferentes isoformas de eIF4E e mais de uma estrutura de cap. O nemátoda *Caenorhabditis elegans*, por exemplo, possui cinco isoformas funcionais de eIF4E (IFE1-5) e duas formas distintas de Cap (monometilado- m⁷GTP e trimetilado- m₃^{2,2,7}GTP) (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998; Keiper *et al.*, 1999). O IFE-3 e o IFE-4 reconhecem apenas o cap monometilado; o IFE-1, o IFE-2 e o IFE-5 se ligam a ambas estruturas (Keiper *et al.*, 1999; Miyoshi *et al.*, 2002), demonstrando uma seletividade funcional para diferentes tipos de mRNA's. O eIF4E e o eIF(iso)4E de plantas compartilham aproximadamente 50% de similaridade nos aminoácidos e possuem aproximadamente 26 kDa e 28 kDa, respectivamente (Browning *et al.*, 1987, 1992; Browning, 1996). A abundância desses fatores é regulada durante o desenvolvimento da planta; o eIF4E é distribuído em todos os tecidos da planta, já o eIF(iso)4E encontra-se em mais abundância em tecidos em desenvolvimento, como órgãos florais, meristemas e folhas jovens. Recentes estudos também atestaram que eles possuem vários papéis durante a infecção viral em plantas e que a deleção de um é compensada pela atuação do outro (Browning, 2004).

3.2.3.2 Interação do eIF4E - eIF4G

Dois estudos independentes com eIF4Es mutantes de leveduras (Ptushkina *et al.*, 1998) e de murinos (Marcotrigiano *et al.*, 1999) identificaram um epitopo coerente formado pelos resíduos 71-75 e 139 que originam as hélices 1 e 2 do eIF4E necessário para a ligação do eIF4G. Tais resíduos encontram-se em uma porção distal ao sítio de ligação ao cap e não estão envolvidos na ligação entre o eIF4E e o Cap (Ptushkina *et al.*, 1998).

Estudos subseqüentes em leveduras demonstraram que a extremidade N-terminal da estrutura do eIF4E (resíduos 23-38) está também envolvida por uma estrutura em forma de bracelete de cinco hélices na ligação com o eIF4G (resíduos 393-490) (Figura 22), e promove um aumento na associação do complexo ao cap sendo necessária para o crescimento ótimo e associação com polissomos *in vivo* (Pestova e Hellen, 2000; Gross *et al.*, 2003). Deleções nesta extremidade do eIF4E reduzem a capacidade de ligação com o eIF4G *in vitro*, de modo que o contato da parte N-terminal do eIF4E é crucial para a conformação e interação deste com o eIF4G (von der Haar *et al.*, 2004). Tem-se mostrado também que a interação entre o eIF4E e o eIF4G depende do domínio correspondente à sequência Val-Glu-X-X-Trp encontrada na extremidade aminoterminal do eIF4E (Ptushkina *et al.*, 1998).

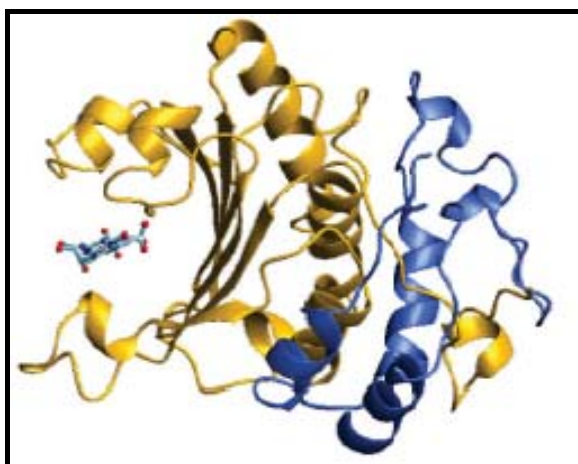


Figura 22. Representação gráfica da conformação da guanosina na cavidade do eIF4E (em amarelo) e ligação com eIF4G (resíduos 393-490 em azul), demonstrando a independência dos dois sítios de ligação (Von der Haar *et al.*, 2004).

3.2.3.3 Controle da atividade do eIF4E

O eIF4E é um fator essencial para a estabilidade do complexo eIF4F na ligação ao cap (von der Harr *et al.*, 2000) e é limitante na célula (Hershey and Merrick, 2000). Seus níveis são relativamente baixos em lisados de reticulócito de coelho (Goss *et al.*, 1990) e células HeLa (Duncan *et al.*, 1987). O eIF4E aparentemente participa de forma crucial no controle do ciclo celular (Strudwick e Borden, 2002). Sua superexpressão causa perda do controle do ciclo celular (De Benedetti e Rhoads, 1990) e está associada a uma série de tumores humanos (De Benetti e Harris, 1999). Aparentemente o eIF4E também é importante na modulação da apoptose (Li *et al.*, 2002).

A atividade do eIF4E é regulada em múltiplos níveis: (1) via modulação de sua transcrição, (2) por fosforilação, e (3) através da sua interação com uma família de proteínas repressoras, as proteínas ligadoras ao 4E (4E binding proteins-4EBP's) (Raught e Gingras, 1999).

3.2.3.3.1 Controle transcricional do eIF4E

Embora os mecanismos de regulação da transcrição do eIF4E não estejam ainda bem esclarecidos, sabe-se que seu promotor contém dois sítios de ligação *myc*, e ambos são necessários para a expressão do gene em sistemas heterólogos (Jones *et al.*, 1996). Concernente com essa observação, o mRNA do eIF4E é mais regulado em células que superexpressam *c-myc*, e a transcrição do gene eIF4E é feita em resposta à ativação de um receptor de fusão *myc*-estrógeno (Rosenwald *et al.*, 1993). Assim, aparentemente o eIF4E participa no controle do crescimento e proliferação celular, no entanto mais estudos são necessários para a compreensão precisa do seu papel nesse processo (Raught e Gingras, 1999).

3.2.3.3.2 Controle do eIF4E por fosforilação

A fosforilação do eIF4E é, geralmente, correlacionada com níveis de tradução e estado de crescimento celular (Kleinjn *et al.*, 1998). Sua fosforilação é feita pelas quinases transdutoras de sinal MAP - Mnk1 e Mnk2 - em um único sítio, na Ser209 (posição no homólogo de mamíferos), que reside próximo à porção N-terminal da seqüência primária do eIF4E (Joshi *et al.*, 1995).

O efeito da fosforilação nas propriedades do eIF4E tem sido alvo de grande interesse e controvérsia. O eIF4E não é fosforilado durante a mitose (Bonneau e Sonenberg, 1987), fase em que as taxas de tradução são menores, e sob influência de estímulos extracelulares que provoquem ploriferação celular há um aumento da fosforilação (Raught e Gingras, 1999). Minich *et al.* (1994) postularam que a fosforilação do eIF4E aumenta a afinidade deste pela estrutura cap. Já estudos de fluorescência realizados mostraram que o eIF4E fosforilado possui uma atividade 2,5 vezes menor de afinidade com análogos do cap quando comparado a proteína não fosforilada. Essa perda de afinidade seria pela criação de uma repulsão eletrostática entre a proteína e o nucleotídeo ligante carregado eletronegativamente (Scheper *et al.*, 2002) (Figura 23).

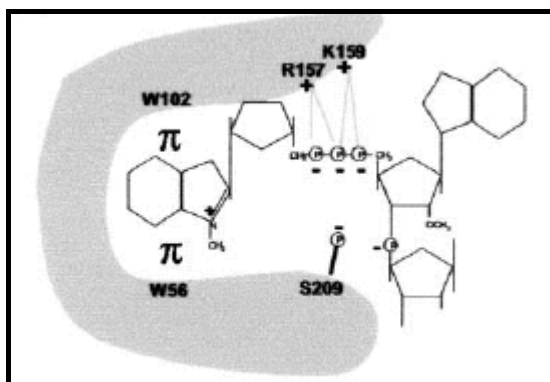


Figura 23. Representação da redução da afinidade por repulsão eletrostática do eIF4E fosforilado na Ser209 (ScheperI *et al.*, 2002).

A fosforilação do eIF4E não afeta sua ligação com o eIF4G ao contrário do que acontece com proteínas de ligação ao 4E, as 4EBPs (4E *bindin proteins*) (Scheper *et al.*, 2002). E a inibição da fosforilação do

eIF4E não possui efeito aparente na proliferação celular ou formação do complexo de iniciação, podendo apenas participar limitando a tradução sob certas condições fisiológicas de uma maneira ainda desconhecida (Knauf *et al.*, 2001). Alternativamente sua fosforilação pode auxiliar na liberação do complexo eIF4F da estrutura cap no processo de "rastreamento" ribossomal, no entanto essas hipóteses ainda necessitam de validação experimental (Scheper *et al.*, 2002).

3.2.3.3.3 Controle do eIF4E pela interação das proteínas 4EBP's

O terceiro nível de controle da atividade do eIF4E, observado em mamíferos, é através da interação com uma família de proteínas repressoras. Pause *et al.* (1994) isolaram por *Far-Western* pequenas proteínas de 12kDa que interagem com o eIF4E, e que tinham cerca de 52% de similaridade entre si ao nível de aminoácidos. Essas proteínas foram denominadas 4EBP1 e 4EBP2 (*4E binding protein 1 e 2*) e foi demonstrado que elas eram capazes de inibir a tradução *in vivo*. A ligação dessas proteínas aumenta grandemente a afinidade do eIF4E pelo cap (Ptushkina *et al.*, 1999) e ainda impede a associação do eIF4G com o eIF4E e assim a formação do complexo eIF4F (Haghighat *et al.*, 1995) (Figura 24). Essa ligação é devida a presença nestas proteínas do mesmo sítio de ligação ao eIF4E (Tyr-X-X-X-X-Leu-Φ) localizado na porção N-terminal do eIF4G (Mader *et al.*, 1995). Um terceiro membro da família 4EBP foi descoberto depois e possui grande similaridade com os outros membros da família na porção central e também inibe a tradução cap-dependente (Poulin *et al.*, 1998).

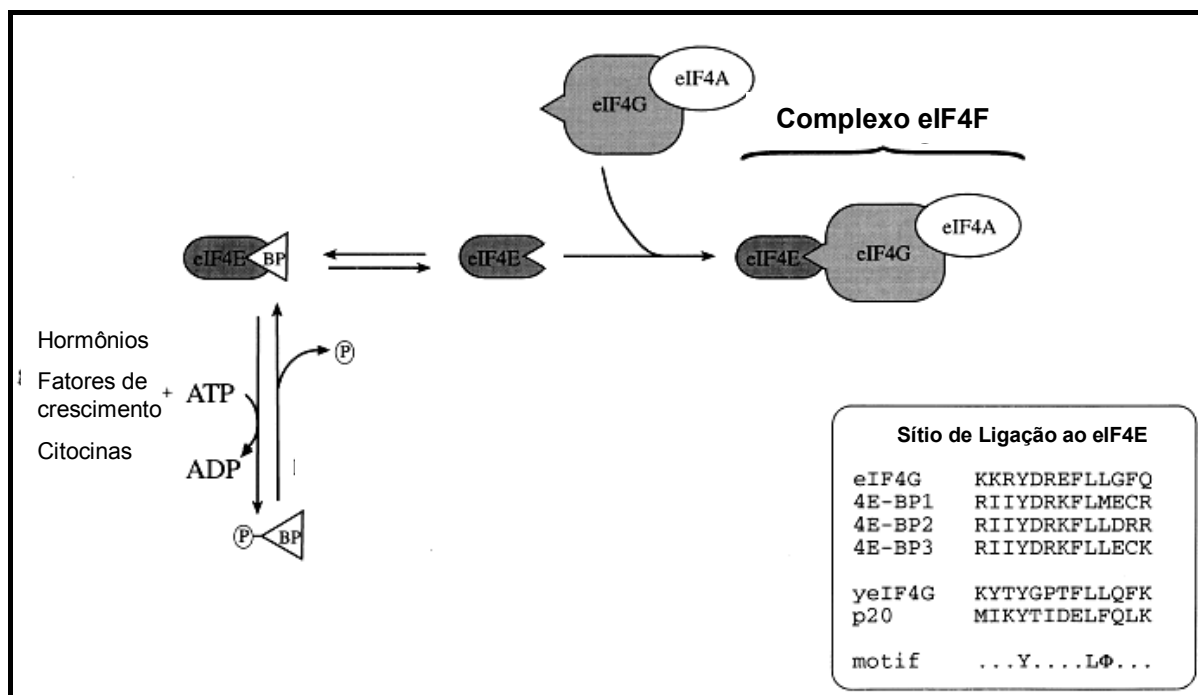


Figura 24. Regulação da formação do complexo eIF4F pela interação das 4EBP's com o eIF4E e controle da atividade das 4EBP's por fosforilação. Quadro: Motivo similar entre o eIF4G e as 4EBP's responsável pela interação com o eIF4E (Raught e Gingras, 1999).

O controle da atividade das 4EBP's é feito por fosforilação de múltiplos resíduos específicos de serina/treonina através da proteína quinase B (AKt/ PKB) (Gingras *et al.*, 1998) e da proteína ligante/rapamicina associada FK506 (sistema FRAP/mTOR) (Gingras *et al.*, 1999), que inibem sua afinidade pelo eIF4E (Pause *et al.*, 1994; Fadden *et al.*, 1997). Essa fosforilação é influenciada por vários tipos de estímulos extracelulares como hormônios, fatores de crescimento, citocinas, mitógenos, e infecções por adenovírus (Kleijn *et al.*, 1998).

A razão da existência das proteínas de ligação ao eIF4E ainda é desconhecida (Raught e Gingras, 1999). Em camundongos a deleção do gene 4EBP1 não demonstrou nenhum defeito no desenvolvimento ou no metabolismo (Blackshear *et al.*, 1997). Embora não exista um homólogo estrutural em leveduras para as 4EBP's, uma proteína que também se liga ao eIF4E denominada p20 foi encontrada. Essa proteína não possui homologia com as 4EBP's exceto pela presença do sítio de ligação ao eIF4E. Além disso possui a capacidade de inibir a tradução cap-dependente. Sua superexpressão resulta em crescimento lento, e sua

deleção estimula o crescimento em cultura (Altmann *et al.*, 1997). Assim aparentemente o mecanismo de controle da atividade do eIF4E via inibição da sua interação com o eIF4G evoluiu independentemente em leveduras e animais (Raught e Gingras, 1999).

Em adição as 4EBP's, vários organismos possuem outras proteínas capazes de se ligar ao eIF4E. Estas podem assumir papéis altamente especializados durante estágios particulares do desenvolvimento (von der Haar *et al.*, 2004). Exemplos dessas proteínas são a Maskin em *Xenopus laevis* (Cao e Richter, 2002), Bicoid e Cup em *Drosophila melanogaster* (Niessing *et al.*, 2002, Wihelm *et al.*, 2003), Proteína de Leucemia Promielocítica (PML - Promyelocytic leukemia protein) e Proteína de homeodomínio rico em Prolina (PRH - *Proline-rich homeodomain protein*) em humanos (Cohen *et al.*, 2001, Topisirovic *et al.* 2003). No entanto até o momento pouco foi esclarecido sobre a organização estrutural dos sítios de ligação dessas proteínas (von der Haar *et al.*, 2004).

3.2.3.4 Papel do eIF4E no controle da exportação de mRNAs na tradução nuclear

Um grande número de estudos tem mostrado que alguns componentes "clássicos" da maquinaria de tradução estão localizados também no núcleo, incluindo-se os fatores de iniciação da tradução (Strudwick e Borden, 2002). Lejbkowitz *et al.* (1992) foram os primeiros a evidenciar por microscopia de imunofluorescência que uma substancial fração do eIF4E localiza-se em estruturas circulares discretas no núcleo de células do fígado de macacos, denominados posteriormente de corpos nucleares. Desde então outros estudos confirmaram a existência de corpos nucleares endógenos de eIF4E em células de mamíferos (Lejbkowitz *et al.*, 1992; Dostie *et al.*, 2000b; Lai e Borden, 2000; Cohen *et al.*, 2001); de leveduras (Lang *et al.*, 1994); células S2 de *Drosophila melanogaster* (Cohen *et al.*, 2001) e *Xenopus laevis* (Strudwick e Borden,

2002). Desta forma os corpos nucleares parecem ser conservados entre os eucariotos desde leveduras até mamíferos (Strudwick e Borden, 2002).

O transporte do eIF4E para o núcleo é efetuado de forma ativa por uma proteína ligante ao eIF4E chamada de 4ET (eIF4E-Transporter) através de um mecanismo de transporte da via importina $\alpha\beta$ (Dostie *et al.*, 2000a) e é regulado por uma quinase específica C1K/Sty (Dostie *et al.*, 2000b). A quantidade de eIF4E nos corpos nucleares varia entre 12 a 68% em cerca de 10-20 corpos de 0,1-1 μ m por núcleo (Lejbkiewicz *et al.*, 1992; Iborra *et al.*, 2001 Dostie *et al.*, 2000b, Lai e Borden, 2000; Cohen *et al.*, 2001). A função desses corpos nucleares do eIF4E tem sido relacionada ao transporte de certos transcritos do núcleo para o citoplasma, chamados de mRNAs "eIF4E-sensíveis" (Rosenwald *et al.*, 1993).

Estudos feitos em *Dictyostelium discoideum* têm sugerido que a tradução pode ocorrer no núcleo de células eucarióticas (Mangiarotti, 1999). Iborra *et al.* (2001), conseguiram visualizar diretamente sítios de síntese protéica no núcleo de células de mamíferos através da incorporação de vários análogos de lisina marcados, e essa tradução parece estar acoplada com o processo de transcrição uma vez que os sítios de transcrição e tradução são parcialmente co-localizados. Interessantemente, estudos feitos através de imunocitoquímica puderam detectar que peptídeos recém sintetizados se co-localizam parcialmente com os corpos nucleares de eIF4E, desta forma supõe-se que esses corpos nucleares de eIF4E possam estar envolvidos nos processos de maturação do mRNA, como no *splicing* e/ou modulação da estabilidade do transcrito, assim como na subsequente síntese protéica cap-dependente (Dostie *et al.*, 2000b; Iborra *et al.*, 2001). Especula-se que a tradução no núcleo seja um processo de "teste em pequena escala" para a avaliação da viabilidade de certos transcritos antes destes serem transportados para o citoplasma e serem lá traduzidos em larga escala (Strudwick e Borden, 2002).

3.2.3.5 Papel do eIF4E na reciclagem de mRNAs

A remoção da estrutura cap do mRNA é um processo chave para os mecanismos de degradação do mRNA mediado por exonucleases 5'→3', bloqueadas pela presença do cap (Parker e Song, 2004). Portanto para haver a degradação dos mRNAs o cap é removido por enzimas "decapiadoras" (*decapping enzymes*); as enzimas mais caracterizadas com essa função são as Dcp1 e Dcp2 de leveduras. As Dcp's clivam o cap entre as estruturas dos grupos fosfato, liberando m⁷GDP e a extremidade 5' monofosforilada. Essa é substrato para outra enzima, a Xrn1 que possui a atividade exonuclease 5'→3' e promove a degradação do mRNA (Parker e Song, 2004). No entanto a clivagem do cap requer acesso a partes protegidas pelo eIF4E, que junto com os demais fatores de iniciação promovem a estabilização do mRNA. Ocorre então uma competição direta entre o eIF4E e a Dcp, demonstrada *in vitro* e *in vivo* (Vilela *et al.*, 2000; Schwartz e Parker, 2000).

Para a remoção do eIF4E outra enzima, a RNA helicase Dhh1, juntamente com os auxiliares de "retirada do cap" Edc1 e Edc2; proteínas Lsm1-7 e uma proteína ligante ao mRNA, a Pat1 (Coller *et al.*, 2001; Tharun e Parker, 2001; Schwartz *et al.*, 2003), formam um grande complexo protéico que promove a desadenilação (remoção da cauda poli-A) e, conseqüentemente, promovem a linearização do mRNA, diminuindo a afinidade do eIF4E com o cap. Através da competição das Lsm1-7 pelo cap e da ação da Dhh1 (Coller *et al.*, 2001) há a remoção do eIF4E e a liberação do cap para a atividade da Dcp.

3.2.4 Tradução em Tripanosomatídeos

Até o momento pouco se sabe a respeito do mecanismo de tradução em Tripanosomatídeos e apenas alguns trabalhos caracterizaram fatores envolvidos nesse processo, dentre esses: fatores de elongação, PABPs e um homólogo ao eIF4A. Nakamura *et al.* (1996) identificaram e caracterizaram subunidades de fatores de elongação eEF1 e eEF2 de alguns Kinetoplastídeos. Um homólogo ao fator eIF4A de *L. major* (denominado LeIF) foi identificado por Skeiky *et al.* (1998) como indutor de resposta imune mediante a sua porção N-terminal (resíduos 1-226). O homólogo da PABP de *T. cruzi* (PABP1) é uma proteína de 66 kDa e está presente em duas cópias no genoma do parasita, sendo que o mRNA desses genes é expresso constitutivamente durante todo o ciclo de vida do parasita (Batista *et al.*, 1994). A PABP1 possui propriedades similares a de outros eucariotos e possui o domínio de ligação entre peptídeos (PABC) mais relacionado com os das PABPs de vegetais (Siddiqui *et al.*, 2003), concernente com os recentes achados para a evolução do parasita (Hannaert *et al.*, 2003). A PABP de *T. brucei* (PABPI) possui uma porção 5' do mRNA rica em repetições A e AU, peso molecular de 62,2 kDa uma estrutura conservada característica das PABPs, com 86,4% de identidade com a PABP de *T. cruzi*. Possui também a capacidade de autoregulação da tradução demonstrada em PABPs humanas (de Melo Neto *et al.*, 1995; Hotchkiss *et al.*, 1999). A PABP de *L. major* (LmPAB1) possui 63 kDa, também é expressa constitutivamente durante o seu ciclo de vida, e sua localização é predominantemente citoplasmática, mas com uma distribuição difusa no núcleo. Em ensaios de complementação, a LmPAB1 não pode reverter um mutante nulo em *Saccharomyces cerevisiae* (Bates *et al.*, 2000).

Recentemente foi também identificado e caracterizado um homólogo ao fator eIF4E de *L. major* (denominado *LeishIF4E-1*), que possui considerável conservação filogenética, especialmente no sítio de ligação ao cap. Esse homólogo possui localização citoplasmática e demonstrou ser

capaz de se ligar a análogos da estrutura cap, principalmente no cap monometilado (m⁷GTP) e no tetrametilado (cap4), característico dos tripanosomatídeos (Yoffe *et al.*, 2004).

3.2.4.1 Resultados obtidos pelo grupo de estudo de Biossíntese Protéica em Tripanosomatídeos.

Para o entendimento do mecanismo de iniciação da tradução em Tripanosomatídeos, o grupo de biossíntese protéica em tripanosomatídeos do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães vem desenvolvendo trabalhos a fim de estudar o complexo eIF4F nestes organismos. Com base em análise de seqüências oriundas de projetos genoma de *L. major* foram identificados quatro homólogos ao fator eIF4E (denominados LmEIF4E1-4, de 24; 31,5; 38 e 33,8 kDa respectivamente); cinco ao eIF4G (LmEIF4G1-5, de 114; 145,9; 71,2; 84,6 e 88,8 kDa respectivamente) e dois ao eIF4A (LmEIF4A1-2 de 45,3 e 43,9 kDa respectivamente). Todos com respectivas representações em *T. brucei* (onde como exemplo os ortólogos de eIF4E são denominados de TbEIF4E1-4, de 26; 28,2; 47,9 e 46,5 kDa, respectivamente) e em *T. cruzi*. A multiplicidade de fatores identificados e características próprias remetem à possibilidade de uma organização diferente do complexo de iniciação da tradução, podendo ser relacionada à adaptação aos hospedeiros e/ou seleção de mRNAs para o controle pós-transcricional tão importante nesse grupo de organismos (Clayton, 2002).

Iniciando a caracterização dos homólogos de eIF4A análises seqüenciais destes de *L. major* mostraram que os nove motivos encontrados nas DEAD Box RNA helicases estão presentes nas duas seqüências identificadas. Ensaio de interação protéica por *pull-down* constataram que o LmEIF4A1, mas não o LmEIF4A2, é capaz de se ligar ao LmEIF4G3 *in vitro*. Interação semelhante ocorre entre os homólogos de eIF4A e eIF4G em outros eucariotos. Análise de expressão por *western blot* dos homólogos LmEIF4A1-2 em promastigotas de *L. major* identificou

a proteína *LmEIF4A1* como sendo uma proteína extremamente abundante enquanto que não foi possível detectar a proteína *LmEIF4A2*. Já no caso dos homólogos de eIF4G, as análises de sequência revelaram que além do domínio HEAT, essencial para a função e identificação desta proteína, outros domínios característicos não puderam ser identificados nos homólogos de tripanosomatídeos. A exceção pode ser um provável domínio de ligação ao eIF4E, semelhante ao encontrado em *C. elegans* (FGRDFMV), encontrado nos homólogos *LmEIF4G3-4*. A quantificação da expressão do homólogo *LmEIF4G3*, único dos homólogos de eIF4G de *L. major* investigado a esse nível, revelou que esta é uma proteína de média abundância com cerca de $6,4 \times 10^3$ moléculas por célula.

No que concerne às análises sequenciais dos homólogos ao fator eIF4E de *L. major*, objetos deste estudo, observou-se que dos oito resíduos de triptofano conservados na família das proteínas ligadoras do cap sete foram encontrados no homólogo *LmEIF4E1*, oito no *LmEIF4E2*, quatro no *LmEIF4E3*, e cinco no *LmEIF4E4*. Os homólogos *LmEIF4E1-2* possuem todas as características suficientes para a ligação ao Cap enquanto que os *LmEIF4E3-4* possuem apenas algumas. A expressão dos fatores homólogos ao eIF4E de Tripanosomatídeos ainda não foi investigada ao longo do ciclo de vida do parasita. Entretanto em análises deste grupo foi encontrada na sequência do gene codificante para o *LmEIF4E1* um possível motivo regulatório para a expressão em amastigotas (Wu, et al., 2000); e um estudo de expressão diferencial do ciclo de vida de *Leishmania major* identificou que o cDNA para o *LmEIF4E2* foi identificado como gene expresso preferencialmente na forma metacíclica através de análises de microarrays (Almeida et al., 2004).

Tendo em vista a importância do controle pós-transcricional (e em especial do controle da tradução) em tripanosomatídeos, este trabalho buscou contribuir com a caracterização do complexo de iniciação da tradução nesses organismos dando ênfase ao estudo dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de *L. major* e *T. brucei*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Almeida R, Gilmartin BJ, McCann SH, Norrish A, Ivens A C, Lawson D, Levick MP, Smith DF, Dyll SD, Vetrie D, Freeman TC, Coulson RM, Sampaio I, Schneider H and Blackwell JM (2004) Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol Biochem Parasit* 136:87-100.

Alonso G, Guevara P and Ramirez JL (1992) *Trypanosomatidae* códon usage and GC distribution. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87:517-523.

Altmann M, Muller PP, Wittmer B, Ruchti F, Lanker S and Trachsel H (1993) A *Saccharomyces cerevisiae* homologue of mammalian translation initiation factor 4B contributes to RNA helicase activity. *EMBO J* 12:3997-4003.

Altmann M, Schmitz N, Berret C and Trachsel H (1997) A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J* 16:1114-1121.

Andrade MA and Bork P (1995) HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* 11:115-116.

Aravind L and Koonin EV (2000) Eukaryote-specific domains in translation initiation factors: Implications for translation regulation and evolution of the translation system. *Gen Res* 10:1172-1184.

- Ashford RW (2000) The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasit* 30:1269-1281.
- Baer BW and Kornberg RD (1980) Repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1890-1892.
- Baer BW and Kornberg RD (1983) The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* 96:717-721.
- Baker JR (1994) The origins of parasitism in the protists. *Int J Parasit* 24:1131-1137.
- Bangs JD, Carin PF, Hashizume T, McCloskey JA and Noothroyd JC (1992) Mass spectrometry of mRNA Cap 4 from Trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 267(14):9805-9815.
- Bates EJ, Knuepfer E and Smith DF (2000) Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* 28:1211-1220.
- Batista JA, Teixeira SM, Donelson JE, Kirchhoff LV and de Sa CM (1994) Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes. *Mol Biochem Parasitol* 67:301-12.
- Bektesh S, van Doren K and Hirsh D (1988) Presence of the *Caenorhabditis elegans* spliced leader on different mRNAs and in different genera of nematodes. *Genes Dev* 2: 1277-1283.

- Blackshear PJ, Stumpo DJ, Carballo E and Lawrence Jr JC (1997) Disruption of the gene encoding the mitogen-regulated translational modulator PHAS-I in mice. *J Biol Chem* 272:31510-31514.
- Bonneau AM and Sonenberg N (1987) Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J Biol Chem* 262:11134-11139.
- Boothroyd JC and Cross GA (1982) Transcripts coding for variant surface glycoproteins of *Trypanosoma brucei* have a short, identical exon at their 5' end. *Gene* 20:281-289.
- Borst P, Rudenko G, Taylor MC, Blundell PA, van Leeuwen F, Bitter W, Cross M and McCulloch R (1996) Antigenic variation in Trypanosomes. *Arch Med Res* 27:379-388.
- Borst P, van der Ploeg M, van Hoek JFM, Tas J and James J (1982) On the DNA content of trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 6:13.
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M and Papadopolou B (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277(22):19511-19520.
- Brehm K, Jensen K and Frosch M (2000) mRNA trans-splicing in the human parasitic cestode *Echinococcus multilocularis*. *J Biol Chem* 275(49):38311-38318.
- Browning KS (1996) The plant translational apparatus. *Plant Mol Biol* 32:107-144.

- Browning KS (2004) Plant initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Soc Trans* 32(4): 589-591.
- Browning KS, Lax SR and Ravel JM (1987) *J Biol Chem* 262:11228–11232.
- Browning KS, Webster C, Roberts JK and Ravel JM (1992) Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* 267:10096–10100.
- Campbell DA, Suyama Y and Simpson L (1989) Genomic organization of nuclear tRNAGly and tRNALeu genes in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 37:257–262.
- Campbell DA, Thomas S and Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes Inf* 5(13):1231-40.
- Cao Q and Richter JD (2002) Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls B1 mRNA translation and oocyte maturation. *EMBO J* 21:3852-3862.
- Cavalier-Smith T (1993) Kingdom Protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57(4):953-994.
- Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21:1881-88.
- Cohen N, Sharma M, Kentsis A, Perez JM, Strudwick S and Borden KL (2001) PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *EMBO J* 20:4547–4559.

- Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA and Parker R (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7(12):1717-1727.
- Cordingley JS (1985) Nucleotide sequence of the 5S ribosomal RNA gene repeat of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 17:321-330.
- Cougot N, van Dijk E, Babajko S and Séraphin B (2004) 'Cap-tabolism'. *Trends Biochem Sci* 29(8):436-444.
- De Benedetti A and Rhoads RE (1990) Overexpression of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in HeLa cells results in aberrant growth and morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8212-8216.
- de Melo Neto OP, Standart N and Martins de Sá C (1995) Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res* 23:2198-2205.
- de Souza W (2002) From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kin Biol Dis* 1:3.
- Desjeux P (1996). Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Derm* 14:417-23.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and perspectives. *Comp Immun Microbiol Infec Dis* 27:305-318.

- Di Noia JM, D'Orso I, Sanchez DO and Frasch AC (2000). AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. J Biol Chem 275(14):10218-10227.
- D'Orso I and Frasch AC (2001a) Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in *Trypanosoma cruzi* by interaction with specific RNA-binding proteins. J Biol Chem 276(19):15783-15793.
- D'Orso I and Frasch AC (2001b) TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. J Biol Chem 276(37):34801-34809.
- D'Orso I, De Gaudenzi JG and Frasch AC (2003) RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. Trends Parasitol 19(4):151-155.
- Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA and Sonenberg N (2000a) A novel shuttling protein 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. EMBO J 19:3142-3156.
- Dostie J, Lejbkiewicz F and Sonenberg, N (2000b) Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. J Cell Biol 148:239-247.
- Duncan R, Milburn SC and Hershey JW (1987) Regulated phosphorylation and low abundance of hela cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. J Biol Chem 262:380-388.

- El-Sayed NM, Hegde P, Quackenbush J, Melville SE and Donelson JE (2000). The African trypanosome genome. *Int J Parasitol* 30:329-345.
- Fadden P, Haystead TAJ and Lawrence JC (1997) Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J Biol Chem* 272:10240-10247.
- Fernandes AP, Nelson K and Beverley S M (1993) Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on age and origins of parasitism. *Proc Nat Acad Sci USA* 90:11608-11612.
- Ferraiuolo MA, Lee C-S, Ler LW, Hsu JL, Costa-Mattioli M, Luo M-J, Reed R and Sonenberg N (2004) A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc Nat Acad Sci USA* 101(12):4118-4123.
- Frantz C, Ebel C, Paulus F and Imbault P (2000) Characterization of trans-splicing in Euglenoids. *Curr Genet* 37(6):349-55.
- Gallie DR and Browning KS (2001) eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276:36951-369620.
- Gallie DR (1998) A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* 216:1-11.

- Ganoza MC, Kiel MC and Aoki H (2002) Evolutionary conservation of reactions in translation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3):460-485.
- Gebauer F and Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Mol Cell Biol* 5:827-835.
- Ghedin E, Bringaud F, Peterson J, Myler P, Berriman M, Ivens A, Andersson B, Bontempi E, Eisen J, Angiuoli S, Wanless D, von Arxa A, Murphye L, Lennard N, Salzberg S, Adamsa MD, White O, Hall N, Stuart K, Fraser CM, El-Sayed NMA (2004). Gene synteny and evolution of genome architecture in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 134:183–191.
- Gingras AC, Raught B and Sonenberg N (1999) eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913-963.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, Aebersold R and Sonenberg N (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: A novel twostep mechanism. *Genes & Dev* 13: 1422–1437.
- Gingras AC, Kennedy SG, O’Leary MA, Sonenberg N and Hay N (1998). 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & Dev* 12: 502–513.
- Goss DJ, Carberry, SE, Dover TE, Merrick WC and Rhoads RE (1990) Fluorescence study of the binding of m7GpppG and rabbit globin mRNA to protein synthesis initiation factors 4A, 4E, and 4F. *Biochem* 29:5008-5012.

- Gossage SM, Rogers ME and Bates PA (2003) Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in the sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol* 33:1027-1034.
- Goyer C, Altmann M, Lee HS, Blanc A, Deshmukh M, Woolford JL Jr, Trachsel H and Sonenberg N (1993) *TIF4631* and *TIF4632*: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol Cell Biol* 13(8):4860-74.
- Gradi A, Imataka H, Svitkin YV, Rom E, Raught B, Morino S and Sonenberg N (1998) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18(1):334-42.
- Grams J, Morris JC, Drew ME, Wang Z, Englund PT and Hajduk SL (2002) A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. *J Biol Chem* 277:16952-16959.
- Gross JD, Moerke NJ, von der Haar T, Lugovskoy AA, Sachs A, McCarthy JEG and Wagner G (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115:739-750.
- Gull K (1999) The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites. *Annu Rev Microbiol* 53:629-655.

- Haghighat A, Mader S, Pause A and Sonenberg N (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J* 14:5701-5709.
- Haghighat A, Svitkin Y, Novoa I, Kuechler E, Skern T and Sonenberg N (1996) The eIF4G-eIF4E complex is the target for direct cleavage by the rhinovirus 2A proteinase. *J Virol* 70:8444-8450.
- Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR and Michels PAM (2003a) Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kin Biol Dis* 2:11.
- Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora, J-P, Rigden DJ, Michels PAM and Opperdoes FR (2003b) Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proc Nat Acad Sci USA* 100(3):1067-1071.
- Hernandez G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, del Corral RD, Schwartz P and Rivera-Pomar R (2005) Functional analysis of seven encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 122:529-543.
- Hershey JWB and Merrick WC (2000) Translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Press, pp. 33-75.
- Hotchkiss TL, Nerantzakis GE, Dills SC, Shang L and Read LK (1999) *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5' untranslated region sequence elements. *Mol Biochem Parasitol* 98:117-29.

- Iborra FJ, Jackson DA and Cook PR (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science* 293:1139–1142.
- Imataka H and Sonenberg N (1997) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 17:6940–6947.
- Imataka H, Gradi A and Sonenberg N (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 17:7480-7489.
- Irmer H and Clayton C (2001) Degradation of the unstable EP1 mRNA in *Trypanosoma brucei* involves initial destruction of the 3'-untranslated region. *Nucleic Acids Res* 29(22):4707-4715.
- Jankowska-Anyszka M, Lamphear BJ, Aamodt EJ, Harrington T, Darzynkiewicz E, Stolarski R and Rhoads RE (1998) Multiple Isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4e in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures. *J Biol Chem* 273(17):10538–10542.
- Jess W, Palm P, Evers R, Köck J and Cornelissen AW (1990) Phylogenetic analysis of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*, with special reference to class-specific transcription. *Curr Genet* 18:547–551.
- Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M, Rustgi A, Callanan L and Schmidt EV (1996) An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein

(eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c myc. Mol Cell Biol 16:4754-4764.

Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, Beach CM, Stepinski J, Stolarski R, Darzynkiewicz E and Rhoads RE (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. J Biol Chem 270:14597-14603.

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

Keiper BD, Gan W and Rhoads RE (1999) Protein synthesis factor 4G. Int J Biochem Cell Biol 31:37-41.

Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T and Rhoads RE (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem 275: 10590-10596.

Killick-Kendrick R (1990) The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. Ann Parasitol Hum Comp 65(1):37-42.

Kleijn M, Scheper GC, Voorma HO and Thomas AAM (1998) Regulation of translation initiation factors by signal transduction. Eur J Biochem 253:531-544.

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

- Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL and Rhoads RE (2000) Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem* 275, 41369–41376.
- Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Merrick WC and Rhoads RE (2001) Characterization of the two eIF4A-binding sites on human eIF4G-1. *J Biol Chem* 276:2872–2879.
- Kozac M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
- Kozac M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiation codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 196:947-950.
- Lai HK and Borden KL (2000) The promyelocytic leukemia (PML) protein suppresses cyclin D1 protein production by altering the nuclear cytoplasmic distribution of cyclin D1 mRNA. *Oncogene* 19:1623–1634.
- Lamphear BJ, Kirchweiger R, Skern T and Rhoads RE (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem* 270:21975–21983.
- Lang V, Zanchin NI, Lunsdorf H, Tuite M and McCarthy JE (1994) Initiation factor eIF-4E of *Saccharomyces cerevisiae*: Distribution within the cell, binding to mRNA, and consequences of its overproduction. *J Biol Chem* 269:6117–6123.

- LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L and Beverley SM (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* 7:996-1007.
- Lee MG-S and van der Ploeg LHT (1997) Transcription of protein-coding genes in trypanosomes by RNA polymerase I. *Annu Rev Microbiol* 51:463-489.
- Lejbkowitz F, Goyer C, Darveau A, Neron S, Lemieux R and Sonenberg N (1992) A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9612-9616.
- Lewdorowicz M, Yoffe Y, Zuberek J, Jemielity J, Stepinski J, Kierzek R, Stolarski R, Shapira M and Darzynkiewicz E (2004) Chemical synthesis and binding activity of the Trypanosomatid cap-4 structure. *RNA* 10(9):1-10.
- Lewin B (2000) *Genes VII*. Oxford University Press and Cell Press. pp. 139-142.
- Li S, Sonenberg N, Gingras A-C, Peterson M, Avdulov S, Polunovsky VA and Bitterman PB (2002) Translational control of cell fate: availability of phosphorylation sites on translational repressor 4E-BP1 governs its proapoptotic potency. *Mol Cell Biol* 22:2852-2861.
- Liang X-H, Haritan A, Uliel S and Michaeli S (2003) *Trans* and *Cis* Splicing in Tripanosomatids: Mechanisms, Factors, and Regulation. *Euk Cell* 2(5):830-840.

- Linder P (2003) Yeast RNA helicases of the DEAD box family involved in translation initiation. *Biol Cell* 95:157-167.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J and Slonimski PP (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337:121-122.
- Liou RF and Blumenthal T (1990) Trans-spliced *Caenorhabditis elegans* mRNAs retain trimethyguanoside caps. *Mol Cell Biol* 10:1764-1768.
- Lomakin IB, Hellen CU and Pestova TV (2000) Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol Cell Biol* 20:6019-6029.
- Lorsch J R and Herschlag D (1998) The DEAD box protein eIF4A: A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes. *Biochemistry* 37(8):2194-2206.
- Mader S, Lee H, Pause A and Sonenberg N (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* 15: 4990-4997.
- Mair G, Shi H, Li H, Djikeng A, Aviles HO, Bishop JR, Falcone FH, Gavrilescu C, Montgomery JL, Santori MI, Stern LS, Wang Z, Ullu E and Tschudi C (2000) A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6(2): 163-9.

- Mair G, Ullu E and Tschudi C (2000) Cotranscriptional Cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* Spliced Leader RNA. J Biol Chem 275(37):28994-28999.
- Mangiarotti G (1999) Coupling of transcription and translation in *Dictyostelium discoideum* nuclei. Biochemistry 38:3996-4000.
- Marcotrigiano J, Gingras A-C, Sonenberg N and Burley SK (1997) Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. Cell 89(6):951-961.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N and Burley SK (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. Mol Cell 3(6):707-716.
- Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, Pestova TV, Hellen CU and Burley SK (2001) A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. Mol Cell. 7(1):193-203.
- Maroney PA, Denker JA, Darzynkiewicz E, Laneve R and Nilsen TW (1995). Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. RNA 1:714-23.
- Martin W and Borst P (2003) Secondary lost of chloroplasts in Trypanosomes. Proc Nat Acad Sci USA 100(3): 765-767.

- Maslov DA, Podlipaev SA and Lukes J (2001) Phylogeny of Kinetoplastida: Taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(3):397-402.
- Matsuo H, Li H, McGuire AM, Fletcher CM, Gingras A-C, Sonenberg N and Wagner G (1997) Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol* 4(9):717-724.
- McKean PG (2003) Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6:600-607.
- McKendrick L, Pain VM and Morley SJ (1999) The initiation factor 4E. *The Int J Biochem Cell Biol* 31:31-35.
- Michels PAM, Hannaert V and Bringaud F (2000) Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol Today* 16:482-489.
- Minich, WB, Balasta ML, Goss DJ and Rhoads RE (1994) Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16):7668-7672.
- Miyoshi H, Dwyer DS, Keiper BD, Jankowska-Anyszka M, Darzynkiewicz E and Rhoads RE (2002) Discrimination between mono- and trimethylated cap structures by two isoforms of *Caenorhabditis elegans* eIF4E. *EMBO J* 21(17): 4680-4690.
- Momem H (2002) Molecular Taxonomy of Trypanosomatids: some problems and pitfalls. *Archiv Med Res* 33:413-415.

- Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV and Sonenberg N (2000) Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol. Cell. Biol.* 20:468–477.
- Myler PJ and Stuart KD (2000) Recent developments from the *Leishmania* genome project. *Curr Opin Microbiol* 3:412–416.
- Myler PJ, Beverley SM, Cruz AK, Dobson DE, Ivens AC, McDonagh PD, Madhubala R, Martinez-Cavillo S, Ruiz JC, Saxena A, Sisk E, Sunkin SM, Worthey E, Yan S and Stuart KD (2001) The *Leishmania* genome project: new insights into gene organization and function. *Med Microbiol Immunol* 190:9-12.
- Nakamura Y, Hashimoto T, Kamaishi T, Adachi J, Nakamura F, Okamoto K and Hasegawa M (1996) Phylogenetic position of kinetoplastid protozoa inferred from the protein phylogenies of elongation factors 1 alpha and 2. *J Biochem (Tokyo)* 119:70-79.
- Niedswiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieczyska A, Dadlez M, Gingras A-C, Mak P, Darzynkiewicz E, Sonenberg N, Burley SK and Stolarski R (2002) Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5'cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* 319: 615–635.
- Niessing D, Blanke S and Jackle H (2003) Bicoid associates with the 5'-cap-bound complex of caudal mRNA and repress translation. *Genes Dev* 16:2576-2585.

- Ogbadoyi E, Ersfeld K, Robinson D, Sherwin T and Gull K (2000) Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. *Chromosoma* 108:501-513.
- Ohlmann T, Rau M, Pain VM and Morley SJ (1996) The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J* 15:1371-1382.
- Orphanides G and Reinberg D (2002) A unified theory of gene expression. *Cell* 108:439-451.
- Parker R and Song H (2004) The enzymes and the control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11:121-127.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donze O, Lin TA, Lawrence JC and Sonenberg, N (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 371:762-767.
- Pestova TV and Hellen CU (2000) The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 57:651-674.
- Pestova TV and Hellen CU (2003) Coupled folding during translation initiation. *Cell* 115:650-652.
- Pestova TV, Hellen CUT and Shatsky IN (1996) Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16:6859-6869.

- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI and Hellen CUT (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Nat Acad Sci USA* 98(13): 7029-7036.
- Poulin F, Gingras A-C, Olsen H, Chevalier S and Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem* 273: 14002-14007.
- Preiss T and Hentze MW (2004) Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays* 25:1201-1211.
- Prévôt D, Darlix J-L and Ohlmann T (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95:141-156.
- Priest JW and Hadjuk SL (1994) Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosome brucei*. *J Bioenerg Biomemb* 26:179-191.
- Ptushkina M, Berthelot K, von der Haar T, Geffers L, Warwicker J and McCarthy JE (2001) A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. *Nucleic Acids Res.* 29:4561-4569.
- Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JMX and McCarthy JEG (1999) Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. *EMBO J* 18:4068-4075.

- Ptushkina M, von der Haar T, Vasilescu S, Frank R, Birkenhäger R and MacCarthy JEG (1998) Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20. *EMBO J* 17(16): 4798-4808.
- Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T and Sonenberg N (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 18, 270-279.
- Raught B and Gingras A-C (1999) eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 31:43-57.
- Reddy R, Singh R and Shimba S (1992) Methylated Cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions. *Pharmac Ther* 54:249-267.
- Richter-Cook NJ, Dever TE, Hensold JO and Merrick WC (1998) Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor: Eukaryotic initiation factor H. *J Biol Chem* 273:7579-7587.
- Rocak S and Linder P (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Mol Cell Biol* 5:232-241.
- Roditi I, Furger A, Ruepp S, Schurch N and Butikofer P (1998) Unravelling the procyclin coat of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91:117-30.
- Rogers GWJ, Lima WF and Merrick WC (2001a) Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem* 276:12598-12608.

- Rogers GWJ, Richter NJ, Lima WF and Merrick WC (2001b) Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* 276, 30914–30922.
- Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ and Schmidt EV (1993) Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6175-6178.
- Rottman F, Shatkin AJ and Peary RP (1974) Sequences containing methylated nucleotides at the 5' termini of messenger RNAs: possible implications for processing. *Cell* 3: 197-199.
- Rovai L, Tripp C, Stuart K and Simpson L (1992) Recurrent polymorphisms in small chromosomes of *Leishmania tarentolae* after nutrient stress or subcloning. *Mol Biochem Parasitol* 50:115-126.
- Saas J, Ziegelbauer K, von Haeseler A, Fast B and Boschart M (2000) A developmentally regulated aconitase related to iron-regulatory protein-1 is localized in the cytoplasm and in the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 275:2745-2755.
- Scheper GC and Proud CG (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269 (22); 5350-5359.
- Scheper GC, van Kollenburg B, Hu J, Luo Y, Goss DJ and Proud CG (2002) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *J Biol Chem* 277(5):3303-3309.

- Schwartz DC, Decker CJ and Parker R (2003) The enhancer of decapping proteins, Edc1p and Edc2p, bind RNA and stimulate the activity of the decapping enzyme. *RNA* 9:239-251.
- Schwartz DC and Parker R (2000) mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* 20:7933-7942.
- Shatkin AJ (1976) Capping of eukaryotic mRNAs. *Cell* 9: 645-653.
- Siddiqui N, Kozlov G, D'Orso I, Trempe J-F and Gehring K (2003) Solution structure of the c-terminal domain from poly(a)-binding protein in *Trypanosoma cruzi*: A vegetal PABC domain. *Prot Sci* 12:1925-1933.
- Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaró R, Trinchieri G and Reed SG (1995) A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J. Exp Med* 181:1527-37.
- Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC and Shatkin AJ (1978) A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4843-4847.
- Stechmann A and Cavalier-Smith T (2002) Rooting the eukaryote tree by using gene fusion. *Science* 297:89-91.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield CJ and Gibson W (2001) The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol* :1-55.

- Stiles JK, Hicok PI, Shah PH and Meade JC (1999) Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Annu Trop Med Parasitol* 93(8):781-807.
- Story R M, Li H and Abelson J N (2001) Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. In: Rocak S and Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *J Cell Biol* 5:232-241.
- Strudwick S and Borden KLB (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 70:10-22.
- Stuart K and Panigrahi AK (2002) RNA editing: complexity and complications. *Mol Microbiol* 45(3):591-596.
- Tarun SZ Jr and Sachs AB (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 15(24):7168-77.
- Tharun S and Parker R (2001) Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol Cell* 8:1075-1083.
- Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, Ishida T, Taniguchi T, Hasegawa H, Terashima A, Sasaki M, Katsuya , Kitamura K, Miyoshi H, Ishikawa M and Miura K (2002) Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P (3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)-bound human full length eukaryotic initiation factor

4E: biological importance of the C-terminal flexible region. *Biochem J* 262:539–544.

Topisirovic I, Culjkovic B, Cohen N, Perez JM, Skrabanek L and Borden KL (2003) The proline-rich homeodomain protein, PRH, is a tissue specific inhibitor of the eIF4E-dependent cyclin D1 mRNA transport and growth. *EMBO J* 22:689-703.

Ullu E and Tschudi C (1991) Trans-splicing in Trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10074-10078.

van Leeuwen F, Kieft R, Cross M and Borst P (1998) Biosynthesis and function of the modified DNA base β -D-glucosyl-hidroximethyluracil in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 18(10):5643-5651.

Vandenberghe AE, Meedel TH and Hastings KE (2001) mRNA 5'-leader *trans*-splicing in the chordates. *Genes Dev* 15:294–303.

Varani G (1997) A cap for all occasions. *Structure* 5:855-858.

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

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

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

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

WHO/TDR (2003) World Health Organization/Tropical Diseases Research. African Trypanosomiasis Poster, [http:// www.who.int/tdr](http://www.who.int/tdr).

WHO/TDR CD Image Library (2003) World Health Organization/Tropical Diseases Research.

WHO/TDR (2003) World Health Organization/Tropical Diseases Research. Leishmaniasis Poster, <http://www.who.int/tdr>.

Wihelm JE, Hilton M, Amos Q and Henzel WJ (2003) Cup is an eIF4E binding protein required for both the translational repression of Oskar and the recruitment of Barentz. *J Cell Biol* 163:1197-1204.

Yan R, Rychlik W, Etchison D and Rhoads RE (1992) Amino acid sequence of the human protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma. *J Biol Chem* 267(32):23226-31.

Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira Z, Keasar C, Orr-Dahan I, Jankowszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E and Shapira M (2004) Cap-binding activity of an homolog from *Leishmania*. *RNA* 10(11):1-12.

5. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Parte dos resultados obtidos durante o trabalho experimental dessa dissertação foram divididos em dois artigos: um já publicado na revista internacional *Molecular and Biochemical Parasitology* 140:23-41, intitulado **“Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues”** (Manuscrito I), que se encontra anexado a seguir. O referido artigo foi fruto de um trabalho conjunto de múltiplos autores com diferentes contribuições individuais. O autor da presente dissertação contribuiu com os dados referentes às quantificações dos fatores *LmEIF4E1-3*. O segundo artigo intitulado **“Caracterização funcional dos homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei*”** (Manuscrito II) contém os dados do autor desta dissertação referentes às análises dos homólogos de *T. brucei* e será submetido para a mesma revista.

MANUSCRITO I

“TRANSLATION INITIATION IN *Leishmania* *major*: CHARACTERISATION OF MULTIPLE IF4F SUBUNIT HOMOLOGUES”

Artigo publicado na revista
***Molecular and Biochemical
Parasitology***
ISSN 0166-6851

Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues

Rafael Dhália^{a,e}, Christian R.S. Reis^{b,e}, Eden R. Freire^{b,e}, Pollyanna O. Rocha^{b,e}, Rodolfo Katz^{b,e}, João R.C. Muniz^c, Nancy Standart^d, Osvaldo P. de Melo Neto^{e,*}

^a Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, D.F., Brazil

^b Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife 50732-970, PE, Brazil

^c Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 369, São Carlos 13560-970, SP, Brazil

^d Department of Biochemistry, University of Cambridge, 80 Tennis Court Road, Cambridge CB21GA, UK

^e Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Professor Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife 50670-420, PE, Brazil

Received 14 August 2004; received in revised form 25 November 2004; accepted 7 December 2004

Available online 29 December 2004

Abstract

In eukaryotes protein synthesis initiates with the binding of the multimeric translation initiation complex eIF4F – eIF4E, eIF4A and eIF4G – to the monomethylated cap present on the 5' end of mRNAs. eIF4E interacts directly with the cap nucleotide, while eIF4A is a highly conserved RNA helicase and eIF4G acts as a scaffold for the complex with binding sites for both eIF4E and eIF4A. eIF4F binding to the mRNA recruits the small ribosomal subunit to its 5' end. Little is known in detail of protein synthesis in the protozoan parasites belonging to the family *Trypanosomatidae*. However, the presence of the highly modified cap structure, cap4, and the spliced leader sequence on the 5' ends of all mRNAs suggests possible differences in mRNA recruitment by ribosomes. We identified several potential eIF4F homologues by searching *Leishmania major* databases: four eIF4Es (*LmEIF4E1-4*), two eIF4As (*LmEIF4A1-2*) and five eIF4Gs (*LmEIF4G1-5*). We report the initial characterisation of *LmEIF4E1-3*, *LmEIF4A1-2* and *LmEIF4G3*. First, the expression of these proteins in *L. major* promastigotes was quantitated by Western blotting using isoform specific antibodies. *LmEIF4A1* and *LmEIF4E3* are very abundant, *LmEIF4G3* is moderately abundant and *LmEIF4E1/LmEIF4E2/LmEIF4A2* are rare or not detected. In cap-binding assays, only *LmEIF4E1* bound to the 7-methyl-GTP-Sepharose resin. Molecular modelling confirmed that *LmEIF4E1* has all the structural features of a cap-binding protein. Finally, pull-down assays were used to investigate the potential interaction between the eIF4A (*LmEIF4A1/LmEIF4A2*) and eIF4G (*LmEIF4G1-3*) homologues. Only *LmEIF4G3*, via the HEAT domain, bound specifically both to *LmEIF4A1* as well as to human eIF4A. Therefore for each factor, one of the *L. major* forms seems to fulfil, in part at least, the expected characteristics of a translational initiation factor.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: eIF4F; Translation initiation; *Leishmania major*; Protein–protein interaction

1. Introduction

Flagellate protozoans belonging to the order *Kinetoplastida*, family *Trypanosomatidae*, are responsible for a series of important diseases, such as the Leishmaniasis, Sleep-

ing Sickness and Chagas' Disease, which affect millions of people world-wide and put a great number of lives at risk (<http://www.who.int/tdr>). These are unique eukaryotes which are characterised by unusual processes in the formation of mature mRNAs, including polycistronic transcription and *trans*-splicing [1,2] (for recent reviews see [3,4]). These parasites are also distinguished by the lack of known mechanisms for the transcriptional control of the expression of

* Corresponding author. Tel.: +55 81 2101 2636; fax: +55 81 3453 2449.
E-mail address: opmn@cpqam.fiocruz.br (O.P. de Melo Neto).

their protein coding genes (reviewed in [5]). Processing of the polycistronic precursor mRNAs by *trans*-splicing adds the capped 39 nt long spliced leader (SL or mini-exon sequence) to the 5' end of each monocistronic mature mRNA. The first 4 nt of the SL sequence are subject to various modifications and constitute, with the 7-methyl-GTP nucleotide at its 5' end, the structure called cap4 [6,7]. Roles for the capped SL sequence in mRNA metabolism have been proposed, based largely on cap functions in metazoans, in mRNA transport, stability and/or translation, but no firm conclusions have been reached yet. Experiments using antisense oligonucleotides complementary to the SL sequence in heterologous cell-free translation systems are suggestive of a role for this sequence in translation [8,9]. Indirect evidence from nematodes, using message-dependent homologous protein synthesis systems, also reinforces a role in translation [10]. Indeed recent data suggests that either the SL sequence or the cap4 is responsible for polysome association of mRNA in *L. tarantolae* [11]. Since the 5' end of most eukaryotic mRNAs is required for translation initiation, it is expected that their influence would be exerted at this stage of the translation process.

In animals, yeast and plants, the highly regulated initiation stage of protein synthesis starts with the binding of eIF4F (formed by the translation initiation factors eIF4E, eIF4A and eIF4G) to the monomethylated cap present on the 5' end of the mRNAs [12]. With the help of other initiation factors, such as eIF3, eIF4F allows the recognition of the mRNAs by the 40S ribosomal subunit and the start of the translation process. Its interaction with the poly(A)-binding protein (PABP), via eIF4G, may also promote the circularization of the mRNA and enhance translation reinitiation (reviewed in [13–15]). eIF4E is a 24 kDa polypeptide responsible for specific cap recognition. It binds to both the cap and eIF4G and its activity can be regulated by phosphorylation or through the eIF4E interacting proteins (reviewed in [16–18]). eIF4A is an ATP-dependent RNA helicase which has been classified as a member of the DEAD box family of RNA helicases (reviewed in [19–21]). During translation initiation eIF4A binds eIF4G and, with the help of another translation initiation factor eIF4B, is responsible for melting secondary structures along the mRNA 5'UTR which allows the recruitment and scanning of the small ribosomal subunit to the translation initiation codon. The large subunit eIF4G (approximately 200 kDa) provides the scaffold for the eIF4F complex (reviewed in [22]). Through its N-terminus, eIF4G binds both eIF4E [23] and PABP [24,25], providing the link between the 5' and 3' ends of the mRNA. eIF4G's central core region includes the conserved HEAT repeat domain (also known as MIF4G/NIC1) [26], which is responsible for the interaction with eIF4A and RNA-binding, and also mediates the interaction with eIF3 [27,28], which recruits the 40S ribosomal subunit. Mammalian eIF4G contain a C-terminal domain with a second eIF4A binding site as well as the binding site for the eIF4E kinase Mnk. Yeast eIF4G lacks this C-terminal domain [29–31].

Knowledge about the process of protein synthesis in trypanosomatid protozoans is inferred by indirect evidence such as sequence similarities between individual translation factors with homologues from higher eukaryotes. Translation factors characterised so far from these organisms include subunits of elongation factors such as eEF1 and eEF2 [32] and the PABP from *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania major* [33–35]. The eIF4A component of the eIF4F complex has also been identified both in *L. major* [36] and in *L. braziliensis*, as an antigen that elicits IL-12 production and Th1-type response in humans [37]. However, little is known regarding the role of these factors in translation.

To understand translation initiation in the trypanosomatids, we set out to characterise the various eIF4F subunits from *L. major*. Multiple potential homologues for the three eIF4F components were identified. These homologues seem to vary in different aspects such as cap binding affinity of the eIF4Es, levels of expression and interaction with other components of eIF4F. Our results suggest a high degree of complexity in translation initiation in these parasites, which may reflect an adaptation to their complex life cycle.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Promastigotes of *L. major* (MHOM/IL/81/Friedlin) were maintained at 26 °C in modified LIT medium pH 7.2 (0.2% sucrose (w/v); 0.36% liver broth (w/v); 0.1% tryptose (w/v); 0.002% haemin (w/v)) containing 20% foetal bovine serum, ampicillin (10 U/ml) and streptomycin (10 µg/ml). Parasites were kept on continuous log phase growth by changing the culture media every 3–4 days. Total protein lysates were obtained from log phase haemocytometer quantified parasite cell pellets resuspended directly in SDS-PAGE sample buffer.

2.2. Sequence analysis and modelling

BLAST searches were carried out for possible *L. major* eIF4F subunit homologues at the GenBank databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) using as query the sequences of the human and *Saccharomyces cerevisiae* proteins. Similar searches were also initially performed with the non-annotated draft *L. major* and *T. brucei* genome databases (<http://www.sanger.org>), and later with those available at the Gene DB website of the Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit (<http://www.genedb.org>). Sequences were aligned with Clustal W (<http://www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/clustalw.shtml>); occasionally manual refinement of the alignments was performed. For the eIF4A sequence analysis, the alignment produced with CLUSTAL W was followed by phylogenetic and molecular evolutionary analyses conducted with the program MEGA version 2.1 [38] using the Neighbour-Joining method [39]. Gaps were treated as miss-

ing data. Bootstrap analysis (10,000 replicates) was done by interior branch test.

For the molecular modelling of *LmEIF4E1* and the *LmEIF4G3* HEAT domain, structural alignments were performed with the GenTHREADER program [40] comparing their secondary structure with that of available proteins with resolved structure. Best matches were the mouse eIF4E bound to 7-methyl-GDP [41] and the human eIF4GII HEAT domain [26], respectively. The atomic coordinates from these structures were submitted with the alignment results to the program MODELLER [42] in order to produce the models, which were then validated using the programs PROCHECK [43], Verify 3D [44] and WHATIF [45].

2.3. PCR and cloning methods for the various *L. major* factors

The *LmEIF4E1*, *LmEIF4E2*, *LmEIF4E2b* (same as *LmEIF4E2* but missing the 5' end coding for the first seven amino acids of the protein), *LmEIF4E3* and *LmEIF4A1* coding sequences were amplified using primers flanked by sites for the restriction enzymes *KpnI/XbaI* (*LmEIF4E2*) or *BamHI/XbaI* (all others) and cloned into the corresponding restriction sites of the pGEM3zf+ vector obtained from Promega (the sequences of all the oligonucleotides described in this work are listed on the [supplementary table](#)). The resulting full length sequences were then reamplified flanked by sites for *AflIII/NotI* (*LmEIF4E1*), *NcoI/NotI* (*LmEIF4E2* and *LmEIF4E3*—in the latter a N to D mutation was introduced in the second codon to accommodate the *NcoI* site) or *NcoI/XhoI* (*LmEIF4A1*) and cloned into the *NcoI/NotI* or *NcoI/XhoI* sites of the expression vector pET21D (Novagen) for the expression of recombinant C-terminal His-tagged proteins. For the expression of N-terminal Glutathione S-transferase (GST) fusions, fragments *LmEIF4E1* and *LmEIF4E2b* were recovered from the pGEM derived plasmids and subcloned into the *BamHI/Sall* sites of the vector pGEX4T3 (Amersham Biosciences). For the same reason *LmEIF4E3* and *LmEIF4A1* were reamplified flanked by sites for *BamHI/NotI* and *BamHI/XhoI*, respectively and cloned into the same sites of the pGEX4T3 vector. *LmEIF4A1* was further subcloned into the same sites of the pRSETA plasmid (Invitrogen) for the expression of N-terminal His-tagged proteins. The *LmEIF4A2* gene was amplified flanked by sites for *BamHI/XhoI* and cloned directly into the same sites of the vectors pRSETA and pGEX4T3.

Fragments coding for the HEAT repeats domain from the *LmEIF4G1-3* homologues, *LmEIF4G1*_{128–475} (the numbers indicate the amino acids remaining from the wild type protein), *LmEIF4G2*_{387–705} (missing the last 22 amino acids from the HEAT domain in [Fig. 7](#)) and *LmEIF4G3*_{26–310}, flanked by sites for *AflIII/NotI* (*LmEIF4G1*_{128–475}) or *NcoI/NotI* (the others), were amplified and cloned into the *NcoI/NotI* sites of the pET21D plasmid for the expression of C-terminal His-tagged proteins. For both *LmEIF4G2*_{387–705} and *LmEIF4G3*_{26–310}, an AUG start codon was introduced in

the constructs with the *NcoI* site. The full length *LmEIF4G3* (*LmEIF4G3*_{1–636}), as well as its first half (*LmEIF4G3*_{1–343}) were also amplified and cloned into the same sites of pET21D. The latter two fragments were then reamplified and cloned into the *BamHI/NotI* sites of pGEX4T3 to have both proteins as GST fusions.

All of the amplified fragments above were sequenced and the resulting sequences confirmed by comparison with those from the *L. major* genome sequencing project.

2.4. Cap binding assay

³⁵S-Met-labelled *L. major* eIF4E proteins were synthesised in the TnT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) using the pET derived plasmids as templates. As a positive control, a *Xenopus laevis* eIF4E cDNA, in pSP64TEN, was recovered by digestion with *HindIII/BglII* and subcloned into the *HindIII/BamHI* sites of pGEM2 (Promega) under control of the T7 promoter. For the cap binding assay, 35 µl of 7-methyl-GTP Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences), previously equilibrated with buffer A (50 mM Hepes; 1 mM EDTA; 0.1 mM GTP; 14 mM 2-mercaptoethanol; 100 mM KCl; pH 7.4), was mixed with 25 µl of the translation products (in 200 µl final volume—completed with buffer A) and incubated for 30 min in ice. The beads were then washed three times with 500 µl buffer A and, for the elution, three times with 50 µl buffer A containing 50 µM cap analogue (m⁷G(5')ppp(5')G (New England Biolabs) instead of the GTP. Any labelled protein still remaining on the beads was recovered with two final washes with 2 M KCl and SDS-PAGE sample buffer, respectively. Aliquots of all fractions were mixed with SDS sample buffer and analysed by SDS-PAGE and autoradiography.

2.5. Expression and purification of recombinant proteins

For the expression of either His or GST-tagged recombinant proteins, plasmids were transformed into *Escherichia coli* BLR or BL21 cells. The transformed bacteria were grown in LB medium and induced with IPTG. Induced cells were sedimented, resuspended in PBS and lysed by sonication or French press. Protein purification was performed as described [46] with either Ni-NTA Agarose (Qiagen) or glutathione-Sepharose (Amersham Biosciences). Protein products were analysed in 15% SDS-PAGE stained with Coomassie Blue R-250. For the quantification of the recombinant proteins, serial dilutions were compared in Coomassie stained gels with serial dilutions of known concentrations of BSA.

2.6. Antibody production and Western blotting

Rabbit antisera were raised against *LmEIF4A1-2*, *LmEIF4E1-2* and *LmEIF4G3*_{26–310} by immunising adult New Zealand White rabbits with the His-tagged recombi-

nant forms. For *LmEIF4E3*, the GST-fusion was first cleaved with thrombin and the fragment corresponding to the protein excised from SDS-PAGE gels and used for the immunization. The various antibodies were affinity purified using the protocol described in [47], with minor modifications, stored at 4 °C with 0.03% sodium azide and used in a dilution of 1/500. Western blots were performed with the Immobilon-P PVDF membrane (Millipore), using as second antibody peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluted 1/15,000. The reactions were detected by enhanced chemiluminescence (ECL). Densitometric scanning of the various results was performed with the Kodak 1D Image Analysis Software, version 3.5 for Windows.

2.7. Pull-down assays

The Ni-NTA Agarose or glutathione-Sepharose beads used for the pull-down assays were initially equilibrated with binding buffer B (100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Hepes pH 7.2, 0.2% NP-40, 5% glycerol). Buffer B was supplemented with 5 mM of imidazole during all the steps of the His-tagged pull-downs. For the GST-tagged protein experiments, the glutathione-Sepharose beads were initially saturated with 10 mg/ml of BSA, followed by two washes with Buffer B prior to their use in the assays. Approximately 10 µl of the equilibrated beads was then incubated with 2 µg of the His or GST tagged constructs in a final volume of 200 µl (completed with Buffer B), for 1 h rotating at 4 °C. The beads were washed twice with Buffer B and incubated with 10 µl of translation lysate containing the ³⁵S-Met-labelled proteins, in Buffer B in a final volume of 200 µl, for 2 h at 4 °C. After three more washes, the bound proteins were eluted by addition of SDS sample buffer and the samples ran on 15% SDS-PAGE.

The gels were stained with Coomassie Blue (to visualize the recombinant proteins), and subjected to autoradiography. Labelled proteins were obtained through the linearizations of the various plasmids described previously (with *NotI* for pET-*LmEIF4G1*_{128–475} and the *LmEIF4G3* variants and with *XhoI* for pET-*LmEIF4G2*_{387–705} and pRSET-*LmEIF4A1-2*), followed by transcription with T7 RNA polymerase in the presence of the cap analogue and translation in the rabbit reticulocyte lysate supplemented with ³⁵S-methionine. To obtain the labelled human eIF4A, its cDNA in plasmid pET(His₆-eIF4A) [48] was first recovered by digestion with *NdeI/NotI* and subcloned into pET21A. The resulting plasmid was linearized with *NotI* and the eIF4A cDNA transcribed and translated as above. Labelled human eIF4G was obtained as described [49].

3. Results

3.1. Sequence analysis of four eIF4E homologues from *L. major*

To characterise *L. major* eIF4F homologues, we initially focused on four available eIF4E sequences which we named as *LmEIF4E1* (GeneDB ID—LmjF27.1620), *LmEIF4E2* (LmjF19.1500/LmjF19.1480), *LmEIF4E3* (LmjF28.2500) and *LmEIF4E4* (LmjF30.0450) (see Table 1). Naming of the various proteins described in this work followed the proposed nomenclature for *Leishmania* and *Trypanosoma* proteins [50]. The potential eIF4E sequences code for proteins ranging in size from 214 to 281, 349 and 447 amino acids, respectively, for *LmEIF4E1-4*, with homologies varying from 41 to 45% similarity to the human eIF4E homologue. Single genes present on chromosomes 27, 28 and 30 encode

Table 1

Summary of the sequence analysis of the various *L. major* eIF4F homologues, depicting identities (similarities) between the *Leishmania*/human sequences and between the *L. major*/*T. brucei* orthologues

<i>L. major</i> sequence	GeneDB ID	Predicted molecular weight (kDa)	Chromosome localization	Identity (similarity) to Human homologue ^a	Identity (similarity) to the <i>T. brucei</i> orthologue
<i>LmEIF4E1</i> ^b	LmjF27.1620	24	27	22% (42)	48% (61)
<i>LmEIF4E2</i> ^b	LmjF19.1500/LmjF19.1480	31.5	19 (2 genes)	27% (41)	45% (57)
<i>LmEIF4E3</i>	LmjF28.2500	38	28	27% (43)	49% (61)
<i>LmEIF4E4</i>	LmjF30.0450 ^c	33.8	30	28% (45)	37% (50)
<i>LmEIF4A1</i> ^b	LmjF01.0780/LmjF01.0770	45.3	1 (2 genes)	56% (74)	85% (91)
<i>LmEIF4A2</i>	LmjF28.1530	43.9	28	50% (71)	79% (89)
<i>LmDHH1</i>	LmjF35.0370	46.4	35	30% (50)	86% (92)
<i>LmEIF4G1</i>	LmjF15.0060	114	15	25% (43) ^d	31% (47)
<i>LmEIF4G2</i>	LmjF15.1320	145.9	15	21% (37) ^d	33% (49)
<i>LmEIF4G3</i>	LmjF16.1600	71.2	16	26% (39) ^d	38% (55)
<i>LmEIF4G4</i>	LmjF36.6060	84.6	36	22% (38) ^d	26% (45)
<i>LmEIF4G5</i>	LmjF10.1080	88.8	10	21% (37) ^d	43% (60)

Results obtained using the GenBank BLAST with the BLOSUM 62 Matrix.

^a Human eIF4GI. GenBank accession: Q04637.

^b GenBank accessions available: *LmEIF4E1*—CAB77676; *LmEIF4E2*—CAB94109 and CAB94111; *LmEIF4A1*—NP.047099.

^c Here the sequence used in our analysis includes the N-terminal extension, present in the *T. brucei* orthologue, which has been omitted from the *L. major* GeneDB annotation.

^d These sequences show similarity to the human sequence only at the level of the central HEAT domain.

LmEIF4E1, 3 and 4, respectively. In contrast, *LmEIF4E2* is encoded by two identical genes contained within a small duplicated region on chromosome 19, which also includes an unidentified trans-membrane protein ORF, separated by approximately 4.5 kb.

In order to compare conserved features in the four *Leishmania* eIF4E homologues we aligned these sequences with characterised human, yeast and plant eIF4E proteins (Fig. 1). Two distinct *Caenorhabditis elegans* homologues with contrasting cap binding affinities – IFE-1 which binds both monomethylated and trimethylated caps and IFE-3 which only binds a monomethylated cap [51] – were also included in the alignment. For simplicity, all the numbers mentioned in Fig. 1 will refer to the amino acids' position in the human eIF4E sequence which is representative of the mammalian protein (only three substitutions in the N-terminus distinguish the human and mouse sequences). eIF4E is characterised by eight tryptophan residues located at conserved positions along the protein [41,12]. *LmEIF4E2* contains all eight of these tryptophan residues, *LmEIF4E1* contains seven, *LmEIF4E4* five and *LmEIF4E3* only four. Three-dimensional structures of mouse eIF4E and its yeast homologue, both bound to 7-methyl-GDP, were solved by X-ray crystallography [41], and by solution NMR spectroscopy [52], respectively. The complex is shaped like a cupped hand, with the cap analogue located in a narrow cap-binding slot on the concave side of the protein. Recognition of the 7-methylguanine moiety is mediated by base sandwich-stacking between W56 and W102, formation of three Watson-Crick-like hydrogen bonds with a side-chain carboxylate of a conserved E103 and a backbone NH of W102, and a van der Waals contact of the N(7)-methyl group with W166. The four residues making contacts with 7-methylguanine are conserved among most known eIF4E proteins (see Ref. [41] and Fig. 1). All four are present in both *LmEIF4E1* and *LmEIF4E2*, while in *LmEIF4E3-4* W56 is replaced by a methionine and a glutamate, respectively. Of the three residues that interact with the two phosphate groups, R157 is absolutely conserved in eIF4E sequences, and the remaining two residues (R112 and K162) make either direct or water mediated contacts with phosphates and are either arginine or lysine [41]. In the *Leishmania* proteins, *LmEIF4E1* and 2 contain K112, R157 and R/K162, respectively, while both *LmEIF4E3-4* contain only R157, and lack basic residues at 112 and 162. On this basis, *LmEIF4E1* and 2 possess all the features expected of a 7-methyl-GDP-binding protein, while *LmEIF4E3-4* have some, but not all, the predicted features.

eIF4G binds the convex dorsal side of eIF4E primarily due to the interaction between W73 of eIF4E and three amino acid side chains of the eIF4E binding peptide, YXXXXLphi (where X can be any amino acid and phi is usually a hydrophobic amino acid such as L, M or F [23]), also present in eIF4E-binding proteins [53,54]. Mutation of W73 to A or R, respectively, in the mouse and yeast eIF4Es abolishes binding to eIF4G, while the yeast F73 eIF4E mutant maintains

binding to eIF4G [55,31]. *LmEIF4E2*, 3 and 4 contain W73, while *LmEIF4E1* contains F73 (Fig. 1); thus on this basis all four proteins would be predicted to be able to interact with eIF4G.

The most striking differences between the *Leishmania* proteins and known eIF4Es include the *LmEIF4E3-4* N-terminal extensions of about 80 and 190 amino acids, respectively, a shorter C-terminus for *LmEIF4E1* and the significant insertions of variable number of amino acids at specific positions in the first three *Leishmania* proteins. *LmEIF4E1* is distinguished by the presence of a 21 amino acids long insertion not observed in other eIF4E sequences. *LmEIF4E2* has two short insertions, one of them also present in *LmEIF4E3*, which are located next to amino acids relevant to cap binding, and a third long insertion on its C-terminus. Comparison with the two nematode eIF4E sequences included in Fig. 1 does not indicate any motifs that may be involved in differential cap recognition and indeed it seems that the multiple eIF4E homologues evolved independently in both systems. Nevertheless, a comparison between the *L. major* and *T. brucei* eIF4E sequences (Table 1; see Section 4) confirm that all the specific features mentioned above for the various *L. major* proteins, with minor variations, are also conserved in the four *T. brucei* homologues. Such conservation indicates that the multiple eIF4E proteins are conserved within the family *Trypanosomatidae* and play significant roles during the parasites' life cycle.

3.2. Expression analysis and quantitation of *LmEIF4E1-3* in *L. major* promastigotes

LmEIF4E1-3 (*LmEIF4E4* was only identified later in this study) were expressed in *E. coli* His-tagged or as GST-fusions and isoform-specific antibodies generated in rabbit against the three proteins. These antibodies were affinity purified and tested in Western blots against the recombinant GST fusions to confirm their specificity. No cross-reaction was observed to the other recombinant *L. major* eIF4Es (data not shown). They were then used to analyse the expression and to estimate the cellular levels of *LmEIF4E1-3* in extracts of exponentially growing *L. major* promastigotes (Fig. 2). All three proteins were detected in these extracts although their levels varied significantly, with *LmEIF4E3* being very abundant ($>5 \times 10^4$ molecules/cell) and both *LmEIF4E1* and 2 present at much lower levels (about $2-4 \times 10^3$ and 10^3 molecules/cell, respectively—Table 2). When compared to yeast eIF4E ($3.2-3.6 \times 10^5$ molecules/cell [56]), even *LmEIF4E3* is expressed at levels lower than those obtained for the yeast protein. However, considering that in yeast, a significant fraction of the eIF4E pool is not complexed to eIF4G (present at only $(1.5-2) \times 10^4$ molecules/cell) these levels could account for the production of enough eIF4F for the survival of the organism. Nevertheless it seems unlikely that the levels of either *LmEIF4E1* or *LmEIF4E2* alone would be sufficient to support translation in these parasites, at least in the promastigote stage.

LmEIF4E4	1	MSTPLDVRAA	EYSPSFAVTM	KKTVA AAPK	SPAPAKSKIS	VTRTGVNTTY	PMPPPMPKPN	YAPFFAEGCQ	TIAASKASMP	PVQPASPLPP	MHSAPPTASV	VSNSIPSSSP	
LmEIF4E3	1		MNPSAAA	YIPQQSDAKG	DPKSSSAAAV	AKPPSTQPAT	KLSAAAEFPV	PGGPKQMSAT	STHVDPKATT	EDEKTTAPLL	MECPASSLPD	SAAAAGAAKK	
LmEIF4E4	111	ATAPGERSPA	VAARSVPTRF	SPATVPRHHM	NPNATEFMPG	RRNGPDGGL	ALPTSTADME	LAKTPAGAAA	AAVHAPSLPG	AVRRSLQNSP	IIQPSRLSVK	SASEIEAISK	
						S1				S2	H1		S3
						SSSSSS	SSSS			SSSS	SSSSSHHHHH	HHHHH	SSSSS
						↓ ↓	*		*		↓ ↓	*	#
HseIF4E	1	MAT	VEPETTPTPN	PPTTEEEKTE	SNQEVANPEH	YIKHPLQNRW	ALWFFKND--	-----KS	KTWQANLRLL	SKFDTVEEFW	ALYNIQLSS	NLMPGCDYSL	
SceIF4E	1	MSV	EEVSKKFEEN	VSVDDTTATP	KTVLSDSAHF	DVKHPLNTKW	TLWYTKPAVD	-----KS	ESMSDLLRPV	TSEQTVEEFW	AIIONAPEPH	ELPLKSDYHV	
TaeIF4E	1	MAEDTE	TRPASAGAE	REEGEIADDG	DGSSAAAAGR	ITAHPLENAN	TFWFDNPQGG	S-----RQ	VAMGSTIHPI	HTFSTVEEFW	GLYNNIHNPS	KLVNGADEHC	
CeIFE1	1	MSD	SEIAF----E	KLKISGEKEG	MTETEQ--TT	APIYPLKRNW	TWYLYNDE--	-----RN	KSWEDRLKKV	YTFNTVSEFW	ALYDAIRPFS	GLNALCDYNV	
CeIFE3	1	MST	SVAEN----K	ALSASGDVNA	SDASVP-PEL	LTRHPLQNRW	ALWYLKAD--	-----RN	KEWEDCLKMV	SLFDTVEEFW	SLYNNIQSAG	GLNWGSDYYL	
LmEIF4E1	1				MS	APSSVPPHKM	ANLHKLQRAW	-----NT	ENWEMSLVPI	MTVHSVEEFW	VMLRYMKPLH	ALRTSSQYHF	
LmEIF4E2	1				MDPNT	CAPASAVTDE	QPLTLWGTV	EMWCDMPQRQ	QGQST---EN	TNMLEQVKSI	GLFDSAEFGW	GIFNCTILFS	WLPNGSYYL
LmEIF4E3	98	EADENDSQL	DWLPEAQPTD	WSESKLPKLF	GCHNTAAKAT	SSAIPPLHSM	DLYADHDHQS	SNMASNSSTP	STMSFEPIFV	SNVGDVESFW	RLWRYLPAPS	ALPTVYTSYW	
LmEIF4E4	221	NSALNAAAA	YVPQRTLARV	VLTQPSP-LA	LAPSEDPKPN	NIEMMLDDLW	CLEYLPTTLG	E-----NI	KEEDYNPTLV	FRVDSILTFW	RVVNNIAAPS	ELQLSTLY-L	
						S4		H2		S5			
						SS	SSS	SSSSS	HHHHHHHHHH	SSSSS	S	SSS	SS
						* ↓		* ↓ ↓ ↓			↓		
HseIF4E	94	FRDGLTPMWE	DERNNRGGGR	WLITLNKQQ	-----	RRSDIDRFWL	ETLLCLTGES	FDDYSDD--	---VCGAVV	N-VRAK---	-----GD		
SceIF4E	96	FRNDVRPEWE	DEANAKGGK	WSFQL-RGK	-----	-GADIDELWL	RTLLAVIGET	IDEDDSQ--	---INGVVL	S-IRKG---	-----GN		
TaeIF4E	100	FKNKLEPKWE	DPICANGGK	WTISCGRGK	-----	---SDTFWL	HTLLAMIGE	ED-FGDE--	---ICGAVV	S-VROK---	-----QE		
CeIFE1	88	FRDDIQPMWE	VPENSNNGGR	WLIVIDKGG	-----	TPEMVDAILWL	EILMALVGEQ	FGKDMES--	---ICGLVC	N-VREK---	-----GS		
CeIFE3	89	FRKGLTPMWE	DVNNVCGGR	WLIVVDKQR	-----	RTQLLDHYWL	ELLMAIVGEQ	FDEYGDY--	---ICGAVV	N-VROK---	-----GD		
LmEIF4E1	75	FOEGVKPMWE	DPANKKGGKL	WVNLDTISAN	GRSSNNNTSG	TSAADGSAAE	AKTDLDKAE	NVLMATVCEY	LDCVDKKTDP	TEPFVTGIVM	S-KRKY---	-----HN	
LmEIF4E2	83	FRKHTAPMWE	HEANRRGGK	WVVPFT-GKA	SRSEG---	DLQPVDEAWQ	TLCLSAITGEL	FPGDEEE--	---ICGVTV	SRGRQRTLPS	GHATSALSEW		
LmEIF4E3	208	FRKDLTPMWE	HPRNKKGGTI	SIVVFDRDRS	GLS-----	DKQVLDVDEM	AMLVGAVGES	FHECSTT--	---LNGIML	K-VRSNK---	-----PV		
LmEIF4E4	322	FRDGLTPMWE	DPANRDGGIV	KVKATAAQ--	-----	---VDEANE	LLLCRTIGDS	WSPSVRET--	---VNGVVL	K-VREK---	-----AY		
						S6	H3		S7	H4		S8	
						SSSSSS	HHHHHHHHH	HHHHH	SSSS	HHHH	H	SSSS	
						↓	*						
HseIF4E	162	KIAIWIITECE	NREAVTHIGR	VYKERLGFPP	KIV-----	-----	-----	-----	-IGYQSHADT	ATKSGSTTKN	RFVV		217
SceIF4E	162	KFALWTK-SE	DKEPLLRIIG	KFKQVILKLD	DGH-----	-----	-----	-----	-LEFFPHSSA	NGRHPQPSIT	L		213
TaeIF4E	163	RVAIWIITKNA	NEAAQISIGK	QWKEFLDYKD	S-----	-----	-----	-----	-IGFIVHED-	AKRSDKGPKN	RYTV		215
CeIFE1	156	KISVWTKDCN	DDETNNRIGV	VLKEKLMAS	KDHSKPLFDV	-----	-----	-----	-TRYEDHESC	QKKTSSVVK	KLSLHSSD-A	PVAEKSAV	231
CeIFE3	157	KVSLWTRDAT	RDDVNLRIQ	VLKQKLSIPD	TEI-----	-----	-----	-----	-LRVEVHKDS	SARTSSTVKP	RICLPAPKPA	PVKEKGPAAT	
LmEIF4E1	172	RLAVWVSDAS	ATDKIEALKK	ALTKEASLAP	IAS-----	-----	-----	-----	-MVETKHGEA	S			214
LmEIF4E2	169	KLCLWTRISAD	NRGSQIRIAE	YIRGQLHLQP	PSKEASRDGK	SGEQDTLMEM	PRSPDRSPVA	KMREASGIPS	AMTYVAHRDL	MEAKQEFVKG	GSSVAQAFRP	KYTLAIDVRN	
LmEIF4E3	282	TLQLWTAHSE	VGKLKAFANS	VRDTLTAKIM	AKTLQK----	-----	-----	-----	-LEYYSHHQK	QAATNSLAAR	MKGKTKISPD	HTF	349
LmEIF4E4	387	WLELWVTKNS	SA-LQKDLAE	LWHPIIGASF	A-----	-----	-----	-----	-TTYLTTHAMM	QERSHAAAAL	AAEKQKKNRR	RY	447
CeIFE3	229	TSPSPNGTEA	TGTSPATPTP										248
LmEIF4E2	279	EGV											281

Fig. 1. Sequence comparison of the putative *L. major* eIF4E homologues with the human, yeast, plant and nematode sequences. Clustal W alignment of different eIF4E homologues from selected organisms. Amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, while amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, on more than 60% of the sequences, are shown in pale gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dashes) to allow better alignment. The structural elements of the mammalian protein are shown numbered S1–S8 and H1–H4 (from [41]). * indicates the conserved tryptophan residues. Double arrows highlight amino acids required for the interaction with the cap structure. Single arrows indicate conserved non-tryptophan residues shown to be involved in eIF4G binding [53]. # indicates the amino acid D90, replaced by a Q in *LmEIF4E1* (Q71) and shown in Fig. 4. Relevant GenBank accession numbers: human (Hs)—P06730; yeast (*S. cerevisiae*, Sc)—P07260; plant (*Triticum aestivum*, Ta) P29557; nematode (*C. elegans*, Ce) IF4E1 and IF4E3—NP_499751 and NP_503124, respectively.

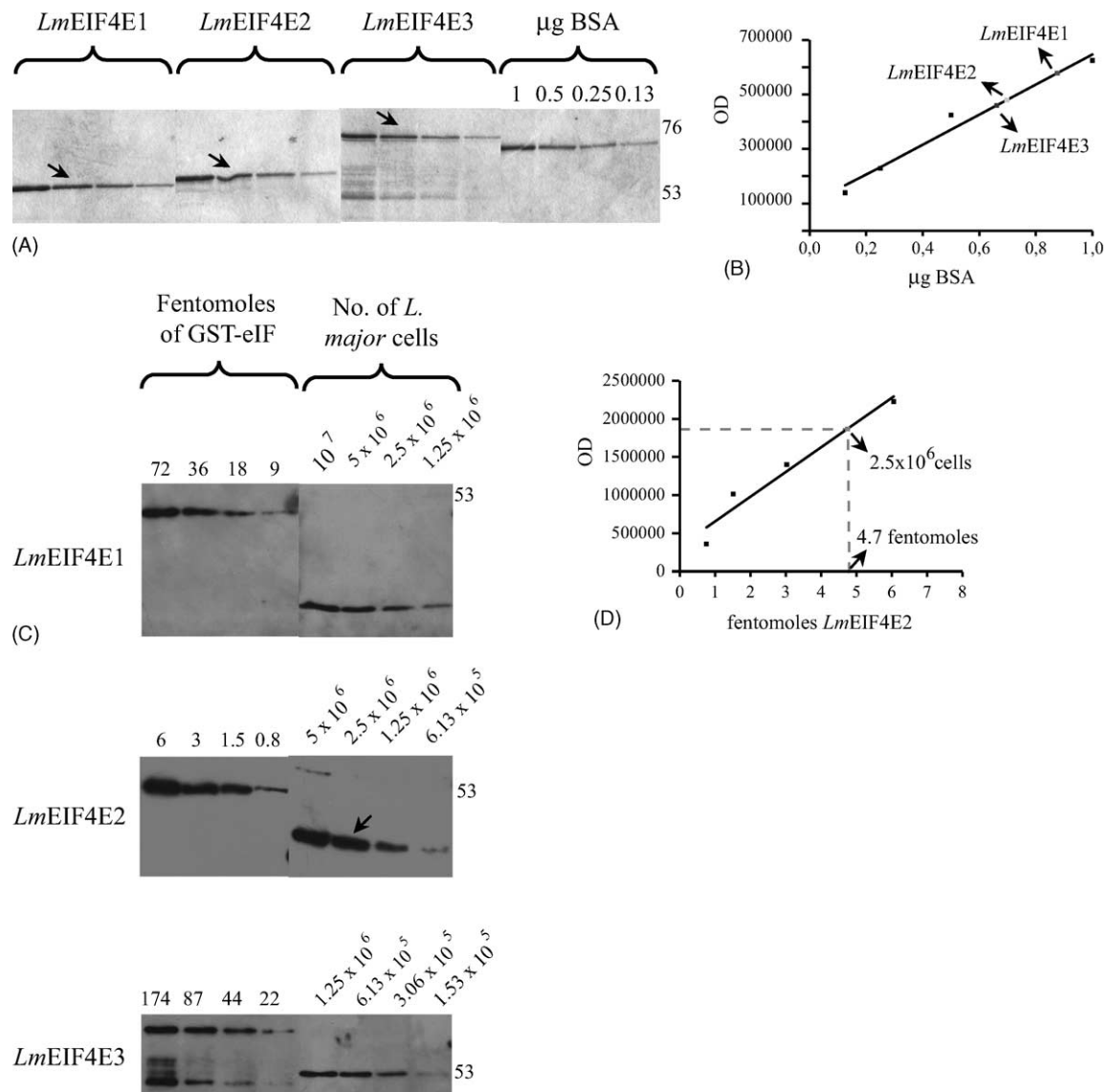


Fig. 2. Expression analysis and quantitation of *LmEIF4E1-3* in exponentially grown *L. major* promastigotes. (A) Serial dilutions of recombinant GST-tagged *LmEIF4E1-3* compared in Coomassie Blue stained gels with known concentrations of BSA. (B) Quantitation of the recombinant proteins (a representative example is shown). The bands from the BSA curve shown in A were quantified by densitometric scanning and plotted as a function of the BSA concentration. To calculate the concentration of recombinant *LmEIF4E1-3*, the optical density of representative bands from these proteins (indicated by arrows in the figure) was determined to derive approximate quantities using the BSA curve. (C) Expression analysis of *LmEIF4E1-3* in extracts of *L. major* promastigotes. The different recombinant GST-fusions, diluted to appropriate concentrations (in fentomoles), and whole parasite extracts were fractionated by 15% SDS-PAGE and analysed by western blotting with the isoform specific sera. (D) Procedure for the quantitation of the endogenous levels of the various factors using *LmEIF4E2* as an example. The Western blot result shown in C for GST-*LmEIF4E2* was quantitated by densitometry and plotted as a function of fentomoles of recombinant protein. The optical density obtained for the endogenous factor at 2.5×10^6 cells (arrow) was then used to calculate its concentration in fentomoles (4.7 fentomoles in the example). The same procedure was used for the different factors including *LmEIF4A1* and *LmEIF4G3*. All the results presented are representative of at least six different experiments using a minimum of three independently grown cell cultures. The data obtained from the various experiments were processed as described above and used to calculate the values shown in Table 2. On the right of the various panels in A and C are shown the sizes in kDa of protein molecular weight markers.

3.3. Cap binding assay of the putative *LmEIF4Es*

LmEIF4E1-3 were then labelled with ^{35}S -Met by in vitro translation and tested for their ability to recognise the mammalian monomethylated cap. As a positive control, *Xenopus* eIF4E was also labelled and used in the same assay. All four proteins were tested in binding assays with the resin

7-methyl-GTP Sepharose 4B, followed by washes with GTP and elution with the cap analogue. The *Xenopus* eIF4E bound to the resin as expected, and was eluted with the cap analogue. In contrast, of the three *L. major* proteins, only *LmEIF4E1* was capable of binding to the resin (Fig. 3). Binding was specific since GTP did not release the protein and in parallel experiments performed with CL6B Sepharose no bind-

Table 2

Summary of the quantitation of the various *L. major* eIF4F homologues in promastigotes

<i>L. major</i> sequence	Fentomoles/10 ⁶ cell	No. of molecules/cell	No. of molecules/cell in yeast ^a
<i>LmEIF4E1</i>	5.2 ± 2.5	3.2 ± 1.5 × 10 ³	(3.2–3.6) × 10 ⁵
<i>LmEIF4E2</i>	1.8 ± 0.5	1 ± 0.3 × 10 ³	
<i>LmEIF4E3</i>	117 ± 56	7.1 ± 3.4 × 10 ⁴	
<i>LmEIF4A1</i>	594 ± 218	3.6 ± 1.3 × 10 ⁵	(7–9) × 10 ⁵
<i>LmEIF4A2</i>	ND	ND	
<i>LmEIF4G3</i>	10.6 ± 4.1	6.4 ± 2.5 × 10 ³	(1.5–2) × 10 ⁴

^a Numbers based on Ref. [56] for yeast eIF4E, eIF4A and eIF4G. ND: not determined.

ing was observed (not shown). *LmEIF4E2* and 3 lacked any affinity with the resin, both labelled proteins eluted in the flow-through. These results confirm that at least one of the *Leishmania* putative eIF4E homologues (*LmEIF4E1*) has all the hallmarks of a typical eIF4E, including size, sequence and cap-binding ability.

3.4. Modelling of *LmEIF4E1*

In order to better define the structure/function conservation of the three *L. major* eIF4E homologues (*LmEIF4E1*–3), we attempted to model their structure based on the mammalian eIF4E structure [41]. However, adequate modelling of both *LmEIF4E2* and *LmEIF4E3* was prevented due to the insertions between the first two β -strands (S1 and S2 in Fig. 1) which are essential to define the cap-binding slot. In contrast, the 21 amino acids long insertion in *LmEIF4E1*, which is located in a loop between a β -strand and an α -helix (S4 and H2), did not prevent its modelling since it does not cause major interferences with the β -sheet or the general structure. In addition to the MODELLER pseudo-energy term, the quality of the models generated for *LmEIF4E1* was also independently evaluated by the programs PROCHECK, Verify 3D and WHATIF [43–45]. The representative model chosen was found to have self-consistency in terms of sequence-

structure compatibility and to be of good overall quality (Fig. 4).

The final *LmEIF4E1* model confirms the predictions derived from the alignment in that it is possible to observe that the interactions mediated by the amino acids W56, D90, W102, E103, R157, K162, R112 and W166 in mammalian eIF4E, which are required for specific binding to the 7-methyl-GDP, are taken over by the amino acids W37, Q71, W83, E84, K93, R167, R172 and W176 (Fig. 4B). The potential to bind eIF4G was also investigated through the analysis of the convex side of the molecule. The amino acid F54, replacing the crucial W73 in mammalian eIF4E, is placed in the expected position for the eIF4E/eIF4G interaction (Fig. 4C). Also shown in Fig. 4C are the amino acids H20 and V50 equivalent to H37 and V69 in the mammalian protein, as well as amino acids E134 and M138 substituting for L128 and L135 (Fig. 1). In mammalian eIF4E, these amino acids have been shown to be involved in the eIF4E/eIF4G interaction [53]. Their positioning in the *LmEIF4E1* model confirms that, despite the minor variations in sequence, not only *LmEIF4E1* but the other *L. major* eIF4E homologues too may bind eIF4G. Finally, an analysis of the electrostatic potential of both the cap binding slot as well as the eIF4G binding side in the *LmEIF4E1* model, using the program GRASP [57], does not show any significant differences in overall charges

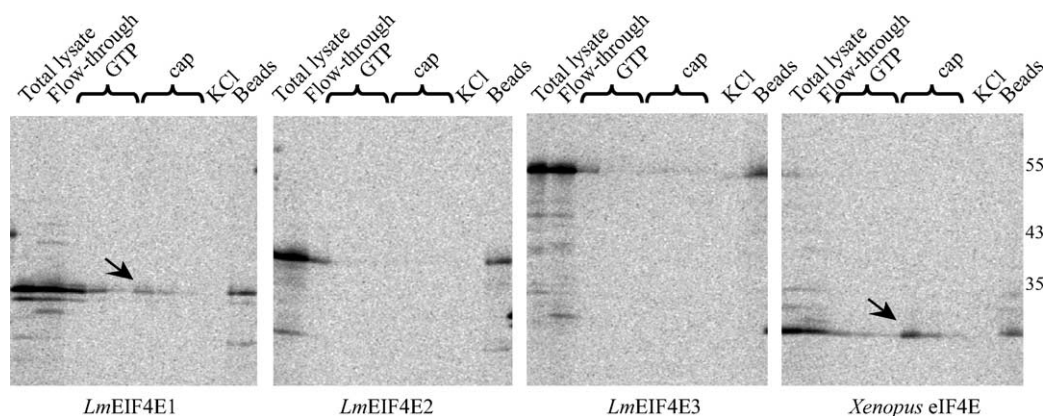


Fig. 3. *LmEIF4E1*, but not *LmEIF4E2* or 3, binds specifically to the eukaryotic cap analogue. The three *L. major* eIF4E homologues (*LmEIF4E1*–3), as well as the *X. laevis* eIF4E (*Xenopus* in the figure) used as positive control, were labelled with ³⁵S-methionine in vitro translation and tested for their ability to bind the resin 7-methyl-GTP Sepharose. Non-specific binding was removed by washes with GTP and specific elution was achieved with the cap analogue. Aliquots of the various washes were run on SDS-PAGE and compared with samples from the original translation reaction (Total lysate) as well as the non-bound fraction (Flow-through) and any protein remaining bound to the beads after washes with 2 M KCl and SDS-PAGE sample buffer (Beads). Arrows indicate proteins eluted by cap analogue. On the right are indicated sizes in kDa of protein molecular weight markers.

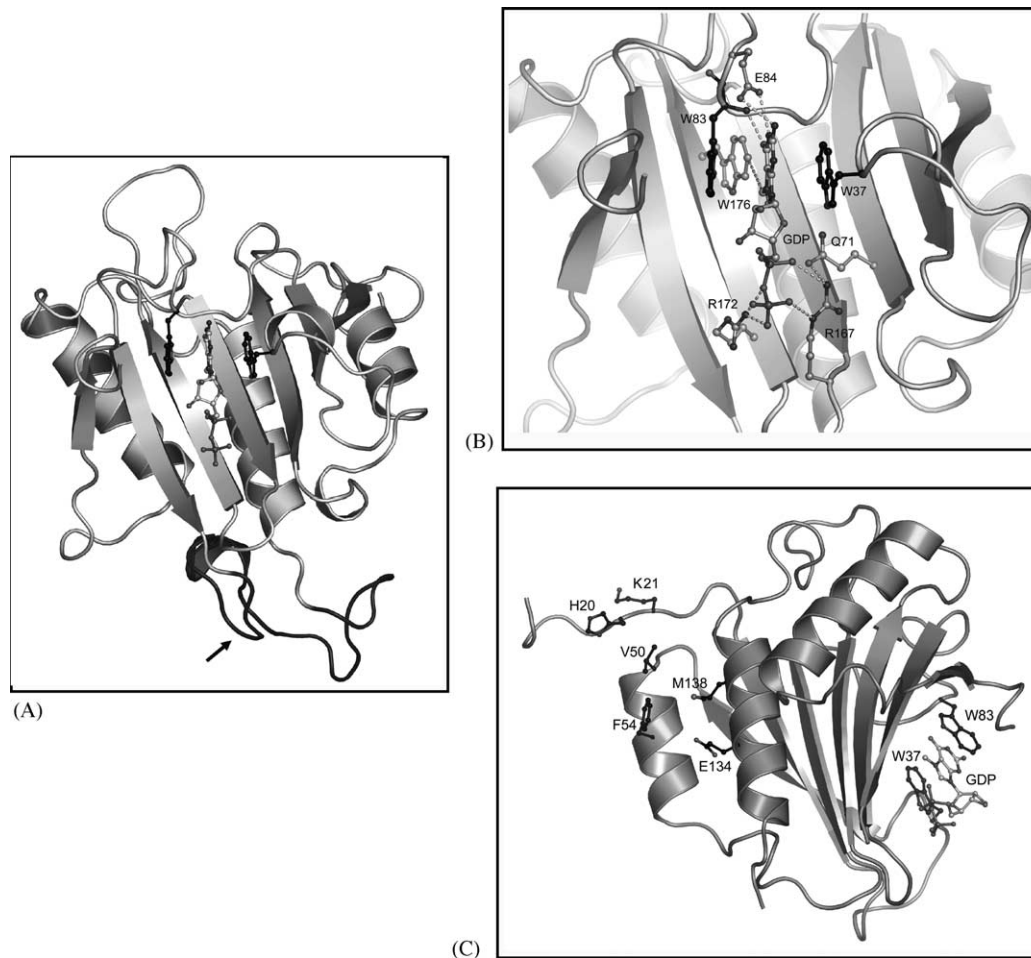


Fig. 4. Model of the predicted *LmEIF4E1* structure bound to 7-methyl GDP. Ribbon diagrams of the overall predicted *LmEIF4E1* structure and detail of the cap binding slot created using the program PyMol (<http://www.pymol.org>). (A) Model of the structure of *LmEIF4E1* bound to 7-methyl GDP, based on the mouse eIF4E structure [41]. W37 and W83 (equivalent to W56 and W102 in mammalian eIF4E) are shown binding the cap. The arrow indicates the loop specific to *LmEIF4E1* which could not be modelled adequately. (B) The cap binding slot in the predicted structure, highlighting the interactions between amino acids W37, Q71, W83, E84, R167, R172 and W176 and the cap nucleotide. The interactions mediated through water molecules are not shown so that the K93 interaction (corresponding to R112 in mammals) is omitted. (C) Side view of the *LmEIF4E1* model showing details of the predicted eIF4G binding surface. Amino acids H20, K21, V50, F54, E134 and M138 equivalent to H37, P38, V69, W73, L128 and L135 in the mammalian protein are highlighted. The cap binding slot with the W37 and W83 amino acids is also shown.

when compared with the mouse homologue (not shown). Once again these results confirm that *LmEIF4E1* has all the features required for a functional eIF4E homologue.

3.5. Sequence analysis of the two *L. major* eIF4A proteins

The RNA helicase subunit of the eIF4F complex, eIF4A, is a highly conserved eukaryote protein. The similarity between the described *L. major* eIF4A (*LeIF*) [36] here called *LmEIF4A1*, and the human eIF4A1 homologue is 74% (Table 1). *LmEIF4A1* (GeneDB IDs—*LmjF01.0780/LmjF01.0770*) is a 403 amino acids long protein encoded by two identical genes placed in tandem roughly 1.8 kb apart within chromosome 1 (Table 1). Blast searches with the human eIF4A as query using the raw sequence data from the *L. major* genome yielded both

LmEIF4A1 as well as a possible second eIF4A homologue from *L. major* (*LmEIF4A2*—*LmjF28.1530*), with 71% similarity to the human protein. The *LmEIF4A2* gene is located on chromosome 28 and codes for a 389 amino acids long protein. Orthologues to both *Leishmania* eIF4A proteins were also identified in *T. brucei*, indicating that they are conserved within the *Trypanosomatids* (Table 1).

Fig. 5 shows a sequence alignment comparing both *L. major* eIF4A sequences with those of human, yeast and plant eIF4A homologues. We have also included in the alignment human eIF4AIII (a negative regulator of translation [58]), a related Eubacteria protein (*EcW2*) which may also be involved in translation initiation [59], an Archae DEAD-box protein (*MjDEAD*) whose structure has been solved [60], as well as two unrelated eukaryotic RNA helicases, *LmDHH1* and *Spisula* p47 (see below). eIF4A and other related DEAD-box RNA helicases are characterised by nine motifs (motifs I,

		*****										***		*****	
HseIF4A1	1	MS---	ASQDSRSRDN	GPDGMEPEGV	IES---NWNE	IVDSFDDMNL	SESLLRGIYA	YGFEKPSAIQ	QRAILPCIKG	Y-DVLAQAQS	GTGKTATFAI				
HseIF4A3	1	MATTA	TMATSGSARK	RLIKEEDMTK	VEFETSEEVD	VTPTFETMGL	REDLLRGIYA	YGFEKPSAIQ	QRAIKQIILG	R-DVLAQSSQ	GTGKTATFSI				
SceIF4A	1	MS---	-----E	GIIDIE-ESQ	IQT---NYDK	VVYKFIDMBL	DENLLRGVFG	YGFEPSAIQ	QRAIMPILEG	H-DVLAQAQS	GTGKTATFSI				
TaeIF4A	1	MAGMAPEG	SQFDAKNYDS	KMQELLSQGE	TEEFFTSYDE	VHESFIDMGL	QENLLRGIYA	YGFEKPSAIQ	QRGLVPFCKG	L-DVLAQAQS	GTGKTATFCS				
LmEIF4A1	1	MAQ--	-----ND	KIAPQDQDSF	LDD---QPGR	PIPSFIDMPL	HQNLLRGIYS	YGFEKPSAIQ	QRAIAPFTRG	G-DVLAQAQS	GTGKTATFAS				
LmEIF4A2	1			METEQVDN	IQAN----VL	ALPTFAMGL	KEDLLRGIYS	YGFEKPSAIQ	KRFIMPFCKG	R-DVLAQAQS	GTGKTATFAS				
EcW2	1			MMSYVDWPPL	LLRHTYYMAE	FETTFADLGL	KAFILEALND	LGFEKPSAIQ	AECIPLHLNG	R-DVLAQAQS	GTGKTATFAS				
MjDEAD	1				MEV	EYMNENELNL	SDNINAIARN	KGFEKPTDIO	MKVLPFLFND	EYNIVAAQART	GTGKTATFAS				
Ssp47	1	MASVKVDHAI	NHSSPATNDL	KGDAHDQGWK	TKLTVPPKDT	RVKTSADVNT	KGNEFEDFCL	KRELLMGIFE	KGNFSPSEIQ	EASTPIALTG	R-DVLAQAQS	GTGKTATFAS			
LmDHH1	1			MSDSNWK	AQLNAPQKST	RKKTEDVESR	RNVNFEYAL	RRELQMGIFE	KGFEKPSAIQ	EEATPVALQG	K-DVLAQAQS	GTGKTATFAS			
		* ****										*****		*****	
HseIF4A1	89	SILQOIELDL	KATQALVLAP	TRELACQIQK	VVMALGDYMG	AS---CHACI	GGTNVRAEVO	KLOMEAPHIL	VGTPGRVFDI	LNRRYLSPKY	TKMFLVDEAD	EMLSRGFKDQ			
HseIF4A3	95	SVLQCLDIQV	RETQALVLAP	TRELACQIQK	GILALGDYMN	VQ---CHACI	GGTNVGEDIR	KED-YGQHVV	AGTPGRVFDI	IRRRSLRTRA	TKMFLVDEAD	EMLNKGFKDQ			
SceIF4A	79	AALQRIDTSV	KAPQALMLAP	TRELACQIQK	VVMALAFHMD	IK---VHACI	GGTSFVEDAE	GER--DAQIV	VGTPGRVFDI	IQRRRFRTRD	TKMFLVDEAD	EMLSSGFKDQ			
TaeIF4A	98	GILQQLDYGL	VEQALVLAP	TRELACQIEK	VMRALGDYLG	VK---VHACV	GGTSVR-EDQ	RELASGVHVV	VGTPGRVFDI	VRRQSLRPDN	TKMFLVDEAD	EMLSRGFKDQ			
LmEIF4A1	83	GILQRLDFRH	NLIQALVLSP	TRELACQTAI	VISRIEGFSL	NSSKFCETFF	GGTRVQDDIR	KIQ-AGVIVA	VGTPGRVSDV	IKRGALRTES	LRVLVDEAD	EMLSQGFADQ			
LmEIF4A2	74	CLLQACDPHT	RETQALVLSP	TRELACQTDQ	LCNNIGHHMG	LT---AYACI	GGKSTEEDIR	REE-SGVHIV	SGTPGRVFDI	IRRRSLRVNG	TKMFLVDEAD	EMLGKGFADQ			
EcW2	80	PILQNLDPDL	KAPQALVLAP	TRELACQVAE	AMTDFSKHMR	GVN--VVVLY	GGQRYDVQLR	AGR-QGPQIV	VGTPGRVLDH	LKRGTLIDLSK	LSGLVDEAD	EMLRMGFED			
MjDEAD	64	PLIELVN-EN	NGIEALILAP	TRELACQVAD	EIESLKGNKN	-LK--IAKIY	GGKATYPOLK	AKK-N-ANIV	VGTPGRVLDH	INRGTLNLKN	VKYFLVDEAD	EMLNMGFKDQ			
Ssp47	110	PILERIDNTK	DEVQAMCTVP	TRELACQTSQ	ILIELSKHI-	GAK--IMVT	GGTNLKDDIM	RIY-EPVHAT	VATPGRVLDL	MNKNLVKIGK	CGILVDEAD	KILLSQDFKGM			
LmDHH1	87	PVLEKVDTRE	LYVQALLMVP	TRELACQTAQ	VTKLGLGKHIP	GLE--VMVT	GGTLIRDDIL	RET-SKVHIL	VATPGRVLDL	ASKKAVDLSH	CHILVDEAD	KILLSQBFMEI			
		***										*****		*****	
HseIF4A1	196	IYDIFQKINS	NTQVLLSAT	MPSEVLEVTK	KFMRDPPIRIL	VKKEBLTLEG	IKOFFYVNER	EEWKLDTLCD	LYETLITLQA	VIFCNTRRKV	DWLTBKM HAR	DFTVSAHMGD			
HseIF4A3	201	IYDVRYLFS	ATQVLLSAT	LPHEILEMTN	KFMTDPIRIL	VKRDELTLLEG	IKOFFEVAVER	EEWKFDTLCD	LYDTLITLQA	VIFCNTRRKV	DWLTBKMREA	NFTVSAHMGD			
SceIF4A	184	IYQIFTLBP	TQVLLSAT	MPNDVLEVT	KFMRNPVRIL	VKKDELTLLEG	IKOFFYVNEE	EEYKYBCLTD	LYDSISVITQA	VIFCNTRRKV	EELTTKLRLND	KFTVSAHMGD			
TaeIF4A	204	IYDIFQLLP	KIQGVFSAT	MPPEALEITR	KFMNKPVRIL	VKRDELTLLEG	IKOFFYVNEK	EEWKLDTLCD	LYETLITLQA	VIFCNTRRKV	DWLTBKMGRG	DHTVSAHMGD			
LmEIF4A1	192	IYEIFRFLBK	DIOVALESAT	MPPEVLELTG	KFMRDPVRIL	VKRDELTLLEG	IKOFFYVNEE	EEWKLDTLCD	LYETVSTAOQ	VIFCNTRRKV	DWLTBKMGRG	NHTVSAHMGD			
LmEIF4A2	180	IYDIFRFLBK	LOIILVSAT	LPADVLEMT	KFMTPEPTSL	VKRDELTLLEG	VKQYFVSVD	EKNKFDVLMR	LYDSLITLQA	VIFCNTRRKV	EQLAKKMTRE	KFAVSAHMGD			
EcW2	187	VETIMAQHE	GHQTALESAT	MPPEAIRRITR	KFMTPEPTSL	VKRDELTLLEG	IKOFFYVNEE	EEWKLDTLCD	LYETVSTAOQ	VIFCNTRRKV	DWLTBKMGRG	NHTVSAHMGD			
MjDEAD	168	VEKILNACNK	DKRILLESAT	MPREITNLAK	KYMGDYSTFK	AKINAN----	IKOFFYVNEE	EEWKLDTLCD	LYETVSTAOQ	VIFCNTRRKV	DWLTBKMGRG	NHTVSAHMGD			
Ssp47	216	LDSTISHLEN	DRQILYSAT	FPLSVQCFMR	KYLQSFYEIN	L-MDELTLKG	VTOYAFVQ-	ERCKVCLNT	LENKLOINQS	IIFCNSTQVR	ELLAKKITEL	GYSCFYIHAR			
LmDHH1	194	IDDLYTYLES	QLOSMLESAT	FEVTVKTFAE	RHLHNPYEIN	L-MDELTLKG	VTOYAFVQ-	ERCKVCLNT	LENKLOINQS	IIFCNSTQVR	ELLAKKITEL	GYSCFYIHAR			
		*****										*****		*****	
HseIF4A1	306	MDQKERDVM	REFRSGSSRV	LITTDLLARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	406		
HseIF4A3	311	MPQKERESTM	KEFRSGASRV	LITTDLLARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREL	YIHRIGRGR	YGRKGVAINF	VKNDDIRILR	DIEQYYSTOI	DEMPFNVDL	I	411		
SceIF4A	294	LPQQRDRTIM	KEFRSGSSRV	LITTDLLARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	395		
TaeIF4A	314	MDQNRDRTIM	REFRSGSSRV	LITTDLLARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	414		
LmEIF4A1	301	MPKSDRERV	NTFRSGSSRV	LITTDLLARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	403		
LmEIF4A2	289	MPQARDEIM	QFRNGHSSRV	LITTDLLARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	389		
EcW2	296	MNQALREOTL	ERLKDGLDL	LITATDVARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	367		
MjDEAD	272	LSQSQREKVI	RLFKQKKIRL	LITATDVARG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	367		
Ssp47	324	MNQQRNRVF	HDFRQGLRN	LVCSDLETRG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	405		
LmDHH1	302	MNQQRNRVF	HDFRQGLRN	LVCSDLETRG	IDVQCVSLVI	NYDLPTNREN	YIHRIGRGR	FGRKGVAINF	VTEEDKRTLR	DIEFYNTSTI	DEMPFNVDL	I	405		
		*****										*****		*****	
EcW2	406	AKVQQQLESS	DLQYRALLS	KIQPTAEGEE	LDLETLAAAL	LKMAQGERTL	IVPPDGPMPR	KREFRDRDDR	GPRDRNRGP	RGDRDRPRR	ERRDVGDMQL	YRIEVRGDDG	449		
Ssp47	434	DDDDRVQKT	NGAPKA												
EcW2	516	VEVRHIVGAI	ANEGDISSRY	IGNIKLFASH	STIELPKVCR	VKCCNTLRAL	AFSTSR						571		

Fig. 5. Sequence comparison of the *L. major* eIF4A homologues with various related protein sequences. Clustal W alignment performed as described in Fig. 1 comparing the sequences of the *L. major* eIF4A homologues with selected sequences from several different organisms. * indicates the nine motifs typical of DEAD box RNA helicases [20,21]. Relevant GenBank accession numbers: human (*Hs*) eIF4A1—P04765; human eIF4AIII (*HseIF4A3*)—P38919; yeast (*S. cerevisiae*, *Sce*)—NP_012397; plant (*T. aestivum*, *Ta*)—P41378; Eubacteria (*E. coli*, *Ec*) W2—AAA23674; Archae (*M. jannaschii*, *Mj*) DEAD box protein—NP_247653; Clam (*S. solidissima*, *Ss*) p47—AAK85400.

Ia, Ib, II, III, IV, V and VI plus the recently identified Q motif), conserved among the various members of this protein family, with roles in ATP binding, and hydrolysis, and RNA-binding [61,20]. The crystal structure of yeast eIF4A [62] indicates that it assumes a “dumbbell” shape with two globular domains connected by a flexible linker and it implicates several conserved arginine residues as important for eIF4A/helicase function. It is thought that these domains interact so that the binding and hydrolysis of ATP influences RNA binding, and comparison with the structure of the related protein from the Archae *Methanococcus jannaschii* MjDEAD supports this model [60,21].

Overall, the alignment in Fig. 5 indicates that both *L. major* proteins share all the conserved motifs from RNA helicases, as well as several minor sequences typical of eIF4A. To support our identification of *LmEIF4A1* and 2 as possible eIF4A homologues, we searched the *L. major*

sequence databases for any related RNA helicases. The sequence with the nearest match (*LmDHH1* in Fig. 5) contains all the motifs which characterise the DEAD-box RNA helicases yet it shares a similarity of only 50% with the human eIF4A1 sequence (Table 1). Remarkably this protein has a much higher degree of similarity (82%) to the clam *Spisula solidissima* p47 RNA helicase [63], a member of the Dhh1/p54 family of RNA helicases, with roles in decapping and translational repression [63,64], suggesting that it is a Dhh1 homologue. The sequences aligned in Fig. 5, plus a few others which we judged relevant, were used in a neighbour-joining analysis to compare their phylogenetic relationships. The resulting tree (Fig. 6A) confirms that both *L. major* eIF4A homologues are more closely related to each other and to other eIF4A proteins involved in translation than to unrelated RNA helicases including *LmDHH1* and bacterial proteins, and also highlights the close

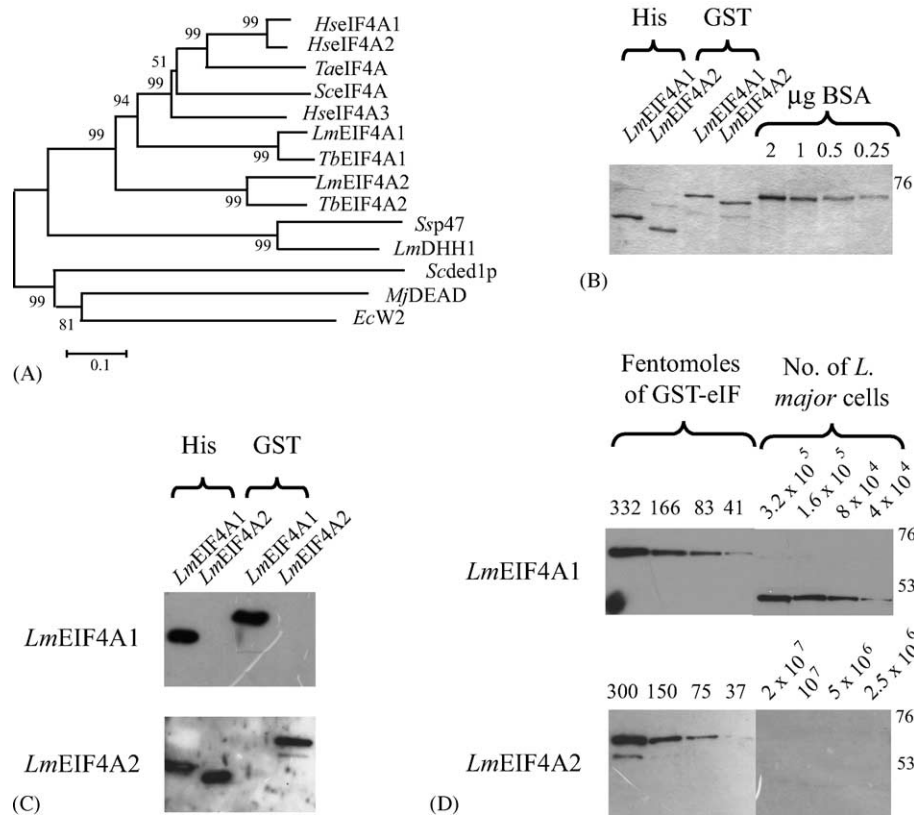


Fig. 6. *LmEIF4A1*, but not *LmEIF4A2*, is expressed as an abundant protein in *L. major* promastigotes. (A) Evolutionary relationship of the *L. major* eIF4A sequences. Neighbour-joining tree based on the alignment of various eIF4A sequences including *LmEIF4A1-2*. Bootstrap values are shown next to the respective branches (10,000 replicates). When compared with Fig. 5 we have included for this tree the sequences from: human eIF4A2 (GenBank accession AAH12547); *S. cerevisiae* ded1p (accession—NP_014847); *T. brucei* eIF4A1 (GeneDB ID—Tb09.160.3270); *T. brucei* eIF4A2 (GeneDB ID—Tb11.12.0011). (B)–(D) Expression analysis of the two putative *L. major* eIF4As done as described in Fig. 2 using recombinant *LmEIF4A1-2* as well as isoform specific purified antibodies. (B) Recombinant proteins used for antibody production (His) and quantitation assays (GST). Approximately 0.5 (His-*LmEIF4A2* and both GST proteins) or 1 μg (His-*LmEIF4A1*) of each recombinant protein was loaded on the gels and compared with known concentrations of BSA. (C) Analysis of the specificity of the antibody obtained against the recombinant proteins. Both GST and His-tagged fusions of *LmEIF4A1-2* were tested with the two antisera. For the *LmEIF4A1* assay, 12.5 ng of each recombinant protein were loaded on the gel whilst for *LmEIF4A2* 6.25 ng of the His and 25 ng of the GST fusions were used. Note that the antibody produced against His-*LmEIF4A2* cross-reacts with His-*LmEIF4A1* since both recombinant proteins share conserved epitopes introduced by the plasmid vector. These epitopes are absent from the GST constructs and from the protein used to produce the anti-*LmEIF4A1* antibody. (D) Analysis of the expression of both *LmEIF4A1* and *LmEIF4A2* in total *L. major* extracts. Quantitation of *LmEIF4A1* in promastigotes was performed as described for the *LmEIF4E* homologues in Fig. 2.

conservation between the *Leishmania* and *T. brucei* orthologues.

3.6. *LmEIF4As* quantitation and expression analysis in *L. major*

Both the *LmEIF4A1* and the *LmEIF4A2* coding sequences were amplified from *L. major* genomic DNA, expressed in *E. coli* and purified in His- or GST-tagged forms. Fig. 6B shows a sample of the representative recombinant proteins. His-tagged *LmEIF4A1* and 2 were then used to immunize rabbits to obtain specific antisera. The resulting antibodies were affinity purified and used to confirm their specificity as well as to determine their cellular levels in total *L. major* extracts as described for the *LmEIF4Es* (Fig. 6C and D). *LmEIF4A1*, readily detected in promastigotes, is a very abundant protein with about $(3\text{--}5) \times 10^5$ molecules per cell (Fig. 6D, Table 2). This concentration is not very different from that of yeast eIF4A [56], and the eIF4A/eIF4E ratio in yeast is similar to that of *LmEIF4A1/LmEIF4E3*. These values are also consistent with results in HeLa and reticulocyte lysate where eIF4A has been found to be a very abundant translation initiation factor present at levels approximately 10-fold higher than eIF4E [65,66]. In contrast we could not detect *LmEIF4A2*, even in 2×10^7 promastigote cells (Fig. 6D). We estimate from the sensitivity of the *LmEIF4A2* antibody that levels above 3×10^3 molecules/cell would have been detected. However in this case, its abundance would be at least 60–150-fold lower than that of *LmEIF4A1*. We conclude then that *LmEIF4A1* is the functional homologue of eIF4A in *L. major* promastigotes and that *LmEIF4A2* is either expressed in other stages of the parasite life cycle, or is a rare factor which is unlikely to have a prominent role in general translation.

3.7. Identification of candidate *LmEIF4G* homologues

In contrast to eIF4A, the eIF4G subunit of eIF4F is a much less conserved protein at the sequence level. The two functionally equivalent eIF4G homologues in mammals (eIF4GI and II) and in yeast (Tif4631 and Tif4632) are only ~45% identical. However, the central eIF4A/RNA binding domain is conserved in the eIF4G sequences from divergent organisms (reviewed in [12]). The recently solved structure of this domain from human eIF4GII consists mostly of alpha-helices organised into HEAT repeats [26]. The eIF4G HEAT domain not only mediates the interaction with eIF4A and RNA [26], but in yeast was also implicated, together with flanking sequences, in the binding to eIF5 and eIF1 to bridge the interaction between eIF3 and eIF4G [67,68]. A second motif conserved in eIF4G sequences from distantly related organisms is the eIF4E binding peptide [23], whilst the PABP binding region does not appear to be conserved in sequence from yeast to mammals [69,25].

Using the human eIF4GI as a BLAST query, we found five *L. major* ORFs containing the conserved central eIF4G domain (*LmEIF4G1*, GeneDB ID—LmjF15.0060;

LmEIF4G2—LmjF15.1320; *LmEIF4G3*—LmjF16.1600; *LmEIF4G4*—LmjF36.6060; *LmEIF4G5*—LmjF10.1080). The five proteins vary significantly in size (ranging from 1016 to 1425, 635, 765 and 782 amino acids for *LmEIF4G1*–5, respectively), overall charge (positive in *LmEIF4G1* and negative in the other four) and in the relative location of the conserved eIF4G domain (central in *LmEIF4G1*, 2, 5 and N-terminal in *LmEIF4G3*–4). Both the *LmEIF4G1* and *LmEIF4G2* genes are located on chromosome 15 while the *LmEIF4G3*–5 genes lie on chromosomes 16, 36 and 10, respectively (see Table 1). No additional similarities with human, yeast or plant homologues can be seen within their sequences and surprisingly, no obvious eIF3, eIF4E or PABP binding domains can be identified based on homology analysis alone (not shown, see Section 4). Apart from the HEAT domain, the *Leishmania* sequences appear unrelated, with the exception of *LmEIF4G3* and 4. These two proteins share a short similar N-terminus and a conserved region (approximately 120 amino acids long) located about 180 amino acids downstream of the HEAT domain, indicating that they may be functionally related.

Fig. 7 shows an alignment comparing the sequences of the HEAT domain from the five putative *L. major* eIF4G proteins with the equivalent sequence from human eIF4GI, *S. cerevisiae* Tif4631p, and wheat eIFiso4G as well as the translation regulator PAIP1. Overall, the domain from *LmEIF4G1* is the most similar to human eIF4GI whilst the ones from *LmEIF4G2* and 5 are the least similar (Table 1), but the differences are small. All five *L. major* domains contain most of the conserved amino acids which in mammalian eIF4G homologues are required for binding to eIF4A [29,30,26]. Residues which have been shown not to be required for eIF4A binding (such as F737, K765, E769, P770, F812 and R855—human eIF4GI numbering) are also well conserved in most *Leishmania* proteins and presumably have other conserved functions. It may be noteworthy that the doublet E769/P770 (strictly conserved in *LmEIF4G1*, 3 and 4) has been implicated in 43S recruitment and formation of the 48S complex [26]. Nevertheless, it is not possible to identify which of these proteins are true eIF4G orthologues with major roles in translation initiation. Strikingly, orthologues to all five proteins, with significant conservation outside the HEAT domain, have been identified in both *T. brucei* (Table 1) and in *T. cruzi* (data not shown) confirming their importance for the survival of these organisms as a group.

3.8. Analysis of the interaction between *L. major* eIF4A/eIF4G through pull-down assays

In animals, yeast and plants, the specific binding between the eIF4A and eIF4G subunits of eIF4F needs to occur so that both proteins can function in translation. In order to functionally demonstrate a possible role in translation for the various *L. major* candidate eIF4A/eIF4G proteins, we investigated their interaction through pull-down assays. First, to validate the assay, we immobilised N-terminally His-tagged

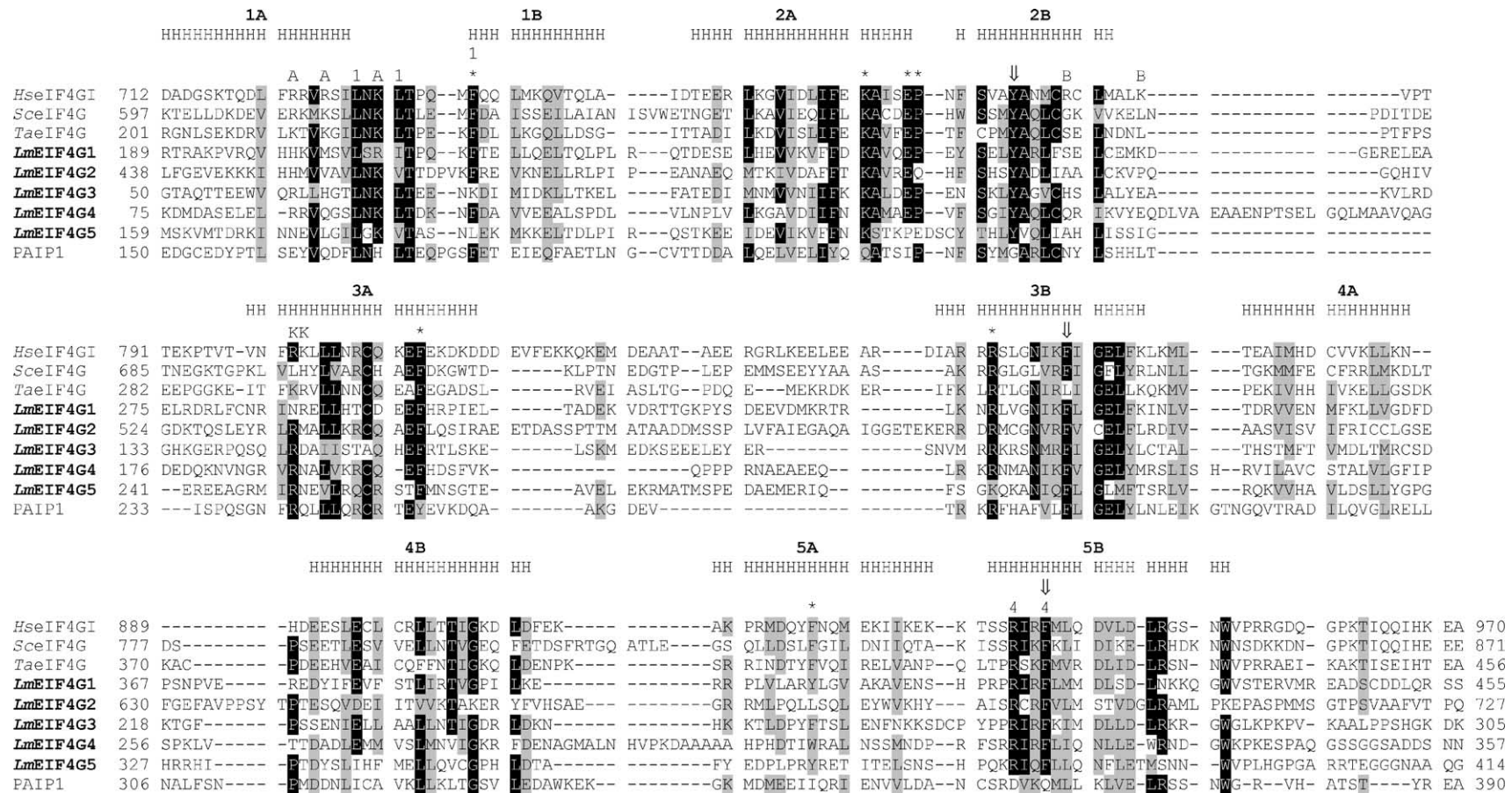


Fig. 7. Sequence comparison of the HEAT domain from the putative *L. major* eIF4G homologues with selected sequences from various organisms. Clustal W alignment performed as described in Fig. 1 comparing the sequences of the HEAT domain from the putative *L. major* eIF4G homologues (LmEIF4G1-5) with the equivalent domain from human, yeast and plant eIF4G homologues as well as the human PAIP1 protein. The predicted five antiparallel alpha helical pairs (1–5, A and B) are indicated [26]. Selected mutations in mammalian eIF4G which have been shown to reduce the binding to eIF4A are shown as follows—A: R723D, R726D and K731D [26]; B: R781D and K787D [26]; 1 (M-1): L729A, L732A and F737A [29]; and 4 (M-4): R935A and F938A [29]. The R801D/K802D mutant (K in the figure) does not prevent eIF4A binding although it does abolish IRES binding [26]. Double arrows highlight amino acids which abolish the binding to eIF4A when individually mutated to alanine [30]. * indicates conserved amino acids which do not interfere with eIF4A binding when mutated to alanine [30,26]. Relevant GenBank accession numbers: human eIF4GI (Hs)—Q04637; yeast Tif4631p (*S. cerevisiae*, Sc)—NP_011678; plant eIFiso4G (*T. aestivum*, Ta)—Q03387; human PAIP1—NP_006442.

recombinant *LmEIF4A1-2* and human eIF4A (His₆-eIF4A [48]) on Ni-NTA beads (Fig. 8A—left panel), and incubated the beads with ³⁵S-labelled human eIF4G [70]. Human eIF4A efficiently bound to human eIF4G, however neither *LmEIFA1* nor *LmEIFA2* was capable of binding to the human protein (Fig. 8A—right panel). Next, fragments cod-

ing for the HEAT domain from three of the *L. major* candidate eIF4G proteins (*LmEIF4G1*_{128–475}, *LmEIF4G2*_{387–705}, *LmEIF4G3*_{26–310}), were synthesised in the presence of ³⁵S methionine and assayed for their ability to bind eIF4A. All three fragments include the region equivalent to amino acids 722–949 from human eIF4G1 sufficient to promote 48S

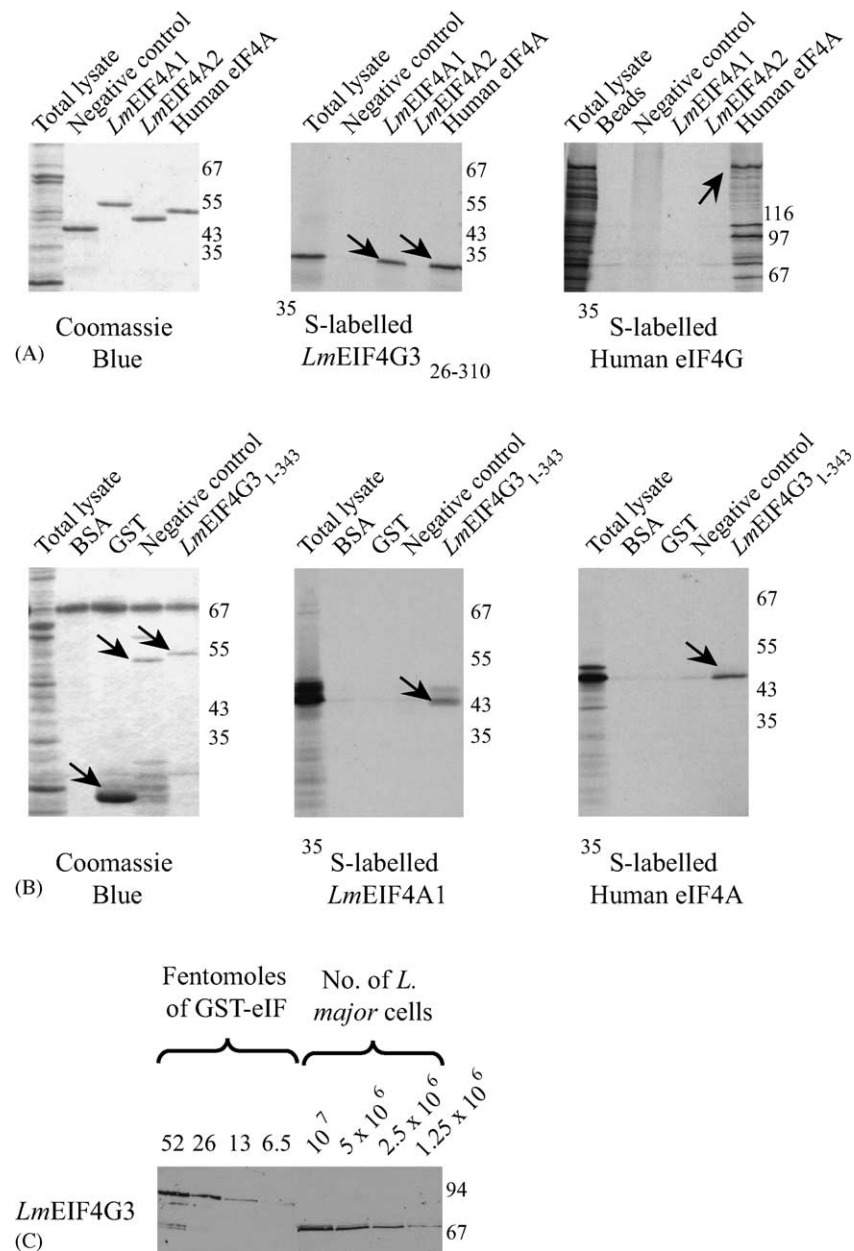


Fig. 8. Analysis of the interaction between human and *L. major* eIF4A homologues with the *LmEIF4G3* protein. (A) Pull-down assay using recombinant His-tagged *LmEIF4A1-2* and human eIF4A incubated with either ³⁵S-labelled human eIF4G or *LmEIF4G3*_{26–310}. Proteins bound to the Ni-NTA beads were analysed through 15% (*LmEIF4G3*_{26–310}) or 10% (human eIF4G) SDS-PAGE. Left panel: Coomassie Blue stained gel showing total translation extract (Total lysate) as well as the recombinant His-tagged proteins. Middle panel: autoradiography showing specific binding (arrows) between *LmEIF4A1*-His/labelled *LmEIF4G3*_{26–310} and human eIF4A-His/labelled *LmEIF4G3*_{26–310}. Right panel: positive control of a 10% SDS-PAGE showing the specific binding between human eIF4A and labelled human eIF4G. (B) Reverse pull-down assay using GST-tagged *LmEIF4G3*_{1–343} and ³⁵S-labelled *LmEIF4A1*/human eIF4A. Left panel: 15% SDS-PAGE showing total translation extract and recombinant GST-tagged proteins. Middle and right panels: autoradiography showing specific binding (arrows) between *LmEIF4G3*_{1–343}-GST/labelled *LmEIF4A1* and *LmEIF4G3*_{1–343}-GST/labelled human eIF4A. (C) Quantitation of *LmEIF4G3* in *L. major* promastigotes. The quantitation of the endogenous protein levels was performed as described in Fig. 2 with recombinant GST-*LmEIF4G3*_{1–636} and isoform specific polyclonal sera against *LmEIF4G3*.

complex formation on the EMCV IRES [28]. Only labelled *LmEIF4G*3_{26–310} was able to bind efficiently to *LmEIF4A*1 and to human eIF4A as shown in Fig. 8A (middle panel). No specific binding by the *LmEIF4G*1–2 constructs to the various recombinant proteins was observed (data not shown). Moreover, even though *LmEIF4A*1 and 2 share a similarity of 71%, no significant binding by any of the three *LmEIF4G* proteins to *LmEIF4A*2 was observed (Fig. 8A and data not shown).

To confirm the specific interaction between *LmEIF4G*3_{26–310} with *LmEIF4A*1, we expressed the N-terminal half of *LmEIF4G*3 containing the HEAT domain (*LmEIF4G*3_{1–310}) in *E. coli* fused to GST and tested it in a reverse pull-down assay. Here, the GST fusion was immobilised on glutathione-Sepharose and incubated with

³⁵S-labelled *LmEIF4A*1 and human eIF4A (Fig. 8B). As negative controls, we used GST on its own and a murine GST-cdc2 fusion protein of a similar size to the GST-*LmEIF4G*3_{1–310} protein. This reverse assay confirmed the interaction between the GST-*LmEIF4G*3_{1–310} fusion protein and both labelled *LmEIF4A*1 and human eIF4A (Fig. 8B—middle and right panels). In summary, the pull-down experiments indicate that of the three *L. major* putative eIF4Gs tested, only *LmEIF4G*3 interacts specifically with *LmEIF4A*1 as well as with human eIF4A.

Thus, our results are consistent with roles for both *LmEIF4A*1 and *LmEIF4G*3 in the process of parasite RNA translation. In order to compare the ratio of the eIF4A/4G homologues in *L. major* with those described for other eukaryotes, an antibody was raised against the His-*LmEIF4G*3_{26–310}

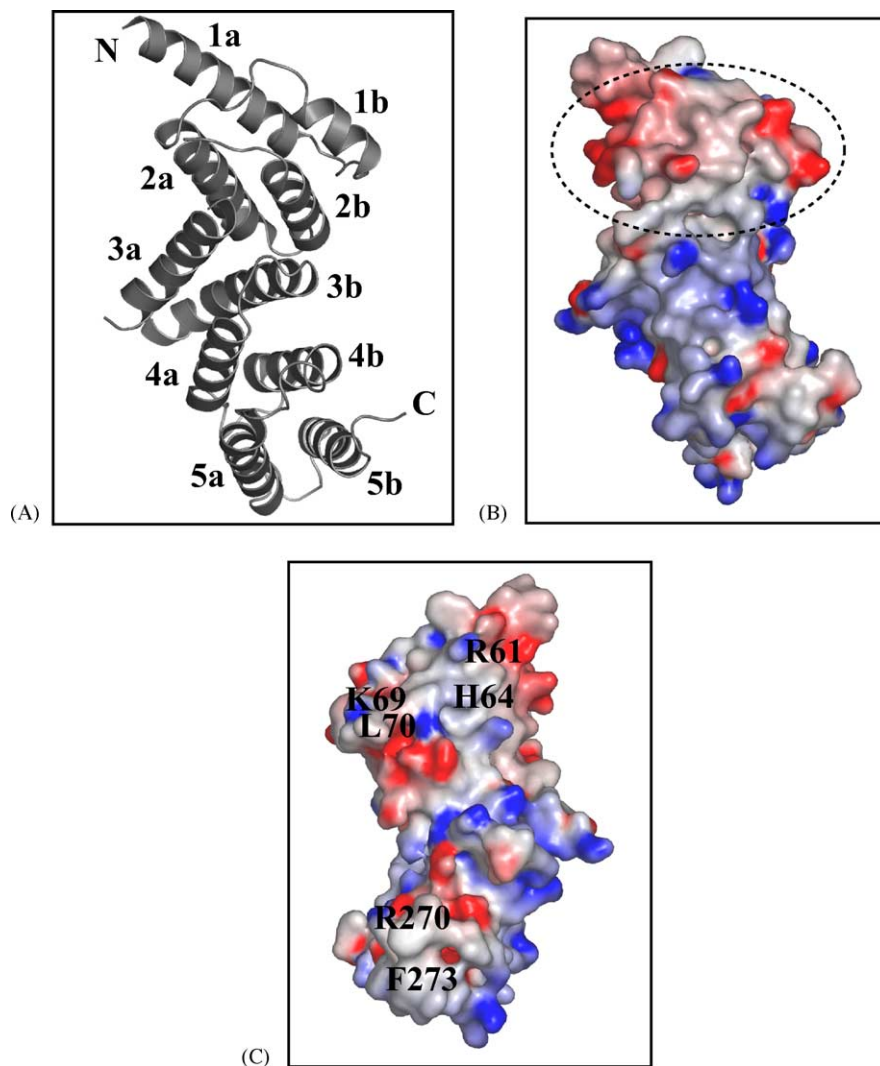


Fig. 9. Model of the structure of the *LmEIF4G*3 HEAT domain. (A) Ribbon diagram of the structure of the predicted *LmEIF4G*3 HEAT domain with the concave surface on the right and the convex surface on the left. The α helices are labelled as described for human eIF4GII [26] and as shown in Fig. 7. (B)–(C) Grasp representation of the surface of the domain colored coded for electrostatic potential (red <-8 kBT; blue >8 kBT). A and B represent identical views of the molecule whilst in C the opposite side of the molecule (rotated 180° about the long axis relative to (A) and (B)), predicted to be involved in the interaction with eIF4A, is shown. In (B) the dotted circle delimits the region in *LmEIF4G*3 which differs from the human eIF4GII HEAT domain. Highlighted in (C) are the amino acids R61, H64, K69, L70, R270, F273, equivalent to amino acids implicated in the binding to eIF4A in the mammalian protein.

to enable quantitation of the endogenous *L. major* *LmEIF4G3* levels, as previously done for *LmEIF4E1-3* and *LmEIF4A1-2*, using full length GST-*LmEIF4G3*_{1–636} for comparison. This quantitation (Fig. 8C and Table 2) indicates that, at about $(4–8) \times 10^3$ molecules per cell, *LmEIF4G3* is present at about twice the level observed for *LmEIF4E1* in *L. major* promastigotes, and is about 10- and 50-fold less abundant than *LmEIF4E3* and *LmEIF4A1*, respectively. The large differences in concentration between the eIF4E/eIF4G or eIF4A/eIF4G homologues are similar to those reported in yeast, where the eIF4G levels are about 20- and 45-fold less abundant than those of eIF4E and eIF4A, respectively [56]. However, considering that the number of *LmEIF4G3* molecules in *L. major* is about one-third to one half of the levels in yeast, it is unclear whether the intracellular levels of *LmEIF4G3* would be sufficient to support translation in *L. major*. While it would appear to function in translation or translational control, based on its sequence and the *LmEIF4A* binding data, we cannot rule out contributions from the other eIF4G homologues in these processes.

3.9. Molecular modelling of the *LmEIF4G3* HEAT domain

So far, the full length eIF4G has been refractory to structural studies. Only recently have individual domains within this protein, such as the central HEAT domain from human eIF4GII [26] and the eIF4E interacting region from yeast eIF4GI [71], been solved at the structural level. Given the evidence obtained above implicating *LmEIF4G3* in translation in *L. major*, we decided to attempt the molecular modelling of *LmEIF4G3*. However, its very short N-terminus, only 50 amino acids long, plus the apparent lack of the consensus eIF4E binding motif (see Section 4), indicates that it may not bind eIF4E factors in the same manner as shown for the mammalian and yeast proteins [53,54,71]. Nevertheless, the *LmEIF4G3* HEAT domain could be modelled and its structural features associated with eIF4A binding were compared with the structure of the human eIF4GII HEAT domain.

Fig. 9A shows the ribbon drawing of the predicted three-dimensional structure of the *LmEIF4G3* HEAT domain. Absent from the drawings are the two segments corresponding to two loops (amino acids 128–140 and 161–178) which were not structured in the original human protein. As for the *LmEIF4E1* model, the overall quality of the final model was confirmed by the programs PROCHECK, Verify 3D and WHATIF. The *LmEIF4G3* HEAT domain folds into the same crescent-shaped molecule described for the human protein, with the five pairs of antiparallel α helices forming the same double layer with the convex and concave surfaces formed by the A and B helices, respectively (Fig. 9A). A major difference between the *Leishmania* and mammalian protein arises from the analysis of the surface electrostatic potential of the model performed with the program GRASP (Fig. 9B and C). This difference is concentrated in the region which in the human protein has been implicated in the interaction with the

EMCV IRES [26]. In human eIF4GII this region has an overall positive charge but in the *LmEIF4G3* HEAT domain the equivalent region is negatively charged (Fig. 9B). In contrast, the region involved in the eIF4A interaction presents a surface electrostatic potential similar to the human model and all the conserved amino acids implicated in the interaction with eIF4A (R61, H64, K69, L70, R270 and F273 equivalent to R756, R759, K764, L765, R968 and F971 in the mammalian protein) are positioned adequately for the interaction to occur (Fig. 9C and [26]). Again these results support a role for *LmEIF4G3* in translation, although the lack of a possible eIF4E interacting region and the differences in the putative RNA binding side of the protein's HEAT domain might indicate a regulatory role in protein synthesis or a different mechanism for its function in translation initiation.

4. Discussion

The three eIF4F initiation factors have multiple isoforms in *L. major* protozoa. This complexity is reflected in *T. brucei* (which have similar isoforms) and indicates that they all have conserved roles in the parasites. Our results show that for each factor, one of the *L. major* forms seems to fulfil, in part at least, the expected characteristics of a translation initiation factor. However we believe that under more stringent assays, at least some of the other isoforms may also have specific roles in translation. For instance, it is possible that the various eIF4E homologues have different affinities for the parasite cap4 structure than those observed for the cap-Sepharose resin. Recently the chemical synthesis of the trypanosomatid cap4 has been achieved and the binding of a *Leishmania* eIF4E homologue, LeishIF4E-1 (equivalent to the *LmEIF4E1* protein described here), to this cap4 structure investigated through fluorescence titration measurements [72,73]. LeishIF4E-1 bound to both the cap4 and m⁷GTP with very similar affinities, confirming the results obtained from the simple cap binding assay shown in Fig. 3 as well as our sequence and structural analysis. It remains to be seen whether either *LmEIF4E2* or 3, which do not bind cap-Sepharose, as well as *LmEIF4E4*, not yet investigated experimentally, would be able to bind the cap4 structure. It is also possible that any one of these proteins may require association to the eIF4G homologues in order to bind efficiently to the cap, since in other eukaryotes the complex eIF4E/eIF4G binds with a higher affinity to the cap structure than eIF4E alone [71]. Alternatively, one last possibility would be for some of these other eIF4E homologues to act as regulators of *LmEIF4E1* function by competing with it for binding to eIF4G.

The existence of multiple isoforms for the eIF4F subunits in other eukaryotes, especially pluricellular organisms, may be associated with different patterns of tissue expression and during development. Insights into the role of the multiple isoforms come from the nematode system which in many aspects regarding mRNA metabolism can be compared to the trypanosomatids. In *Ascaris lumbricoides*, a 22 nt SL se-

quence and its associated trimethylated cap, *trans*-spliced to about 80–90% of all mRNAs, has been shown to functionally collaborate to enhance translation, very likely at the level of initiation [10]. It is not known how these features influence protein synthesis, but it seems likely that they do so via *trans*-acting factors. The presence of multiple eIF4E homologues in *C. elegans* is also reminiscent of what we see in the parasite system [51]. The five nematode homologues differ in cap binding affinity, requirement for viability [74] and possible roles in development [75]. In the case of the trypanosomatid protozoan unicellular organisms, the multiple eIF4F isoforms could be associated with their different life stages or be required for the translation of different classes of mRNAs. Indirect evidence for the second hypothesis comes from wheat germ, where two different eIF4F isoforms have been described, with distinct eIF4E and eIF4G subunits, which differ in their ability to translate mRNAs containing structured regions in their 5'UTR as well as uncapped mRNAs and dicistronic messages [76].

Our own results tend to indicate a stage specific expression for at least some of the eIF4E orthologues, since in *T. brucei* we have observed that the *TbEIF4E3* protein is expressed at high levels in the procyclic stage and it is absent from bloodstream forms (Dhalia et al., unpublished results). The mRNA encoding *LmEIF4E1* contains in its 3'UTR a sequence similar (68% identity) to the regulatory element found in the *Leishmania* amastin mRNA [77,78]. This element is found in a number of *Leishmania* mRNAs, several of which are differentially expressed in *L. donovani* amastigotes, and can confer amastigote-specific expression to a reporter mRNA possibly by regulating translation instead of stability [78]. It seems plausible that the expression of *LmEIF4E1* may be enhanced at the amastigote stage specially considering that, assuming a similar behaviour to the *T. brucei* orthologue, *LmEIF4E3* (the most abundant of the three eIF4E proteins in promastigotes), may be absent from the *Leishmania* mammalian form as well. Additional evidence for the stage specific expression of the eIF4E homologues was provided recently by microarray analysis, where the *LmEIF4E2* coding sequence was found within a subset of genes preferentially expressed in metacyclic populations of *L. major* [79]. Regarding the eIF4A subunit, the differences in levels between the two *Leishmania* eIF4A orthologues leave no doubt as to the relevant role for *LmEIF4A1* in translation in promastigotes. Since equivalent levels of expression have been reported for *LmEIF4A1* in both promastigote and amastigote stages of the *Leishmania* life cycle [37], it is unlikely that *LmEIF4A2* would replace it to a significant extent in the mammalian stage.

The multiple candidate eIF4G homologues identified in *L. major* add yet a new level of complexity to the study of translation initiation in this parasite. None of the identified homologues can be unambiguously assigned the role of a translation factor. Although *LmEIF4G3* (and possibly the related *LmEIF4G4*) seems to be clearly involved in translation, its very short N-terminus may not accommodate binding

sites for both eIF4E and PABP, as in other eukaryotes. It is possible that both *LmEIF4G3–4* function as a translational regulator/inhibitor as proposed for the mammalian protein p97/DAP-5/NAT1 (reviewed in [12]), which is homologous to the C-terminal two-thirds of mammalian eIF4G but lacks the N-terminal one-third including the eIF4E- and PABP-binding sites. However none of the other eIF4G homologues from *L. major* share any homology to *LmEIF4G3–4* outside the HEAT domain and despite having much longer N-termini, they do not have well defined eIF4E-binding motifs.

To continue the comparison with the nematode system, we searched for eIF4G homologues in the *C. elegans* genome. Strikingly, we found only one clear homologue which contains what seems to be a modified eIF4E binding sequence, **FGRDFMV** (GenBank accession NP495729). Similar sequences **FSLDEVV** and **FSLERVV** are present in the short N-termini of *LmEIF4G3* and *LmEIF4G4* respectively and variations of it can also be found in possible *T. brucei* and *T. cruzi* orthologues. Their similarity to the nematode sequence suggests that all three sequences may bind eIF4E proteins, in which case both *LmEIF4G3* and *LmEIF4G4* could be true eIF4G orthologues. However considering the possible deviation from the eIF4E binding consensus the potential eIF4E binding sites need to be determined experimentally.

In summary, the results reported here indicate that *LmEIF4E1*, *LmEIF4A1* and *LmEIF4G3* are the factors that functionally interact with the cap structure or each other, suggesting that they perform essential roles in protein synthesis. In order to assess their importance for cellular viability, as well as of the other homologues identified, we are currently performing RNA interference experiments in *T. brucei*. To address their function we will continue the protein–protein pull down assays and investigate possible eIF4G/eIF4E interactions. Finally expression analysis will be carried out so as to identify patterns of expression during the parasite life cycle for the various homologues. We expect with these studies to define, within the homologues already identified, which ones are required for translation initiation in trypanosomatids and whether their expression/activity can be regulated during the different stages of differentiation of these unique organisms.

Acknowledgements

This work was supported by grants/studentships from CNPq, CAPES, FIOCRUZ, FACEPE and the Wellcome Trust. Technical assistance to grow the *Leishmania* cells was provided by L. Rocha. We thank A. Ivens for the gift of cosmid DNAs and help with some preliminary sequence data. The human eIF4A cDNA in plasmid pET(His₆-eIF4A) and the *X. laevis* eIF4E cDNA in pSP64TEN were kind gifts from I. Ali, R. Jackson and S. Morley, respectively. We would also like to acknowledge E. Cupolillo for the *L. major* Friedlin strain, M. Carrington for access to preliminary *T. brucei* eIF4E sequences and A. Git for the GST-cdc2 clone. Finally, we are deeply indebted to O. Thiemann and D.H.F. Souza for

allowing us access to the computing facilities necessary to the modelling work. Sequencing of *L. major* was accomplished as part of the *Leishmania* genome network and was financially supported by the Wellcome Trust, Burroughs Wellcome Fund, the EU, WHO/TDR and NIAID. This work could not be accomplished as such without the free availability of the sequences produced by this network.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [10.1016/j.molbiopara.2004.12.001](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.12.001).

References

- [1] Muhich ML, Boothroyd JC. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 1988;8:3837–46.
- [2] Ullu E, Tschudi C. Trans splicing in trypanosomes requires methylation of the 5' end of the spliced leader RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:10074–8.
- [3] Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 2003;5:1231–40.
- [4] Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. *Trans* and *cis* splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell* 2003;2:830–40.
- [5] Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 2002;21:1881–8.
- [6] Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 1992;267:9805–15.
- [7] Nilsen TW. *Trans*-splicing: an update. *Mol Biochem Parasitol* 1995;73:1–6.
- [8] Pascolo E, Blonski C, Shire D, Toulme JJ. Antisense effect of oligodeoxynucleotides complementary to the mini-exon sequence of the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *Biochimie* 1993;75:43–7.
- [9] Ramazeilles C, Mishra RK, Moreau S, Pascolo E, Toulme JJ. Antisense phosphorothioate oligonucleotides: selective killing of the intracellular parasite *Leishmania amazonensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7859–63.
- [10] Maroney PA, Denker JA, Darzynkiewicz E, Laneve R, Nilsen TW. Most mRNAs in the nematode *Ascaris lumbricoides* are trans-spliced: a role for spliced leader addition in translational efficiency. *RNA* 1995;1:714–23.
- [11] Zeiner GM, Sturm NR, Campbell DA. The *Leishmania tarentolae* spliced leader contains determinants for association with polysomes. *J Biol Chem* 2003;278:38269–75.
- [12] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999;68:913–63.
- [13] Hershey JWB, Merrick WC. Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: Sonenberg N, et al., editors. *Translational control of gene expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. p. 33–88.
- [14] Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, et al. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7029–36.
- [15] Sonenberg N, Dever TE. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* 2003;13:56–63.
- [16] Sonenberg N, Gingras AC. The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:268–75.
- [17] Raught B, Gingras AC. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:43–57.
- [18] Scheper GC, Proud CG. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 2002;269:5350–9.
- [19] Luking A, Stahl U, Schmidt U. The protein family of RNA helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998;33:259–96.
- [20] Linder P. Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol Cell* 2003;95:157–67.
- [21] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:232–41.
- [22] Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 2003;95:141–56.
- [23] Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15:4990–7.
- [24] Tarun Jr SZ, Sachs AB. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 1996;15:7168–77.
- [25] Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* 1998;17:7480–9.
- [26] Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, Pestova TV, Hellen CU, Burley SK. A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Mol Cell* 2001;7:193–203.
- [27] Korneeva NL, Lamphear BJ, Hennigan FL, Rhoads RE. Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem* 2000;275:41369–76.
- [28] Lomakin IB, Hellen CU, Pestova TV. Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol Cell Biol* 2000;20:6019–29.
- [29] Imataka H, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 1997;17:6940–7.
- [30] Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV, Sonenberg N. Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4G constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. *Mol Cell Biol* 2000;20:468–77.
- [31] Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 1999;18:270–9.
- [32] Nakamura Y, Hashimoto T, Kamaishi T, et al. Phylogenetic position of kinetoplastid protozoa inferred from the protein phylogenies of elongation factors 1alpha and 2. *J Biochem (Tokyo)* 1996;119:70–9.
- [33] Batista JA, Teixeira SM, Donelson JE, Kirchhoff LV, de Sa CM. Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes. *Mol Biochem Parasitol* 1994;67:301–12.
- [34] Hotchkiss TL, Nerantzakis GE, Dills SC, Shang L, Read LK. *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5' untranslated region sequence elements. *Mol Biochem Parasitol* 1999;98:117–29.
- [35] Bates EJ, Knuepfer E, Smith DF. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucl Acids Res* 2000;28:1211–20.
- [36] Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* 1998;161:6171–9.

- [37] Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, et al. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 1995;181:1527–37.
- [38] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics* 2001;17:1244–5.
- [39] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–25.
- [40] Jones DT. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. *J Mol Biol* 1999;287:797–815.
- [41] Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 1997;89:951–61.
- [42] Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993;234:779–815.
- [43] Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993;26:283–91.
- [44] Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature* 1992;356:83–5.
- [45] Vriend G. WHATIF: a molecular modelling and drug design program. *J Mol Graph* 1990;8:52–6.
- [46] de Melo Neto OP, Standart N, de Sa CM. Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucl Acids Res* 1995;23:2198–205.
- [47] Minshall N, Thom G, Standart N. A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* 2001;7:1728–42.
- [48] Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 1996;16:6859–69.
- [49] Melo EO, Dhalia R, de Sa CM, Standart N, de Melo Neto OP. Identification of a C-terminal PABP-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly(A) and efficient cap distal translational repression. *J Biol Chem* 2003;278:46357–68.
- [50] Clayton C, Adams M, Almeida R, et al. Genetic nomenclature for *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1998;97:221–4.
- [51] Jankowska-Anyszka M, Lamphear BJ, Aamodt EJ, et al., Rhoads RE. Multiple isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between mono- and trimethylated mRNA cap structures. *J Biol Chem* 1998;273:10538–42.
- [52] Matsuo H, Li H, McGuire AM, et al. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol* 1997;4:717–24.
- [53] Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 1999;3:707–16.
- [54] Niedzwiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, et al. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* 2002;319:615–35.
- [55] Ptushkina M, von der Haar T, Vasilescu S, Frank R, Birkenhager R, McCarthy JE. Cooperative modulation by eIF4G of eIF4E-binding to the mRNA 5' cap in yeast involves a site partially shared by p20. *EMBO J* 1998;17:4798–808.
- [56] von der Haar T, McCarthy JE. Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function. *Mol Microbiol* 2002;46:531–44.
- [57] Nicholls A, Sharp KA, Honig B. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 1991;11:281–96.
- [58] Li Q, Imataka H, Morino S, et al. Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol* 1999;19:7336–46.
- [59] Lu J, Aoki H, Ganoza MC. Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:215–9.
- [60] Story RM, Li H, Abelson JN. Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1465–70.
- [61] Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doere M, Linder P. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* 2003;11:127–38.
- [62] Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13080–5.
- [63] Minshall N, Thom G, Standart N. A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* 2001;7:1728–42.
- [64] Collier JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 2001;7:1717–27.
- [65] Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem* 1987;262:380–8.
- [66] Rau M, Ohlmann T, Morley SJ, Pain VM. A reevaluation of the cap-binding protein, eIF4E, as a rate-limiting factor for initiation of translation in reticulocyte lysate. *J Biol Chem* 1996;271:8983–90.
- [67] Asano K, Shalev A, Phan L, et al. Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GT-Pase activation. *EMBO J* 2001;20:2326–37.
- [68] He H, von der Haar T, Singh CR, et al. The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection. *Mol Cell Biol* 2003;23:5431–45.
- [69] Tarun Jr SZ, Wells SE, Deardorff JA, Sachs AB. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9046–51.
- [70] Joshi B, Yan R, Rhoads RE. In vitro synthesis of human protein synthesis initiation factor 4 gamma and its localization on 43 and 48 S initiation complexes. *J Biol Chem* 1994;269:2048–55.
- [71] Gross JD, Moerke NJ, von der Haar T, et al. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 2003;115:739–50.
- [72] Lewdorowicz M, Yoffe Y, Zuberek J, et al. Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *RNA* 2004;10:1–10.
- [73] Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, et al. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *RNA* 2004;10:1764–75.
- [74] Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, et al. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2000;275:10590–6.
- [75] Amiri A, Keiper BD, Kawasaki I, et al. An isoform of eIF4E is a component of germ granules and is required for spermatogenesis in *C. elegans*. *Development* 2001;128:3899–912.
- [76] Gallie DR, Browning KS. eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 2001;276:36951–60.
- [77] Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulos B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania amastigotes* encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:345–57.
- [78] Boucher N, Wu Y, Dumas C, et al. A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 2002;277:19511–20.
- [79] Almeida R, Gilmartin BJ, McCann SH, et al. Expression profiling of the *Leishmania* life cycle: cDNA arrays identify developmentally regulated genes present but not annotated in the genome. *Mol Biochem Parasitol* 2004;136:87–100.

MANUSCRITO II

“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS HOMÓLOGOS AO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4E DE *Trypanosoma brucei*”

Manuscrito a ser submetido à revista
Molecular and Biochemical Parasitology
ISSN 0166-6851

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS HOMÓLOGOS AO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4E DE *Trypanosoma brucei*

Eden R. Freire^{+\$}, Rafael Dhalia^{#\$}, Rodolfo Katz^{+\$}, Nancy Standart*, Mark Carnington*,
Oswaldo P. de Melo Neto^{\$}

⁺Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor
Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária Recife, PE Brasil 50732-970.

[#] Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília DF Brasil 70910-900.

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

^{\$}Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Professor Moraes
Rego s/n, Cidade Universitária, Recife PE Brasil 50670-420.

Palavras-Chave: eIF4E, Iniciação da tradução, *Trypanosoma brucei*, Interação ao cap.

Autor correspondente: Oswaldo P. de Melo Neto

e-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br

Tel: 55 81 2101 2636

Fax: 55 81 3453 2449

Resumo

Em eucariotos, a síntese protéica se inicia com a ligação do complexo multimérico de iniciação da tradução eIF4F ao cap monometilado e o recrutamento da subunidade menor ribossomal à porção 5' dos mRNAs. Este complexo é composto por três subunidades: eIF4E, eIF4A e eIF4G. O eIF4E interage diretamente com o nucleotídeo cap, o eIF4A é uma RNA helicase altamente conservada e o eIF4G atua como montador para o complexo. Pouco é conhecido sobre os detalhes da síntese protéica em tripanosomatídeos. Nosso grupo de pesquisa identificou vários homólogos a fatores de iniciação do complexo eIF4F de tripanosomatídeos em trabalhos anteriores, e neste trabalho propôs a caracterização dos quatro homólogos ao eIF4E de *Trypanosoma brucei*, denominados TbEIF4E1-4. Para isso foram utilizados soros policlonais já disponíveis contra cada um destes homólogos assim como as respectivas proteínas recombinantes. Numa primeira abordagem foram realizados ensaios de quantificação com ambas as formas do ciclo de vida de *T. brucei*. O TbEIF4E1 pôde ser detectado em baixos níveis nas formas procíclica e sanguínea, o TbEIF4E2 é raro ou não detectado nas duas formas e o TbEIF4E3 e o TbEIF4E4 são muito abundantes na forma procíclica e raros ou não detectados na forma sanguínea. Em seguida ensaios de ligação ao cap foram realizados visando identificar diferenças funcionais entre as várias proteínas. Três dos homólogos de *T. brucei* (TbEIF4E1, TbEIF4E2 e TbEIF4E4) foram capazes de se ligar às resinas de 7-metil-GTPsefarose, ao contrário do constatado em *L. major*, onde apenas um dos homólogos, o LmEIF4E1, foi capaz de se ligar especificamente à estrutura cap monometilada. Desta forma foram encontradas características diferentes no comportamento desses homólogos entre tripanosomatídeos, levando a novos desafios na compreensão do sistema de tradução nesses organismos.

Introdução

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida, cujas principais espécies representantes dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* apresentam importância médica e veterinária. As doenças causadas por tripanosomatídeos constituem grave problema sócio-econômico, principalmente em países de terceiro mundo devido ao difícil controle e à falta de vacinas e agentes quimioterápicos eficientes (<http://who.int/tdr>). Tais fatos nos remetem à necessidade de um conhecimento mais completo dos processos biológicos básicos destes organismos. Nesse contexto a caracterização do processo de síntese protéica, ou tradução, nos tripanosomatídeos, se destaca como uma pergunta fundamental para o conhecimento da biologia molecular destes parasitas com possíveis aplicações futuras no desenvolvimento de agentes quimioterápicos que possam ser utilizados no tratamento de pacientes infectados por estes organismos.

A tradução eucariótica ocorre em vários passos e é catalizada por proteínas referidas como Fatores de Iniciação Eucarióticos (eIFs-“eukaryotic initiation factors”). Até o momento foram identificados, em mamíferos, seis grupos de fatores de iniciação: eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5 e eIF6. Estes atuam em um processo altamente regulado onde a ausência de apenas um é suficiente para diminuir ou até mesmo impedir a síntese protéica [1].

A tradução do mRNA em proteína inicia-se após a separação das subunidades ribossomais 40S e 60S, pela ação dos fatores eIF3 e eIF6 sobre o ribossomo pré-existente 80S, e pela formação do complexo ternário eIF2/GTP/Met-tRNA_i (onde Met-tRNA_i indica o RNA transportador iniciador responsável pela adição do primeiro aminoácido da proteína). A subunidade 40S e o eIF3, ligam-se então ao complexo ternário, formando o complexo de “pré-iniciação 43S”. Este necessita da interação entre o eIF3 e o complexo **eIF4F**, para se ligar com a porção 5' do mRNA [1,2,3]. Os fatores eIF4 são aparentemente exclusivos de

eucariotos [4] e são responsáveis pela etapa de reconhecimento do mRNA pelo ribossomo. O fator eIF4F é um complexo heterotrimérico formado pelas seguintes subunidades polipeptídicas: **eIF4A**, uma RNA helicase responsável pela remoção de estruturas secundárias da extremidade 5' do mRNA entre o cap e o códon AUG; **eIF4E**, a proteína de reconhecimento da estrutura cap; **eIF4G**, a proteína estruturadora do complexo [revisto em 1]. O complexo eIF4F é ainda auxiliado pelos fatores eIF4B, eIF4H [5] e pela proteína de ligação à cauda poli-A ou PABP [revisto em 6].

O fator eIF4E (chamado de “cap binding protein”) é uma proteína de cerca de 24 kDa que é conservada de leveduras a humanos [1], e encontrada em um número variado de formas em diversos organismos [7,8]. Seus níveis são relativamente baixos em lisados de reticulócito de coelho [9] e células HeLa [10] e sua superexpressão está relacionada ao crescimento aberrante de células [11]. Sua função no complexo eIF4F é limitada por proteínas da família 4E-BP, que funcionam como sequestradores do eIF4E e assim inibem a tradução [12], e por fosforilação, aumentando a taxa de tradução [2].

Até o momento pouco se sabe a respeito do mecanismo de tradução em tripanosomatídeos e apenas alguns trabalhos caracterizaram fatores envolvidos nesse processo, dentre estes o fator EF-1 α de *L. braziliensis* [13]; os fatores EF-1 γ , EF-1 β e EF-2 de *T. cruzi* [14,15]; a PABP1 de *T. cruzi* [16,17]; a PABPI de *T. brucei* [18]; a LmPAB1 de *L. major* [19]; e um homólogo ao eIF4A [20] de *L. braziliensis*. Um homólogo de eIF4E em *Leishmania major* foi recentemente identificado e caracterizado parcialmente com o nome de *LeishIF4E-I* [21]. Este fator possui considerável conservação filogenética, especialmente no sítio de ligação ao cap e foi constatado que possui localização citoplasmática. Além disso, esse homólogo demonstrou ser capaz de se ligar a análogos da estrutura cap, principalmente no cap monometilado (m⁷GTP) e no tetrametilado (cap4), característico dos tripanosomatídeos [21].

Recentemente Dhalia, *et al* (2005) [22] identificaram dois homólogos ao eIF4A, cinco ao eIF4G e quatro ao eIF4E em *L. major*. Neste trabalho três dos homólogos ao eIF4E (denominados *LmEIF4E1-3*) foram quantificados na fase procíclica do parasita, onde o homólogo *LmEIF4E3* foi o mais abundante, seguido dos homólogos *LmEIF4E1* e *E2*. Tais homólogos também foram testados quanto à capacidade de ligação ao cap em resinas de m⁷GTP sefarose, mas somente um deles, o *LmEIF4E1* (o mesmo que o *LeishIF4E-1*) foi capaz de se ligar ao cap monometilado de mamíferos.

Para a ampliação do entendimento da iniciação da tradução em tripanosomatídeos, este trabalho propôs a caracterização dos homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de *T. brucei* através da quantificação desses fatores nas duas formas do ciclo de vida do parasita e através da avaliação da afinidade destes ao cap monometilado de mamíferos, estabelecendo semelhanças e diferenças em relação aos homólogos já testados de *L. major* e de outros eucariotos.

Material e Métodos

Alinhamento de seqüências

Os homólogos de eIF4E de *L. major* (*LmEIF4E1-4*) e de *T. brucei* (*TbEIF4E1-4*) foram identificados por buscas *on-line* utilizado-se o programa *BLAST* por comparação das seqüências dos homólogos ao eIF4E de *Homo sapiens* e *Saccharomyces cerevisiae* com as seqüências do banco de dados Gene DB (www.genedb.org) e foram alinhadas por grau de homologia com o programa *CLUSTAL W* (www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/clustalw.shtml). Ocasionalmente as seqüências do alinhamento sofreram alguns ajustes manuais para o refinamento do resultado.

Cultivo de parasitas.

Formas selvagens de *T. brucei* procíclica (427) e sanguínea (118) foram cultivadas a 27° C em meio SDM-79 (Sigma®), suplementado com 0,002% p/v hemina, 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina (1 U)/estreptomicina (1 mg) . Do mesmo modo formas sanguíneas foram crescidas em meio HMI-9 com soro fetal bovino e adição de penicilina/estreptomicina a 37°C. Na fase exponencial de crescimento, as culturas foram contadas em câmara de Newbauer e submetidas a duas lavagens com PBS pH 7.4 para posterior lise. As células de *T. brucei* foram lisadas em fervura em tampão Laemmli 2X (2% p/v SDS; 80 mM de Tris-Cl; 10% Glicerol; Azul de Bromofenol até a tonalidade desejada) para obtenção de proteínas para análises de *Western-blot*.

Amplificação e clonagem dos homólogos ao eIF4E de *T. brucei*

Os quatro candidatos a homólogos ao eIF4E de *T. brucei* (*TbEIF4E1-4*) foram amplificados a partir de DNA total do parasita (cepa 427) utilizando oligonucleotídeos espécie-específicos flanqueados pelos sítios de restrição *Hind III/BamH I*. Os produtos de PCR foram amplificados com a enzima Pwo DNA polimerase (Roche®), tratados com Taq DNA polimerase (para adição de adeninas nas suas extremidades), clonados no vetor pGEMT-Easy (Promega®) e seqüenciados para a confirmação da qualidade/identidade das seqüências amplificadas. Os vetores utilizados na amplificação estão relacionados na Tabela 1.

As construções plasmidiais com os genes *TbEIF4E1-4* foram então digeridas por 4h com as enzimas *Hind III/BamH I* (0,5 unidade de cada enzima) e subclonados em vetores de expressão pET21D (previamente digeridos com as mesmas enzimas) para a expressão de proteínas fusionadas à cauda de histidinas para serem utilizadas na imunização de coelhos e obtenção dos anticorpos policlonais específicos para cada isoforma. Para a subclonagem dos

homólogos *TbEIF4E2* e *TbEIF4E3* foram feitas digestões parciais devido à existência de sítio interno para a enzima *Bam HI* na sequência de ambos os genes.

Expressão de proteínas recombinantes

Para expressar as proteínas fusionadas à sequência de histidinas (cosantruições pPET-*TbEIF4E1-4*), foram transformadas as construções plasmidiais em células *Escherichia coli* competentes das cepas BL21 *star*. As bactérias transformadas foram crescidas a 37°C em meio LB líquido na presença de ampicilina (100µg/ml). O crescimento foi acompanhado pela dosagem da cultura, em diferentes intervalos de tempo, no espectrofotômetro. Ao atingirem a densidade óptica (OD, Optical Density) de 0,5 foram induzidas a 30°C com IPTG na concentração final de 0,1mM por 4 horas. As células foram coletadas por centrifugação (a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C) e ressuspendidas em PBS e lisadas por prensa francesa. As amostras foram então centrifugadas e quantificadas em gel SDS-PAGE corado com azul de *comassie*.

Anticorpos contra os homólogos ao eIF4E de *T. brucei*

Os anticorpos contra os homólogos ao eIF4E de *T. brucei*, foram obtidos pela imunização de coelhos convencionais com proteínas HIS-recombinantes. Para a purificação dos anticorpos (imunoabsorção) para ensaios de *Western blot*, aproximadamente 100 µg das proteínas recombinantes foram separadas em gel SDS-PAGE 15%, transferidas para membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore). As membranas foram coradas com Rouge Ponceau S 0.2% (p/v) (em 1% de ácido tricloroacético), os fragmentos contendo as bandas protéicas de interesse foram picotados e colocadas em tubos de 1,5 mL. Estes fragmentos de membrana foram então bloqueados por 30 minutos com tampão PBS (0,1 M de NaCl, 2 mM de KCl, 4 mM de Na₂HPO₄·7H₂O e 1 mM de KH₂PO₄) , leite desnatado 1% e Tween-20

0,05% e incubados com os respectivos soros, durante a noite, a 4°C. Em seguida, os fragmentos foram lavados por três vezes com 1 ml de PBS e os anticorpos purificados eluídos com solução de glicina pH 2,5 (10 mM de Glicina). Depois foram recuperados os sobrenadantes em novos tubos e o pH foi neutralizado com a adição de 200 µl de Tris 1M pH 8,5. Os soros purificados foram então titulados com 220 µl de PBS 2X e azida sódica 0,8% (46 mM) e conservados a 4° C.

Quantificação dos fatores por *Western blot*

Nas reações de *Western blot*, a membrana utilizada foi a mesma da purificação de anticorpos. As proteínas recombinantes e amostras de extratos viáveis de *T. brucei* (fase procíclica e sangüínea), foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas. Estas, por sua vez, foram bloqueadas com leite desnatado 5% por 1 h e, em seguida, incubadas por mais 1 h em tampão TBS 1M pH 8,5, leite desnatado 1% e Tween-20 0,05% e um dos anticorpos específicos (imunoadsorvido) na diluição de 1:500. O segundo anticorpo, anti Ig-G conjugado a peroxidase (Amersham Biosciences®), foi utilizado na diluição de 1:5000 e a revelação do *Western blot* foi realizado por quimioluminescência e expostos ao filme Biomax-MS (Kodak).

Subclonagens TbEIF4E's

Os Para os ensaios de transcrição e tradução *in vitro*, os plasmídeos das maxi-preparações contendo os genes dos quatro homólogos ao eIF4E de *T. brucei* foram então digeridos sequencialmente com as enzimas de restrição *Eco RI* e *Bam HI* (com 0,5 unidades de cada enzima por 4 h a 37°C) e seguida os fragmentos foram purificados por eletroeluição. Como os genes *TbEIF4E2* e *TbEIF4E3* possuem um sítio interno para a enzima *Bam HI* eles foram digeridos parcialmente com essa enzima e os fragmentos que foram cortados apenas na

porção do primer foram então cortados do gel e purificados. Em seguida os fragmentos foram subclonados (por 20 h a 16°C em presença de 0,3 µl de DNA Ligase (4000 U/ µl) em vetor de clonagem pGEM3zf+ (Promega®) previamente digeridos com as mesmas enzimas e também purificados por eletroeluição. Estas construções dos quatro homólogos citados foram usadas para transformar células de *Escherichia coli* DH5α. Por fim foram feitas maxi-preparações de DNA plasmidial de cada clonagem segundo protocolo de Sambrook & Russel (2001) [24].

Transcrição e tradução *in vitro*

As construções pGEM3zf+/TbEIF4E1 foram digeridas por *Bam* *HI* e as construções pGEM3zf+/TbEIF4E2-4 foram digeridas por *Xba* *I* e em seguida transcritas *in vitro* com a enzima T7 RNA polimerase (Amersham Biosciences). Da mesma forma, as construções pET21D/LmEIF4E1-3 e o eIF4E de *Xenopus laevis* clonados no plasmídeo pGEM2 [22], foram linearizadas com *Not* *I*. A reação de transcrição se processou em um volume final de 50 µL contendo: 5µL tampão de transcrição (tris-HCl 400mM, pH 7, MgCl₂ 150mM), 2,5 µL de m7-GTP (cap) 10mM (New England Biolabs), 2µL de solução de NTPs (GTP a 10 mM, enquanto os outros NTPs a 100 mM), 0,5 µL DTT 1M, 1,5 µL inibidor de RNase, 2,0 µL (10 U/µL) , T7 RNA polimerase (5U/µL) (Pharmacia), 3 µg de DNA plasmidial linearizado e H₂O (destilada, deionizada, estéril e tratada com DEPC). Essa reação foi incubada a 37 ° C por 30 minutos, quando se adicionou 0,5 µL de GTP a 100 mM. Após outros 30 minutos de incubação foi adicionado mais 0,5 µL de T7 RNA (62 U/µL) polimerase e incubado por mais 60 minutos a 37 °C. Ao término da incubação adicionou-se ao sistema 50 µL de tampão TE 10X (Tris 10 mM, EDTA 10 mM) para terminar a reação. Da reação final de transcrição, com o volume final de 100 µL, foi analisado 1 µL dos transcritos sintetizados em gel de agarose 1%.

Os RNAs sintéticos obtidos foram extraídos em fenol/clorofórmio 1:1, precipitados com etanol 100% / NaCl 0,3 M e ressuspensos em 20 μ L de H₂O. Uma alíquota de 1 μ L RNA purificado ($\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi traduzido no lisado de reticulócito de coelho, de acordo com o fabricante (Rabbit Reticulocyte Lysate - Promega[®]) contendo metionina marcada com S³⁵ (2.5 $\mu\text{Ci}/\text{reação}$). As reações foram submetidas à temperatura de 30° C por 90 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão de amostra Laemmli 2X e, em seguida, os produtos das traduções foram separados por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% em condições desnaturantes, secos à vácuo e revelados por auto-radiografia com exposição em filme Biomax-MR[®] (Kodak).

Ensaio de afinidade ao cap de homólogos *LmEIF4Es* e *TbEIF4Es*

Neste ensaio foram utilizadas as proteínas marcadas com ³⁵S resultantes das reações de tradução *in vitro* descritas no item anterior. Cerca de 25 μ l de cada proteína marcada com ³⁵S foi incubado com 33 μ L da resina 7-metil-GTP-sefárose e 142 μ L de tampão HEPES (50 mM de Hepes; 14 mM de β -mercaptoetanol, 1mM de EDTA 0,5 M e 99 mM de KCl) por 1 hora a 4 °C. A resina foi lavada três vezes com 1 ml de Tampão HEPES, três vezes com 50 μ l de Tampão HEPES acrescido de 100 μ M de GTP e eluído três vezes com 50 μ l tampão HEPES acrescido de 50 μ M de cap solúvel. Alíquotas coletadas em todas as fases do ensaio foram analisadas em SDS-PAGE 15% e reveladas por auto-radiografia conforme descrito.

Resultados

Análise das seqüências homólogos ao fator eIF4E de *L. major* e *T. brucei*

As análises das seqüências dos homólogos ao fator eIF4E de *T. brucei* constataram quatro possíveis homólogos ao eIF4E neste organismo, denominados *TbEIF4E1-4*, e que todos estes homólogos putativos possuem seus respectivos ortólogos em *L. major* (denominados *LmEIF4E1-4*). Os pesos moleculares preditos para cada uma dos homólogos das proteínas dos homólogos ao eIF4E de *T. brucei* são de 26; 28,2; 47,9 e 46,5 kDa, respectivamente. Observou-se também que dos oito resíduos de triptofano conservados na família das proteínas ligadoras do cap sete foram encontrados nos homólogos *TbEIF4E1* e *LmEIF4E1*, oito no *TbEIF4E2* e *LmEIF4E2*, quatro no *TbEIF4E3* e *LmEIF4E3*, e cinco no *TbEIF4E4* e *LmEIF4E4* [Figura 1]. Pode-se observar adicionalmente a existência de duas inserções não conservadas de 10 (resíduos 156-165) e 37 aminoácidos (resíduos 199-236) respectivamente na porção C-terminal da proteína do ortólogo *LmEIF4E2* de *L. major*, estas estão ausentes no homólogo de *T. brucei* [Figura 1].

Quantificação das proteínas recombinantes *TbEIF4E1-4*

A análise da expressão das proteínas durante o ciclo de vida do parasita, e sua eventual comparação com os dados obtidos em *L. major* [22], poderia fornecer informação de qual homólogo funcional estaria exercendo a função de proteína de ligação ao cap em cada estágio do parasita. E com esse objetivo foi então feita a análise da expressão dos homólogos ao eIF4E de *T. brucei* (previamente clonados nas construções pET-*TbEIF4E1*, pET-*TbEIF4E2*, pET-*TbEIF4E3* e *TbEIF4E4*).

As construções obtidas tiveram suas proteínas expressas em bactérias, extraídas e foram feitas curvas de diluições destas proteínas para quantificação. Comparando-se as

diluições destas proteínas com diluições de BSA conhecidas pode-se então estimar a concentração aproximada para cada uma delas. As amostras equivalentes a 1µg/10µl foram selecionadas para novas diluições utilizadas em ensaios de análise da expressão desses homólogos em extratos totais de *T. brucei* [Figuras 2A e 2B].

Análise da expressão dos homólogos *TbEIF4E1-3*

Para a análise da expressão dos fatores em extratos totais de *T. brucei* por *Western blot*, foram incubados os respectivos anticorpos purificados em membranas contendo diluições de concentrações estimadas de proteína recombinante juntamente com diluições de concentrações conhecidas de extrato total de células de *T. brucei* [Figuras 3A-C].

Para a quantificação da expressão das proteínas nas duas formas celulares de *T. brucei* os valores obtidos foram os seguintes: o *TbEIF4E1* foi encontrado nas duas formas com o valor em torno de $1,2 \times 10^4$ moléculas/célula na forma procíclica (PCF) e $2,4 \times 10^4$ moléculas/célula na forma sanguínea (BSF); o *TbEIF4E2* não foi detectado nas duas formas e o *TbEIF4E3* foi encontrado apenas na forma procíclica no valor em torno de $1,44 \times 10^5$ moléculas/célula [Tabela 2]. O quarto homólogo de ao eIF4E de *T. brucei* não pode ser quantificado, pois a proteína recombinante desse homólogo se mostrou muito lábil, o que impossibilitou uma análise mais eficiente dos ensaios de *Western blot*, no entanto os experimentos já executados apontam indícios que este homólogo somente é expresso na fase procíclica do parasita (dados não mostrados).

Análise da interação ao cap dos homólogos *LmEIF4E* e *TbEIF4E*

A interação com a estrutura m⁷GTP cap é a característica principal das proteínas da família eIF4E [9], assim a investigação da afinidade dos homólogos putativos de *T. brucei* à estrutura cap forneceria indícios de qual destes poderia fazer parte do complexo eIF4F. Para a

execução dos ensaios de afinidade ao cap, os homólogos ao eIF4E de *L. major* e *T. brucei* clonados, foram transcritos [Figura 4] e depois traduzidos *in vitro* em sistema de reticulócito de coelhos [Figura 5]. Em seguida cada um dos homólogos ao eIF4E marcados de *L. major* e *T. brucei*, foram incubados com a resina contendo a estrutura m⁷GTP cap e avaliados quanto a sua ligação específica para essa resina.

Dentre os homólogos testados de *L. major*, apenas o *LmEIF4E1* foi capaz de se ligar ao cap de forma eficiente, conforme demonstrado na Figura 6A. E dentre os homólogos de *T. brucei* testados, três foram capazes de se ligar ao cap de forma eficiente (*TbEIF4E1*, *TbEIF4E2* e *TbEIF4E4*), conforme demonstrado na Figura 6B.

Discussão

Nosso grupo vem desenvolvendo trabalhos a fim de estudar o complexo eIF4F em tripanosomatídeos. Com base em análise de seqüências oriundas de projetos genoma de *L. major* foram identificados quatro homólogos ao fator eIF4E (denominados *LmEIF4E1-4*)[22]. Todos com respectivas representações em *T. brucei*, onde como exemplo os ortólogos de eIF4E são denominados de *TbEIF4E1-4*. A multiplicidade de fatores identificados e características próprias remetem à possibilidade de uma organização diferente do complexo de iniciação da tradução, podendo ser relacionada à adaptação aos hospedeiros e/ou seleção de mRNAs para o controle pós-transcricional, importante nesse grupo de organismos [24].

Até o momento a expressão desses fatores não foi investigada ao longo do ciclo de vida do parasita. Neste trabalho, os ensaios quantitativos dos homólogos ao eIF4E de *T. brucei* revelaram que o *TbEIF4E3* também é o mais abundante em células na fase do inseto e ainda que é aparentemente ausente ou não detectado em células da fase sanguínea. O *TbEIF4E1* foi detectado em pequenas quantidades tanto na fase do inseto (como encontrado

em *L. major*) quanto na sanguínea e o *TbEIF4E2* curiosamente não foi detectado em nenhuma das duas fases. Os valores encontrados estão de acordo com o constatado para cada um dos homólogos estudados em *L. major* [24] e estão um pouco abaixo dos correspondentes aos encontrados em leveduras ($\sim 7 \times 10^5$ moléculas/ célula) [25] [Tabela 1]. No entanto, em leveduras, boa parte do eIF4E está ligado à proteína p20 (um inibidor da tradução), diminuindo assim a quantidade de eIF4E disponível para a tradução [25]. Assim os níveis encontrados em *T. brucei* e leveduras podem ser equivalentes, uma vez que não foram ainda relatados homólogos de proteínas ligantes aos eIF4Es em Tripanosomatídeos.

A análise feita com as seqüências dos homólogos ao eIF4E de *L. major* e de *T. brucei* revelou que os homólogos *LmEIF4E1-2* e *TbEIF4E1-2* possuem todas as características suficientes para a ligação ao cap enquanto que os *LmEIF4E3-4* e *TbEIF4E4* possuem apenas algumas [22]. Recentemente, o homólogo *LmEIF4E1* (denominado *LeishIFE-1*) foi testado em ensaios de afinidade ao cap mono e tetrametilado. Nesses ensaios foi constatada a afinidade por ambas as estruturas com valores similares [21]. Em trabalho posterior três dos homólogos identificados em *L. major* (*LmEIF4E1-3*) foram testados quanto à afinidade de ligação à estrutura cap monometilada e apenas um desses, o *LmEIF4E1*, foi capaz de se ligar especificamente [22]. Os ensaios de afinidade ao cap realizados neste trabalho demonstraram que dentre os quatro homólogos ao eIF4E testados ao de *T. brucei*, três deles foram capazes de se ligar ao cap. Curiosamente o *TbEIF4E2* possui essa capacidade, não demonstrada pelo seu homólogo em *L. major*, denotando alguma diferença entre suas propriedades. Tal disparidade pode ser provinda da existência de duas inserções não conservadas de 10 e 37 aminoácidos respectivamente na porção C-terminal da proteína do ortólogo *LmEIF4E2* de *L. major*. A primeira inserção ocorre entre uma folha- β pregueada e uma α -hélice e a segunda inserção ocorre entre duas folhas- β pregueadas, segundo comparação com o modelo de

mamíferos [26,27], o que poderia causar um desarranjo no sítio hidrofóbico de ligação ao cap nessa proteína, impossibilitando a ligação dessa proteína à estrutura cap.

Em teoria os homólogos *LmEIF4E3-4* e *TbEIF4E3-4* não poderiam ligar ao cap porque não possuem o resíduo de triptofano conservado na posição correspondente ao triptofano 56 de mamíferos (resíduo Trp 58 em leveduras) envolvido no processo de empacotamento π - π . Em *L. major* na posição do resíduo citado há uma substituição para uma metionina (resíduo Met 170) no *LmEIF4E3* e por um ácido glutâmico (resíduo Glu 146); em *T. brucei* nesta mesma posição há uma substituição do triptofano por uma leucina (resíduo Leu 261) no *TbEIF4E3* e por uma serina (resíduo Ser 263) no *TbEIF4E4*. Todas essas substituições teoricamente implicariam na perda da capacidade de uma ligação estável à estrutura cap, uma vez que esses aminoácidos não possuem anéis aromáticos para o processo de empacotamento do tipo π - π característico das proteínas de ligação ao cap [26,27]. No entanto, o homólogo *TbEIF4E4* é capaz de se ligar ao cap, denotando um possível reconhecimento do cap diferenciado (ainda não esclarecido) do relatado na literatura [26,27]. Interessantemente os homólogos mais abundantes tanto em *L. major* [22] e *T. brucei* (*LmEIF4E3* e *TbEIF4E3* respectivamente) não demonstram a capacidade de se ligar ao cap. Isto pode ser devido à necessidade de mudanças na conformação desses quando associados a um dos homólogos ao eIF4G, o que pode aumentar a afinidade de ambos ao cap [28,29]. Análises de interferência de RNA constataram ainda que o *TbEIF4E3* é essencial para a sobrevivência do parasita na sua forma procíclica enquanto os homólogos *TbEIF4E1*, *TbEIF4E2* e *TbEIF4E4* não o são (Dhalia *et al.*, dados não publicados). Ademais, o homólogo *LmEIF4E3* é o único capaz de interagir *in vitro* com o respectivo homólogo do eIF4G de *L. major* (Reis *et al.*, dados não publicados) denotando ainda mais a importância do terceiro homólogo nestes parasitas.

Assim foram encontradas similaridades e algumas diferenças (que devem ser analisadas futuramente) nas avaliações das proteínas de ligação ao cap de *L. major* e *T.*

brucei. A investigação detalhada do processo de tradução nestes organismos pode revelar diferenças significativas que poderão ser utilizadas para a produção de agentes quimioterápicos mais eficientes que atuem na inibição desse processo. Para tal, análises adicionais são necessárias para uma elucidação mais apurada da participação dos homólogos a proteínas de ligação ao cap no mecanismo de iniciação da tradução em tripanosomatídeos.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, CAPES, FIOCRUZ, FACEPE e the Wellcome Trust. As seqüências de *L. major* e *T. brucei* foram obtidas a partir do Banco de dados *Leishmania major* Genome Network e *Trypanosoma brucei* Genome Network com apoio do The Wellcome Trust. Este trabalho não poderia ter sido executado sem a disponibilidade das seqüências produzidas por esses bancos de dados.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Hershey JWB, Merrick WC. Translational control of gene expression. Cold Spring Harbor Press, 2000; pp. 33-75.
- [2] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 Initiation Factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:913-963.
- [3] Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CUT. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *PNAS* 2001; 98(13): 7029-7036.
- [4] Aravind L, Koonin EV. Eukaryote-specific domains in translation initiation factors: Implications for translation regulation and evolution of the translation system. *Gen Res* 2000; 10:1172-1184.
- [5] Richter-Cook NJ, Dever TE, Hensold JO, Merrick WC. Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor: Eukaryotic initiation factor H. *J Biol Chem* 1998; 273:7579-7587.
- [6] Preiss T, Hentze MW. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *BioEssays* 2004; 25:1201-1211.
- [7] Jankowska-Anyszka M, Lamphear BJ, Aamodt EJ, Harrington T, Darzynkiewicz E, Stolarski R, Rhoads RE. Multiple isoforms of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E

in *Caenorhabditis elegans* can distinguish between Mono- and Trimethylated mRNA cap structures. *J Biol Chem* 1998; 273(17):10538–10542.

[8] Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande AM, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T, Rhoads RE. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 2000; 275: 10590-10596.

[9] Goss DJ, Carberry SE, Dover TE, Merrick WC, Rhoads RE. Fluorescence study of the binding of m7GpppG and rabbit globin mRNA to protein synthesis initiation factors 4A, 4E, and 4F. *Biochem* 1990; 29:5008-5012.

[10] Duncan R, Milburn SC, Hershey JW. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. *Biol Chem* 1987; 262:380-388.

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

[12] Sonenberg N. Translational control. In: Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-cap by domains of eIF4G. (Von deer Haar, T., Ball, P.D., and MacCarthy, J.E.G.). *Biol. Chem.* 39:30551-30555.

[13] Ladeira de Campos CB, Lopes UG. *Leishmania braziliensis*, molecular characterization of an elongation factor 1alpha gene. *Gene* 1997; 198:281-288.

- [14] Billaut-Mulot O, Schoneck R, Fernandez-Gomez R, Taibi A, Capron A, Pommier V, Plumas-Marty B, Loyens M, Ouaisi A. Molecular and immunological characterization of a *Trypanosoma cruzi* protein homologous to mammalian elongation factor 1 gamma. *Biol Cell* 1994; 82:39-44.
- [15] Nakamura Y, Hashimoto T, Kamaishi T, Adachi J, Nakamura F, Okamoto K, Hasegawa M. Phylogenetic position of kinetoplastid protozoa inferred from the protein phylogenies of elongation factors 1alpha and 2. *J Biochem (Tokyo)* 1996; 119:70-79.
- [16] Batista JA, Teixeira SM, Donelson JE, Kirchhoff LV, de Sa CM. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 67:301-12.
- [17] Siddiqui N, Kozlov G, D'Orso I, Trempe J-F, Gehring K. Solution structure of the c-terminal domain from poly(a)-binding protein in *Trypanosoma cruzi*: A vegetal PABC domain. *Prot Sci* 2003; 12:1925-1933.
- [18] Hotchkiss TL, Nerantzakis GE, Dills SC, Shang, Read LK. *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5 untranslated region sequence elements. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 98:117-29.
- [19] Bates EJ, Knuepfer E, Smith DF. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:1211-1220.

- [20] Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacelar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaró R, Trinchieri G, Reed SG. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 1995; 181:1527-37.
- [21] Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira Z, Keasar C, Orr-Dahan I, Jankowszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Shapira, M. Cap-binding activity of an homolog from *Leishmania*. *RNA* 2004; 10(11):1-12.
- [22] Dhalia R, Reis CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, Standart N, de Melo Neto OP. Translation initiation in *Leishmania major*: characterization of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasit* 2005; 140:23-41.
- [23] Sambrook J, Russel DW. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, New York, USA 2001.
- [24] Clayton CE. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 2002; 21:1881-88.
- [25] von der Haar T, McCarthy EG. Intracellular translation initiation factor levels in *Saccharomyces cerevisiae* and their role in cap-complex function. *Mol Microbiol* 2002; 2:531-544.
- [26] Niedswiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieczyska A, Dadlez M, Gingras A-C, Mak P, Darzynkiewicz E, Sonenberg N, Burley SK,

Stolarski R. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5'cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol* 2002; 319: 615–635.

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

[28] Pestova TV , Hellen CU. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57:651–674.

[29] Gross, JD, Moerke, NJ, von der Haar T, Lugovskoy AA, Sachs A, McCarthy JEG, Wagner G. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 2003; 115:739-750.

Tabela 1: Oligonucleotídeos e sítios de clonagem utilizados na clonagem homólogos *TbEIF4E1-4*.

Gene de <i>T. brucei</i>	Orientação do primer	Oligonucleotídeos
<i>TbEIF4E1</i>	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGCAGACCTTACTGAGAC
	3'	GGATCC <u>CAGAACCCAATTGATACAAGGGTGG</u>
<i>TbEIF4E2</i>	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGGAAGCGAATCATGTTTC
	3'	GGATCC <u>CAGAACCGCCTTGCTAGCGCCATGG</u>
<i>TbEIF4E3</i>	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGAATCCAGAAGCGGAG
	3'	GGATCC <u>CAGAACCAAGCGTGAAGTCGGGTGTTATC</u>
<i>TbEIF4E4</i>	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGCAAAATTTACGTGCTG
	3'	GGATCC <u>CAGAACCCCAAAGCCGACGATTGCC</u>

Os nucleotídeos sublinhados correspondem as sítios de clonagem para as enzimas *Hind III* (primers 5') e *Bam HI* (primers 3').

Tabela 2: Sumário da quantificação dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de *Trypanosoma brucei*.

Homólogo <i>T. brucei</i>	Nº de moléculas/célula			
	<i>T. brucei</i>		<i>L major</i> [#]	Levedura*
	PCF	BSF		
<i>TbEIF4E1</i>	1,2x10 ⁴	2,4x10 ⁴	1 ± 0.3 x 10 ³	
<i>TbEIF4E2</i>	ND	ND	3,2 ± 1.5 x 10 ³	3.2-3.6 x 10 ⁵
<i>TbEIF4E3</i>	1,44x10 ⁵	ND	7,1 ± 3.4 x 10 ⁴	

Números baseados em [22] para eIF4E em promastigotas de *Leishmania major*.

* Números baseados em [25] para eIF4E de leveduras.

ND – Não Determinado.

[illegible]

Figura 1. Alinhamento comparando as seqüências de aminoácidos dos homólogos ao fator de iniciação eIF4E de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* com os homólogos de leveduras e de humanos. Aminoácidos idênticos em mais de 60% das seqüências estão destacados em cinza escuro, enquanto os aminoácidos similares em mais de 60% das seqüências estão destacados em cinza claro. Códigos de acesso no GeneBank: eIF4E de levedura- *Sc* (P07260); eIF4E Humano- *Hs* (P06730). Os aminoácidos em negrito e sublinhados representam as duas inserções não conservadas existentes no homólogo *LmEIF4E2*. * Indica os triptófanos conservados típicos do eIF4E. ↓ Indica os triptófanos conservados, típicos do eIF4E, envolvidos diretamente no reconhecimento do nucleotídeo cap.

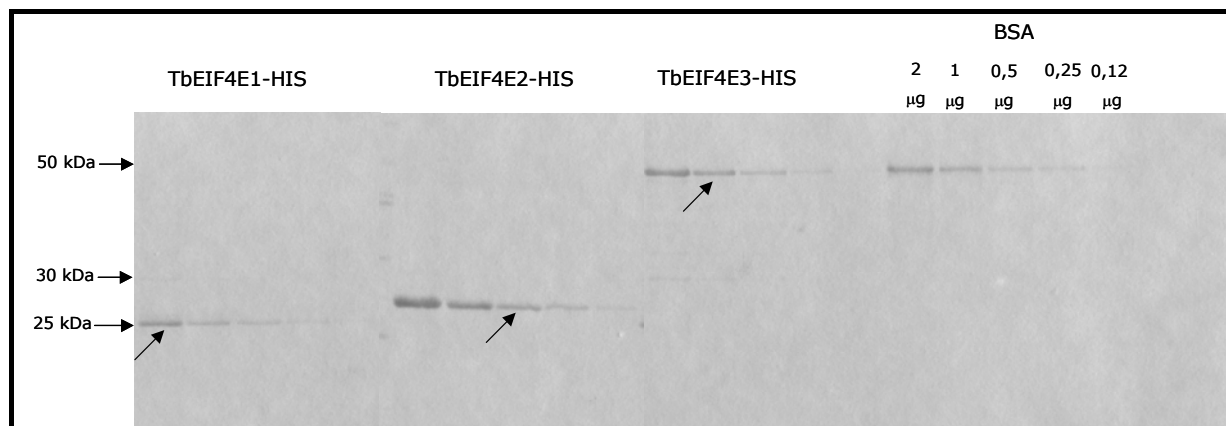
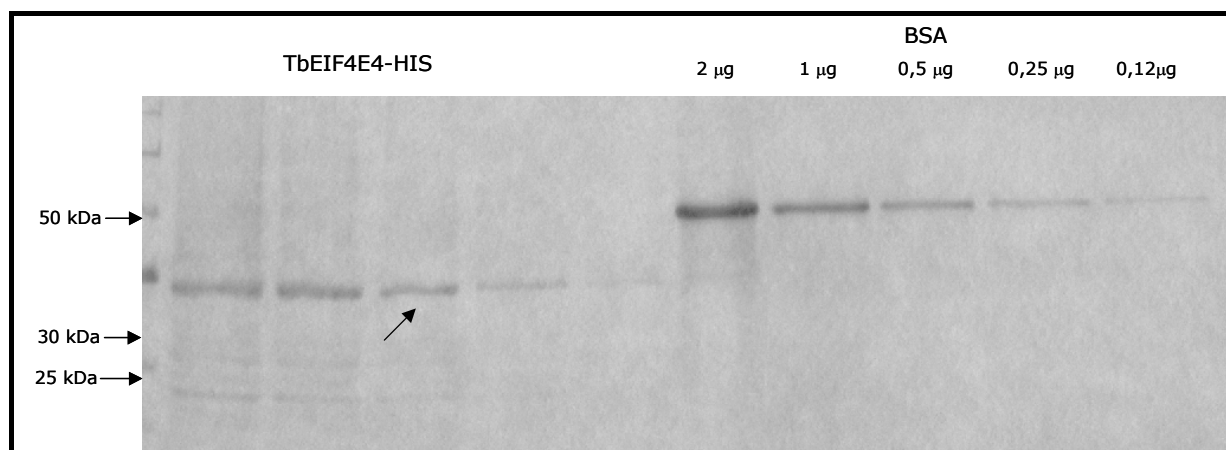
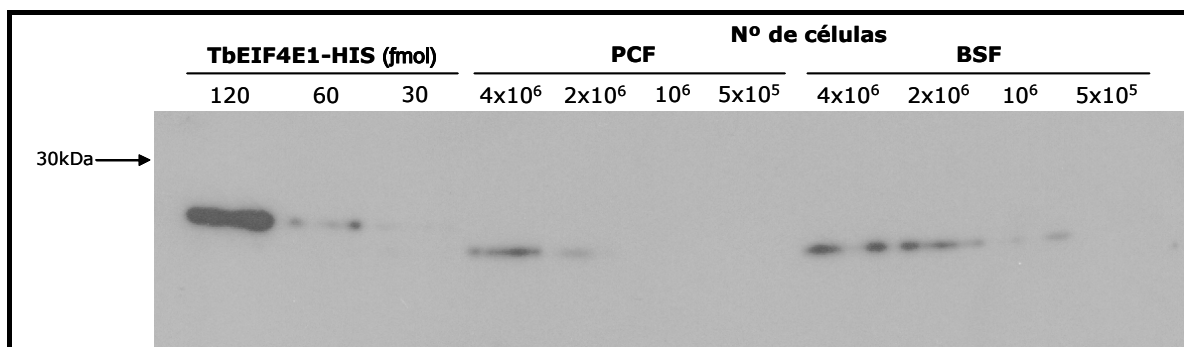
Freire *et al.*, Figura 2.**A****B**

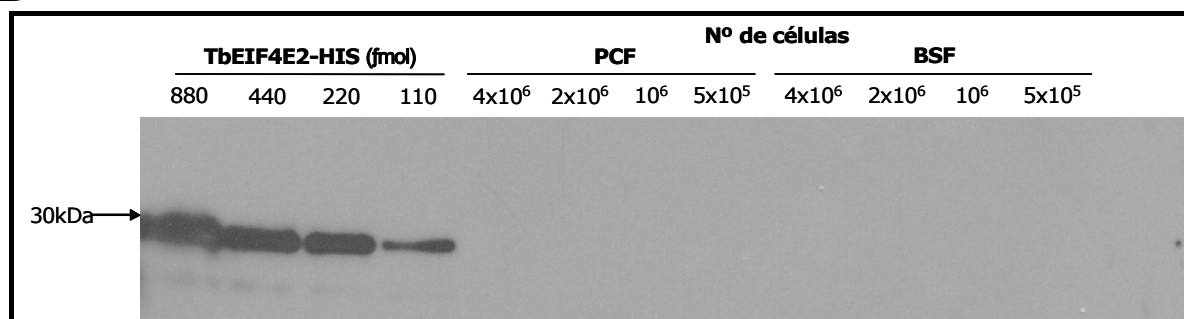
Figura 2. Géis SDS-PAGE das quantificações das proteínas homólogas ao eIF4E de *T. brucei* expressas em bactérias e purificadas. A - Proteínas recombinantes *TbEIF4E1-3*. B - Proteína recombinante *TbEIF4E4*. As setas indicam quantidades estimadas de 1µg (A) e 0,5µg (B), baseadas na comparação com a curva de albumina de soro bovino (BSA).

Freire *et al.*, Figura 3

A



B



C

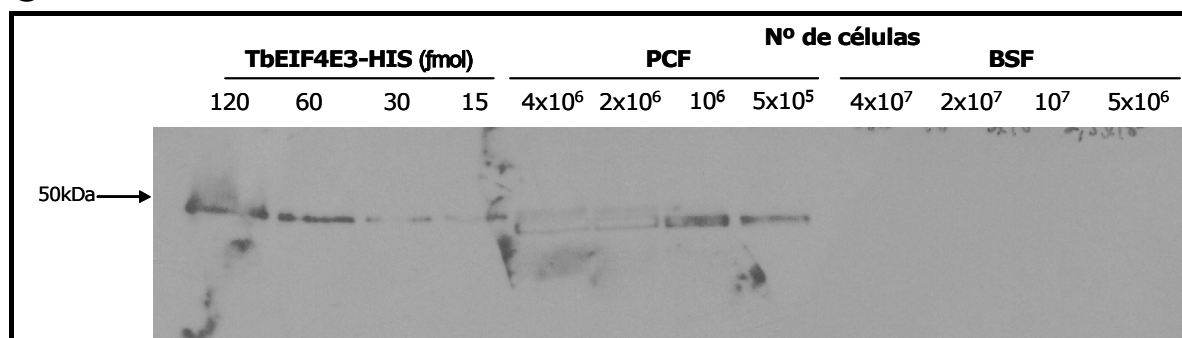


Figura 3. Análise da expressão e quantificação das proteínas homólogas ao eIF4E em extratos totais de *Trypanosoma brucei*. A-C – As diferentes proteínas recombinantes (*TbEIF4E1-3*) foram diluídas nas devidas concentrações (em fentomoles) e, juntamente com extratos totais de células das formas procíclica (PCF) e sanguínea (BSF) de *Trypanosoma brucei*, foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e analisados por *western blot* contra os anticorpos específicos para cada isoforma.

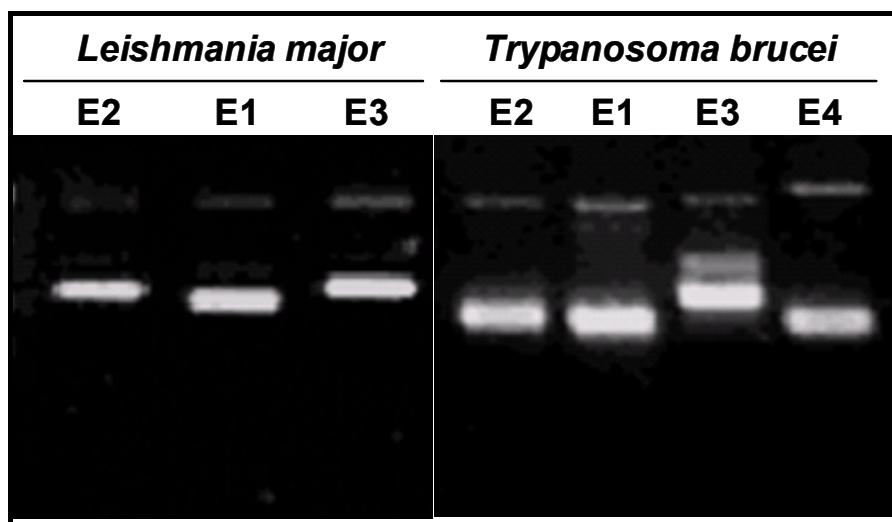
Freire *et al.*, Figura 4

Figura 4. Fotografia do gel de separação eletroforética (agarose) dos RNAs dos homólogos ao fator eIF4E de *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* obtidos por transcrição *in vitro*.

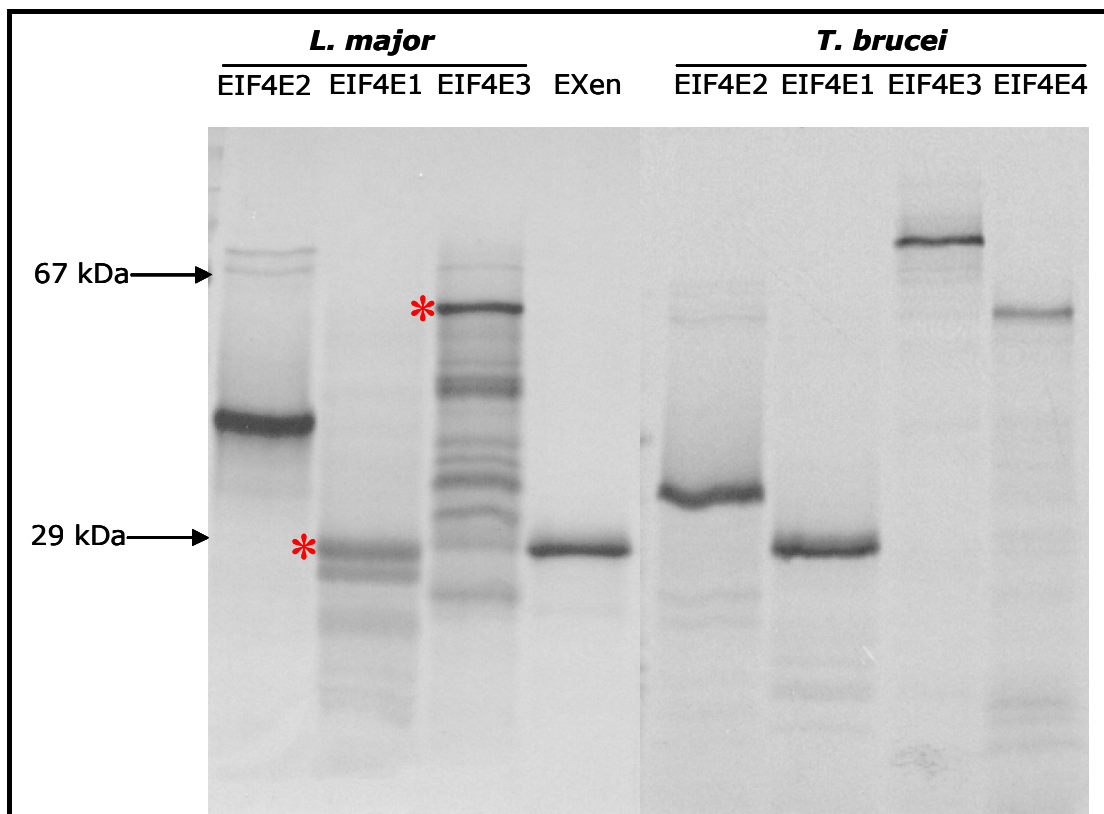
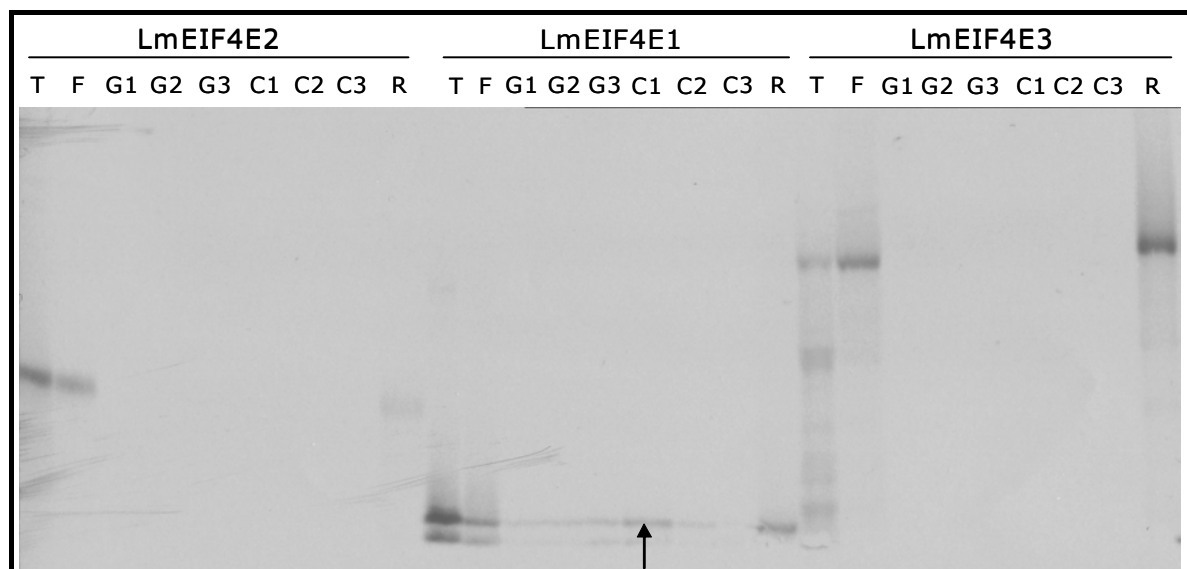
Freire *et al.*, Figura 5

Figura 5. Autoradiografia de separação eletroforética (SDS-PAGE) de proteínas homólogas ao fator eIF4E de *Leishmania major* (EIF4E1-E3) e *Trypanosoma brucei* (EIF4E1-E4) obtidas por tradução *in vitro* e marcadas com S^{32} . EXen: homólogo ao eIF4E de *Xenopus leavis*, utilizado como controle positivo. As proteínas dos homólogos *LmEIF4E1* e *LmEIF4E3* sofreram um pouco de degradação durante o processo, gerando múltiplas bandas. As bandas correspondentes às proteínas intactas estão marcadas com o asterisco (*).

Freire *et al.*, Figura 6

A



B

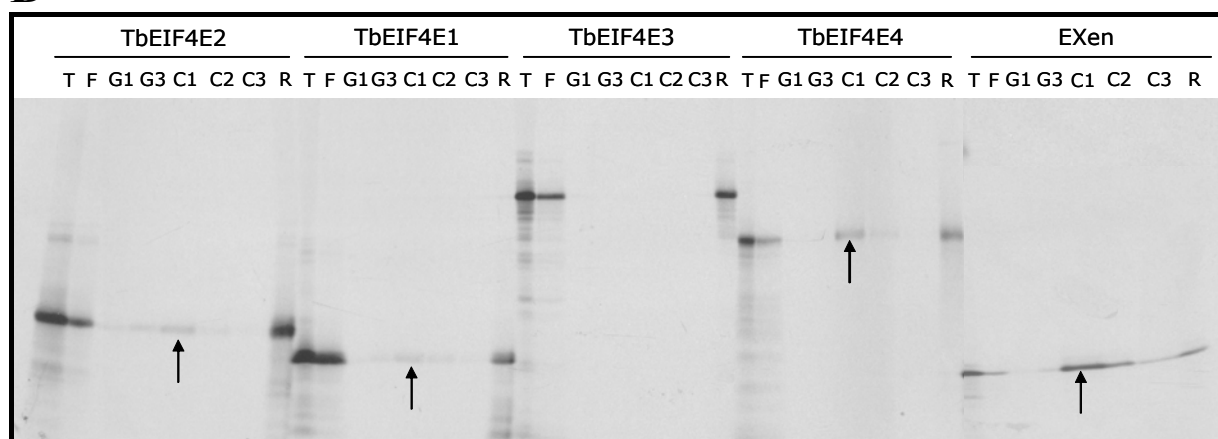


Figura 6. Autoradiografias de separação eletroforética (SDS-PAGE) dos ensaios de ligação ao cap das proteínas homólogas ao fator eIF4E de *Leishmania major* (A), utilizada neste trabalho como controle positivo, e de *Trypanosoma brucei* (B), obtidas por tradução *in vitro* e marcadas com S^{35} . T- Tradução original; F- Sobrenadante da incubação; G1-G3- Lavagens com GTP; C1-C3- Eluições com cap; e R- Resina m^7 GTP-sefarose. Exen – Controle positivo: eIF4E de *Xenopus leavis*. As setas indicam o desligamento das proteínas quando eluídas com o cap solúvel.

6- ABSTRACT

In eukaryotes, protein synthesis initiates with the binding of the multimeric translation initiation complex eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) to the cap nucleotide, present on the 5' end of the mRNAs, with the subsequent recruitment of the small ribosomal subunit. eIF4F is composed by three subunits: eIF4E, the cap binding protein; eIF4A, a RNA helicase; and eIF4G, which acts as a scaffold for the complex. Little is known in detail about protein synthesis in Trypanosomatids; however the presence of the conserved modified cap structure, cap4, suggests possible differences in the way ribosomes bind to the mRNA. Our group has previously identified multiple homologues to the eIF4F subunits in trypanosomatids, and the objective of this work was to characterize the eIF4E homologues in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. The quantitation assays of the *L. major* homologues (*LmEIF4E1-3*) revealed that *LmEIF4E1* and *LmEIF4E2* are rare and *LmEIF4E3* is a very abundant in promastigote form of this parasite. Among the *T. brucei* homologues (*TbEIF4E1-3*), *TbEIF4E1* is present at low levels in both procyclic and bloodstream forms; *TbEIF4E2* is rare or not detected in either form; and *TbEIF4E3* is very abundant in the procyclic form but not detected in bloodstream form. In cap-binding assays, only *LmEIF4E1* and the *TbEIF4E1*, *TbEIF4E2* and *TbEIF4E4* homologues were able to bind the 7-methyl-GTP Sepharose resins. These assays revealed that only one of the homologues tested in both parasites seem to fulfill the expected characteristics of a translational initiation factor. However, new assays are necessary for a better characterization of these proteins and the understanding of their roles in translation in trypanosomatids.

Key words: eIF4E, Translation initiation, Trypanosomatids.

7. CONCLUSÕES

- O homólogo ao eIF4E mais abundante e provável candidato funcional na fase procíclica de *Leishmania major* é o *LmEIF4E3*;
- O homólogo ao eIF4E mais abundante e provável candidato funcional na fase procíclica de *Trypanosoma brucei* é o *TbEIF4E3*;
- O homólogo ao eIF4E mais abundante e provável candidato funcional na fase sanguínea de *Trypanosoma brucei* é o *TbEIF4E1*;
- Existe uma conservação na expressão entre os homólogos EIF4E1 à EIF4E3 na fase de inseto de ambos os parasitas;
- Apenas um dos homólogos ao eIF4E de *Leishmania major* testados, o *LmEIF4E1*, foi capaz de se ligar especificamente à estrutura cap monometilada;
- Três dos homólogos ao eIF4E de *Trypanosoma brucei* testados, *TbEIF4E1*, E2 e E4, foram capazes de se ligar especificamente à estrutura cap monometilada;
- Existe uma diferença na afinidade ao cap entre os homólogos *LmEIF4E2* e *TbEIF4E2*.

8. ANEXO

8.1 Amplificação e clonagem do gene *LmEIF4E4*

As amplificações do *LmEIF4E4* a partir de DNA total de *L. major* foram feitas usando a Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen®) e um conjunto de primers que permitiriam que a sequência amplificada fosse flanqueada pelos sítios *Afl* III / *Not*I (primer 5' B06 - CT GAC ATG TCT ACC CCT CTC GAT GTG; primer 3' B08 - TA TGC GGC CGC GTA GCG ACG ACG GTT CTT TTT C) para clonagem no plasmídeo pET 21D (Novagen®); *Bam* HI/ *Not* I (Primer 5' B07 - TCT GGA TCC ATG TCT ACC CCT CTC GAT GTG; primer 3' B08 descrito acima) para clonagem no plasmídeo pGEX4T3 (Pharmacia®). O ciclo básico utilizado para as reações foi: 94°C/1', 60°C/30s e 72°C/2', executado 30 vezes por reação, finalizando a 4°C . (Fig. 1).

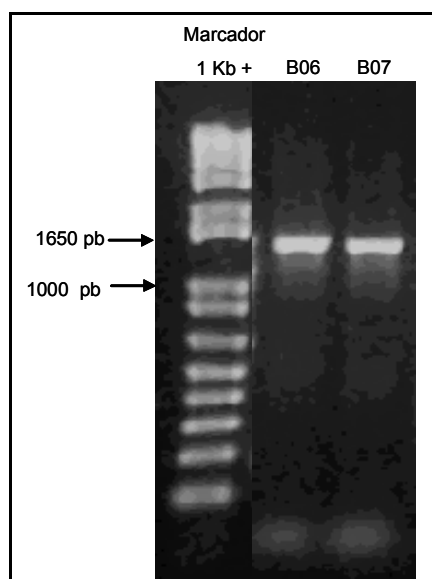


Fig. 1. Reação de amplificação por PCR *LmEIF4E4* com os primers B06 e B08 para a clonagem no plasmídeo pET21D; e B07 e B08 para a clonagem no plasmídeo pGEX4T3. a partir do DNA total de *Leishmania major*.

Após a amplificação os fragmentos obtidos foram extraídos fenol/clorofórmio 1:1, precipitado com etanol 100% / NaCl 0,3 M e ressuspendidos em 20 µL de H₂O. Em seguida foram digeridos sequencialmente com as enzimas *AFL* III/ *Not* I para clonagem no vetor pET21D e *Bam* I/ *Not* I para clonagem no vetor pGEX4T3. Após as

digestões os fragmentos foram purificados com kit QIAGEN® e clonados nos seus respectivos vetores previamente digeridos com as mesmas enzimas, gerando as construções pET-*LmEIF4E4* e pGEX-*LmEIF4E4*. Estas construções foram clonadas em bactérias *Escherichia coli* DH5α para maxi preparações de DNA plasmidial e, em seguida em bactérias *E. coli* BL21 *star*, para a expressão da proteína fusionada à cauda de histidinas ou à GST (glutathione-S-transferase).

8.2 Transcrição e tradução *in vitro* do gene *LmEIF4E4*

A construção pET-*LmEIF4E4* foi então linearizada com a digestão pela enzima *Not I* e, em seguida, transcrita *in vitro* com a enzima T7 RNA polimerase (Amersham Biosciences). A reação de transcrição se processou em um volume final de 50 µL contendo: 5µL tampão de transcrição (tris-HCl 400mM, pH 7, MgCl₂ 150mM), 2,5 µL de m7-GTP (cap) 10mM (New England Biolabs), 2 µL de solução de NTPs (GTP a 10 mM, enquanto os outros NTPs a 100 mM), 0,5 µL DTT 1M, 1,5 µL inibidor de RNase (10 U/µL), 2,0 µL T7 RNA polimerase (62 U/µL) (Pharmacia), 3 µg de DNA plasmidial linearizado e H₂O (destilada, deionizada, estéril e tratada com DEPC). Essa reação foi incubada a 37 ° C por 30 minutos, quando se adicionou 0,5 µL de GTP a 100 mM. Após outros 30 minutos de incubação foi adicionado mais 0,5 µL de T7 RNA polimerase e incubado por mais 60 minutos a 37 °C. Ao término da incubação adicionou-se ao sistema 50 µL de tampão TE 10X (Tris 10 mM, EDTA 10 mM) para terminar a reação. Da reação final de transcrição, com o volume final de 100 µL, foi analisado 1 µL dos transcritos sintetizados em gel de agarose 1% (Fig. 2A).

O RNA sintético obtido foi extraído em fenol/clorofórmio 1:1, precipitado com etanol 100% / NaCl 0,3 M e ressuspendidos em 20 μ L de H₂O. Uma alíquota de 1 μ L RNA purificado ($\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi traduzido no lisado de reticulócito de coelho, de acordo com o fabricante (Rabbit Reticulocyte Lysate - Promega[®]) contendo metionina marcada com S³⁵ (2.5 $\mu\text{Ci}/\text{reação}$). A reação foi submetida à temperatura de 30° C por 90 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão Laemmli 2X, e o produto da tradução foi separado por eletroforese em gel SDS-PAGE 15% em condições desnaturantes, seco á vácuo e revelado por autoradiografia com exposição em filme Biomax-MR[®] (Kodak) (Fig. 2B).

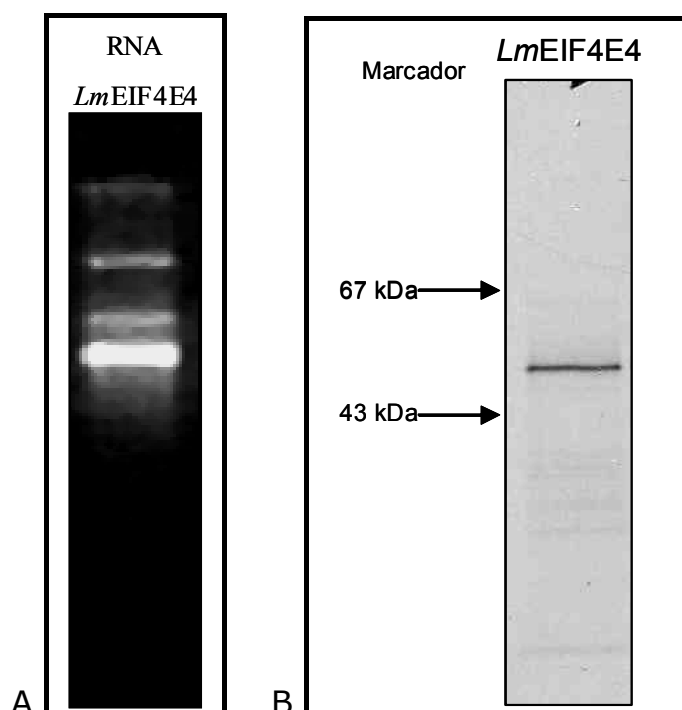


Fig. 2. Transcrição e tradução *in vitro* do gene *LmEIF4E4*. A – Gel da separação eletroforética (agarose) do RNA do homólogo *LmEIF4E* obtido por transcrição *in vitro* do gene clonado na construção pET-*LmEIF4E4*. B – Autoradiografia da separação eletroforética (SDS-PAGE) da proteína marcada com S³⁵ do homólogo *LmEIF4E4* obtida por tradução *in vitro* em lisado de reticulócito de coelho.

8.3 Expressão da proteína *LmEIF4E4* em bactérias

O gene *LmEIF4E4*, recentemente clonado, teve sua proteína (33,8 kDa) expressa, fusionada à cauda de histidinas e à glutathione S-transferase (GST), em bactérias *E. coli* BL21 por meio da indução com IPTG, como relatado anteriormente nos artigos (Fig. 3).

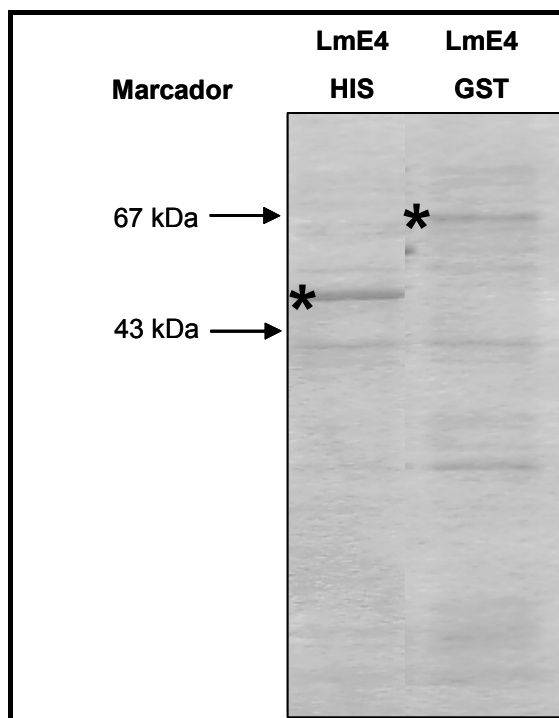


Fig. 3. Gel SDS-PAGE com as proteínas provenientes da expressão em bactérias da proteína *LmEIF4E4* fusionada à cauda de histidinas ou à GST, indicadas pelos asteriscos (*).

As construções pET-*LmEIF4E4* e pGEX-*LmEIF4E4* vão ser em breve seqüenciadas para a verificação correta da amplificação e clonagem. Em seguida será feita a indução em larga escala das proteínas para a imunização de coelhos e obtenção dos anticorpos.

8.4 Análise da especificidade dos anticorpos *LmEIF4E1-3*

Para a análise da especificidade dos anticorpos disponíveis contra as proteínas *LmEIF4E1-3*, estes foram purificados como o especificado anteriormente, e utilizados em ensaios de *Western-blot*, como descrito anteriormente. Segundo essa análise, os três anticorpos se mostraram específicos no reconhecimento das suas respectivas proteínas e foram capazes de reconhecer as proteínas do extrato total de *L. major* e *L. chagasi*, e o *LmEIF4E1* pôde ser também detectado em *L. braziliensis*, mas os três anticorpos não foram capazes de reconhecer as proteínas dos extratos e lisados de *Blastocrithidia sp.*, *T. cruzi* e *T. brucei* (Fig.4-6).

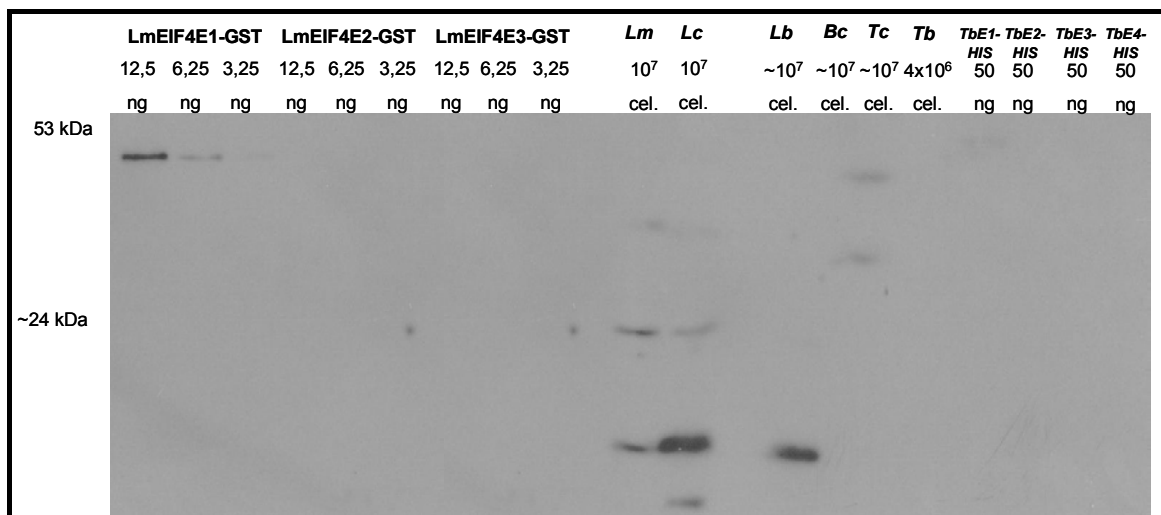


Fig. 4. *Western blot* demonstrando a especificidade do anticorpo do *LmEIF4E1* testado contra as proteínas recombinantes *LmEIF4E1-3* e *TbEIF4E1-4* (*TbE1-TbE4*) e extratos totais de vários tripanosomatídeos (Lm- *Leishmania major*; Lc- *Leishmania chagasi*; Lb- *Leishmania braziliensis*; Bc- *Blatocrithidia sp.*; Tc- *Trypanosoma cruzi*; Tb-*Trypanosoma brucei*). A proteína nativa do extrato de *Leishmania major* se mostrou muito lábil e passível de degradação, como pode ser observado .

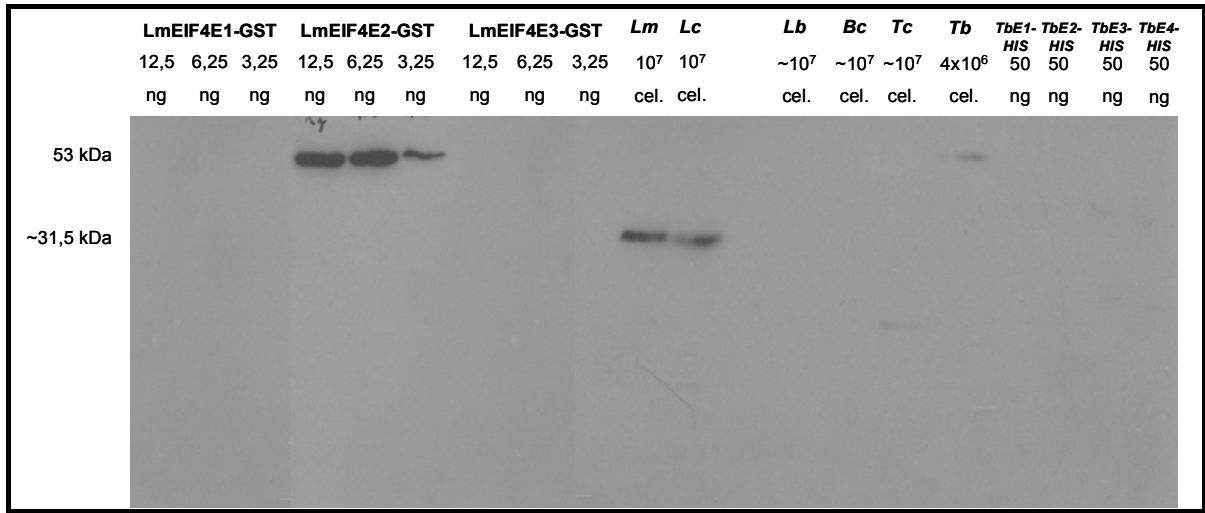


Fig. 5. *Western Blot* demonstrando a especificidade do anticorpo contra o *LmEIF4E2* testado contra proteínas recombinantes *LmEIF4E1-E3* (fusionadas à GST) e *TbEIF4E1-4* (*TbE1-E4*, fusionadas à cauda-HIS) e extratos totais de vários tripanosomatídeos (*Lm*-*Leishmania major*; *Lc*- *Leishmania chagasi*; *Lb*- *Leishmania braziliensis*; *Bc*- *Blatocrithidia* sp.; *Tc*- *Trypanosoma cruzi*; *Tb*-*Trypanosoma brucei*).

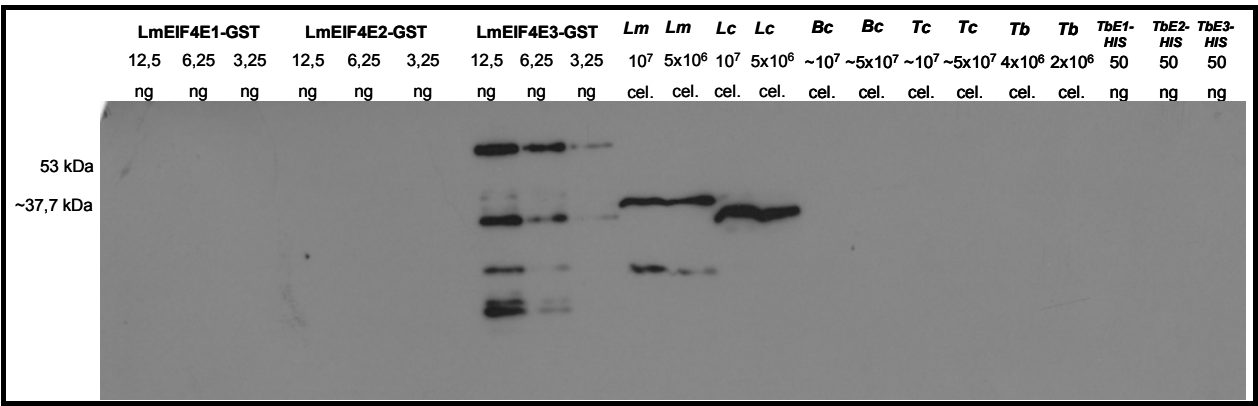


Fig. 6. *Western blot* demonstrando a especificidade do anticorpo contra o *LmEIF4E3* testado contra proteínas recombinantes *LmEIF4E1-E3* (fusionadas à GST) e *TbEIF4E1-3* (*TbE1-E3*, fusionadas à cauda-HIS) e extratos totais de vários tripanosomatídeos (*Lm*-*Leishmania major*; *Lc*- *Leishmania chagasi*; *Bc*- *Blatocrithidia* sp.; *Tc*- *Trypanosoma cruzi*; *Tb*-*Trypanosoma brucei*).