

MARIA CAROLINA STRANO MORAES

**TbeIF2K2, uma nova quinase de eIF2 α associada à membrana da bolsa
flagelar do *Trypanosoma brucei***

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Moraes, Maria Carolina Strano. TbeIF2K2, uma nova quinase de eIF2 α associada à membrana da bolsa flagelar do *Trypanosoma brucei* / Maria Carolina Strano Moraes – São Paulo, 2007

Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

A novel membrane-bound eIF2 α kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*

1. eIF2 α . 2. *Trypanosoma brucei*. 3. Doença do Sono. 4. Síntese protéica. 5. Quinases de eIF2 α .

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. José Daniel Lopes
Coordenador da Pós-Graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

**Este trabalho foi realizado com o suporte financeiro da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo –
FAPESP (processo nº 02/13783-9)**

*Dedico este trabalho a meus pais, que
sempre estiveram ao meu lado, apoiando meus
passos, incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

A meus pais e irmãos, por tudo.

A minha família, pelo amor e apoio constantes.

A Dra Beatriz Castilho, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e pelo incentivo, sempre demonstrados.

A Viviane, minha grande amiga e comadre, pelo companheirismo, apoio e amizade. Sua presença foi de fundamental importância para a conclusão deste trabalho.

A Nilce, Catia e Larissa, queridas amigas, pelo carinho e amizade, mesmo que às vezes à distância.

A Bárbara, Carla, Martin, Arthur e Teresa, pelo companheirismo e ajuda.

A Vitória, por toda a ajuda, paciência e carinho.

A Darci e Magda, pelo incentivo e apoio.

A Carol Padovan, Paola, Michelle e Cris, pela amizade, paciência e apoio.

A Simone, Silvia e Carol Jaqueta, grandes e queridas amigas, que sempre estiveram ao meu lado, em todos os momentos, felizes e tristes.

Ao Dr Sergio Schenkman, pelo apoio e ensinamentos.

A todos os colegas do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
I – INTRODUÇÃO.....	1
I.1 – <i>Trypanosoma brucei</i>	1
<i>I.1.1 – A biologia celular do T. brucei</i>	<i>5</i>
<i>I.1.2 – O ciclo de vida do T. brucei.....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.3 – Variação antigênica em T. brucei.....</i>	<i>12</i>
<i>I.1.4 – Regulação da expressão gênica em T. brucei.....</i>	<i>14</i>
I.2 – A Síntese Protéica	19
<i>I.2.1 – O início de tradução nos eucariotos</i>	<i>22</i>
I.3 – Regulação do início da síntese protéica eucariótica.....	25
<i>I.3.1 - Regulação traducional por eIF4F</i>	<i>25</i>
<i>I.3.2 - Regulação traducional por fosforilação de eIF2</i>	<i>26</i>
<i>I.3.3 – As quinases de eIF2α.....</i>	<i>30</i>
I.4 – Fatores e reguladores do início de tradução em tripanossomatídeos.....	32
II – OBJETIVOS	33
III – MATERIAL E MÉTODOS	34
III.1 - Linhagens de <i>Escherichia coli</i>.....	34
III.2 – Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	34
III.3 – Linhagens de <i>T. brucei</i>.....	35
III.4 – Plasmídios e Construções.....	35
III.5 - Oligonucleotídeos.....	37
III.6 - Meios de cultivo	38
III.7 - Manipulação de bactérias	39
<i>III.7.1 - Transformação de E. coli.....</i>	<i>39</i>

III.8 - Manipulação de leveduras	40
III.8.1 - Transformação de <i>S. cerevisiae</i>	40
III.8.2 – Preparação de extratos protéicos de <i>S.cerevisiae</i>	40
III.8.3 – Análise fenotípica em <i>S. cerevisiae</i>	41
III.9 - Manipulação de DNA	41
III.9.1 - Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep).....	41
III.9.2 - Manipulação enzimática de DNA	42
III.9.3 - Ligação de extremidades de DNA.....	42
III.9.4 - Seqüenciamento.....	42
III.9.5 - Resolução eletroforética de DNAs	43
III.9.6 - PCRs.....	43
III.10 – Manipulação de RNA	44
III.10.1 – Extração de RNA total de <i>T. brucei</i>	44
III.10.2 – RT-PCR das 3 quinases de <i>T. brucei</i>	44
III.11 – Manipulação de proteínas	45
III.11.1 – SDS-PAGE.....	45
III.11.2 – Expressão de proteínas recombinantes e preparação de extratos protéicos.....	46
III.11.3 – Quantificação de proteínas	46
III.11.4 – Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	47
III.11.5 – Preparo de extrato protéico de <i>T. brucei</i>	49
III.11.6 – “Western blot”	49
III.12 – Imunização de coelhos	50
III.13 – Purificação de anticorpo contra TbeIF2K2.....	51
III.14 – Ensaio de deglicosilação	51
III.15 – Ensaio de defosforilação.....	52
III.16 – Imunofluorescência.....	52
III.16.1 – Ensaio de marcação com <i>TbeIF2K2</i>	52
III.16.2 – Ensaio de co-localização	53
III.17 - Co-imunoprecipitação de TbBiP e TbeIF2K2	53
III.18 – Imunoprecipitação	54
III.19 – Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i>	55

III.20 – Marcação de proteínas extracelulares com Biotina.....	56
III.21 – Estresse celular.....	56
<i>III.21.1 – Diferentes fases de crescimento</i>	<i>56</i>
<i>III.21.2 – BAPTA</i>	<i>56</i>
IV – RESULTADOS.....	57
IV.1 – Identificação de 3 potenciais quinases de eIF2α em <i>T. brucei</i>	57
IV.2 – TbeIF2K2 localiza-se na bolsa flagelar e em vesículas endossomais de <i>T. brucei</i>.....	65
IV.3 – Interação entre TbeIF2K2 e TbBiP.....	71
IV.4 – Atividade quinase de TbeIF2K2	73
<i>IV.4.1 – TbeIF2K2 fosforila a proteína eIF2α de levedura e de mamíferos.....</i>	<i>73</i>
<i>IV.4.2 – TbeIF2K2 fosforila eIF2α de <i>T. brucei</i></i>	<i>77</i>
IV.5 – Fosforilação de TbeIF2K2 na forma sanguínea de <i>T. brucei</i>	83
IV.6 – TbeIF2K2 em parasitas sanguíneos em diferentes fases de crescimento	85
IV.7 – TbeIF2K2 em parasitas sanguíneos tratados com BAPTA.....	87
V – DISCUSSÃO	90
VI – CONCLUSÕES	98
VII – BIBLIOGRAFIA	99

ABREVIATURAS

°C – graus celsius

µg – micrograma(s)

µl – microlitro(s)

µM – micromolar

mM – milimolar

A – Absorbância

BSA – Albumina bovina sérica

Da – Dalton(s)

5-FOA – “5-fluoroorotic acid” (ácido 5-fluoroorótico)

DNA – ácido desoxiribonucléico

ATP – adenosina trifosfato

GTP – guanosina trifosfato

dNTP – desoxiriboucleotídeo trifosfato

PCR – “Polymerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase)

RT-PCR – “Reverse transcription-PCR” (PCR com transcrição reversa)

DEPC – dietil pirocarbonato

eIF – “eukaryotic initiation factor” (fator de iniciação de eucariotos)

IF – “initiation factor” (fator de iniciação de procariotos)

Ig – Imunoglobulina

kb – quilobase(s)

kDa – quilodalton(s)

MW – peso molecular

mA – miliampére

mRNA – RNA mensageiro

ORF – “open reading frame” (fase aberta de leitura)

PAGE – gel de poliacrilamida para eletroforese

PBS – tampão fosfato-salina

pH – $-\log [H^+]$

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
rRNA – ácido ribonucléico ribossômico
S – unidade de sedimentação (Svedberg)
SDS – dodecil sulfato de sódio
EGTA – ácido etilenoglicoltetracético
DAPI – 4,6-diamino-2-fenilindole
FITC – isotiocianato fluoresceína
TBE – Tris-borato EDTA
TBS – tampão tris-salina
TE – Tris 10mM - EDTA 1mM
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina
Tris – Tris-hidroximetil amino metano
tRNA – ácido ribonucléico transportador
BAPTA – 1,2 bis(aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-ácido tetra acético
U – unidade de enzima
UV – ultra-violeta
v/v – volume por volume

Nomenclatura genética em leveduras (exemplo):

LEU2 = alelo com fenótipo dominante (no caso, selvagem)

leu2 = alelo com fenótipo recessivo (no caso, mutante)

Leu = fenótipo

Leu2 = proteína codificada pelo locus LEU2

RESUMO

O controle traducional mediado pela fosforilação da subunidade alfa do fator de início de tradução 2 (eIF2 α) é um ponto central para programas de expressão gênica induzidos por estresse. Tripanossomatídeos, importantes patógenos humanos, apresentam processos de diferenciação desencadeados pelo contato com os distintos ambientes encontrados em seus insetos vetores e hospedeiros mamíferos, provavelmente representando situações de estresse. *Trypanosoma brucei*, o agente causador da tripanossomíase africana, codifica três potenciais quinases de eIF2 α (TbeIF2K1-K3). Neste trabalho, nós mostramos que TbeIF2K2 é uma glicoproteína associada à membrana, expressa tanto na forma procíclica quanto na sanguínea. O domínio catalítico de TbeIF2K2 fosforila eIF2 α de levedura e de mamíferos na Ser51. A quinase também fosforila a incomum forma de eIF2 α encontrada em tripanossomatídeos, especificamente no resíduo Thr169, que corresponde à Ser51 em outros eucariotos. O eIF2 α de *T. brucei*, no entanto, não é um substrato para GCN2 ou PKR *in vitro*. O domínio regulatório putativo de TbeIF2K2 não apresenta nenhuma similaridade de seqüência com as quinases de eIF2 α conhecidas. Tanto na forma sanguínea quanto na procíclica, TbeIF2K2 está localizada principalmente na bolsa flagelar, organela que é o local exclusivo de exo e endocitose nesses parasitas. Ela também pode ser detectada em compartimentos endocíticos, mas não em lisossomos, sugerindo que a quinase é reciclada entre os endossomos e a bolsa flagelar. A localização de TbeIF2K2 sugere que ela possa funcionar como um sensor do transporte de nutrientes ou proteínas em *T. brucei*, um organismo que depende de mecanismos regulatórios pós-transcricionais para controlar a expressão gênica em diferentes situações. Essa é a primeira quinase de eIF2 α associada a membrana descrita em eucariotos unicelulares.

ABSTRACT

Translational control mediated by phosphorylation of the alpha subunit of the eukaryotic initiation factor 2 (eIF2 α) is central to stress-induced programs of gene expression. Trypanosomatids, important human pathogens, display differentiation processes elicited by contact with the distinct physiological milieu found in their insect vectors and mammalian hosts, likely representing stress situations. *Trypanosoma brucei*, the agent of African trypanosomiasis, encodes three potential eIF2 α kinases (TbeIF2K1-K3). We show here that TbeIF2K2 is a transmembrane glycoprotein expressed both in procyclic and bloodstream forms. The catalytic domain of TbeIF2K2 phosphorylates yeast and mammalian eIF2 α at Ser51. It also phosphorylates the highly unusual form of eIF2 α found in trypanosomatids specifically at residue Thr169, that corresponds to Ser51 in other eukaryotes. *T. brucei* eIF2 α , however, is not a substrate for GCN2 or PKR *in vitro*. The putative regulatory domain of TbeIF2K2 does not share any sequence similarity with known eIF2 α kinases. In both procyclic and bloodstream forms TbeIF2K2 is mainly localized in the membrane of the flagellar pocket, an organelle that is the exclusive site of exo- and endocytosis in these parasites. It can also be detected in endocytic compartments but not in lysosomes, suggesting it is recycled between endosomes and the flagellar pocket. TbeIF2K2 location suggests a relevance in sensing protein or nutrient transport in *T. brucei*, an organism that relies heavily on posttranscriptional regulatory mechanisms to control gene expression in different environmental conditions. This is the first membrane-associated eIF2 α kinase described in unicellular eukaryotes.

I – INTRODUÇÃO

I.1 – *Trypanosoma brucei*

Tripanossomas africanos são protozoários flagelados, transmitidos pela mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.), capazes de infectar vários mamíferos. Algumas espécies e subespécies do gênero *Trypanosoma* causam doença em animais selvagens e domésticos (tripanossomíase africana animal), entre elas *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma simiae*, *Trypanosoma suis* e *Trypanosoma vivax*. Em humanos, a espécie *Trypanosoma brucei* é a causadora da tripanossomíase africana humana, também conhecida como doença do sono, uma doença fatal se não tratada [1]. O *Trypanosoma brucei*, assim como o *Trypanosoma cruzi* (causador da doença de Chagas) e a *Leishmania major* (causadora de uma série de doenças, as leishmanioses), é um protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae* e à ordem *Kinetoplastida* [2].

A doença do sono é um problema sério que atinge 36 países da África Subsaariana. No início do século XX, grandes áreas foram devastadas pela doença. A população de Uganda, por exemplo, foi reduzida de 6,5 milhões de habitantes para 2,5 milhões. O controle continuado realizado por equipes especializadas levou a uma redução no número de casos, e por volta de 1960 a doença havia quase desaparecido. Após uma diminuição na vigilância, principalmente devido à instabilidade política, guerras e grandes movimentos migratórios, porém, a doença ressurgiu em várias áreas nos últimos 30 anos (Figura 1). Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1986 aproximadamente 70 milhões de pessoas viviam em áreas de risco; e em 1998 entre 300.000 e 500.000 pessoas estavam infectadas, mas apenas 40.000 casos haviam sido reportados. Atualmente, a OMS estima que de 50.000 a 70.000 pessoas estejam infectadas [1; 3; 4].

Duas subespécies de *T. brucei* causam, em diferentes regiões africanas, a doença do sono: *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* (Figura 2). O único país em que a doença do sono é causada pelas duas subespécies do parasita é Uganda. A subespécie *T. b. gambiense* causa a forma crônica da doença, cuja progressão pode durar anos. A forma aguda da doença, que

dura entre semanas e poucos meses, é causada pelo *T. b. rhodesiense*. A doença, em suas duas formas, pode ser dividida em dois estágios: o primeiro estágio sistêmico (fase hemolinfática), sem sintomas clínicos específicos; e o segundo estágio, em que os parasitas cruzam a barreira hematoencefálica, atingindo o Sistema Nervoso Central (SNC), causando distúrbios sensoriais, motores e psiquiátricos, incluindo alteração no padrão de sono, caracterizado nesses pacientes por sonolência diurna (motivo do nome “doença do sono”) e insônia noturna [4; 5; 6].

O *T. b. rhodesiense* também é capaz de infectar outros animais, selvagens e domésticos, que acabam funcionando como reservatórios animais para o parasita. Apesar de já ter sido demonstrado que vários animais selvagens podem ser infectados pelo *T. b. gambiense*, porém, a relevância de reservatórios animais para a doença causada por esta subespécie ainda é controversa [6; 7]. Já a subespécie *T. b. brucei*, que causa tripanossomíase em animais, não é capaz de infectar humanos, pois neste caso o parasita é lisado em decorrência da atividade tripanolítica do soro humano. *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense* são as únicas subespécies capazes de resistir a esta atividade tripanolítica, que está associada a partículas de lipoproteínas de alta-densidade (HDL – “high-density lipoprotein”), daí serem estas as únicas patogênicas para o homem [8].

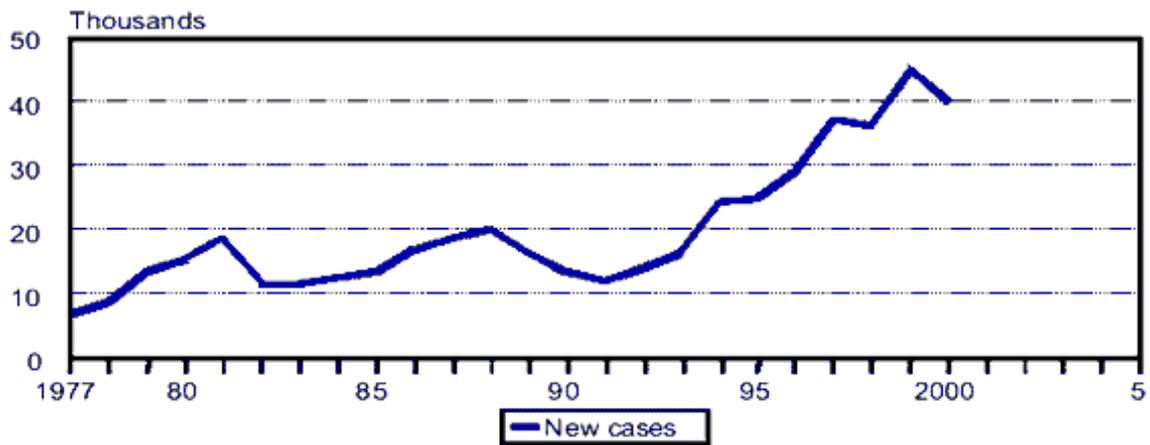


Figura 1 – Incidência de Tripanossomíase Africana Humana (1977 – 1999).
 Número de novos casos reportados (em milhares) nos anos indicados (retirado de [9]).

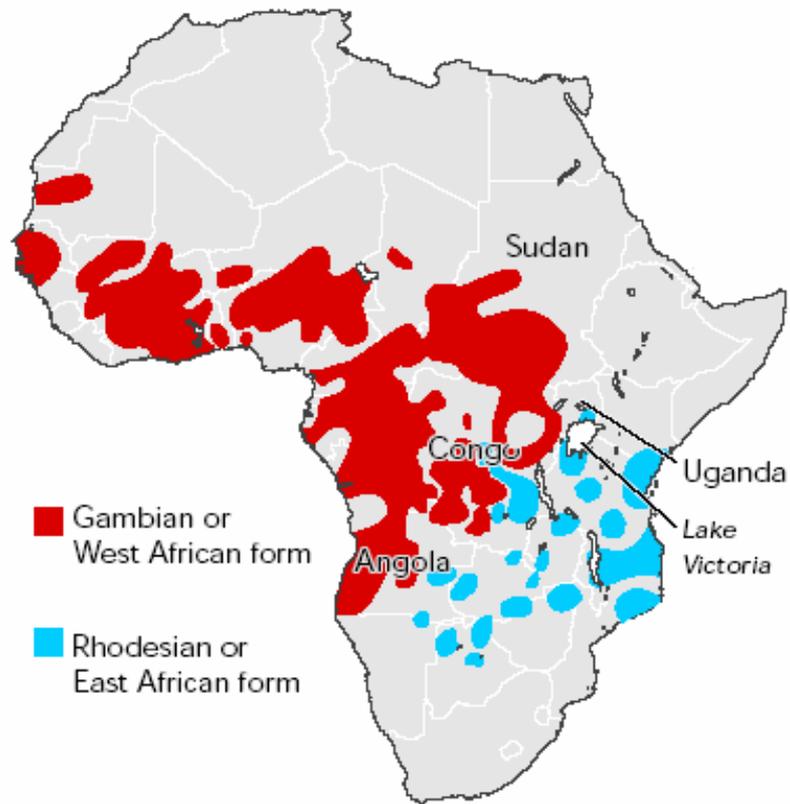


Figura 2 – Distribuição das duas formas da Tripanossomíase Africana Humana, ou Doença do Sono, na África Subsaariana. Em vermelho, estão indicados focos da doença causados pelo *T. b. gambiense*; em azul, pelo *T. b. rhodesiense* (retirado de [4]).

I.1.1 – A biologia celular do *T. brucei*

A organização da estrutura celular do *T. brucei* é fundamental para a continuidade do seu ciclo de vida. A célula do tripanossoma é alongada, com um citoesqueleto de microtúbulos bastante polarizado, o que define sua forma. O citoesqueleto posiciona com precisão, entre o centro da célula e sua extremidade posterior, as organelas que apresentam uma única cópia no parasita: a bolsa flagelar, o flagelo, o cinetoplasto, a mitocôndria, o núcleo e o complexo de Golgi (Figura 3) [10; 11].

A bolsa flagelar, uma especialização da membrana plasmática, é a estrutura mais posterior na célula, e é dela que sai o flagelo. O flagelo se origina em um corpo basal, que por sua vez está ligado ao genoma mitocondrial através da membrana mitocondrial. O flagelo acompanha todo o comprimento do parasita em direção à sua extremidade anterior, e é ligado à membrana plasmática através da zona de anexação do flagelo (FAZ – “flagellum attachment zone”). Enquanto toda a face citoplasmática da membrana plasmática é ligada a microtúbulos, o mesmo não ocorre com a membrana da bolsa flagelar, em cuja face citoplasmática há uma ausência de microtúbulos anexados. Toda a endo e exocitose do parasita é realizada através da bolsa flagelar que, assim, funciona como um ponto de interação entre o parasita e o ambiente em que ele se encontra, seja o hospedeiro mamífero ou o inseto. Não há indicações de que exista diferença na taxa de exocitose entre parasitas procíclicos (forma presente no intestino do inseto) e sanguíneos (forma presente no hospedeiro mamífero). Porém, em parasitas sanguíneos a taxa de endocitose é muito mais alta que em parasitas procíclicos [10; 12; 13; 14].

A única mitocôndria da célula é uma estrutura alongada que vai da sua extremidade posterior à anterior. Em parasitas sanguíneos, a mitocôndria é uma estrutura tubular simples, sem cristas, refletindo a ausência de respiração mitocondrial. Em parasitas procíclicos, no entanto, a mitocôndria é muito mais ativa, voltando a apresentar cristas. O genoma mitocondrial, conhecido como cinetoplasto, é composto por dois tipos de DNA circular, os maxicírculos e os minicírculos. A replicação do genoma mitocondrial é coordenada com a replicação do genoma nuclear [10].

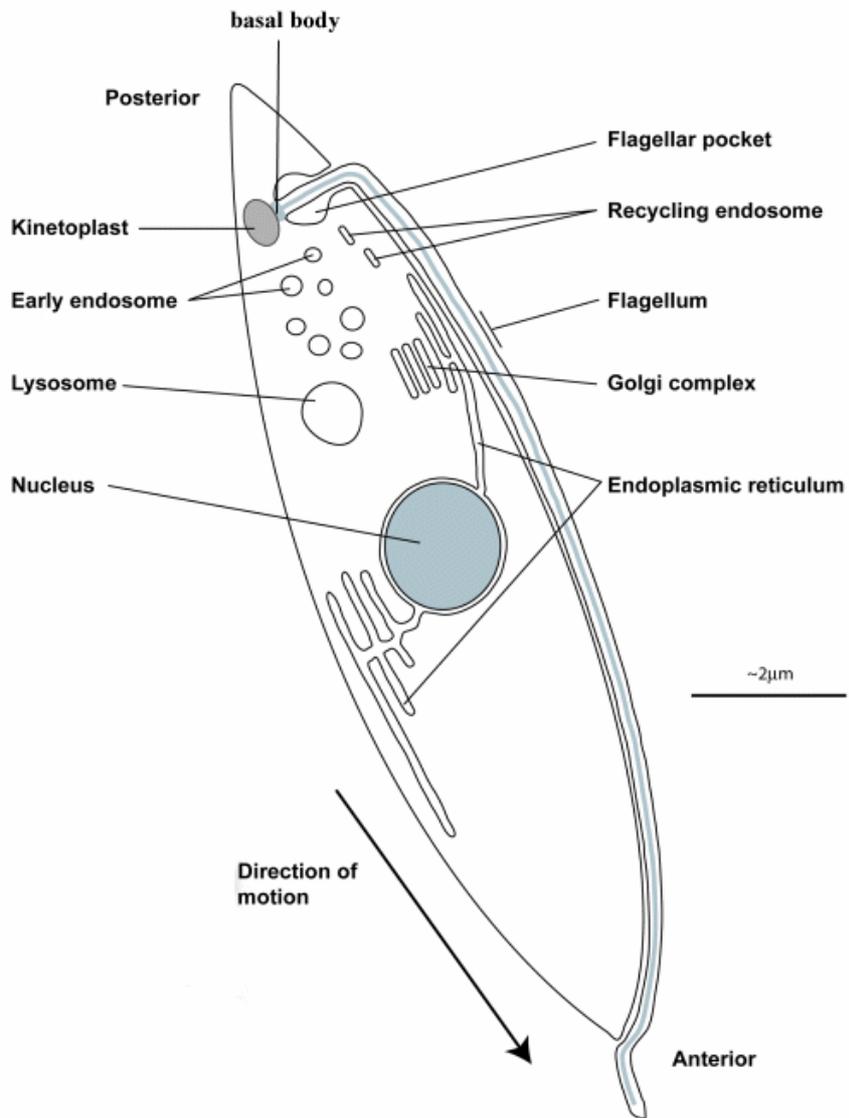


Figura 3 – Esquema representando uma célula de *T. brucei*. (modificado de [14]).

I.1.2 – O ciclo de vida do *T. brucei*

O ciclo de vida do *T. brucei* depende de transmissões cíclicas entre o hospedeiro mamífero e o inseto. Para a bem-sucedida adaptação do parasita a estes diferentes ambientes, uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas são necessárias. As formas infectivas do parasita são formas não-proliferativas, que após a transmissão para o novo hospedeiro readquirem a capacidade de se dividir. Quando a mosca tsé-tsé pica o hospedeiro mamífero, este é infectado pelo parasita na sua forma metacíclica, não-proliferativa, que é a forma presente na glândula salivar da mosca. Na corrente sanguínea do mamífero, o parasita se diferencia para a forma tripomastigota proliferativa chamada, devido a seu formato alongado, de “slender”. Com o aumento do número de parasitas no sangue, outro processo de diferenciação leva ao surgimento da forma sanguínea não-proliferativa chamada, por ser morfológicamente mais curta e larga, de “stumpy”. Acredita-se que a transição da forma “slender” para a “stumpy” é desencadeada por um fator chamado fator indutor de “stumpy” (SIF – “stumpy induction factor”), produzido pelos próprios tripanossomas. No sangue do hospedeiro mamífero, portanto, a população de tripanossomas consiste em uma mistura de parasitas “slender” e “stumpy”, além de intermediários entre estas duas bem definidas formas (população pleomórfica). Quando este hospedeiro é novamente picado pelo inseto, apenas a forma “stumpy” presente no sangue ingerido é capaz de se diferenciar, gerando a forma procíclica, que se prolifera no intestino da mosca. Após o estabelecimento da infecção, os parasitas migram para a glândula salivar da mosca, onde aderem através do flagelo, diferenciando-se para a forma epimastigota, ainda proliferativa. Esta passará por outro processo de diferenciação, gerando a forma metacíclica, que fechará o ciclo quando, por meio da picada da mosca, outro mamífero for infectado (Figura 4) [10; 15; 16].

As formas mais estudadas do *T. brucei* são as formas proliferativas sanguínea (“slender”) e procíclica, já que estas podem facilmente ser mantidas em cultura. Parasitas sanguíneos (proliferativos ou não) expressam como antígeno de superfície glicoproteínas variantes de superfície (VSG – “variant surface glycoprotein”), formando uma capa de aproximadamente 1×10^7 moléculas que recobre toda a superfície do parasita e é responsável pelo processo de variação antigênica (ver abaixo – item I.1.3). Já parasitas

procíclicos expressam como antígenos de superfície prociclinas, porém estas formam uma capa menos densa (5×10^6 moléculas) que a formada por VSGs. A capa de prociclina é formada por duas proteínas diferentes e funcionalmente distintas, caracterizadas por diferentes motivos de repetição internos: prociclina EP (repetição dos aminoácidos ácido glutâmico (E) e prolina (P)), e prociclina GPEET (repetição dos aminoácidos glicina (G), prolina (P), ácido glutâmico (E) e treonina (T)) [10; 17]. As prociclinas começam a ser expressas antes que o parasita perca a sua capa de VSG [18]. As duas formas de prociclina são expressas logo no início da diferenciação para a forma procíclica de *T. brucei*, embora a expressão da prociclina GPEET diminua com a continuidade do desenvolvimento da forma procíclica. Existem 3 isoformas da prociclina EP (EP1, 2 e 3), que diferem em suas regiões N-terminal, e também quanto à sua glicosilação (apenas EP1 e EP3 são N-glicosiladas). Tanto o N-terminal da prociclina EP quanto o da prociclina GPEET são clivados por proteases na mosca tsé-tsé. O motivo desta clivagem ainda não foi bem estabelecido, apesar de já ter sido sugerido que o peptídeo liberado pela clivagem proteolítica seja importante para modular o curso da infecção na mosca, seja sinalizando para o tripanossoma ou para o próprio inseto [10; 14; 15; 17; 19].

Metabolicamente, parasitas sanguíneos e procíclicos diferem em relação à fonte utilizada para a geração de energia. O sangue é um ambiente rico em glicose. Assim, a maior fonte de energia dos parasitas sanguíneos é a glicose do sangue, convertida em energia pelo processo de glicólise, nos glicosossomos. No inseto, a glicose deixa de ser uma fonte abundante de energia, e a geração de energia passa a depender da prolina, através de reações da cadeia respiratória. Assim, parasitas procíclicos apresentam mitocôndrias metabolicamente muito mais ativas que parasitas sanguíneos [10; 17; 20].

Morfológicamente, várias diferenças entre as formas do parasita também podem ser observadas. Além das já mencionadas, principalmente relacionadas às formas sanguíneas “slender” e “stumpy”, a diferença morfológica mais óbvia que pode ser notada é a posição do cinetoplasto, o DNA mitocondrial do parasita, em relação à extremidade posterior da célula. Parasitas tripomastigotas sanguíneos apresentam cinetoplasto terminal, ou seja, bastante próximo à extremidade posterior da célula. Parasitas tripomastigotas procíclicos

apresentam cinetoplasto sub-terminal, ou seja, entre a extremidade posterior da célula e o núcleo. Já o cinetoplasto de parasitas epimastigotas, presentes na glândula salivar da mosca, é anterior ao núcleo da célula, cuja posição é central (Figura 5). A razão para esta distinta localização do cinetoplasto ainda é desconhecida [10].

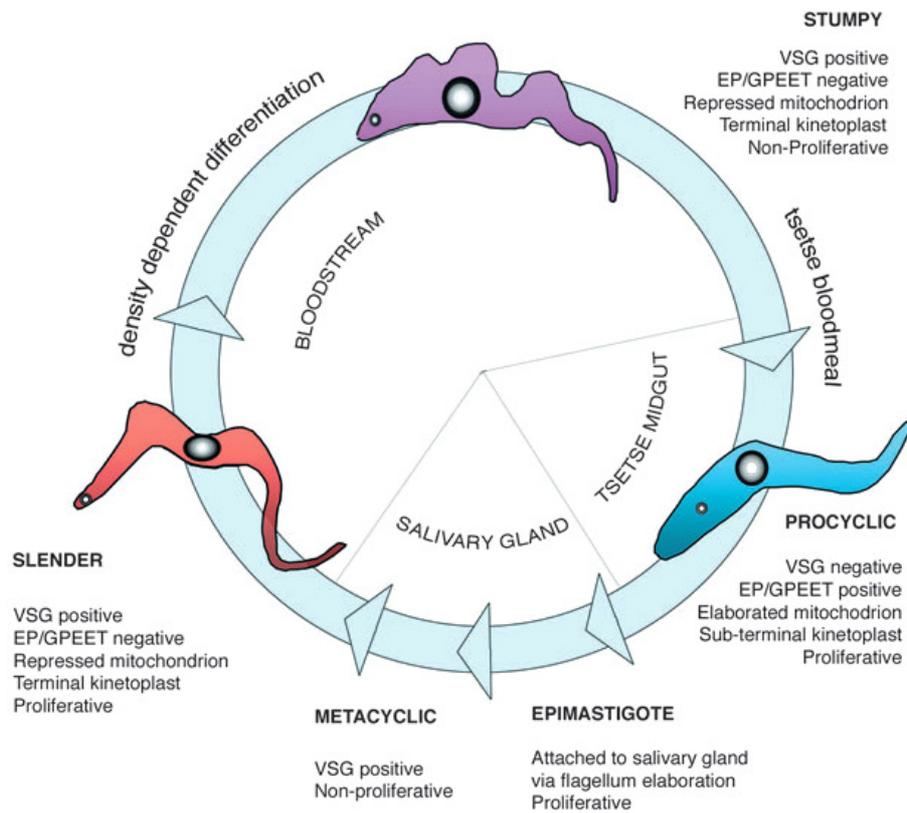


Figura 4 – O ciclo de vida do *T. brucei*. Algumas características das diferentes formas do parasita estão relacionadas (retirado de [10]).

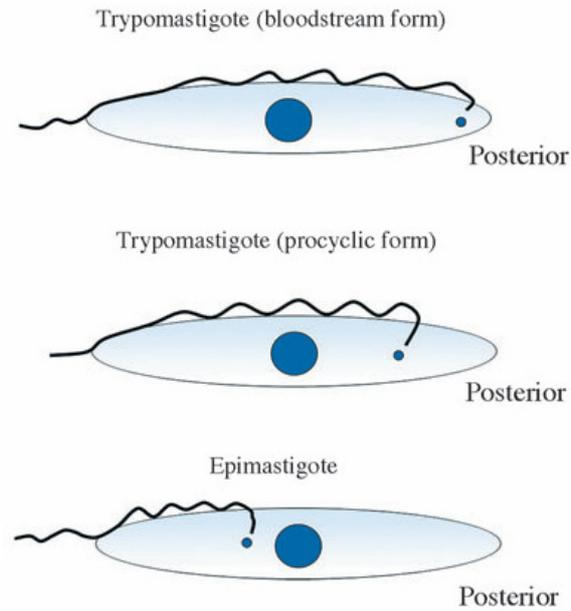


Figura 5 – Localização do cinetoplasto nas diferentes formas de *T. brucei*. A região posterior da célula está indicada. O cinetoplasto está representado pelo círculo menor, enquanto o DNA nuclear está representado pelo círculo maior (retirado de [10]).

I.1.3 – Variação antigênica em *T. brucei*

O *T. brucei* é um parasita extracelular e, como tal, quando presente na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero deve ser capaz de resistir ao seu sistema de defesa. A principal proteção destes parasitas é uma densa capa de revestimento, que recobre a sua membrana plasmática, composta por uma monocamada de aproximadamente 10^7 moléculas de VSG. VSGs ligam-se à membrana plasmática através de âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), formando homodímeros [8]. O mamífero infectado desenvolve uma reação imune durante a infecção, com a formação de anticorpos contra a variante de VSG predominantemente expressa, o que ocasiona a remoção dos parasitas expressando esta variante. Alguns parasitas, no entanto, alteram a VSG expressa para uma variante antigênicamente distinta. Estes parasitas que evadem o sistema imune do hospedeiro mamífero não são eliminados e, deste modo, seguem se proliferando, o que leva a um novo aumento da parasitemia, até que anticorpos contra esta nova variante sejam produzidos. Este processo caracterizado pela expressão sequencial de diferentes VSGs é conhecido como variação antigênica [21]. A alternância dos tipos de VSG expressos é um processo ordenado, e não aleatório, que depende da variante de VSG que passa a ser expressa pelo tripanossoma, e não da variante que deixa de ser expressa [22].

Um possível mecanismo auxiliar da evasão imune é o sistema de reciclagem de proteínas de membrana do parasita sanguíneo. Isso porque o sistema de reciclagem, em que proteínas de superfície são endocitadas junto com a membrana plasmática, pode potencialmente remover da superfície do parasita não só a VSG, mas também a IgG que a reconhece. Assim, os complexos imunes VSG-IgG são endocitados pelo parasita, a IgG é degradada, e a VSG intacta é reciclada, retornando à superfície celular. Deste modo, imunoglobulinas que reconhecem a VSG da superfície celular saem da circulação sanguínea, prolongando a vida dos parasitas expressando a VSG já reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro [14].

A variação antigênica permite que a infecção se prolongue por até muitos anos, visto que o *T. brucei* possui um grande repertório de VSGs. O sequenciamento do genoma do parasita

mostrou que o *T. brucei* tem de 1250 a 1500 genes de VSG. Destes, 806 foram analisados, e apenas 7 % parecem ser genes intactos e funcionais. 66 % são pseudogenes, com códons de terminação ou alterações na fase de leitura; 18 % são fragmentos de genes; e 9 % são genes de algum modo atípicos. Além das VSGs intactas que podem ser expressas, o *T. brucei* também é capaz de expressar VSGs mosaico, ou seja, moléculas inteiras e funcionais formadas a partir da união de fragmentos originados de diferentes pseudogenes doadores, gerando um enorme número de possíveis variantes de VSGs a partir de um limitado número de genes e pseudogenes, aumentando assim o potencial de variação antigênica do parasita [21; 23]. É principalmente em sua região N-terminal que as moléculas de VSG diferem antígenicamente. O domínio C-terminal, que se liga à membrana plasmática através da âncora GPI, é mais conservado, e fica oculto dos mecanismos imunes do hospedeiro pelo N-terminal, mais exposto [22].

Além de parasitas sanguíneos, parasitas metacíclicos presentes na glândula salivar da mosca tsé-tsé também apresentam uma capa de VSG, já como uma preparação para a infecção do hospedeiro mamífero. VSGs são traduzidas a partir de RNAs mensageiros transcritos de genes localizados em sítios de expressão (ES – “expression sites”) teloméricos. Os ESs metacíclicos (MESs – “metacyclic ESs”) são diferentes dos ESs sanguíneos (BESs – “bloodstream form ESs”). Os BESs são compostos por vários genes associados ao sítio de expressão, chamados ESAGs (ESAG – “expression site-associated gene”), localizados entre o promotor e o gene de VSG. Esses genes são transcritos junto com o gene de VSG. Os genes ESAGs 6 e 7, por exemplo, codificam para as duas subunidades do receptor de transferrina, e são expressos exclusivamente em parasitas sanguíneos. Os MESs não possuem ESAGs funcionais, estando o promotor localizado diretamente 5' ao gene de VSG [21; 24; 25].

Existem ao menos 27 MESs, mas apenas um gene de VSG é expresso, e o mesmo continua sendo expresso durante todo o estágio metacíclico. Nesta fase do ciclo de vida do parasita, o gene de VSG expresso depende apenas do controle de qual MES está ativo, já que os genes de VSG nestes sítios raramente são substituídos por outros [24]. Por outro lado, existem aproximadamente 20 BESs, e nestes sítios é comum que, por rearranjos de DNA,

um gene silencioso de VSG seja inserido em uma BES ativa, substituindo assim o gene de VSG previamente expresso. Neste caso, o BES ativo continua o mesmo. Alternativamente, outro mecanismo possível de variação antigênica na forma sanguínea é o silenciamento de um BES previamente ativo, enquanto em paralelo um BES silencioso se torna ativo. Neste caso, ocorre uma troca de BESs [21].

Em *T. b. rhodesiense*, uma única ES (R-ES) é sistematicamente selecionada para ser transcrita na forma sanguínea do parasita. Esta R-ES em particular contém um ESAG chamado SRA, um gene relacionado à resistência do tripanossoma à lise no sangue humano (SRA – “serum-resistance associated”). SRA codifica uma VSG truncada, capaz de neutralizar o fator tripanolítico presente no sangue humano. Assim, nessa subespécie de *T. brucei*, a variação antigênica parece ser devida principalmente à troca de VSG ativa em um mesmo R-ES, e não à alternância entre diferentes ESs. Esse mecanismo de resistência à lise no sangue humano é bastante conservado entre diferentes isolados de *T. b. rhodesiense*. No entanto, o mecanismo de resistência do *T. b. gambiense* à lise não é o mesmo, já que esta subespécie não carrega o gene SRA [8].

I.1.4 – Regulação da expressão gênica em *T. brucei*

Para que o *T. brucei* se adapte a dois ambientes distintos, o mamífero e a mosca, que apresentam diferentes temperaturas e fontes de nutrientes, são necessárias grandes alterações na expressão gênica. Centenas de RNA mensageiros estão presentes em distintas concentrações nas diferentes fases do ciclo de vida do parasita [26]. Em outros eucariotos, um ponto chave de regulação da expressão gênica é a regulação do início de transcrição, mais especificamente a regulação da atividade da enzima RNA polimerase II, responsável pela transcrição do RNA mensageiro. No entanto, em *T. brucei* tal regulação parece não ter um papel central no controle da expressão gênica. Nas formas proliferativas do parasita, parece haver uma transcrição permanente das longas unidades policistrônicas (vários genes transcritos em um mesmo RNA), enquanto nas formas quiescentes existe uma forte repressão global da transcrição. Assim, neste organismo a regulação da expressão gênica

depende principalmente de mecanismos pós-transcricionais. A transcrição constitutiva seguida de regulação da expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais provavelmente permite a rápida alteração da expressão gênica do parasita, para que este se adapte com velocidade e sobreviva em um novo ambiente. Em concordância com este fato, o *T. brucei* não possui vários fatores transcricionais conhecidos, apesar de possuir as três RNA polimerases (I, II e III) eucarióticas. No tripanossoma, duas das RNA polimerases encontradas transcrevem genes que codificam para proteínas. São elas as RNA polimerases I e II [26; 27; 28; 29].

- **RNA polimerase I (RNAP I) :** em eucariotos, a RNAP I sintetiza pré-rRNA. Este é então processado, formando os rRNA 28S, 18S e 5.8S, encontrados nos ribossomos. Em *T. brucei*, a RNAP I faz o mesmo. Surpreendentemente, além desta função característica, a RNAP I também é responsável pela transcrição de RNAs mensageiros (mRNAs) que codificam proteínas estágio-específicas do parasita, em especial as proteínas de superfície VSG e prociclinas [28]. Três conhecidos promotores em *T. brucei* são capazes de recrutar a RNAP I. Um destes é o promotor que orienta a transcrição do rDNA, e os outros dois das unidades policistrônicas contendo os genes que codificam para VSG ou para as prociclinas [29]. A regulação da expressão desses genes depende de vários mecanismos, ainda não completamente caracterizados. Um importante alvo de regulação é a expressão das prociclinas na forma sanguínea do parasita. A transcrição da prociclina EP é diminuída aproximadamente 10 vezes na forma sanguínea de *T. brucei*. Os mRNAs que codificam para a prociclina EP que ainda assim tenham sido produzidos são rapidamente degradados, diminuindo a expressão da proteína EP mais 10 vezes. Além disso, os mRNAs que sobram são pouco traduzidos. Juntos, estes mecanismos são capazes de regular negativamente, em aproximadamente 1000 vezes, a expressão da prociclina EP na forma sanguínea de *T. brucei*. A regulação da prociclina GPEET depende de mecanismos pós-transcricionais. Já o controle da transcrição de VSG em parasitas na forma sanguínea ainda não é bem compreendido. Sabe-se que existe um fraco início de transcrição em promotores de sítios de expressão de VSG inativos, e acredita-se que a regulação ocorra

principalmente por mecanismos epigenéticos, entre eles regulação através da estrutura de cromatina, e pela eficiência do processo de alongação do RNA. Por outro lado, e de modo mais convencional, a expressão de VSG metacíclica, cujo gene é monocistrônico, parece ser regulada no processo de início de transcrição [27; 30].

- **RNA polimerase II (RNAP II):** como ocorre em outros eucariotos, em *T. brucei* a RNAP II transcreve RNAs mensageiros. Mas no parasita a RNAP II também é a responsável pela transcrição de um RNA específico do tripanossoma, o SL RNA (SL – “spliced leader”), também conhecido como “miniexon”. O SL RNA contém em sua extremidade 5’ um “cap” altamente modificado, o “cap 4” ($m^7Gpppm^{6,2}AmpAmpCmpm^3Um$) [28]. Dados recentes sugerem, porém, que a formação incompleta do hipermetilado “cap 4” não afeta a tradução na célula [31]. O único promotor dependente de RNAP II conhecido é o que dirige a transcrição do gene do SL RNA. A ausência de promotores facilmente identificáveis levou à proposição de que a RNAP II inicie a transcrição de maneira aleatória dentro de uma determinada sequência de DNA; ou, alternativamente, que haja apenas alguns promotores distantes dos genes transcritos. Outra possibilidade é a existência de promotores incomuns, ainda não caracterizados [28; 29; 30].

O RNA mensageiro do *T. brucei*, assim como o de outros organismos eucarióticos, é modificado nas suas extremidades 5’ (adição do “cap”) e 3’ (adição da cauda poliA). Porém, estas modificações não são realizadas co-transcricionalmente. Os genes transcritos pela RNAP II nesses parasitas organizam-se formando várias unidades policistrônicas, e são transcritos conjuntamente. Estes genes não são funcionalmente relacionados. O transcrito policistrônico é clivado, os mRNAs individuais são separados, e duas reações acopladas ocorrem: a poliadenilação da extremidade 3’ do primeiro gene; e a adição, na extremidade 5’ do segundo gene, da sequência de 39 nucleotídeos correspondente ao SL RNA, e portanto contendo a estrutura “cap 4” (reação de “trans splicing”). Forma-se, assim, o mRNA maduro a partir de um precursor. Estas reações ocorrem também com os RNAs transcritos pela RNAP I que codificam proteínas como VSG e prociclinas. Esse

processo incomum permite que uma única iniciação de transcrição pela RNAP II produza vários mRNAs funcionais. As taxas de transcrição entre RNAs policistrônicos não variam consideravelmente, e um modo de se regular os níveis de proteína expressa é pelo número de cópias de cada gene. Muitas proteínas abundantes no tripanossoma são codificadas por várias cópias do mesmo gene [27; 28; 30]. Outra característica marcante dos tripanossomas é a relativa ausência de íntrons em seus genes. Apenas algumas exceções foram observadas, como o gene que codifica para a PAP (poli(A) polimerase) [29; 32].

Assim, visto que a transcrição em *T. brucei* não é um processo altamente regulado, nestes parasitas a regulação da expressão gênica é realizada principalmente por processos pós-transcricionais. O processamento e a estabilidade do RNA mensageiro, por exemplo. Durante o processamento do RNA precursor e a formação do RNA mensageiro maduro, a eficiência do “splicing” depende de seqüências na região 5’ não-traduzida (5’-UTR – “5’ untranslated region”) e do tamanho e composição do trato de polipirimidinas, um dos determinantes do sítio acceptor do “splicing”. Se a degradação do precursor for mais rápida que o “splicing”, o transcrito será pouco expresso. Ilustrativo desse tipo de regulação gênica são os três genes que codificam para fosfoglicerato quinase (PGK – “phosphoglycerate kinase”) em *T. brucei*, PGKA, PGKB e PGKC, que são co-transcritos na mesma unidade policistrônica. PGKA está sempre presente em baixos níveis, tanto na forma procíclica quanto na sanguínea do parasita, provavelmente devido ao “splicing” pouco eficiente. PGKB é expresso somente pela forma procíclica, e PGKC apenas pela forma sanguínea. A eficiência dos sinais de “splicing” para PGKB e PGKC ainda é contraditória, porém existem indicativos de que a expressão diferencial de PGKB e PGKC pode ser explicada pelo controle da degradação de seus RNAs mensageiros. O mRNA de PGKB é um dos mais instáveis (baixa meia-vida) em parasitas sanguíneos, assim como os mRNAs que codificam para as prociclinas EP. Transcritos abundantes, como é o caso das prociclinas EP e PGKB em parasitas procíclicos, por outro lado, apresentam meia-vida maior [26].

RNAs mensageiros são, em geral, mais estáveis em parasitas procíclicos, que crescem a 27°C, que em sanguíneos, que crescem a 37°C. É possível que apenas a temperatura seja

capaz de regular a estabilidade do mRNA. De acordo com esta possibilidade, parasitas sanguíneos submetidos a choque térmico (temperaturas mais baixas) apresentam aumento da quantidade de mRNA que codifica para a prociclina EP, possivelmente devido à estabilização deste mRNA. Além disso, a temperatura influencia a conformação do RNA, o que pode fazer com que sinais de degradação específicos sejam reconhecidos pela maquinaria de degradação apenas em uma faixa específica de temperatura. Existem homólogos, em *T. brucei*, da maioria dos componentes da maquinaria de degradação de mamíferos e de levedura. A degradação de mRNAs também pode ser regulada pela presença de seqüências específicas na região 3' não-traduzida (3'-UTR – “3' untranslated region”), e tanto VSG quanto as prociclinas apresentam estes motivos regulatórios. A identidade das proteínas regulatórias que se ligam a esses motivos, porém, ainda não foi claramente determinada [26; 27].

A regulação pós-transcricional da expressão gênica em *T. brucei* também pode ser realizada pelo processo de tradução [26]. Os níveis de síntese protéica diferem entre as formas procíclica, sanguínea “slender” e sanguínea “stumpy”. Parasitas “stumpy” não-proliferativos são os que sintetizam menos proteína, “slender” os que mais sintetizam, e os procíclicos apresentam um nível intermediário de tradução. A análise dos perfis polissomais dessas três formas do parasita demonstrou que existem variações significativas no processo de tradução durante o desenvolvimento do *T. brucei*, provavelmente durante o início da tradução [33]. Os fatores que participam do início de tradução no tripanossoma serão discutidos no item I.4. A síntese de proteínas específicas pode, ainda, ser regulada pela região 3'-UTR do transcrito [26].

I.2 – A Síntese Protéica

A síntese protéica é um processo celular complexo e um importante ponto de regulação da expressão gênica nos eucariotos. A tradução de mRNAs em proteínas pode ser dividida em 3 fases, a iniciação, a alongação e a terminação. O controle traducional pode ser realizado de forma global, em que a tradução da maioria dos mRNAs da célula é regulada, e de modo específico, em que a tradução de um grupo definido de mRNAs é modulada sem afetar a síntese protéica geral da célula [34].

A maquinaria traducional é altamente conservada evolutivamente. Do ponto de vista mecânico, algumas características são praticamente idênticas entre os organismos, como por exemplo, a translocação ribossomal, a formação das ligações peptídicas e a divisão de trabalho entre as subunidades ribossomais. Entretanto, o processo de iniciação da tradução é bastante divergente entre procariotos e eucariotos [35].

A conservação evolutiva dos rRNAs e das proteínas ribossomais reforça a hipótese de que as subunidades ribossomais compartilham o arranjo espacial, e que o mecanismo fundamental de síntese protéica é o mesmo nos diferentes organismos. Os ribossomos eucarióticos são maiores que os procarióticos. A subunidade ribossomal 40S de *Saccharomyces cerevisiae* é composta pelo rRNA 18S, que possui 256 nucleotídeos a mais que o rRNA 16S de *Escherichia coli*, e por 32 proteínas ribossomais, 11 proteínas a mais que a subunidade 30S de *E. coli*. A subunidade 60S de *S. cerevisiae* é formada pelos rRNAs 25S, 5.8S e 5S e 45 proteínas ribossomais, 12 proteínas a mais que a subunidade 50S de *E. coli*, que possui os rRNAs 23S e 5S [36].

Os tRNAs de procariotos e eucariotos são, em termos gerais, bastante conservados, sendo as divergências limitadas a detalhes no pareamento de alguns nucleotídeos, algumas modificações pós-transcricionais e a constituição de algumas de suas alças. Nos eucariotos, a metionina inicial é transportada por um tRNA diferente daquele utilizado para o transporte das demais metioninas da cadeia polipeptídica, denominado Met-tRNA_i^{Met};

geralmente a metionina inicial é removida da cadeia polipeptídica. Os procariotos utilizam, no início da síntese protéica, o formil-Metionil-tRNA^{fMet} que transporta uma metionina formilada, também normalmente removida da cadeia polipeptídica. A utilização destes tRNAs especiais para o início da tradução é necessária para o reconhecimento do códon de iniciação pelos fatores que atuam nesse processo [35].

Em procariotos, os genes são transcritos de forma policistrônica, e em geral estes genes são funcionalmente relacionados (operons). Os cistrons nestes transcritos policistrônicos apresentam muitas vezes tradução acoplada, ou seja, a tradução do cistron “downstream” é realizada pelo ribossomo assim que a tradução do cistron predecessor termina. O códon de terminação do primeiro cistron frequentemente sobrepõe-se ao códon de iniciação do próximo (UGAUG). O códon iniciador AUG é reconhecido pelo pareamento com o anticódon (3'-UAC-5') do formil-Metionil-tRNA^{Met}. Códon iniciadores alternativos (GUG, UUG e AUU) enfraquecem o pareamento, diminuindo a eficiência da tradução. O reconhecimento do sítio de início da tradução nos procariotos ocorre através de uma seqüência de, em geral, 4 ou 5 nucleotídeos (5'-GGAGG-3') denominada Shine-Dalgarno, localizada de 5 a 8 nucleotídeos antes do códon iniciador, que parecia com uma seqüência complementar presente na extremidade 3' do rRNA 16S, permitindo o posicionamento correto da subunidade ribossomal 30S para dar início à síntese protéica [37].

Em eucariotos, em geral os transcritos são monocistrônicos, codificando para apenas uma proteína. No entanto, alguns organismos, como o verme *Caenorhabditis elegans* e o já discutido *T. brucei*, apresentam transcrição policistrônica [38]. Nos eucariotos, a seleção do códon iniciador não depende da seqüência Shine-Dalgarno (não encontrada). Em mamíferos, o contexto ótimo para a iniciação da tradução é a seqüência GCCRCCAAUGG (“seqüência Kozak”), sendo que os nucleotídeos mais relevantes para a eficiência desta seqüência são a purina (R) na posição -3, e o G na posição +4. A alteração de uma destas posições para pirimidinas reduz significativamente a eficiência da utilização do primeiro códon AUG como sítio de início de tradução. Esta baixa eficiência pode fazer com que o ribossomo ultrapasse o primeiro códon AUG, durante a varredura da região 5' do mRNA,

iniciando a tradução em um códon posterior. Ao contrário dos procariotos, eucariotos não utilizam códons iniciadores alternativos, apenas o AUG [37].

Algumas características dos mRNAs de eucariotos podem modular a sua tradução. Entre elas: as modificações pós-transcricionais do mRNA, ou seja, a adição do “cap” (m^7Gppp) à extremidade 5', já que a estrutura “cap” é reconhecida pelo fator eIF4E, o que permite a ligação do ribossomo na extremidade 5' do mRNA, e a adição da cauda poli(A) à extremidade 3', o que aumenta a estabilidade e a eficiência da tradução da mensagem; a presença de sítio interno de entrada do ribossomo (IRES – “internal ribosome-entry site”), que media o início de tradução independente do “cap”; a presença de pequenas fases de leitura aberta antes da principal (uORF – “upstream open reading frame”), cuja tradução pode assim ser reduzida; estruturas secundárias ou terciárias do RNA, que em geral inibem a tradução; e sítios de ligação a complexos regulatórios [34].

A síntese protéica, em eucariotos, é um processo citoplasmático. Novos mRNAs produzidos pela célula, porém, poderiam ser ainda no núcleo analisados (traduzidos pela primeira vez), de modo a se verificar se estes mRNAs são funcionais e codificam para proteínas inteiras antes que eles sejam transportados para o citoplasma. Apesar de este ser ainda um tema contraditório, o mais provável é que esta primeira tradução ocorra após o novo mRNA ter deixado o núcleo, mas enquanto ele ainda está na região citoplasmática associada ao núcleo (perinuclear) [39]. Algumas células eucarióticas, especialmente células complexas e altamente polarizadas como neurônios de mamíferos, apresentam RNAs específicos localizados no citoplasma e, portanto, tradução localizada. Isso permitiria o controle local da expressão gênica nestas células [40].

O início da tradução, em procariotos, é mediado por 3 fatores (IF - “Initiation Factor”): IF1, IF2 e IF3. Em eucariotos, os fatores de início de tradução (eIF-“eukaryotic Initiation Factor”) são mais numerosos (eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4E, eIF4G, eIF5 e eIF5B) e o processo é mais complexo [37]. O fator IF1 é homólogo do fator eIF1A, e IF2 do fator eIF5B [41]. A partir de agora apenas o processo de tradução em eucariotos será discutido.

O processo de iniciação da tradução será discutido no item I.2.1. A etapa de alongação da síntese protéica envolve menos fatores que o processo de iniciação. Na alongação, aminoácidos são sequencialmente adicionados à cadeia polipeptídica crescente. O fator de alongação eEF1A (eEF – “ekaryotic Elongation Factor”), ligado a uma molécula de GTP, entrega os tRNAs aminoacilados ao sítio A ribossomal. A regeneração dos complexos ativos eEF1A–GTP é realizada pelo fator eEF1B. Por fim, o movimento do ribossomo pelo mRNA e a translocação da cadeia polipeptídica nascente do sítio A para o sítio P do ribossomo são realizados pelo último fator de alongação, o eEF2. Quando um códon terminador, posicionado no sítio A ribossomal, é encontrado, tem início o processo de terminação da tradução. O códon terminador é reconhecido pelo fator eRF1 (eRF – “ekaryotic Release Factor”) em outro processo dependente de GTP. A ligação do fator ao ribossomo estimula a clivagem da ligação entre o tRNA e o peptídeo, liberando-o [42].

I.2.1 – O início de tradução nos eucariotos

O início de tradução em eucariotos é um processo complexo que envolve vários fatores de iniciação (Figura 6), e é através deste processo que o ribossomo 80S é posicionado corretamente no códon iniciador AUG do mRNA. Para que o processo ocorra, o fator eIF2 deve ligar-se a uma molécula de GTP e ao tRNA iniciador aminoacilado Met-tRNA_i^{Met}, formando um complexo denominado complexo ternário. Este complexo ternário liga-se à subunidade ribossomal 40S, que por sua vez interage com os fatores eIF3, eIF1, eIF1A e eIF5, formando o complexo de pré-iniciação 43S. Paralelamente, o mRNA liga-se, na sua extremidade 5’ (“cap”), ao fator eIF4E, que junto com os fatores eIF4A e eIF4G forma o complexo eIF4F. A interação entre os fatores eIF4G e eIF3 aproxima o complexo de pré-iniciação 43S da extremidade 5’ do mRNA, e deste modo o complexo 43S inicia a varredura do transcrito em direção à sua extremidade 3’, até o encontro do códon iniciador AUG. O fator eIF4G também se liga à proteína ligante da cauda poli(A) (PABP – “poly(A)-binding protein”), circularizando o mRNA e aproximando, assim, a 3’ UTR e as seqüências regulatórias nela contidas da extremidade 5’, o que levaria a um aumento da eficiência traducional [34].

O reconhecimento do códon iniciador correto é de vital importância para a síntese protéica. Quando o primeiro códon AUG é encontrado, o pareamento das bases entre o códon e o anti-códon leva a uma rápida mudança conformacional no complexo, afastando um do outro os fatores eIF1 e eIF1A. Esta alteração reduz a afinidade do complexo pelo eIF1, que se dissocia. Neste passo também, o fator eIF2 hidrolisa o GTP a ele ligado de forma reversível, criando um equilíbrio entre GTP e GDP+Pi (Pi – fosfato inorgânico), em uma reação promovida por eIF5, uma proteína ativadora de GTPase (GAP – “GT Pase activating protein”). A dissociação do eIF1 do complexo faz com que o Pi seja liberado do eIF2, tornando a hidrólise do GTP irreversível e comprometendo o complexo a iniciar a tradução no códon AUG assim selecionado. Desse modo, é a liberação do fosfato inorgânico, e não a hidrólise do GTP, que leva à seleção do códon iniciador [43; 44].

Uma vez selecionado o códon iniciador, o complexo eIF2 – GDP se dissocia, deixando o Met-tRNA_i^{Met} no sítio P (P – “peptidyl”) da subunidade 40S ribossomal. Acredita-se que neste ponto do processo outros fatores de iniciação também se dissociam do complexo. A subunidade ribossomal 60S se liga então à 40S em um processo promovido pelo fator eIF5B, mediado pela hidrólise do GTP a ele ligado, formando o ribossomo 80S. O fator eIF5B é liberado do ribossomo, que iniciará o processo de alongação da cadeia polipeptídica assim que um tRNA aminoacilado for entregue ao sítio A (A – “acceptor”) ribossomal [34; 44].

O processo normal de tradução, como descrito acima, depende do reconhecimento da estrutura “cap”, presente na extremidade 5’ dos mRNAs. No entanto, conhecem-se mecanismos de iniciação interna independentes do fator eIF4E, comuns em mensagens virais. Nestes casos, o ribossomo aparentemente se liga diretamente a um sítio interno da mensagem, denominado IRES. O processo de iniciação interna também já foi observado em uma série de mensagens em células eucarióticas que provavelmente contêm IRES. A tradução mediada por IRES é, até agora, o único mecanismo validado de iniciação independente do “cap” [45].

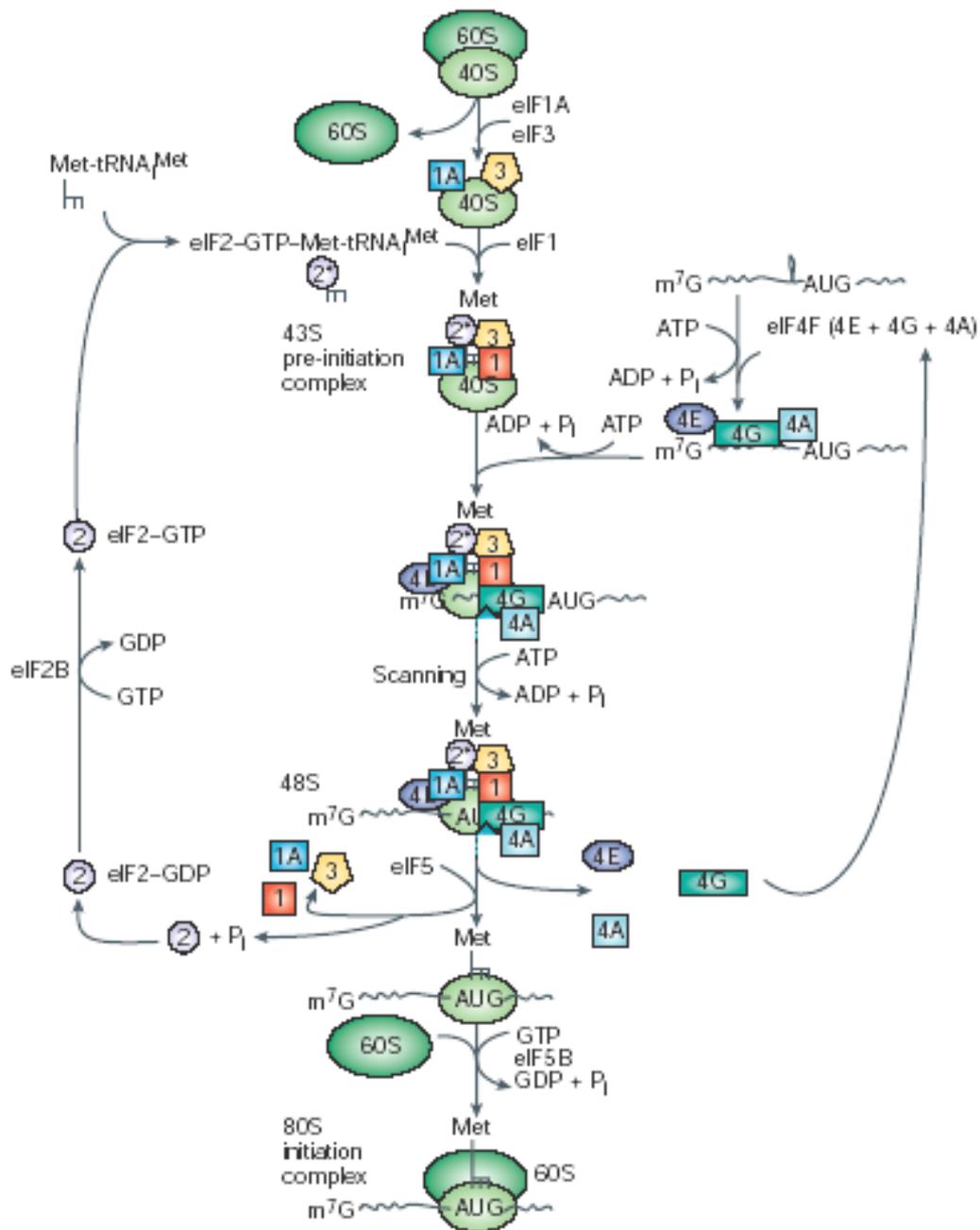


Figura 6 – Esquema do processo de início de tradução em eucariotos.
(modificado de [45]).

I.3 – Regulação do início da síntese protéica eucariótica

O processo de síntese protéica consome a maior parte da energia celular e por isso os eucariotos desenvolveram mecanismos complexos de regulação traducional, que permitem sua adaptação a mudanças ambientais bruscas e resposta imediata a estímulos internos e externos. Podem ser distinguidos dois tipos de regulação traducional, um envolvendo síntese protéica geral da célula, responsável por um ajuste da necessidade ou capacidade das células para o crescimento e a multiplicação, e outro, a ativação ou repressão da tradução de mensagens específicas, as quais podem ser responsáveis por respostas a estímulos específicos. A modulação da atividade dos fatores eIF2 e eIF4F é crucial na determinação dos níveis de tradução geral das células e da tradução de mensagens específicas.

I.3.1 - Regulação traducional por eIF4F

A regulação traducional por eIF4F é mediada principalmente pela modulação da atividade do fator ligante de “cap” eIF4E. O fator eIF4E pode ser fosforilado, o que pode levar a alterações em sua atividade ligante de “cap”. Porém, a relevância desta fosforilação para a função de eIF4E ainda é controversa. Assim, apenas a modulação da atividade ligante de “cap” de eIF4E mediada pela interação do fator com outras proteínas será discutida [46].

A ligação do eIF4E ao “cap” envolve pequenas mudanças conformacionais do fator, e é possível que a maioria dos ligantes de eIF4E sejam capazes de distinguir entre o eIF4E ligado ao “cap” e o eIF4E não-ligado (apo eIF4E). A interação de eIF4E com as proteínas ligantes de 4E (4E-BPs – “4E-binding proteins”) é um dos mais conhecidos mecanismos regulatórios envolvendo este fator. 4E-BPs competem com eIF4G pela ligação ao eIF4E, impedindo a formação do complexo traducionalmente ativo eIF4E-eIF4G-mRNA. A associação de 4E-BP com eIF4E é muito maior quando este último está ligado ao “cap”. Em condições normais de crescimento celular, as 4E-BPs são fosforiladas, o que inibe a sua ligação ao eIF4E. Nestas condições, é provável que a maior parte do eIF4E esteja ligado ao

eIF4G, ou esteja na sua forma apo eIF4E. Em condições em que a célula necessite de uma diminuição geral da síntese protéica, 4E-BPs são defosforiladas e, assim, ligam-se ao eIF4E. A disponibilidade na célula de eIF4E livre para interagir com eIF4G diminui, o que levaria a uma inibição da síntese protéica. O grau de inibição geral da síntese protéica dependeria do nível de defosforilação de 4E-BP, e também da eficiência da competição entre 4E-BP e eIF4G [46].

Além de 4E-BPs, vários organismos possuem outras proteínas ligantes de eIF4E, que também competem com eIF4G. Entre elas, “Maskin” em *Xenopus laevis*, e “Cup” e “Bicoid” em *Drosophila melanogaster*. Todas estas proteínas incluindo eIF4G, contêm o motivo conservado mínimo de ligação ao eIF4E: Tyr-X-X-X-X-Leu- ϕ (onde X é qualquer resíduo, e ϕ é uma leucina, uma metionina ou uma fenilalanina) [46].

I.3.2 - Regulação traducional por fosforilação de eIF2

Um ponto crucial para o processo de início da síntese protéica é a formação de complexos ternários (eIF2 – GTP – Met-tRNA_i^{Met}). Após o encontro do códon iniciador, o fator eIF2 é liberado ligado a uma molécula de GDP. O complexo eIF2 – GDP não é capaz de se ligar ao tRNA iniciador carregado e, assim, formar novos complexos ternários. Para novo ciclo de iniciação, é necessário que o GDP ligado a eIF2 seja trocado por GTP, regenerando assim o complexo ativo eIF2 – GTP. Esta troca é realizada pelo fator trocador de guaninas eIF2B. O fator eIF2 é composto por 3 subunidades, α , β e γ . Em determinadas situações de estresse, a subunidade α do fator eIF2 pode ser fosforilada no resíduo Ser51, e a proteína eIF2 α fosforilada tem maior afinidade pelo fator eIF2B que a não fosforilada. Deste modo, eIF2 α fosforilado age como um inibidor competitivo do fator eIF2B, diminuindo sua atividade trocadora de guaninas (Figura 7a). Isso impede a regeneração do complexo eIF2 – GTP e, portanto, diminui a quantidade de complexos ternários na célula, o que leva a uma inibição geral da síntese protéica [47].

A fosforilação de eIF2 α , em mamíferos, é realizada por 4 quinases, compostas por um domínio quinase de eIF2 conservado ligado a diferentes domínios regulatórios, que detectam diferentes situações de estresse. São elas GCN2 (“general control non-repressible”), PKR (“RNA-dependent protein kinase”), PERK (“PKR-like ER kinase”) e HRI (“heme-regulated inhibitor”). Destas, a mais conservada parece ser a quinase GCN2, encontrada em todos os eucariotos, e a única presente em *S. cerevisiae* [47; 48]. A defosforilação de eIF2 α é crucial para a retomada da síntese protéica após o estresse celular. Em mamíferos, GADD34 liga-se à proteína fosfatase 1 (PP1) e promove a defosforilação de eIF2 α , e a expressão de GADD34 em resposta ao estresse está correlacionada com a defosforilação da subunidade α do fator [49]. Outra proteína que se liga a PP1, ativando-a, é CReP, cuja expressão é constitutiva. CReP é a responsável pela manutenção dos baixos níveis basais de fosforilação de eIF2 α em células não estressadas [50].

Além da inibição geral da síntese protéica, a fosforilação de eIF2 α leva à ativação traducional de mensagens cujos produtos são importantes para a recuperação celular frente a situações de estresse. Em levedura, a ativação de GCN2 induz a tradução do ativador transcricional GCN4 (Figura 7b). Em um mecanismo análogo, em mamíferos ocorre a tradução do ativador transcricional ATF4. Tanto GCN4 quanto ATF4 ativam a transcrição de centenas de genes cuja função é a recuperação da célula ao estresse inicial. O mRNA que codifica para GCN4 é, em situações normais, pouco expresso. Este transcrito apresenta, antes da ORF de GCN4, 4 pequenas uORFs. A uORF1 é traduzida e, com o término deste processo, a subunidade 40S ribossomal não se desliga da mensagem, continuando o processo de varredura do transcrito. Quando a concentração citoplasmática de complexos ternários é alta, em condições normais de crescimento, novos complexos de pré-iniciação 43S serão formados antes da uORF4, que assim será traduzida. A tradução da uORF4 inibe fortemente a tradução da ORF de GCN4, pois a seqüência rica em GC que rodeia o códon de terminação da uORF4 promove a dissociação do ribossomo, que assim não traduz a ORF de GCN4. Em situações de estresse celular em que há uma diminuição da concentração de complexos ternários na célula devido à fosforilação de eIF2 α , porém, após a tradução da uORF1 a subunidade ribossomal 40S demora mais para formar novos

complexos 43S. Esta demora faz com que algumas vezes o complexo 43S seja formado só após a uORF4. Isso faz com que a uORF4 não seja traduzida, e que o processo de tradução reinicie na ORF de GCN4, levando a um aumento da expressão de GCN4 na célula estressada [34].

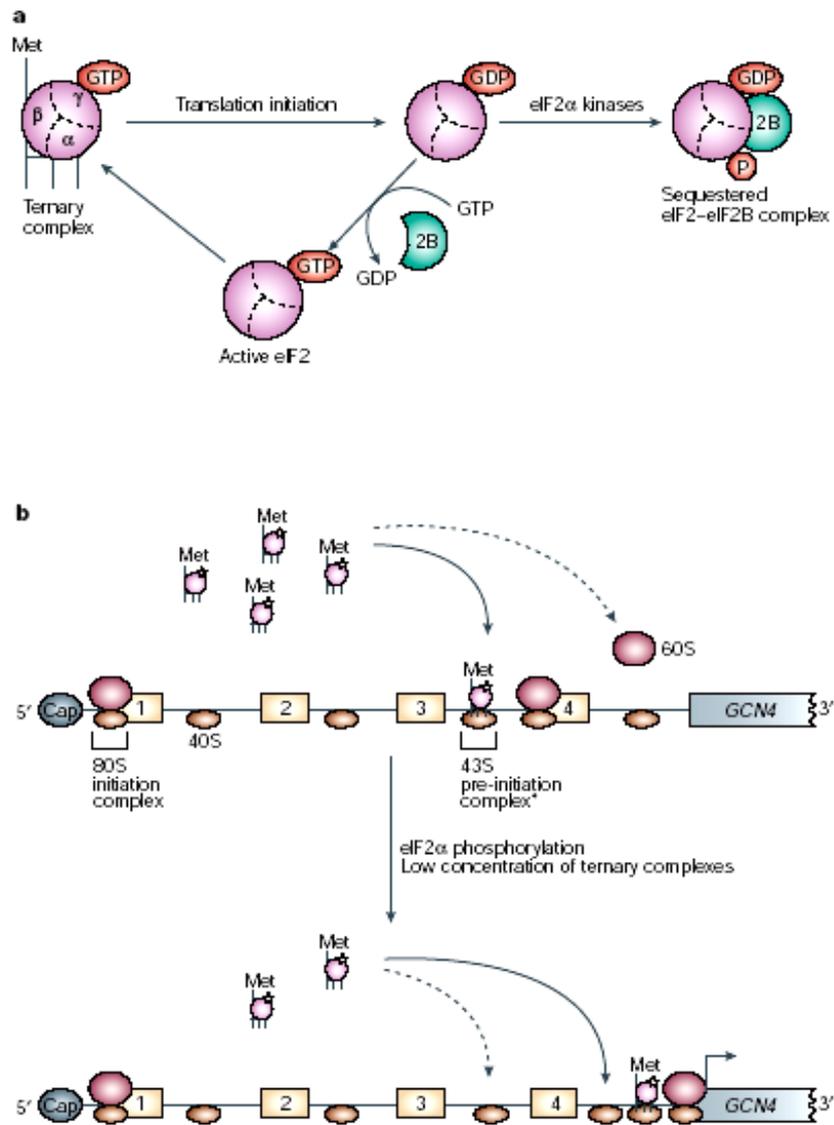


Figura 7 – Esquemas do mecanismo regulatório envolvendo a fosforilação de eIF2 α (a); e da regulação da tradução da mensagem de GCN4 (b). (retirado de [34]).

I.3.3 – As quinases de eIF2 α

A fosforilação de eIF2 α por quinases ativadas em diferentes situações de estresse reduz a tradução global, permitindo que a célula conserve energia e inicie uma reconfiguração da sua expressão gênica, de modo a efetivamente lidar com essas condições de estresse. A perda dessa via de regulação da expressão gênica, em mamíferos, pode causar sérios problemas de saúde [48]. A seguir estão descritas algumas das características das quinases de eIF2 α de mamíferos.

- **GCN2** : a mais conservada e a única presente na levedura *S. cerevisiae*. Seu domínio C-terminal é semelhante à histidil-tRNA sintetase (domínio HisRS – “histidinyl-tRNA synthetase”). Além do seu domínio catalítico (mais central), também apresenta um domínio pseudo-quinase N-terminal a este domínio catalítico, e em sua extremidade N-terminal um domínio denominado RWD (“domain in RING finger and WD repeat containing proteins and DEXDc-like helicases subfamily related to the UBCc domain”), também conhecido como domínio GI (em referência à sua presença nas proteínas GCN2 e Impact), importante para a ativação da proteína. Em situações de carência de aminoácidos, tRNAs não-carregados acumulam-se e ligam-se ao domínio HisRS, o que leva à ativação de GCN2 e à conseqüente fosforilação de eIF2 α [49; 51; 52]. Em situações nutricionais normais, o domínio pseudo-quinase interage com o domínio quinase, inibindo sua atividade catalítica [53]. Um estudo realizado com GCN2 de *S. cerevisiae* mostra que a dimerização da quinase através de sua região C-terminal é necessária para a sua ativação [54]. GCN2 também é ativada por radiação ultra violeta (UV) e inibição de proteassomo. Camundongos “knock-out” homozigotos para GCN2 são sensíveis a deficiências nutricionais e apresentam comportamentos aberrantes de ingestão de alimentos [48].
- **HRI** : presente principalmente em reticulócitos, é ativada em situações de carência de heme. Consistente com o papel regulatório de heme modulando a atividade de HRI, existem sítios ligantes de heme no domínio quinase e na região N-terminal de

HRI. Aparentemente, heme liga-se diretamente à quinase em situações normais, bloqueando sua atividade catalítica. A função de HRI provavelmente está relacionada à necessidade de diminuição da síntese de globina durante a carência de heme. Alternativamente, HRI parece ser ativada também durante os estresses osmótico e oxidativo [47; 55].

- **PERK** : a única quinase de eIF2 α de membrana em mamíferos, expressa em níveis mais altos em células secretórias. É composta por 2 domínios principais: o domínio quinase (C-terminal) citoplasmático e o domínio regulatório localizado no lúmen do Retículo Endoplasmático (RE). O domínio regulatório é similar à proteína IRE1, uma outra proteína de membrana do RE envolvida na via de resposta a proteínas mal-dobradas presentes nesta organela (UPR – “unfolded protein response”). O domínio regulatório normalmente liga-se à chaperona BiP. Em situações que levam ao acúmulo de proteínas mal-dobradas no RE, BiP se desliga de PERK, o que leva à dimerização da quinase e sua conseqüente ativação. Isso leva a uma diminuição da quantidade de novas proteínas no RE e, também, a um aumento da expressão de genes envolvidos na resposta a esse estresse, por exemplo chaperonas, ativados pelo ativador transcricional ATF4. A persistência do estresse durante longos períodos de tempo pode induzir a morte celular. A Síndrome de Wolcott-Rallison, caracterizada por diabetes tipo-I (dependente de insulina), é causada por mutações que resultam em perda da função de PERK. Camundongos *Perk*^{-/-} também sofrem de diabetes [49].
- **PKR** : a região N-terminal da PKR contém dois domínios ligantes de RNA dupla fita (dsRNA – “double-stranded RNA”), e o domínio quinase localiza-se na região C-terminal [55]. dsRNAs são produzidos como intermediários do processo de replicação viral em células infectadas, e a ligação de dsRNAs aos domínios regulatórios de PKR faz com que a quinase forme dímeros, o que desencadeia a autofosforilação intermolecular da quinase em um mecanismo ordenado, levando à sua ativação [56; 57]. A inibição da tradução na célula infectada impede a replicação viral, e vários tipos de vírus adotaram diferentes estratégias para inibir a

ação de PKR. Impedir a ativação da quinase, aumentar a degradação da proteína e aumentar a defosforilação de eIF2 α são algumas dessas estratégias [49].

Além das quinases de eIF2 α acima descritas, apenas outras 2 são conhecidas, ambas em parasitas do filo Apicomplexa. São elas a quinase PfPK4, no parasita *Plasmodium falciparum*, causador da malária [58], e a quinase TgIF2K-A, no parasita *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose [59].

I.4 – Fatores e reguladores do início de tradução em tripanossomatídeos

Pouco se sabe a respeito do processo de síntese protéica nos protozoários parasitas pertencentes à família *Trypanosomatidae*, os tripanossomatídeos. O “cap” destes organismos, o “cap4”, é a estrutura 5’ mais modificada já descrita em eucariotos [60], o que sugere uma função destas modificações no processo traducional em tripanossomatídeos. De acordo com esta observação, a maior parte do conhecimento disponível sobre participantes do processo de tradução nesses parasitas envolve componentes do complexo eIF4F, que se liga à extremidade 5’ dos mRNAs. Em *Leishmania major*, foram identificados homólogos de eIF4E (*LmEIF4E1-4*), eIF4A (*LmEIF4A1-2*) e eIF4G (*LmEIF4G1-5*). Caracterizações iniciais indicam diferentes níveis de expressão entre as proteínas, assim como distintas afinidades pelo “cap” (no caso dos *LmEIF4Es*) e interações entre os componentes, indicativos de um alto grau de complexidade no início de tradução dos tripanossomatídeos [61; 62; 63]. Outra proteína participante do início de tradução identificada foi a PABP, em *T. cruzi* [64].

Nada se sabe, porém, a respeito do fator eIF2, ou da(s) quinase(s) envolvida(s) em sua regulação, em tripanossomatídeos.

II – OBJETIVOS

Considerando a relevância da sinalização via fosforilação de eIF2 para a resposta e recuperação da célula frente situações de estresse, assim como a relevância da regulação pós-transcricional da expressão gênica para o *T. brucei*, o objetivo principal deste trabalho foi a caracterização de componentes desta via regulatória no tripanossoma. Mais especificamente, tivemos por objetivo identificar componentes desta via e analisar sua expressão em diferentes fases do ciclo de vida do parasita; localizar estes componentes; e caracterizá-los funcionalmente.

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1 - Linhagens de *Escherichia coli*

<u>Linhagem</u>	<u>Genótipo</u>	<u>Referência/ Origem</u>
DH5α F'	<i>supE, ΔlacU169, (φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, F' [traD36, proAB+, lacIq, lacZΔM15]</i>	[65]
BL21(DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻), dcm, gal λ(DE3)</i>	Novagen
Rosetta (DE3)	F ⁻ , <i>ompT, hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻), gal, dcm(DE3), pRARE(argU, argW, ilex, glyT, leuW, proL)</i>	Novagen

III.2 – Linhagens de *S. cerevisiae*

<u>Linhagem</u>	<u>Genótipo</u>	<u>Origem</u>
J80	MATa, <i>ura3-52, leu2-3-112, trp1-Δ63, gcn2Δ, sui2Δ, p[SUI2, LEU2]</i>	[66]
J82	MATa, <i>ura3-52, leu2-3-112, trp1-Δ63, gcn2Δ, sui2Δ, p[SUI2-S51A, LEU2]</i>	[66]
H1643	MATa, <i>ura3-52, leu2-3-112, trp1-Δ63, sui2Δ, p1108[GCN4-lacZ], p[SUI2, URA3]</i>	[67]

III.3 – Linhagens de *T. brucei*

- Procíclicos: linhagens 427 e 29-13.
- Sanguíneos: linhagem 427.

III.4 – Plasmídios e Construções

<u>Plasmídio</u>	<u>Características</u>	<u>Referência/ Origem</u>
pCR4.0-Topo	pUC Ori, LacZ α -ccdB gene fusion, Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pCR2.1-Topo	pUC Ori, LacZ α , Amp ^R , Kan ^R	Invitrogen
pET28-a(+)	His-tag N-terminal, sitio para trombina, T7-tag N-terminal, His-tag C-terminal opcional, Kan ^R	Novagen
pGEX-2T	Glutathione S-transferase N-terminal, sítio para Trombina, Amp ^R	Amersham Biosciences
pEGST	Glutathione S-transferase N-terminal para fusão em <i>S. cerevisiae</i> , Amp ^R	[68]
pBM272	<i>URA3</i> , <i>CEN4</i> , <i>ARS1</i> , promotor GAL1-10, Amp ^R	[69]
pRS315	pBluescript, <i>LEU2</i> , <i>CEN6</i> , <i>ARS4</i> , Amp ^R	[70]
pBE 495	Sequência codificadora de eIF2 α (<i>T. brucei</i>) clonada nos sítios <i>SacI/NotI</i> do vetor de expressão pET-28a(+)	Este laboratório
pBE498	Fragmentos <i>EcoRI/BamHI</i> de pBM272 (promotor GAL1) e <i>BamHI/XbaI</i> de pBE495 clonados nos sítios <i>EcoRI/XbaI</i> de pRS315	Este laboratório
pBE501	Sequência codificadora de eIF2 α (<i>T. brucei</i>), compreendendo região entre aa 125-419 (selvagem), clonada nos sítios <i>BamHI/NotI</i> do pET28a(+)	Este laboratório

pBE506	Fragmento <i>NcoI(blunt)-NotI</i> de pBE501 clonado nos sítios <i>BamHI(blunt)/NotI</i> de pBE498	Este laboratório
pBE 520	Sequência codificadora de eIF2 α (<i>T. brucei</i>), compreendendo região entre aa 125-419 e com mutação T169A, clonada nos sítios <i>BamHI/NotI</i> do pET28a(+)	Este laboratório
pBE508	Sequência codificadora de eIF2 α de levedura clonada no sítio <i>BamHI</i> de pBE498	Este laboratório
pBE 526	Sequência codificadora de eIF2 α de camundongo clonado nos sítios <i>BamHI/EcoRI</i> do pET28a(+)	Este laboratório
pBE 527	Sequência codificadora de PKR humana compreendendo região entre aa 265-551 clonada nos sítios <i>BamHI/HindIII-Klenow</i> do pGEX2T	Este laboratório
pBE 549	Produto de PCR (BC 442 e BC 445) correspondente a TbeIF2K2 (aa 618-1008) clonado no pCR2.1-Topo	Este trabalho
pBE 550	Produto de PCR (BC436 e BC437) de TbeIF2K1 (aa 1068-1236) clonado no pCR4.0-Topo	Este trabalho
pBE 551	Fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> de pBE 549 clonado no pGEX2T <i>BamHI/EcoRI</i>	Este trabalho
pBE 553	Fragmento <i>BamHI/EcoRI</i> de pBE 549 clonado em pEGST <i>BamHI/EcoRI</i>	Este laboratório
pBE 554	Produto de PCR (BC 446 e BC 450) correspondente a TbeIF2K3 (aa 1-476) clonado no pCR4.0-Topo	Este trabalho
pBE 559	Produto de PCR (BC 438 e BC441) correspondente a TbeIF2K2 (aa 35-449) clonado no pCR4.0-Topo	Este trabalho
pBE 565	Fragmento <i>BamHI/XhoI</i> de pBE 554 clonado no pET-28a <i>BamHI/XhoI</i>	Este trabalho
pBE 566	Fragmento <i>EcoRI/HindIII</i> de pBE 559 clonado no pET-28a <i>EcoRI/HindIII</i>	Este trabalho

pBE 583	Fragmento <i>XhoI/EcoRI</i> de pBE 550 clonado no vetor pET-28a <i>EcoRI/XhoI</i>	Este trabalho
pBE 587	Fragmento <i>AlwNI/NotI</i> de pBE 520 e fragmento <i>SacI/AlwNI</i> de pBE 495 clonados no pET-28a <i>SacI/NotI</i>	Este trabalho

Todas as bactérias portando os plasmídios e construções foram estocadas em meio de cultivo apropriado, à temperatura ambiente e à -80°C, em glicerol 15%.

III.5 - Oligonucleotídeos

<u>Oligonucleotídeo</u>	<u>Descrição</u>
M13 F/ pUC 23pb“sequencing primer”	5'CCCAGTTCACGACGTTGTAAAAC 3'
M13 R/ pUC 23pb“sequencing primer”	5'AGCGGATAACAATTTACACACAGG 3'
BC436	5' AAGCTTTTTCAAGTTGGAAGTCA 3'
BC437	5' CTCGAGTTACTTCTTTCTCCG 3'
BC438	5' GAATTCATGCAACCATCAGGGG 3'
BC439 ^A	5' AAGCTTGCCGCGCCGCACC 3'
BC440 ^A	5' GTGGTGCGGCGCGGCATG 3'
BC441	5' AAGCTTTTATATTGGAATAGACTC 3'
BC442	5' GGATCCATGCCACAACCTCTTTC 3'
BC443 ^A	5' CGTTGGCAGACGCCATTGG 3'
BC444 ^A	5' CCAATGGCGTCTGCCAACG 3'
BC445	5' GAATTCTCAGTTGGCTGACGG 3'
BC446	5' GGATCCATGGACTCTCAAAGTG 3'
BC447 ^A	5' GGGAATGATGGTCCTCAGATG 3'
BC448 ^A	5' CATCTGAGGACCATCATTCCC 3'

BC450	5' CTCGAGTTAATTAGAGATGTTCTC 3'
BC451	5' AGATCTATGTCGAGCGGTGCG 3'
BC454	5' GAATTCTCACACCTCAGAAAAAAG 3'

^A Oligos usados para sequenciamento interno.

III.6 - Meios de cultivo

- Para bactérias:

Meio LB: triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%.

Foram adicionados ao meio LB os antibióticos adequados: canamicina (15 µg/ml); ampicilina (100 µg/ml); e cloranfenicol (32 µg/ml).

- Para *S. cerevisiae*:

Meio completo YPD (“Yeast extract Peptone Dextrose”): glicose 2%, peptona 2%, extrato de levedura 1% (ágar 2% para meio sólido).

Meio mínimo S (“Synthetic”): base nitrogenada de levedura 0,67%, sulfato de amônia 0,5% (ágar 2% para meio sólido). Para os diferentes experimentos foi suplementado com dextrose 2% (“SD”), rafinose 2% (“Sraf”) ou galactose 10% (“SgalRaf”), e aminoácidos necessários.

- Para *T. brucei* (procíclicos):

Meio SDM 79 : 7 g de MEM, 5 g de MOPS, 2 g de meio 199, 3,8 g de HEPES, 1 g de glicose, 2 g de NaHCO₃, 100 mg de piruvato de sódio, 200 mg de L-alanina, 100 mg de L-arginina, 300 mg de L-glutamina, 70 mg de L-metionina, 80 mg de L-fenilalanina, 600 mg de L-prolina, 60 mg de L-serina, 350 mg de L-treonina, 180 mg de taurina, 100 mg de adenosina, 10 mg de guanosina, 4 mg de ácido fólico, 2 mg de PABA, 0,2 mg de biotina, 6 ml de MEM (aminoácidos não-essenciais), 10 ml MEM (aminoácidos essenciais), 59 mg de penicilina, 133 mg de estreptomicina. O pH foi acertado com NaOH para 7,3, o volume foi completado para 1000 ml com H₂O milliQ e o meio foi filtrado com filtro de 0,20 mm.

- Para *T. brucei* (sanguíneos):

Meio HMI-9: 800 ml de IMDM9 (GIBCO), 100 ml de soro fetal bovino, 100 ml de Serum Plus, 10 ml de hipoxantina, 28 mg de sulfanato de batocuproína, 182 mg de cisteína, 110 mg de ácido pirúvico, 39 mg de timidina, 14 µl de β-mercaptoetanol. O pH foi acertado com para 7,3, o volume foi completado para 1000 ml com H₂O milliQ e o meio foi filtrado com filtro de 0,20 mm.

III.7 - Manipulação de bactérias

III.7.1 - Transformação de *E. coli*

Para o preparo das células quimicamente competentes, foi usado o método do cloreto de cálcio. Uma colônia da linhagem de *E. coli* foi inoculada em meio LB, crescida durante 18 horas a 37°C sob agitação, diluída 1:50 em 100 ml do mesmo meio de cultura e incubada a 37°C até A₅₅₀ = 0,5. A cultura foi centrifugada durante 10 minutos a 4000 rpm (rotor GSA/Sorvall®) a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 45 ml de solução de CaCl₂ 50mM gelada. Após Incubação no gelo por 20 minutos, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 6 ml de solução de CaCl₂ 50mM gelada. Para o armazenamento, adicionou-se glicerol 15% às células e estas foram aliquotadas e congeladas a -80°C.

Para a transformação com os diferentes plasmídios e construções, as células foram descongeladas no gelo. Em um tubo estéril foram adicionados 200 µl das células competentes e um mínimo de 100 ng de DNA; incubou-se no gelo por 10 minutos e procedeu-se o choque térmico pela incubação do tubo a 42°C durante 2 minutos. Outra incubação, no gelo, de 5 minutos foi realizada e, em seguida, adicionou-se 1 ml de meio LB. Este foi incubado a 37°C durante 1 hora. As células foram centrifugadas em microcentrífuga (rotor A-4-44/ centrífuga Eppendorf 5804 R) por 1 minuto, ressuspensas em 100 µl de meio LB e plaqueadas no mesmo meio suplementado com os antibióticos

necessários (ampicilina 100 µg/ ml ou canamicina 15 µg/ ml). As placas foram incubadas durante 18 horas a 37°C.

III.8 - Manipulação de leveduras

III.8.1 - Transformação de *S. cerevisiae*

Foi utilizado o método do acetato de lítio. Uma colônia da linhagem hospedeira foi inoculada em meio YPD, crescida durante 18 horas a 30°C sob agitação, diluída 1:50 em 50 ml do mesmo meio de cultura e incubada a 30°C até $A_{600} = 0,5$. A cultura foi centrifugada durante 15 minutos a 6000 rpm. As células foram ressuspensas em 1 ml de acetato de lítio 100 mM, centrifugadas durante 15 minutos a 13000 rpm e ressuspensas em 400 µl de acetato de lítio 100 mM. 50 µl da suspensão foram centrifugados durante 10 segundos a 13000 rpm, este volume foi adicionado de 240 µl de PEG 50% (v/v) (polietilenoglicol), 36 µl de acetato de lítio 1M, 25 µl de ssDNA 2 mg/ ml (DNA de esperma de salmão) e 1 µg de plasmídeo em 50 µl de água. A mistura foi vortexada, incubada durante 30 minutos a 30°C e 30 minutos a 42°C, e centrifugada a 13000 rpm. O “pellet” foi ressuspensão em 100 µl de água estéril e plaqueado em meio SD contendo os aminoácidos necessários. As placas foram incubadas a 30°C durante 72 horas.

III.8.2 – Preparação de extratos protéicos de *S.cerevisiae*

As linhagens de *S. cerevisiae* foram crescidas, a partir de um pré-inóculo diluído 1:50, em meio seletivo, acrescido de aminoácidos de acordo com as marcas auxotróficas, a 30°C durante 18 horas. Em casos de linhagens superexpressando proteínas heterólogas sob controle do promotor GAL1 (sequências codificadoras clonadas no vetor pEGST), as células eram centrifugadas, ressuspensas no mesmo meio, acrescido de galactose (5 ou 10%), e crescidas a 30°C por aproximadamente 18 horas. A cultura foi centrifugada a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C, as células foram lavadas com solução salina 0,85% e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente as células foram

ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 10mM pH 7,5; NaCl 100mM; MgCl₂ 30mM; PMSF 1mM), adicionadas de esferas de vidro de 450μ (Sigma) e as células foram quebradas por agitação mecânica em vortex, utilizando 10 ciclos de 15 segundos cada, intercalados por 1 minuto no gelo. A suspensão foi transferida para um novo tubo e centrifugada a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e estocado à -80°C.

III.8.3 – Análise fenotípica em *S. cerevisiae*

As linhagens J80 e J82 de *S. cerevisiae*, transformadas com os plasmídios carregando a sequência codificadora do domínio quinase de TbeIF2K2, sob controle do promotor GAL1, foram crescidas em meio sólido S Raf adicionado dos aminoácidos necessários, com e sem galactose. As placas foram incubadas a 30° C por aproximadamente 3 dias, e foi observada a capacidade de crescimento destas linhagens.

A linhagem H1643 de *S. cerevisiae*, transformada com os plasmídios carregando a sequência codificadora de eIF2α de levedura ou de *T. brucei* (inteiro ou truncado), sob controle do promotor GAL1, foi crescida em meio com galactose, com ou sem ácido 5-fluoroorótico. As placas foram incubadas a 30° C por aproximadamente 3 dias, e foi observada a capacidade de crescimento destas linhagens.

III.9 - Manipulação de DNA

III.9.1 - Preparação de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep)

Para obtenção do DNA plasmidial bacteriano em pequena escala, uma colônia isolada foi crescida em meio de cultivo apropriado durante 18 horas a 37°C, sob agitação. 1,5 ml da cultura foi transferido para um tubo de polipropileno novo, centrifugado durante 3 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente; o sobrenadante foi descartado, o “pellet” lavado com 1 ml de solução salina 0,85% e centrifugado durante 3 minutos a 13000 rpm à temperatura

ambiente; o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento celular ressuspenso em 200 µl de TE. Adicionaram-se então 200 µl de solução de lise (NaOH 0,4 M; SDS 2% (v/v)), e a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada 5 minutos à temperatura ambiente. Ao lisado, adicionaram-se 150 µl de acetato de sódio 3 M pH4,5, homogeneizou-se por inversão e centrifugou-se durante 15 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente; o sobrenadante foi transferido para um tubo novo, adicionado de 1 ml de isopropanol, incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugado durante 20 minutos a 13000 rpm; o “pellet” foi lavado com etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µl de TE RNase.

III.9.2 - Manipulação enzimática de DNA

As reações de digestão com endonucleases de restrição, de preenchimento de extremidades protuberantes e de defosforilação de extremidades de DNA seguiram as especificações dos fabricantes das enzimas (New England Biolabs, Invitrogen, Fermentas ou Promega).

III.9.3 - Ligação de extremidades de DNA

As reações de ligação foram feitas em um volume final de 20 µl. Foram utilizados 4 µl de tampão de ligase 5X (Invitrogen), 1 µl de T4 DNA ligase 1U /µl (Invitrogen), 0,1 a 0,3 µg de vetor e o fragmento a ser ligado ao vetor numa concentração molar cinco vezes maior que a do vetor utilizado. A reação foi incubada a 4°C durante 18 horas. Toda a reação foi a seguir usada para transformar as células de *E. coli* (DH5α).

III.9.4 - Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento, os DNAs plasmidiais foram purificados utilizando “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech), concentrados em “Speed Vac” SC110 (Savant) para aproximadamente 1 µg/ µL. O seqüenciamento foi realizado utilizando os oligonucleotídeos M13 F e R, para os fragmentos clonados no vetor pCR4-TOPO ou pUC18, ou oligonucleotídeos específicos,

“ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit” (Applied Biosystems) e seqüenciador ABI-377 (Applied Biosystems).

III.9.5 - Resolução eletroforética de DNAs

Para análise qualitativa e quantitativa, aliquotas do DNA genômico, plasmidial ou produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 0,8 - 1 %, em TBE 0,5X.

III.9.6 - PCRs

Para a reação de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR) foram utilizados 50 ng de moléculas molde, 100 pmoles dos oligos “forward” e “reverse” específicos, 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, tampão da *Taq* polimerase 1X, 2,5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen) e H₂O qsp. 50 µl. As condições de amplificação compreenderam 35 ciclos com desnaturação a 94° C por 30 segundos , anelamento dos oligos por 45 segundos e extensão da cadeia nucleotídica a 72° C, conforme indicado; além de uma extensão final adicional, a 72°C durante 10 minutos.

<u>Produto amplificado</u>	<u>Oligos</u>	<u>Molde</u>	<u>Temperatura de anelamento</u>	<u>Tempo de extensão</u> (segundos)	<u>Tamanho do fragmento</u> (pbs)
TbeIF2K2 ³⁵⁻⁴⁴⁹	BC 438 e BC 441	DNA genômico (<i>T. brucei</i>)	53° C	90	1263
TbeIF2K2 ⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸	BC 442 e BC 445	DNA genômico (<i>T. brucei</i>)	60° C	105	1187
TbeIF2K3 ¹⁻⁴⁷⁶	BC 446 e BC 450	DNA genômico (<i>T. brucei</i>)	53° C	90	1443
TbeIF2K3 ⁵⁰¹⁻¹⁰³⁹	BC 451 e BC 454	DNA genômico (<i>T. brucei</i>)	60° C	105	1628

III.10 – Manipulação de RNA

III.10.1 – Extração de RNA total de *T. brucei*

Aproximadamente $6,7 \times 10^6$ parasitas foram coletados e ressuspensos em 500 μl de “TRIzol LS Reagent” (Invitrogen). Foram adicionados à suspensão de células 100 μl de clorofórmio. A suspensão foi homogeneizada (Vortex-2 Genie) e incubada no gelo por 10 minutos. Após centrifugação de 10 minutos a 14000 rpm (4°C), a fase aquosa foi coletada e adicionada de 2 volumes de etanol absoluto gelado. Foi feita uma incubação de 1 hora a temperatura ambiente, seguida de centrifugação de 10 minutos a 14000 rpm (4°C). O precipitado foi lavado com etanol 75% (em H_2O -DEPC), homogeneizado no Vortex, e centrifugado nas condições anteriores. Após secar a 4°C , o precipitado foi ressuspenso em 40 μl de H_2O -DEPC e armazenado a -80°C .

III.10.2 – RT-PCR das 3 quinases de *T. brucei*

RNA total (1 μg) extraído de *T. brucei* foi tratado com DNase I (Invitrogen) por 30 minutos a temperatura ambiente. Este RNA foi usado como molde em uma reação de transcriptase reversa com Improm II (Promega), segundo protocolo do fabricante. As reações de PCR usando cDNA como molde foram feitas em um volume final de 25 μl , com os seguintes componentes: tampão 10X concentrado (2,5 μl), MgCl_2 50 mM (0,75 μl), cDNA molde (18,2 ng), primers Forward e Reverse (25 pmoles cada) (BC436 e BC437 para TbeIF2K1; BC438 e BC441 para TbeIF2K2; BC446 e BC450 para TbeIF2K3), enzima Taq Platinum (0,25 μl), e 19 μl de água. Após desnaturação do DNA a 94°C por 3 minutos, foram feitos 40 ciclos nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 2 minutos. A seguir a reação foi deixada a 72°C por 5 minutos, e foram aplicados no gel de agarose 18 μl de cada reação.

III.11 – Manipulação de proteínas

III.11.1 – SDS-PAGE

A resolução eletroforética das proteínas, em mini-géis, foi obtida utilizando-se SDS-PAGE (“Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis”) 10-12%, de acordo com o protocolo descrito em [71].

Preparação do gel :

<u>Gel de Separação</u>	<u>12%</u>	<u>10%</u>	<u>Gel de empacotamento</u>	
Acrilamida/ Bisacrilamida (30%/0,8%)	6 ml	5 ml	Acrilamida/ Bisacrilamida (30%/0,8%)	1,3 ml
Água estéril	7,1 ml	8,1 ml	Água estéril	7,2 ml
Tris-HCl , pH 8,8	1,9 ml	1,9 ml	Tris-HCl , pH 6,8	1, 25 ml
SDS 10%	150 µl	150 µl	SDS 10%	100 µl
Persulfato de amônia	150 µl	150 µl	PA	100 µl
TEMED	40 µl	40µl	TEMED	20 µl

Para a eletroforese, as amostras foram adicionadas de tampão de Laemmli (LB) 1X (LB 4X → 0,625M Tris-HCl pH 6,8; 10% glycerol; 3% SDS; 5% β-mercaptoetanol, 0,1% azul de bromofenol).

A corrida foi realizada em tampão RB (“Running Buffer”) 1X (RB 10X → 30,0 g de Tris-base, 144,0 g de glicina, 10% SDS e água deionizada qsp 1 L) a 30-85 mA (miliampéres). Após a resolução, o gel foi corado com solução de azul de Coomassie (0,25% de Coomassie Blue R250 (Sigma) em etanol 50% e ácido acético 7,5%), descorado e fixado com solução contendo 10% de ácido acético e 20% de etanol absoluto, ou utilizado para a realização de Western blots (transferência para membrana de nitrocelulose).

III.11.2 – Expressão de proteínas recombinantes e preparação de extratos protéicos

Bactérias contendo plasmídeo foram crescidas em um pré-inóculo a 37° C em meio LB com canamicina por 18 horas. O pré-inóculo foi diluído 1:100 no mesmo meio. A cultura foi incubada a 37° C, com agitação a 200 rpm, até atingir $A_{550}=0,2-0,4$ (para indução de 18 horas) ou $A_{550}=0,8$ (para indução de 4 horas ou menos). Nesse ponto foi realizada a indução da expressão protéica com IPTG (tempo e concentração variáveis, de acordo com a proteína), a 240 rpm, em frascos de no mínimo 4 vezes o volume da cultura. A cultura pós-indução foi centrifugada (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, rotor GSA) a 6000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi ressuspensão em tampão de lise gelado (sacarose 10%, NaCl 0,2 M, Tris-HCl 50 mM pH 7,5) ou em PBS 1X gelado, na proporção 1,5 ml tampão:100 ml cultura. A amostra foi congelada em gelo seco e, após descongelamento, foi incubada no gelo com lisozima (para uma concentração final de 1 mg/ml, a partir de solução estoque 50 mg/ml) por 30 minutos, e em seguida sonicada (sonicador Branson Sonifier 450) e centrifugada (Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, rotor SS-34) a 10000rpm por 10 minutos. O sobrenadante (fração solúvel) e o precipitado ressuspensão em tampão com uréia 8 M (fração insolúvel) foram aliquotados e guardados a -80° C.

III.11.3 – Quantificação de proteínas

Volumes variáveis de extrato celular total ou de proteínas purificadas foram adicionadas de 1ml de solução de “Coomassie Brilliant Blue” (CBB, descrito abaixo) e a absorbância a 595 nm foi determinada em espectrofotômetro. A concentração das proteínas foi determinada utilizando uma curva padrão de BSA (1-10 µg). Solução CBB: 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G (Sigma, B-0770) foram dissolvidos em 5ml etanol 95%. Adicionou-se 10ml H₃PO₄, e o volume foi completado para 100ml com água deionizada. A solução foi filtrada em papel de filtro grosso e guardada a 4° C em frasco escuro.

III.11.4 – Expressão e purificação de proteínas recombinantes

- TbeIF2 α selvagem e TbeIF2 α ^{T169A}

A indução da expressão de His₆-TbeIF2 α (pBE 495) ou de His₆-TbeIF2 α ^{T169A} (pBE 587) foi feita com 100 μ M de IPTG a 23° C, em células BL21, por aproximadamente 18 horas. O extrato contendo a proteína solúvel foi preparado, em PBS, conforme descrito acima. A resina quelante de níquel (QIAGEN), depositada em uma coluna de vidro a 4°C, foi lavada em água milli-Q, carregada com 5 volumes de solução NiSO₄ 50 mM e equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0). O extrato foi aplicado à resina. Após a lavagem com aproximadamente 140 volumes de tampão de ligação, a resina foi lavada com 4 volumes de solução imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, e 20 volumes de solução imidazol 60 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A eluição foi feita com 6 volumes de solução de eluição (imidazol 200 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0). O eluato foi dialisado contra solução Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e glicerol 5%.

- TbeIF2K1¹⁰⁶⁸⁻¹²³⁶

A indução da expressão de His₆-TbeIF2K1¹⁰⁶⁸⁻¹²³⁶ (pBE 583) foi feita com 1 mM de IPTG a 37° C, em células BL21, por aproximadamente 3 horas. O extrato contendo a proteína insolúvel foi aplicado em um gel preparativo SDS-PAGE. A banda correspondente à proteína recombinante foi cortada do gel, e a proteína foi eluída em H₂O.

- TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹

A indução da expressão de His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ (pBE 566) foi feita com 1 mM de IPTG a 23° C, em células BL21, por aproximadamente 18 horas. O extrato contendo a proteína insolúvel foi preparado em PBS e uréia 6M. O extrato foi incubado por 1 hora a 4° C com resina quelante de níquel, preparada conforme descrito acima. A resina foi lavada com 45 volumes de solução imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 6M, e 30 volumes de solução imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 6M. A proteína foi eluída da resina com 6 volumes de solução imidazol 200 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 6M.

Alternativamente, o extrato contendo a proteína insolúvel foi aplicado em um gel preparativo SDS-PAGE. A banda correspondente à proteína recombinante foi cortada do gel, e a proteína His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ foi eluída em H₂O.

- TbeIF2K3¹⁻⁴⁷⁶

A indução da expressão de His₆-TbeIF2K3¹⁻⁴⁷⁶ (pBE 565) foi feita com 1 mM de IPTG a 30° C por aproximadamente 18 horas, em células Rosetta. O extrato contendo a proteína solúvel foi preparado em PBS. O extrato foi incubado por 1 hora a 4° C com resina quelante de níquel, preparada conforme descrito acima. A resina foi lavada com 30 volumes de solução imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, e 15 volumes de solução imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A proteína foi eluída da resina com 9 volumes de solução imidazol 200 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

- eIF2α de mamífero

A indução da expressão de His₆-eIF2α (pBE 526) foi feita com 0,4 mM de IPTG a 23° C, em células BL21, por aproximadamente 18 horas. O extrato contendo a proteína solúvel foi preparado em PBS. O extrato foi incubado por 90 minutos a 4° C com resina quelante de níquel, preparada como já descrito. A resina foi lavada com 30 volumes de solução imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, e 18 volumes de solução imidazol 60 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A proteína foi eluída da resina com 9 volumes de solução imidazol 1 M, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0. O eluato foi dialisado contra solução PBS e glicerol 10%.

- PKR

A indução da expressão do domínio quinase de PKR em fusão com GST, GST-PKR (pBE 527), foi feita com 0,4 mM de IPTG a 23° C por aproximadamente 18 horas. O extrato contendo a proteína solúvel foi preparado em PBS. O extrato foi incubado por 90 minutos a 4° C com resina “Glutathione SepharoseTM 4B” (Amersham), preparada de acordo com instruções do fabricante. A resina foi lavada com 30 volumes de PBS, e a proteína foi eluída com 9 volumes de solução Tris-base 50 mM e glutatona 40 mM. O eluato foi

dialisado contra solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5, KCl 50 mM, β -mercaptoetanol 2 mM e glicerol 5%.

III.11.5 – Preparo de extrato protéico de *T. brucei*

Os parasitas foram crescidos em meio de cultura adequado. A cultura (totalizando aproximadamente 5×10^8 parasitas da forma procíclica, ou $1,5 \times 10^8$ parasitas da forma sanguínea) foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos e, após lavagem com PBS, novamente centrifugada a 2070 rpm por 2 minutos. Os parasitas foram ressuspensos em solução Tris 20 mM pH8,0, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 2 mM, NaCl 150 mM e inibidores de proteases (PMSF 1 mM, benzamidina 2mM, leupeptina 1 μ g/ml, pepstatina A 10 μ g/ml, aprotinina 4 μ g/ml e antipaína 1 μ g/ml) e fosfatases (pirofosfato de sódio 10 mM e fluoreto de sódio 1 mM). A suspensão de parasitas foi vortexada e a lise foi feita por congelamento/descongelamento, este seguido por nova vortexação e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante (fração solúvel) foi armazenado a -80°C.

Para a preparação da fração protéica enriquecida de membrana plasmática, após a separação do sobrenadante (fração solúvel), o precipitado foi ressuspenso em igual volume da solução anterior com os inibidores, adicionada de Triton X-100 1%. Após vortexação e centrifugação a 14000 rpm por 15 minutos a 4° C, o sobrenadante (fração protéica enriquecida de membrana) foi armazenado a -80° C.

III.11.6 – “Western blot”

Após resolução em géis de acrilamida (SDS-PAGE), as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences). A membrana foi então bloqueada com solução de leite 5% em H₂O, exceto quando indicado, e incubada por no mínimo 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo primário:

- Soro anti-TbeIF2 α - diluição 1:500 em PBS.
- Soro anti-TbeIF2K2 – diluição 1:500 em PBS.
- Anticorpo anti-TbeIF2K2 purificado – diluição 1:500 em PBS.

- Soro anti-TbBiP – diluição 1:60000 em PBS-Tween / BSA 2,5%.
- Anticorpo contra eIF2 α (mamífero) fosforilado (Biosource) – diluição 1:1000 em TBS-Tween / BSA 2,5%.
- Anticorpo contra eIF2 α (mamífero) total (Cell Signaling) – diluição 1:2000 em TBS-Tween / BSA 2,5%.

A membrana foi a seguir lavada por três vezes de 5 minutos com PBS-Tween ou TBS-Tween, de acordo com o utilizado na diluição do anticorpo. Após as lavagens, a membrana foi incubada com proteína A conjugada a HRP (“horseradish peroxidase”) (GE Healthcare) na diluição 1:4000 (PBS) por 1 hora a temperatura ambiente, exceto:

- para detecção do anticorpo contra eIF2 α (mamífero) fosforilado foi usada proteína A-HRP 1:4000 em TBS-Tween.
- para detecção de anticorpo contra eIF2 α (mamífero) total foi usado anticorpo secundário contra -IgG de camundongo acoplado a HRP (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:2000 em TBS-Tween / BSA 2,5%.

Foram repetidas as lavagens com PBS-Tween ou TBS-Tween e, então, com água para a retirada do detergente. A membrana foi revelada com o reagente ECL (“ECLTM Western Blotting Analysis System”, Amersham Biosciences), e filmes “HyperfilmTM MP” , Amersham Biosciences.

Quando necessário reutilizar a mesma membrana para incubação com outro anticorpo, a membrana após a primeira revelação foi incubada por 30 minutos a 55° C com solução de “stripping” (Tris-HCl 62,5 mM pH6,7; SDS 2%; β -mercaptoetanol 100 mM). Após repetidas lavagens com H₂O, a membrana foi bloqueada e o protocolo foi seguido como descrito acima para o anticorpo em questão.

III.12 – Imunização de coelhos

Para a preparação de soros policlonais, coelhos foram imunizados com 150 μ g de proteína recombinante purificada por cada dose. Foram dadas 4 doses com intervalos de 21 dias entre elas. 11 dias após a terceira e a quarta inoculações, os coelhos foram sangrados para o

teste do soro. Foi usado adjuvante de Freund (completo para a primeira dose e incompleto para as demais) (SIGMA). A primeira inoculação foi subcutânea, e as demais intraperitoneais.

Para a preparação do soro, o sangue foi incubado a 37° C por 30 minutos, e depois a 4° C por 18 horas. O sangue foi então centrifugado a 700g por 15 minutos, e o sobrenadante novamente centrifugado a 2800g por 20 minutos. O soro (sobrenadante) foi armazenado a –80° C.

III.13 – Purificação de anticorpo contra TbeIF2K2

Para a purificação dos anticorpos contra TbeIF2K2, aproximadamente 1 mg da proteína recombinante purificada foi resolvida por SDS-PAGE preparativo 12%, e transferida para uma membrana de nitrocelulose. A proteína transferida para a membrana foi corada com Ponceau S, e a faixa da membrana correspondente à proteína TbeIF2K2 foi cortada. Após bloqueio com leite 5% (H₂O), a membrana foi incubada com 2 ml de soro de coelho contra TbeIF2K2 diluído 1:10 em PBS, por 4 horas a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada por três vezes de 5 minutos com PBS, e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente com 2 ml de solução de eluição do anticorpo (glicina 0,1 M pH 2,5 e EGTA 1 mM). Este eluato foi neutralizado com igual volume de solução Tris base 0,1 M, e concentrado no Centricon Plus-20 (Millipore). O anticorpo purificado foi aliquotado e armazenado a –80° C.

III.14 – Ensaio de deglicosilação

Nos ensaios de deglicosilação com endoglicosidase H (SIGMA), 20 µg de fração enriquecida de membrana de parasitas procíclicos foram incubados por 5 minutos a 100° C com solução denaturante (SDS 0,1% e β-mercaptoetanol 50 mM) em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 5,5), em um volume final de 20 µl. Após incubação no gelo por 10 minutos, 0,5 µl da enzima endo H foi adicionada à solução, e a reação prosseguiu a 37 °C

por aproximadamente 18 horas. A amostra foi então aplicada a SDS-PAGE 10%, e o resultado foi analisado por “Western blot” usando anticorpo anti-TbeIF2K2.

III.15 – Ensaio de defosforilação

Aproximadamente 5 µg de fração protéica enriquecida de membrana das linhagens 427 sanguínea e procíclica de *T. brucei* foram incubados com 20 unidades de fosfatase alcalina (CIAP - PROMEGA) em tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 9,3 a 25 °C), MgCl₂ 1 mM, ZnCl₂ 100 µM e spermidina 1 mM, em um volume final de 10 µl. Após incubação a 37° C por aproximadamente 3 horas, as amostras foram resolvidas por SDS-PAGE 10% e analisadas por “Western blot”.

III.16 – Imunofluorescência

III.16.1 – Ensaios de marcação com TbeIF2K2

5 x 10⁶ parasitas (sanguíneos ou procíclicos) foram centrifugados por 10 minutos a 3750 rpm, lavados com 1 ml de PBS, centrifugados a 2070 rpm por 2 minutos, e novamente ressuspensos em 1 ml de PBS. Aproximadamente 40 µl desta suspensão foram adicionados a um poço circular em uma lâmina própria para imunofluorescência. O excesso de líquido foi retirado após 3 minutos, e os parasitas aderidos à lâmina foram fixados com paraformaldeído 2 % gelado, por 15 minutos a temperatura ambiente. Os parasitas foram lavados 4 vezes com PBS, e permeabilizados com Triton X-100 0,1 % em PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. As lavagens foram repetidas, e os parasitas fixados e permeabilizados foram incubados com o anticorpo primário anti-TbeIF2K2 purificado 1:100 (PBS), por 1 hora a temperatura ambiente. No caso do ensaio de competição, o anticorpo purificado anti-TbeIF2K2 foi incubado por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente com 5 µg de His₆-TbeIF2K2^{35 a 449} antes de ser utilizado. A seguir os parasitas foram lavados 4 vezes com PBS e incubados com DAPI (1 mg/ml) 1:200 e anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho conjugado com FITC 1:200 (Santa Cruz

Biotechnology) em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Pela última vez os parasitas foram lavados e a lâmina foi montada com vectashield (Vector) para preservar a fluorescência. Os parasitas foram observados com lente de imersão (aumento 100 x) em microscópio Nikon.

III.16.2 – Ensaio de co-localização

Células de parasitas sanguíneos foram lavadas com tampão HBS (Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, KCl 5 mM e glicose 70 mM) e ressuspensas, para uma concentração final de 10^7 parasitas/ml, em meio HMI9-BSA (meio HMI9 sem soro, suplementado com BSA 0,5 mg/ml) contendo lectina de tomate conjugada à biotina na concentração de 20 µg/ml (TL, Vector Laboratories). As células foram então incubadas por 30 minutos a 5 °C ou 15 °C, e a seguir lavadas com PBS. As células lavadas foram pré-fixadas com formaldeído 0,1%, e a seguir fixadas na lâmina com metanol/acetona [72]. As células fixadas foram incubadas com streptavidina conjugada a Alexa 633 (Molecular Probes), e em paralelo com os anticorpos anti-TbIF2K2 (1:100 em PBS) e anti-p67 [72]. Foram utilizados anticorpos secundários anti-IgG de cabra conjugados a Alexa633 (p67) ou Alexa488 (TbK2) (Molecular Probes), e também DAPI 500 ng/ml.

III.17 - Co-imunoprecipitação de TbBiP e TbIF2K2

Aproximadamente 150 µg de fração protéica enriquecida de membrana de *T. brucei* foram incubados por 1 hora a 4° C com 1 µl de soro pré-imune e 25 µl de resina “Protein A Sepharose™ CL-4B” (Amersham Biosciences) em um volume de 200 µl, completados com solução Triton 1%, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, glicerol 10% e EGTA 1 mM, adicionada de inibidores de fosfatases (pirofosfato de sódio 10 mM e fluoreto de sódio 1 mM). Paralelamente, 1,5 µl de soro contra TbBiP foram incubados com 25 µl de resina Proteína A Sepharose, também em um volume final de 200 µl, por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, a resina ligada a anti-BiP foi lavada 3 vezes (de 200 µl) com a solução Triton 1%, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, glicerol 10%, EGTA 1 mM, adicionada

de inibidores de fosfatases, e a ela foi adicionado o sobrenadante do extrato previamente incubado com soro pré-imune e resina Proteína A Sepharose. Após aproximadamente 2 horas de incubação a 4° C, a resina foi lavada 3 vezes com 1 ml de solução Triton 1%, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, glicerol 10%, EGTA 1 mM, adicionada de inibidores de fosfatases. O imunoprecipitado foi resolvido por SDS-PAGE e o resultado foi analisado por “Western blot” usando anticorpo purificado contra TbeIF2K2.

III.18 – Imunoprecipitação

- GST e GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸

Aproximadamente 700 µg de extrato protéico de *S. cerevisiae* superexpressando GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ (pBE553) ou apenas GST (pEGST), foram incubados por 1 hora a 4 °C com 1 µl de soro pré-imune e 25 µl de resina “Protein A SepharoseTM CL-4B” (Amersham Biosciences), em um volume de 200 µl , completados com solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 30 mM adicionada do inibidor de fosfatase fluoreto de sódio 1 mM. Paralelamente, 0,5 µl de soro anti-GST foi incubado com 25 µl de resina Proteína A Sepharose, também em um volume final de 200 µl, por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, a resina ligada a anti-GST foi lavada 3 vezes (de 200 µl) com a solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 30 mM, NaF 1 mM, e a ela foi adicionado o sobrenadante do extrato previamente incubado com soro pré-imune e resina Proteína A Sepharose. Após aproximadamente 90 minutos de incubação a 4 °C, a resina foi lavada 1 vez com 1 ml de solução Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 30 mM, NaF 1 mM, e 2 vezes com 1 ml de PBS, adicionado de pirofosfato de sódio 10 mM e NaF 1 mM.

- TbeIF2K2 endógena

Aproximadamente 200-400 µg de fração protéica enriquecida de membrana de *T. brucei* foram incubados por 1 hora a 4 °C com 1 µl de soro pré-imune e 25 µl de resina Proteína A Sepharose em um volume de 200 µl , completados com solução Triton 1%, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, glicerol 10% e EGTA 1 mM, adicionada de inibidores de fosfatases (pirofosfato de sódio 10 mM e NaF 1 mM). Paralelamente, 2-4 µl de anticorpo purificado

contra TbeIF2K2 foram incubados com 25 µl de resina Proteína A Sepharose, também em um volume final de 200 µl, por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, a resina ligada a anti-TbeIF2K2 foi lavada 3 vezes (de 200 µl) com a solução Triton 1%, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, glicerol 10%, EGTA 1 mM, adicionada de inibidores de fosfatases, e a ela foi adicionado o sobrenadante do extrato previamente incubado com soro pré-imune e resina Proteína A Sepharose. Após aproximadamente 2 horas de incubação a 4° C, a resina foi lavada 1 vez com 1 ml de solução Triton 1%, NaCl 150 mM, Hepes 20 mM pH 7,5, glicerol 10%, EGTA 1 mM, adicionada de inibidores de fosfatases, e 2 vezes com 1 ml de PBS, adicionado de inibidores de fosfatases.

III.19 – Ensaio de fosforilação *in vitro*

Para os ensaios de fosforilação *in vitro*, os imunoprecipitados descritos acima (GST, GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ ou TbeIF2K2 endógena) foram incubados por 1 hora a temperatura ambiente com o fator eIF2α de mamífero (aproximadamente 0,5 µg) ou de *T. brucei* (aproximadamente 3,5 µg), selvagem ou mutado, na presença de ATP (0,1 mM) ou ATP [γ-³²P] (10 µCi), em 25 µl do tampão imidazol 50 mM, NaCl 120 mM, Tris-HCl 4 mM pH 8,0, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EGTA 1 mM, triton 1%, MnCl₂ 2,5 mM, β-mercaptoetanol 7 mM e MgAc 2 mM. Nos casos em que TbeIF2α foi usado como substrato, o ensaio foi realizado sem β-mercaptoetanol. Como controle positivo, o ensaio foi feito com 0,5 µg de PKR purificada, ao invés dos imunoprecipitados. E como controle negativo, o fator eIF2α foi incubado pelo mesmo tempo apenas com ATP, no tampão apropriado.

No caso do ensaio usando GCN2 e PKR purificadas, a reação foi realizada em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0, KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM e PMSF 1 µM, adicionado de ATP[γ-³³P] (10 µCi). A incubação com His₆-TbeIF2α foi feita a temperatura ambiente por 20 minutos [56].

III.20 – Marcação de proteínas extracelulares com Biotina.

Para a marcação de proteínas extracelulares, 5×10^8 parasitas procíclicos (29-13) foram lavados, ressuspensos em 1 ml de PBS (pH 8) gelado, e incubados com 3 mM de “Sulfo-NHS-Biotin reagent” (PIERCE) por 30 minutos a 4° C. A reação foi interrompida lavando-se as células com glicina 100 mM e PBS. Foram então preparadas as frações protéicas solúvel e de membrana, conforme descrito, e estas foram usadas para imunoprecipitar as proteínas endógenas TbBiP, TbeIF2K2 e TbeIF2 α . Os imunoprecipitados foram resolvidos por SDS-PAGE e as proteínas biotiniladas foram analisadas por “Western blots” com “Streptavidin- Horseradish Peroxidase Conjugate” (GIBCO BRL).

III.21 – Estresse celular

III.21.1 – Diferentes fases de crescimento

Culturas de parasitas sanguíneos 427 foram crescidas até diferentes fases, e os parasitas foram coletados aproximadamente a cada 12 horas, nas seguintes densidades: $2,4 \times 10^6$ parasitas/ml (ponto 1); $2,0 \times 10^6$ parasitas/ml (ponto 2 – fase estacionária de crescimento); e $4,0 \times 10^5$ parasitas/ml (ponto 3 – fase de morte celular). Os extratos protéicos foram preparados como descrito.

III.21.2 – BAPTA

Parasitas sanguíneos 427, na concentração de 1×10^7 parasitas/ml, foram submetidos à incubação com BAPTA-AM (Molecular Probes), nas concentrações de 10 μ M, 25 μ M ou 50 μ M, por 1 hora, a temperatura ambiente, no meio de cultura. A posterior preparação das amostras, separando as proteínas solúveis (fração solúvel) das proteínas de membrana (fração de membrana), foi realizada como já descrito, a 4° C ou a temperatura ambiente. O precipitado restante, após a separação da fração de membrana, foi ressuspensão em uréia 6M, e também analisado.

IV – RESULTADOS

IV.1 – Identificação de 3 potenciais quinases de eIF2 α em *T. brucei*

Por comparação de sequências, identificamos no genoma de *T. brucei* 3 possíveis quinases de eIF2 α , que nomeamos TbeIF2K1 (GeneDB: Tb11.02.5050), TbeIF2K2 (Tb04.1H19.980) e TbeIF2K3 (Tb06.5F5.660). Os genes codificantes destas 3 quinases em potencial também estão presentes nos tripanossomatídeos *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* [23; 73; 74]. As 3 quinases de *T. brucei* apresentam domínios quinase semelhantes aos domínios catalíticos de quinases de eIF2 α conhecidas (Figura 8). As 3 proteínas de *T. brucei* apresentam um inserto característico das quinases de eIF2 α entre os subdomínios IV e V [75]. Estes insertos são de tamanhos variáveis: TbeIF2K1, inserto de 99 resíduos; TbeIF2K2, 46 resíduos; e TbeIF2K3, 119 resíduos. A quinase TbeIF2K3 apresenta ainda um grande inserto (111 resíduos) entre os subdomínios VIB e VII, incomum nesta família de quinases. O sítio de autofosforilação das quinases é, em geral, uma treonina (seta azul envolta por quadrado na Figura 8). Na quinase TbeIF2K2, porém, este resíduo é substituído por uma serina, substituição esta confirmada por sequenciamento de DNA. A fosforilação deste resíduo na quinase PKR está envolvida tanto com a dimerização da quinase quanto com o reconhecimento do substrato [56]. Já a treonina na posição 487 de PKR, indicada na Figura 8 por uma cabeça de seta envolta por um quadrado, é um importante determinante de especificidade para o reconhecimento do substrato pela quinase. Esta especificidade é determinada pela orientação e pelo tamanho do domínio de α -hélice em que este resíduo está localizado, maior nas quinases de eIF2 α que em outras classes de quinases. Esta treonina é encontrada nas proteínas TbeIF2K2 e TbeIF2K3, porém não na TbeIF2K1. Em relação aos outros resíduos característicos de quinases de eIF2 α , esta conservação é em geral mantida nas quinases de *T. brucei* (cabeças de seta na Figura 8).

Os domínios regulatórios putativos das quinases de *T. brucei*, com exceção de TbeIF2K1, não são conservados em relação aos domínios regulatórios de outras quinases de eIF2 α . TbeIF2K1 parece ser um ortólogo da quinase GCN2, apresentando os domínios

conservados RWD e HisRS, importantes, como demonstrado em levedura, para a ativação da quinase e para a ligação a tRNAs não-carregados, respectivamente (Figura 9). A região HisRS foi detectada pelo programa de predição de homologia Phyre (“Protein Homology/Analogy Recognition Engine”) [76]. A organização dos domínios de TbeIF2K1 é parecida com a de GCN2, com as regiões RWD (N-terminal) e HisRS (C-terminal) flanqueando o domínio quinase, porém nenhuma região pseudo-quinase foi detectada em TbeIF2K1. Os domínios regulatórios putativos de TbeIF2K2 e TbeIF2K3, no entanto, não são semelhantes a nenhum outro domínio regulatório de conhecidas quinases de eIF2 α (Figura 9). TbeIF2K2 tem uma seqüência sinal predita e um potencial domínio transmembrana, sugerindo uma associação com membranas e uma semelhança topológica com PERK, uma proteína transmembrana residente no Retículo Endoplasmático.

A presença dos transcritos que codificam as 3 quinases foi detectada tanto em parasitas sanguíneos quanto em parasitas procíclicos crescidos em cultura (Figura 10A). Para verificar a expressão das proteínas, anticorpos contra as prováveis regiões regulatórias das quinases (TbeIF2K1¹⁰⁶⁸⁻¹²³⁶, TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ e TbeIF2K3¹⁻⁴⁷⁶) foram produzidos em coelhos. Os soros contra TbeIF2K1 e TbeIF2K3 reconheceram as proteínas recombinantes utilizadas para imunização; no entanto, estes soros não foram capazes de reconhecer as proteínas endógenas, nem em parasitas sanguíneos, nem em procíclicos (dados não mostrados). É possível que essas duas quinases sejam muito pouco expressas nestes parasitas, ou ainda que elas sejam traduzidas apenas em condições específicas não testadas neste trabalho. Outra possibilidade é que elas sejam expressas apenas em fases do ciclo de vida do *T. brucei* não analisadas aqui por dificuldades técnicas, como a fase metacíclica presente na glândula salivar da mosca tsé-tsé. Já o soro produzido contra TbeIF2K2 reconheceu tanto a proteína recombinante quanto a endógena (Figura 10B). Porém, a proteína reconhecida tanto em parasitas sanguíneos quanto procíclicos migra em SDS-PAGE com uma massa molecular aparente de aproximadamente 130-140 kDa, maior que o tamanho esperado, de 111 kDa, o que sugere uma possível glicosilação da quinase. De acordo com esta observação, a região N-terminal (resíduos 1-464) apresenta 4 potenciais sítios de N-glicosilação (Asn63, 165, 217 e 444). A partir daqui, todas as análises foram feitas utilizando o anticorpo anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ purificado (Figura 11).

A análise da seqüência de TbeIF2K2 sugere, desse modo, ser esta possivelmente uma quinase transmembrana, o que seria uma característica singular desta proteína entre as quinases de eIF2 α de eucariotos unicelulares conhecidas. Esta observação, juntamente com o fato de a quinase TbeIF2K2 ter sido a única das 3 putativas quinases de eIF2 α detectada em parasitas sanguíneos e procíclicos, fez com que o foco deste trabalho passasse a ser a sua caracterização.

Figura 8 – Alinhamento dos domínios catalíticos das quinases de eIF2 α indicadas. Resíduos idênticos estão em cinza escuro; resíduos conservados em cinza claro. Os subdomínios de I a XI estão indicados acima das seqüências, assim como as regiões catalítica e de ativação. O tamanho dos insertos entre os subdomínios IV e V está indicado pelo número de resíduos entre parênteses. Os círculos pretos indicam resíduos conservados entre quinases em geral; cabeças de seta, resíduos conservados entre quinases de eIF2 α , sendo que a cabeça de seta envolta por um quadrado indica o resíduo determinante da especificidade da PKR pelo substrato. A seta azul envolta por um quadrado no subdomínio VIII indica o resíduo de PKR que é autofosforilado na proteína ativa. Sc, *S. cerevisiae*; Dm, *D. melanogaster*; Nc, *N. crassa*; Hs, *H. sapiens*; Sp, *S. pombe*; Rn, *R. norvegicus*; Tg, *T. gondii*; Ce, *C. elegans*. Números de acesso das proteínas no GeneDB: TbK1 – Tb1.02.5050; TbK2 – Tb04.1H19.980; TbK3 – Tb06.5F5.660. Números de acesso das proteínas no GeneBank: ScGCN2 – NP_010569; DmGCN2 – AAC47516; NcGCN2 – CAA62973; HsGCN2 – Q9P2K8; CePEK – AAF61200; DmPEK – Q19192; HsPEK – AA126355; SpHRI – Q9UTE5; HsPKR – P19525; TgKA – AY518936.

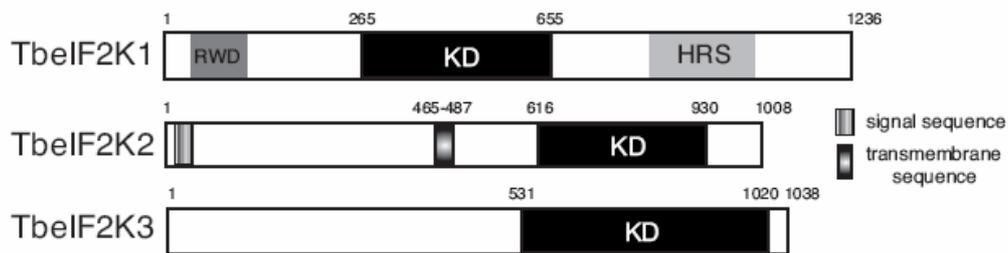


Figura 9 – Esquema das quinases de eIF2 α de *T. brucei*. RWD, domínio RWD; KD, domínio quinase (catalítico); HRS, domínio HisRS. Os números dos resíduos de aminoácidos estão indicados, assim como a seqüência sinal e a região transmembrana de TbeIF2K2.

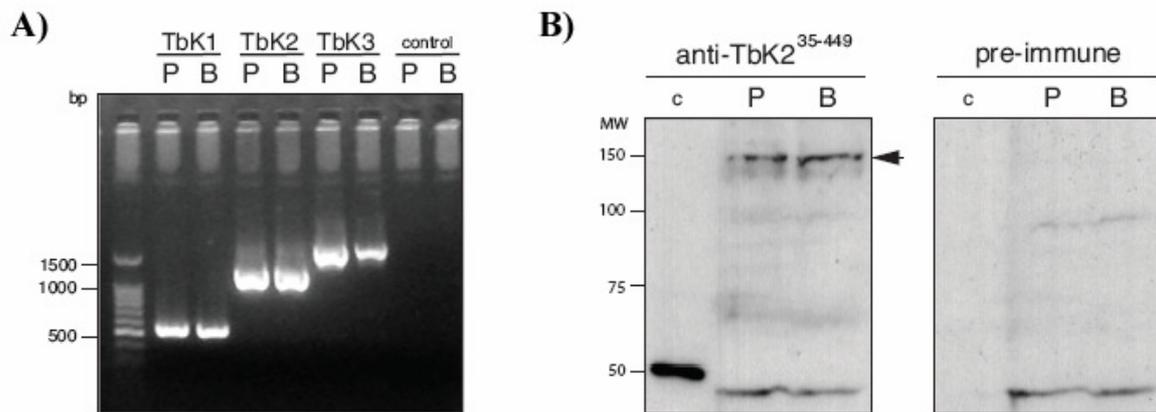


Figura 10 – Expressão das quinases TbelF2K1-K3 em *T. brucei*. **A) Expressão das mensagens que codificam as 3 quinases.** RT-PCRs mostrando a presença dos RNA mensageiros das 3 quinases de *T. brucei* nas duas formas do parasita, procíclica (P) e sanguínea (B); foram usados os pares de oligonucleotídeos BC436-BC437 para TbelF2K1 (0,5 kb), BC438-BC441 para TbelF2K2 (1,2 kb) e BC446-BC450 para TbelF2K3 (1,4 kb). Como controle da reação foi usado o mesmo RNA tratado com DNase, submetido apenas a PCR (sem a reação prévia de transcrição reversa) usando o par de oligonucleotídeos para TbelF2K1. **B) Expressão de TbelF2K2.** “Western blot” com células intactas (1×10^7) de parasitas procíclicos (P) e sanguíneos (B), com soro anti-TbelF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ ou soro pré-imune, conforme indicado. “c” indica a proteína recombinante purificada His₆-TbelF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ usada para a imunização dos coelhos. A seta indica a proteína TbelF2K2 endógena. Os pesos moleculares ($\times 10^3$) estão indicados.

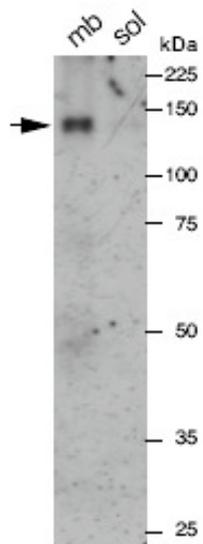


Figura 11 – Especificidade do anticorpo anti-TbelF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ purificado.
“Western blot” usando o anticorpo anti-TbelF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ purificado. Foram aplicados ao gel aproximadamente 15 µg das frações solúvel (sol) e enriquecida de membrana (mb) de parasitas sanguíneos (ver item IV.2).

IV.2 – TbeIF2K2 localiza-se na bolsa flagelar e em vesículas endossomais de *T. brucei*

Como já mencionado, a análise da seqüência de TbeIF2K2 indica a existência de um domínio transmembrana. O fracionamento do extrato protéico do parasita, separando as proteínas solúveis (fração solúvel) das proteínas solubilizadas com detergente não-iônico Triton X-100 (fração enriquecida de proteínas de membrana), indica a presença da quinase entre as proteínas solubilizadas pelo detergente (Figura 12A). Como mostrado na figura, praticamente toda a quinase está presente na fração de membrana nos parasitas procíclicos. O mesmo ocorre em parasitas sanguíneos (Figura 11). Como controle, foi analisado o fracionamento da proteína citoplasmática TbeIF2 α , o fator eIF2 α de *T. brucei* que, como esperado, está presente principalmente na fração solúvel (Figura 12A). Outro indicativo da associação de TbeIF2K2 a membranas é o fato de o tratamento da fração enriquecida de membrana com a enzima endoglicosidase H resultar em uma diminuição do tamanho observado de TbeIF2K2 em gel de acrilamida. Esta enzima cliva apenas oligossacarídeos N-ligados e, portanto, esta alteração de migração (diminuição de tamanho) da quinase confirma a presença de N-glicosilação na proteína, o que indica, por sua vez, que TbeIF2K2 transita pelo Retículo Endoplasmático do parasita, passando pela via secretória (Figura 12B). Somente em parasitas procíclicos TbeIF2K2 mostrou-se sensível à endoglicosidase H. Nas formas sanguíneas não houve alteração na migração da proteína após tratamento com esta enzima (Figura 12B). Sabe-se que nas formas procíclicas, contrariamente às sanguíneas, não há modificação das cadeias longas de manose durante a passagem das proteínas pelo Golgi, como já mostrado para a proteína p67 [77]. Este processamento diferenciado faz com que glicoconjugados de parasitas procíclicos sejam sensíveis à endoglicosidase H, enquanto glicoconjugados de parasitas sanguíneos são resistentes à ação desta enzima. De acordo com esta observação, VSG expressa em parasitas procíclicos torna-se sensível à ação da endoglicosidase H [78].

A análise da localização celular de TbeIF2K2 por ensaios de imunofluorescência mostrou que a quinase endógena localiza-se principalmente em uma estrutura bastante específica próxima ao cinetoplasto do parasita, tanto em parasitas procíclicos (Figura 13) quanto em parasitas sanguíneos (Figura 14). Esta estrutura, por seu posicionamento e morfologia, pode

ser a bolsa flagelar do *T. brucei*. A especificidade do anticorpo purificado anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ pode ser constatada nos painéis inferiores da Figura 13, em que o anticorpo foi incubado com a proteína recombinante His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ antes de ser usado no ensaio de imunofluorescência. Deste modo, a proteína recombinante se liga ao anticorpo, inibindo a ligação deste à proteína endógena durante o ensaio, resultando em parasitas não marcados, como observado. A marcação observada é a mesma quando é usado no ensaio de imunofluorescência anticorpo produzido contra o domínio quinase de TbeIF2K2 (anti-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸) (dados não mostrados). Para confirmar a localização de TbeIF2K2, foram feitos ensaios de co-localização com lectina de tomate (TL) (Figura 14). Quando a incubação da lectina com parasitas sanguíneos é realizada a 5° C, a TL se liga exclusivamente à bolsa flagelar da célula, já que nesta temperatura a endocitose é inibida. A 15° C, por outro lado, a TL passa a ser internalizada por vesículas endocíticas, sem que haja ligação ao lisossomo [79; 80]. A 5° C, a maior parte da marcação de TbeIF2K2 coincide com a marcação da lectina de tomate (Figura 14, painéis A-D), confirmando a localização de TbeIF2K2 na bolsa flagelar de *T. brucei*. Apesar de localizar-se predominantemente na bolsa flagelar, pode-se também observar a presença de TbeIF2K2 em uma região próxima ao lisossomo, mas não no lisossomo (seta, painéis E-H), e na região entre a bolsa flagelar e o lisossomo (cabeça de seta, painéis E-H), sugerindo uma localização endossomal parcial. A presença de TbeIF2K2 em vesículas endossomais foi confirmada em ensaios de co-localização com TL a 15° C, em que a marcação da quinase coincide fortemente com a bolsa flagelar do parasita, mas também com o endossomo (painéis I-L e M-P da Figura 14).

Assim, TbeIF2K2 localiza-se predominantemente na bolsa flagelar de *T. brucei*, podendo também estar presente em vesículas endossomais do parasita.

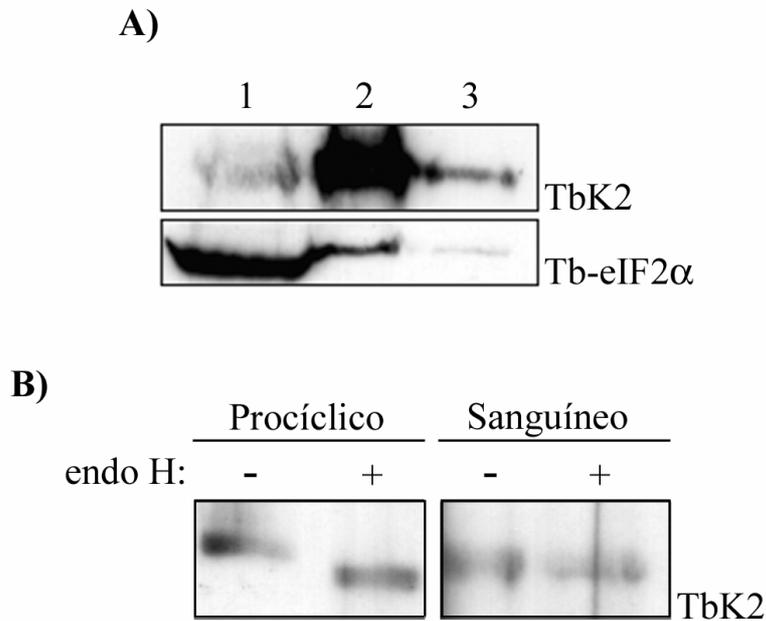


Figura 12 – TbelF2K2 é uma proteína glicosilada associada à membrana. A) Fracionamento do extrato protéico de *T. brucei*. Parasitas procíclicos foram lisados por congelamento e descongelamento, e centrifugados (ver item III.10.5). O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi separado (1); o precipitado foi ressuspenso no mesmo tampão contendo 1 % de Triton X-100, e no mesmo volume que o sobrenadante. Após nova centrifugação, o sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas pelo detergente foi separado (2), e o precipitado restante solubilizado com tampão contendo uréia 8 M (3). A figura mostra “western blots” com anticorpo anti-TbelF2K2 purificado (TbK2) e soro anti-TbelF2α (Tb-eIF2α), em que foram aplicados iguais volumes das três amostras. **B) Deglicosilação de TbelF2K2.** As frações contendo as proteínas solubilizadas com Triton X-100 (fração enriquecida de proteínas de membrana) de parasitas procíclicos e sanguíneos, conforme indicado, foram tratadas com endoglicosidase H (+), ou incubadas nas mesmas condições, porém sem endo H (-). As amostras foram resolvidas por SDS-PAGE, e o resultado analisado por “western blot” com anticorpo anti-TbelF2K2 purificado (TbK2).

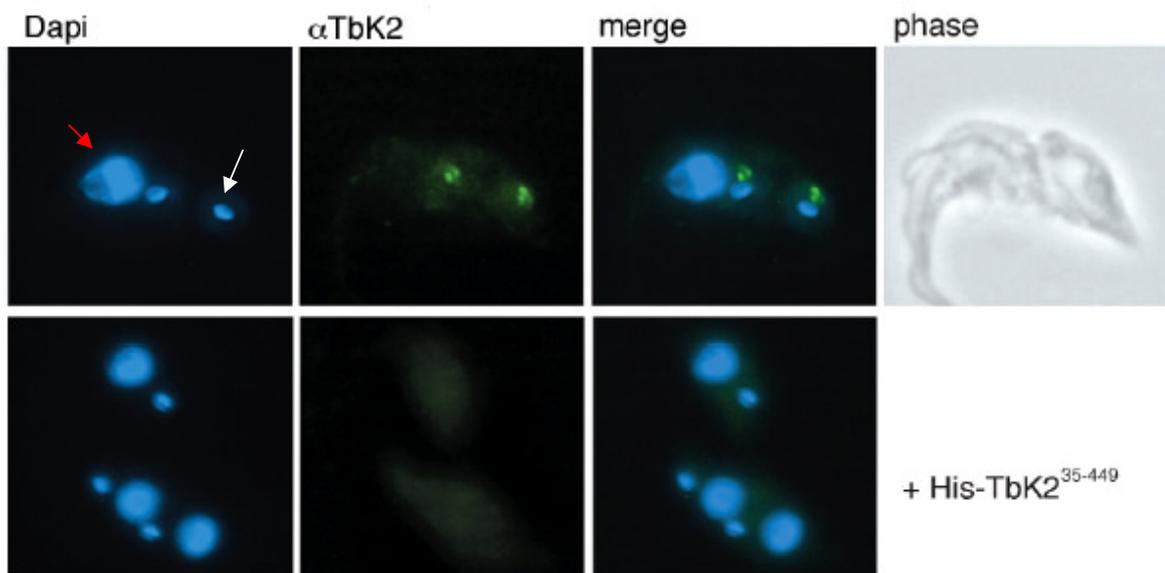


Figura 13 – Localização de TbelF2K2 em parasitas procíclicos.

Imunofluorescência de parasitas procíclicos usando anticorpo anti-TbelF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹, e anti-IgG de coelho conjugado a FITC. O núcleo (seta vermelha) e o cinetoplasto (seta branca) foram marcados com DAPI. Painéis inferiores: antes de ser usado na imunofluorescência, o anticorpo foi pré-incubado com 5 μ g de proteína recombinante purificada His₆-TbelF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹.

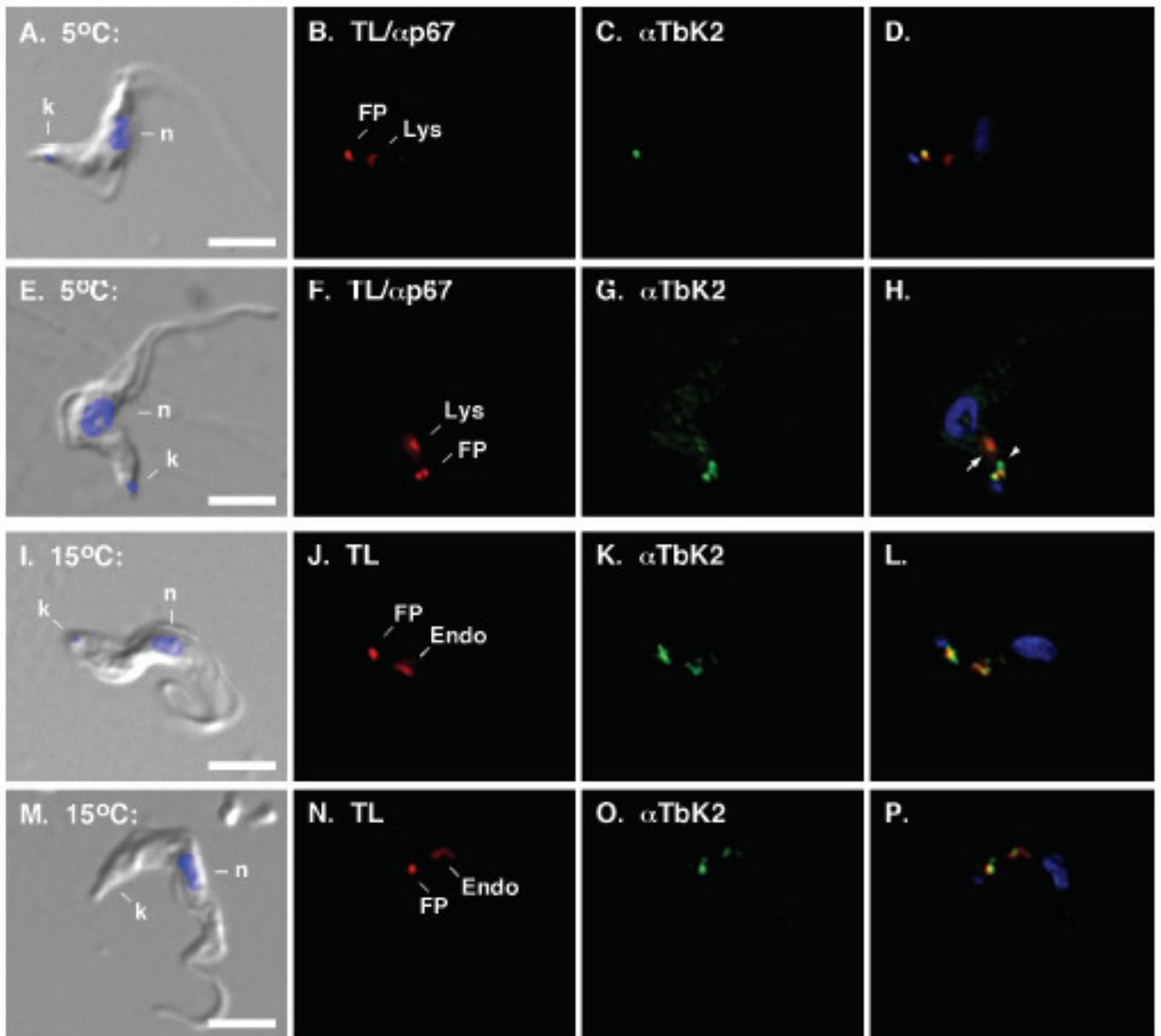


Figura 14

Figura 14 – Localização de TbelF2K2 em parasitas sanguíneos. Parasitas sanguíneos foram incubados com lectina de tomate (TL), conforme descrito no item III.15.1. A incubação a 5° C permite a ligação da TL à bolsa flagelar do parasita (**A-D, E-H**), enquanto a incubação a 15° C permite tanto a ligação da lectina à bolsa flagelar quanto a sua internalização por vesículas endocíticas (**I-L, M-P**). Anti-p67 foi usado como marcador lisossomal. Lyso, lisossomo; Endo, endossomo; k, cinetoplasto; n, núcleo; FP, bolsa flagelar. As cabeças de seta no painel H indicam uma região em que a marcação de TbelF2K2, presumivelmente endossomal, não co-localiza com a bolsa flagelar, apesar de a incubação ter ocorrido a 5° C. As barras indicam 5 µm.

IV.3 – Interação entre TbeIF2K2 e TbBiP

A única quinase transmembrana de eIF2 α conhecida, PERK, interage com BiP [81]. BiP é uma chaperona localizada no retículo endoplasmático que se liga transientemente a proteínas recém-sintetizadas, e de modo mais estável a proteínas mal-dobradas retidas no retículo [82]. Quando ocorre um acúmulo de proteínas mal-dobradas no retículo, BiP se desliga de PERK, o que desencadeia a dimerização e autofosforilação da quinase, que é assim ativada [45]. Por analogia a PERK, e também pela existência em *T. brucei* de BiP (TbBiP) extracelular (ver abaixo), investigamos a interação entre TbBiP e TbeIF2K2. Para tanto, realizamos ensaios de co-imunoprecipitação com anticorpos específicos contra as duas proteínas. TbBiP foi imunoprecipitada a partir da fração de membrana de parasitas sanguíneos usando a resina Proteína A Sepharose, e a presença de TbeIF2K2 no imunoprecipitado foi analisada por “western blot”. De fato, TbeIF2K2 liga-se a TbBiP (Figura 15A). Em parasitas procíclicos, TbBiP e TbeIF2K2 também interagem (dado não mostrado).

Além de sua característica localização no retículo endoplasmático, TbBiP também está presente na superfície da célula, incluindo possivelmente a bolsa flagelar, como mostrado em ensaios de marcação com biotina (Figura 15B). Usando o kit “Sulfo-NHS-Biotin reagent” (PIERCE), marcamos as proteínas extracelulares de *T. brucei* covalentemente com biotina. TbBiP foi então imunoprecipitada a partir da fração de membrana, e o imunoprecipitado foi analisado por “western blot” realizado com streptavidina conjugada a peroxidase. TbeIF2K2 também foi imunoprecipitada a partir da fração de membrana e, como esperado, a quinase ligou-se a biotina; e como controle negativo, foi imunoprecipitada a partir da fração solúvel a proteína citoplasmática TbeIF2 α , que não liga biotina (dados não mostrados).

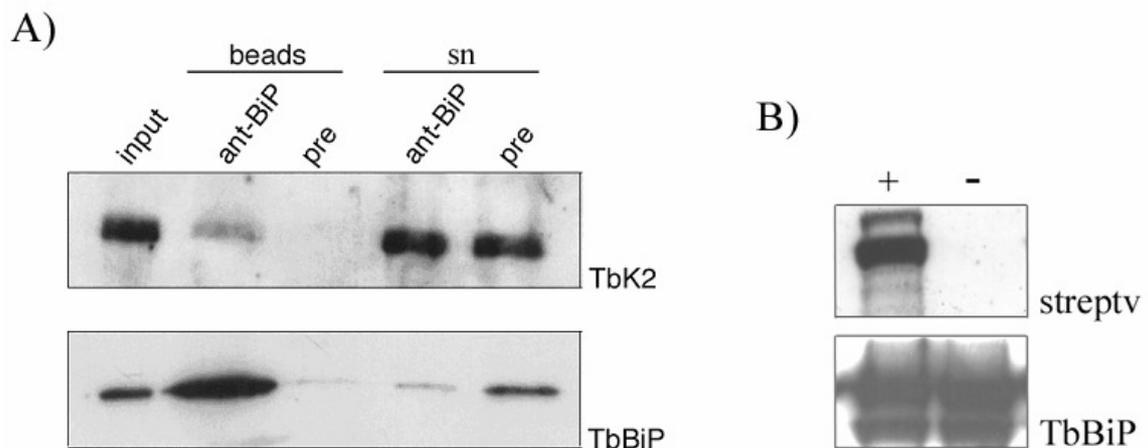


Figura 15 – TbeIF2K2 interage com TbBiP. **A)** TbBiP foi imunoprecipitada a partir da fração de membrana de parasitas sanguíneos; como controle, a mesma quantidade de extrato foi imunoprecipitado com soro pré-imune (“pre”). Foram aplicados ao gel todo o imunoprecipitado (“beads”), aproximadamente 7,5 µg da fração de membrana (“input”) e 1/20 dos sobrenadantes das imunoprecipitações (sn). O “western blot” foi feito com anticorpos anti-TbK2 e anti-TbBiP. **B)** “Western blot” com streptavidina (strp) e anti-TbBiP, conforme indicado. Foram aplicados ao gel os imunoprecipitados realizados com anti-TbBiP, a partir de culturas de parasitas procíclicos (29-13) incubados (+) ou não (-) com biotina.

IV.4 – Atividade quinase de TbeIF2K2

IV.4.1 – TbeIF2K2 fosforila a proteína eIF2 α de levedura e de mamíferos

Visto que, por similaridade de seqüência, TbeIF2K2 é possivelmente uma quinase de eIF2 α em *T. brucei*, analisamos a seguir sua atividade catalítica. Para tanto, o domínio quinase de TbeIF2K2 (TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁹), em fusão N-terminal a glutationa-S-transferase (GST), foi expresso em levedura, sob controle do promotor GAL1, ativado por galactose. A dimerização das quinases de eIF2 α é necessária para sua ativação, como já mostrado para GCN2 [54], PKR [57] e PERK [81]. A fusão do domínio quinase de PKR a um domínio de dimerização heterólogo, como GST, resulta em uma proteína constitutivamente ativa, já que a dimerização mediada por GST leva à ativação do domínio quinase [81; 83]. As linhagens de levedura J80 e J82 foram transformadas com os plasmídios carregando GST (pEGST) e GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ (pBE 553). Ambas as linhagens não possuem as cópias genômicas de eIF2 α e de sua quinase GCN2. J80 carrega um plasmídio que codifica eIF2 α selvagem, enquanto J82 apresenta um plasmídio que codifica eIF2 α ^{S51A}, que não pode ser fosforilado. Na presença de galactose, caso a quinase de *T. brucei* superexpressa seja capaz de fosforilar a proteína eIF2 α , a linhagem J80 não crescerá pois haverá inibição da síntese protéica por fosforilação de eIF2 α . A superexpressão de GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ inibiu o crescimento da linhagem J80 (Figura 16A). A inibição do crescimento é específica já que a linhagem J82, na qual o resíduo Ser51 de eIF2 α encontra-se mutado para Alanina, cresce normalmente em galactose (Figura 16A). Estes dados indicam que TbeIF2K2 é uma quinase de eIF2 que fosforila especificamente o resíduo Ser51. A expressão de GST e de GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ na linhagem J82 foi confirmada por “western blot” usando anticorpos anti-GST (Figura 16B). Evidência direta de que, na linhagem J80, eIF2 α selvagem é fosforilado pelo domínio quinase de TbeIF2K2 foi obtida por “western blot” de extratos protéicos totais, preparados após indução, com galactose, da expressão de GST e de GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸. Usando anticorpos que reconhecem exclusivamente a forma fosforilada de eIF2 α , foi possível observar que esta proteína é fosforilada apenas na presença do domínio quinase de TbeIF2K2, e não na presença de GST (Figura 16C).

Portanto, TbeIF2K2 é capaz de fosforilar eIF2 α de levedura especificamente na Ser51, inibindo o processo de síntese protéica e, desse modo, o crescimento da célula.

Analisamos, a seguir, a eficiência da atividade do domínio quinase de TbeIF2K2, em ensaios de fosforilação *in vitro*, comparando-a com a atividade do domínio quinase de PKR (PKR²⁶⁵⁻⁵⁵¹), também fundido a GST. No ensaio, GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸, imunoprecipitado com o anticorpo anti-GST a partir de transformante da linhagem J82 crescido na presença de galactose, e GST-PKR²⁶⁵⁻⁵⁵¹ purificado, foram incubados com eIF2 α de mamífero purificado. O resultado foi analisado por “western blot” usando o anticorpo anti-eIF2 α fosforilado, e normalizado com eIF2 α total; a quantidade de quinase nos ensaios foi verificada usando o anticorpo anti-GST. Ambas as quinases fosforilaram o fator eIF2 α eficientemente, e em níveis semelhantes, visto que foram usadas quantidades equivalentes de cada quinase nos ensaios (Figura 17, comparar 2 e 4). Como controles negativos foram usadas uma reação sem quinase, contendo apenas o fator eIF2 α ; e uma reação em que eIF2 α foi incubado com GST, imunoprecipitado de transformante da linhagem J82 crescido com galactose.

Os resultados obtidos nas análises *in vivo* (em levedura) e *in vitro* mostrados aqui indicam, assim, que TbeIF2K2 tem a mesma capacidade que PKR de reconhecer e fosforilar eIF2 α , especificamente na Ser51, apesar das diferenças que existem entre essas quinases em regiões importantes para autofosforilação e reconhecimento do substrato.

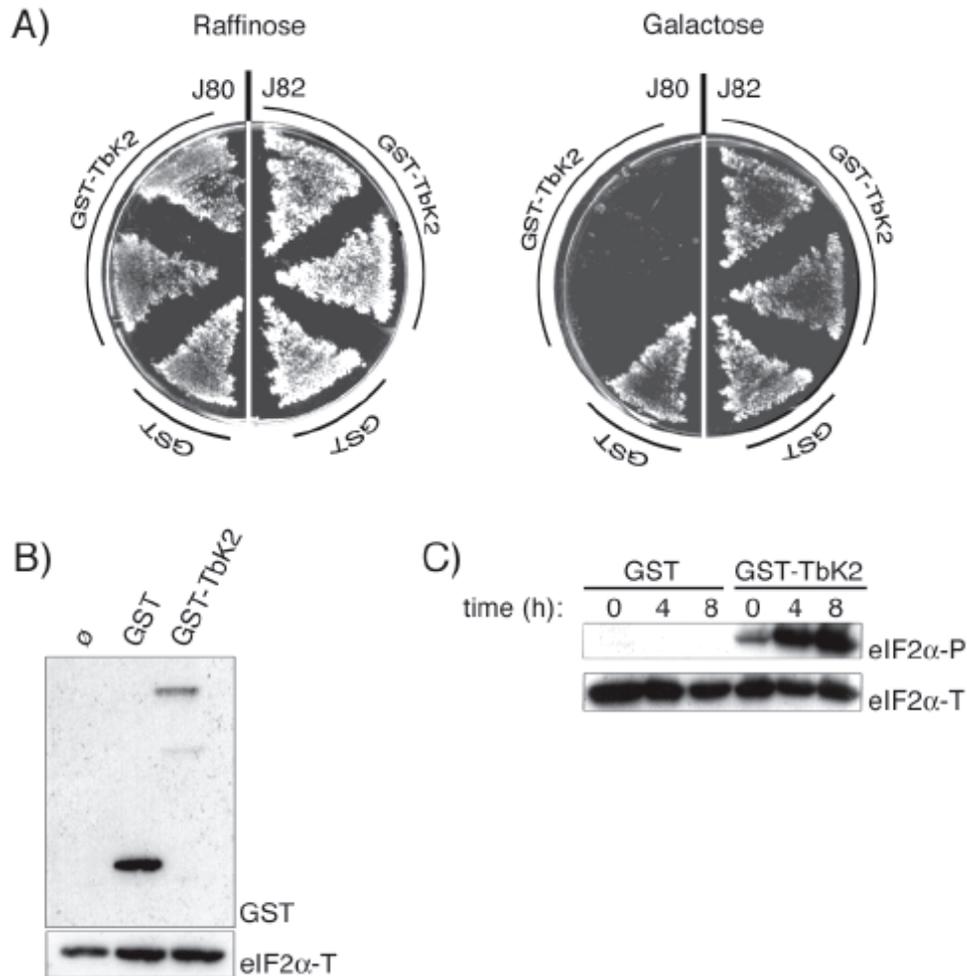


Figura 16 – TbeIF2K2 fosforila eIF2 α de *S. cerevisiae* especificamente na Ser51. A) Transformantes das linhagens J80 e J82 expressando GST ou GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ (GST-Tbk2) foram crescidos em meio com rafinose ou com galactose, conforme indicado. **B)** “Western blot” usando anticorpo anti-GST (GST) e, como controle, anti-eIF2 α total (eIF2 α -T). Foram aplicados ao gel 5 μ g de extrato protéico total, preparados dos transformantes da linhagem J82 mostrados em (A), crescidos na presença de galactose. ϕ , linhagem J82 sem plasmídeo. **C)** “Western blot” com anticorpos anti-eIF2 α fosforilado (eIF2 α -P) e total (eIF2 α -T). Foram aplicados ao gel extratos protéicos dos transformantes da linhagem J80 mostrados em (A), após indução da expressão de GST e GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ por 4 e 8 horas, com galactose.

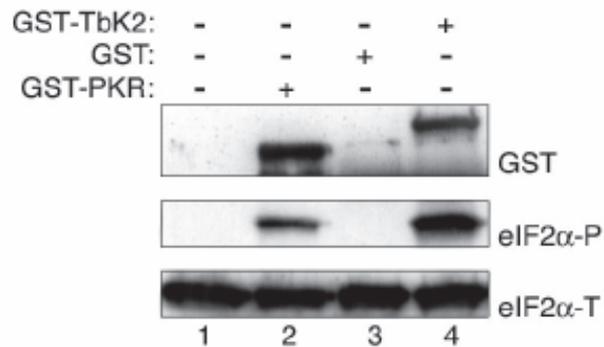


Figura 17 – Comparação entre as atividades catalíticas de TbeIF2K2 e PKR.

“Western blots” realizados com anticorpos anti-GST, anti-eIF2 α fosforilado (eIF2 α -P), e anti-eIF2 α total (eIF2 α -T) (normalização do ensaio). Foi aplicada ao gel toda a reação correspondente ao ensaio de fosforilação *in vitro*. 1, apenas eIF2 α , sem quinase; 2, eIF2 α incubado com GST-PKR²⁶⁵⁻⁵⁵¹ (GST-PKR) purificada; 3, eIF2 α incubado com GST imunoprecipitado; 4, eIF2 α incubado com GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ imunoprecipitada(GST-TbK2).

IV.4.2 – TbeIF2K2 fosforila eIF2 α de *T. brucei*

A subunidade α do fator eIF2 de *T. brucei* (TbeIF2 α), identificada por similaridade de seqüência com fatores de outros organismos, apresenta uma extensão N-terminal presente apenas na proteína de outros tripanossomatídeos, como *T. cruzi* e *L. major*. Interessantemente, o resíduo fosforilado na proteína eIF2 α eucariótica, a serina presente na posição 51, foi substituído por uma treonina (Thr169) na proteína de tripanossomatídeos, substituição esta confirmada por sequenciamento de *T. brucei* (Figura 18A) e de *T. cruzi* (dados não mostrados). A presença da extensão na região N-terminal de TbeIF2 α foi confirmada pelo tamanho de fragmento amplificado por RT-PCR correspondente à região N-terminal do gene, utilizando um oligonucleotídeo correspondente à seqüência do “spliced leader” e outro específico para TbeIF2 α (dado não mostrado); e pelo tamanho da proteína expressa por parasitas sanguíneos e procíclicos, detectada por “western blot” com anticorpo produzido contra a proteína recombinante His₆-TbeIF2 α (Figura 18B). A diferença de tamanho entre a proteína endógena e a recombinante é devida à presença, na última, da cauda de histidinas.

Devido às características incomuns de TbeIF2 α , a sua capacidade de substituir eIF2 α de levedura foi analisada, assim como foi verificado se TbeIF2 α é substrato de outras quinases de eIF2 α conhecidas. Primeiramente, com o objetivo de analisar a substituição de eIF2 α de levedura por TbeIF2 α , a seqüência que codifica para o fator completo de *T. brucei* foi clonada sob controle do promotor GAL1 (pBE498). Este plasmídeo foi usado para transformar a linhagem H1643 de *S. cerevisiae*, cuja cópia cromossomal do gene que codifica para eIF2 α (SUI2) foi deletada, mas que é viável por conter um plasmídeo com a marca URA3 carregando o gene *SUI2*. Esta linhagem é incapaz de crescer na presença de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), pois este seleciona células Ura⁻ que surgem pela perda espontânea do plasmídeo *URA3* e, conseqüentemente, pela perda do gene *SUI2*. Caso TbeIF2 α seja capaz de substituir o eIF2 α de levedura, as células carregando o plasmídeo pBE498 e que perderam o plasmídeo *URA3* carregando o gene *SUI2* serão capazes de crescer na presença de 5-FOA. Como controle positivo, foi usado um plasmídeo carregando

o gene que codifica para eIF2 α de levedura (pBE508), também sob controle do promotor GAL1. A expressão de TbeIF2 α , confirmada por “western blot” (dado não mostrado), não foi capaz de restaurar o crescimento da linhagem e, portanto, TbeIF2 α não substituiu funcionalmente a subunidade α do fator eIF2 de levedura (Figura 19). A extensão N-terminal de TbeIF2 α é uma das características deste fator que mais o diferencia dos fatores de outros organismos eucarióticos. Assim, o ensaio descrito acima foi realizado também com plasmídeo carregando a sequência codificadora da proteína truncada TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ (pBE506). A proteína TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ é funcional em levedura, já que transformantes que expressam esta forma truncada da proteína de *T. brucei* são capazes de crescer em meio contendo 5-FOA (Figura 19). Este dado sugere que a extensão N-terminal de TbeIF2 α impede a atividade desta proteína na levedura, talvez por formar complexos ternários não funcionais, ou ainda por ser incapaz de formá-los.

A capacidade de TbeIF2 α servir como substrato para quinases de eIF2 α foi, a seguir, testada. GCN2 e PKR purificadas foram incubadas com His₆-TbeIF2 α purificada, na presença de ATP[γ -³³P]. GCN2 não fosforila TbeIF2 α , enquanto PKR é capaz de fosforilar a proteína eIF2 α de *T. brucei*, porém fracamente (Figura 20). A eficiência da fosforilação por estas quinases foi a mesma quando como substrato foi utilizado TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ (dados não mostrados), sugerindo que a extensão N-terminal não interfere no reconhecimento deste fator pelas quinases GCN2 e PKR.

Para verificar se TbeIF2K2 fosforila TbeIF2 α , GST-TbeIF2K2⁶¹⁸⁻¹⁰⁰⁸ foi imunoprecipitado de extrato protéico preparado a partir de transformante da linhagem J82 crescido na presença de galactose. O imunoprecipitado foi incubado com His₆-TbeIF2 α selvagem e His₆-TbeIF2 α ^{T169A}, na presença de ATP[γ -³²P]. A quinase TbeIF2K2 fosforila TbeIF2 α selvagem, mas não a proteína mutada no resíduo Thr169 correspondente à Ser51 de outros eucariotos (Figura 20). Assim, TbeIF2K2 é uma quinase que fosforila TbeIF2 α especificamente na T169.

Com estes ensaios, pode-se concluir que TbeIF2K2 fosforila eIF2 α de levedura, de mamífero e de *T. brucei*, de modo resíduo-específico. A proteína eIF2 α de *T. brucei*, TbeIF2 α , é fosforilada com eficiência apenas pela quinase do tripanossoma.

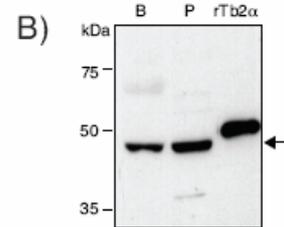
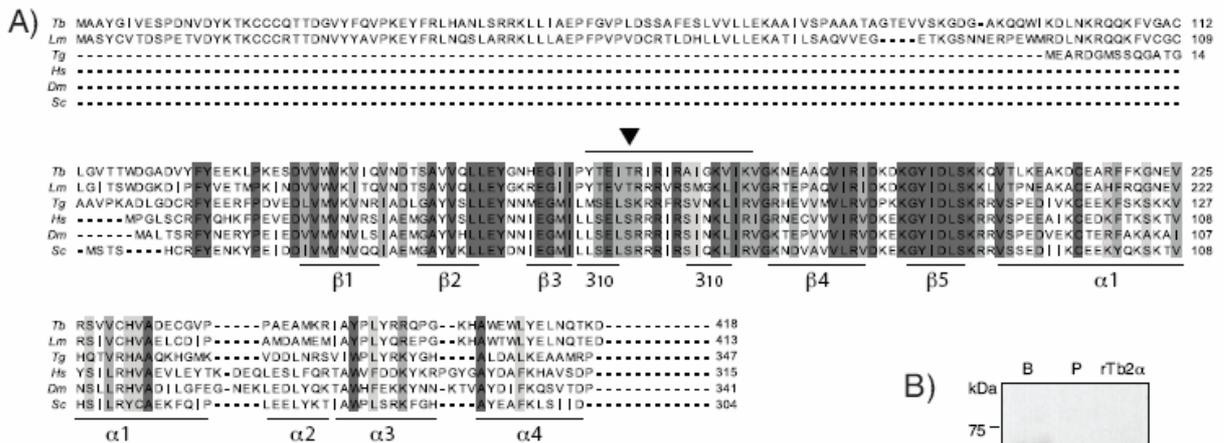


Figura 18 – eIF2 α de *T. brucei*. A) Alinhamento da metade N-terminal da proteína eIF2 α de vários organismos. A linha acima das seqüências indica a região em que se localiza o resíduo fosforilável, que por sua vez está indicado por uma cabeça de seta. Tb, *T. brucei*; Lm, *L. major*; Tg, *T. gondii*; Hs, *H. sapiens*; Dm, *D. melanogaster*; Sc, *S. cerevisiae*. **B)** “Western blot” com soro anti-Tbelf2 α . Foram aplicadas ao gel frações contendo as proteínas solúveis de parasitas procíclicos (P) e sanguíneos (B), e também a proteína recombinante His₆-Tbelf2 α (rTb2 α).

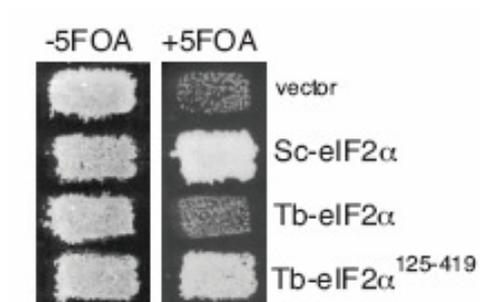


Figura 19 – TbeIF2 α , sem a extensão N-terminal, substitui eIF2 α de levedura.

Transformantes da linhagem H1643 com o vetor vazio (pRS315), ou com plasmídio carregando a seqüência codificadora de eIF2 α de levedura, Sc-eIF2 α (pBE508), de *T. brucei*, Tb-eIF2 α (pBE498), e de *T. brucei* truncado, Tb-eIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ (pBE506), foram crescidos em meio contendo galactose, na presença (+5FOA) ou na ausência (-5FOA) de ácido 5-fluoroorótico (5-FOA),

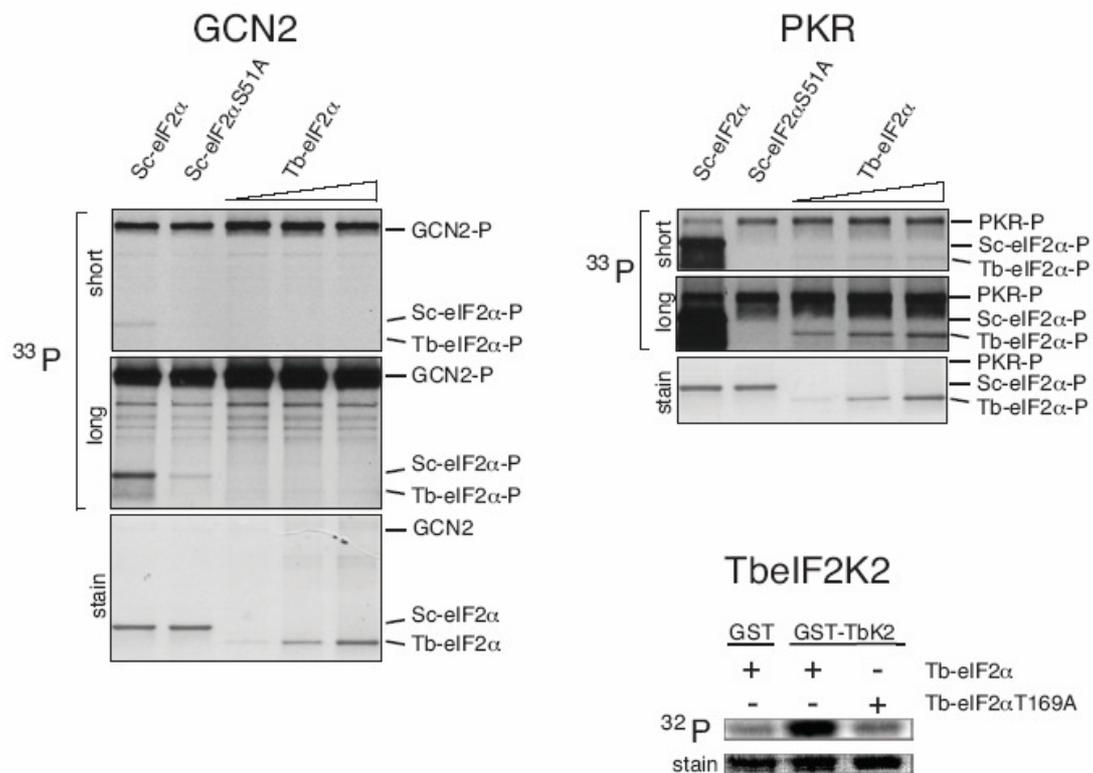


Figura 20 – Fosforilação de TbeIF2 α *in vitro*. As quinases purificadas GCN2 (painéis da esquerda) e PKR (painéis superiores da direita), e a quinase imunoprecipitada TbeIF2K2 (painéis inferiores da direita) foram incubadas com as proteínas purificadas eIF2 α de levedura (Sc-eIF2 α) e de *T. brucei*, selvagem (Tb-eIF2 α) e mutada (Tb-eIF2 α T169A). Estão indicados tempos de exposição curtos (“short”) e longos (“long”). A quantidade total de proteína nos ensaios foi detectada com o corante Coomassie R250 (“stain”).

IV.5 – Fosforilação de TbeIF2K2 na forma sanguínea de *T. brucei*

Em corridas prolongadas em SDS-PAGE 10%, anticorpos anti-TbeIF2K2 purificados detectam duas bandas correspondentes à quinase na fração enriquecida de membrana de parasitas sanguíneos crescidos em condições normais. Em contrapartida, apenas uma banda correspondente à quinase endógena é detectada em parasitas procíclicos (Figura 21A). Em situações em que PERK é ativada, a autofosforilação da quinase leva a uma alteração de sua migração em SDS-PAGE: a quinase fosforilada (ativa) migra mais lentamente que a quinase não fosforilada (inativa) [81]. Em analogia a PERK, supusemos que a banda de migração mais lenta poderia ser equivalente à quinase fosforilada. Para verificar esta hipótese, as frações enriquecidas de membrana de parasitas sanguíneos e procíclicos foram tratadas com fosfatase alcalina (CIAP – “*c*alf *i*ntestinal *a*lkaline *p*hosphatase”). O tratamento com fosfatase leva a uma alteração de migração da quinase TbeIF2K2 de parasitas sanguíneos (a banda passa a migrar mais rapidamente), mas não de parasitas procíclicos (Figura 21B). Portanto, em parasitas sanguíneos crescidos em cultura em condições normais, uma parte da quinase TbeIF2K2 é fosforilada.

Durante este trabalho, a migração de TbeIF2K2 em parasitas sanguíneos e procíclicos submetidos a várias situações supostamente estressantes para a célula foi analisada. No entanto, não foi detectado o aumento da quantidade da quinase fosforilada em nenhuma das situações testadas, como parasitas tratados com DTT ou tapsigargina, potentes ativadores de PERK (dados não mostrados).

Outra característica que distingue a quinase procíclica da sanguínea é o tamanho das bandas observado em SDS-PAGE. A quinase da forma procíclica migra entre as duas bandas observadas na forma sanguínea (Figura 21A), o que pode indicar a existência de processamentos pós-traducionais diferentes para TbeIF2K2 entre as diferentes formas de *T. brucei*, tal como o diferente processamento das cadeias de manose durante seu trânsito pelo Golgi, como mencionado anteriormente.

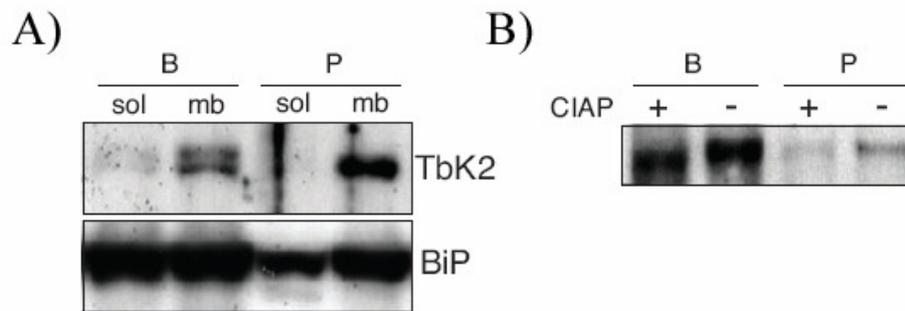


Figura 21 – Fosforilação de Tbelf2K2 em parasitas sanguíneos. A) “Western blot” com anticorpo anti-Tbelf2K2 (TbK2) e anti-TbBiP (BiP), conforme indicado. Foram aplicados ao gel 5 μ g das frações protéicas solúvel (sol) e enriquecida de membrana (mb), de parasitas sanguíneos (B) e procíclicos (P). **B)** “Western blot” com anti-Tbelf2K2. Foram aplicadas ao gel frações enriquecidas de membrana de parasitas sanguíneos e procíclicos, tratadas (+) ou não (-) com fosfatase alcalina (CIAP).

IV.6 – TbeIF2K2 em parasitas sanguíneos em diferentes fases de crescimento

Parasitas sanguíneos são bastante sensíveis à densidade. Alta densidade de parasitas sanguíneos pleomórficos em cultura induz a diferenciação da forma “slender” para a forma “stumpy” [84], assim como ocorre com a forma sanguínea de *T. brucei* no sangue do hospedeiro mamífero. O aumento da densidade de culturas de parasitas monomórficos, como os usados neste trabalho, no entanto, causa a morte da célula [85]. Durante o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos dados preliminares indicativos de que a quinase TbeIF2K2 é afetada pela densidade da cultura de parasitas sanguíneos. Para analisar de maneira conclusiva o efeito da densidade da cultura nesses parasitas, células de culturas de parasitas sanguíneos foram coletadas a cada 12 horas, sendo que o primeiro ponto foi coletado no final da fase logarítmica de crescimento (densidade da cultura: $2,4 \times 10^6$ parasitas/ml). O segundo ponto de coleta (12 horas após o primeiro), durante a fase estacionária de crescimento ($2,0 \times 10^6$ p/ml); e o terceiro ponto (24 horas após o primeiro), quando a morte celular é evidente ($4,0 \times 10^5$ p/ml). As frações protéicas solúvel e enriquecida de membrana foram preparadas e analisadas por “western blot”. Como esperado, TbeIF2K2 está presente na fração de membrana dos parasitas sanguíneos coletados nos dois primeiros pontos de crescimento ($2,4 \times 10^6$ p/ml e $2,0 \times 10^6$ p/ml). Surpreendentemente, porém, TbeIF2K2 praticamente não é detectada em parasitas coletados no último ponto ($4,0 \times 10^5$ p/ml) (Figura 22). Esses resultados sugerem, assim, que a presença de TbeIF2K2 em parasitas sanguíneos é regulada em diferentes fases de crescimento. A diminuição da quantidade de TbeIF2K2 observada pode ser devida a uma diminuição da expressão da proteína, e/ou por degradação proteolítica da proteína já expressa, mas não por uma alteração no fracionamento de TbeIF2K2 (dados não mostrados), como ocorre em parasitas tratados com BAPTA (ver item IV.7). A relevância desta regulação para o ciclo de vida do parasita ainda não é conhecida.

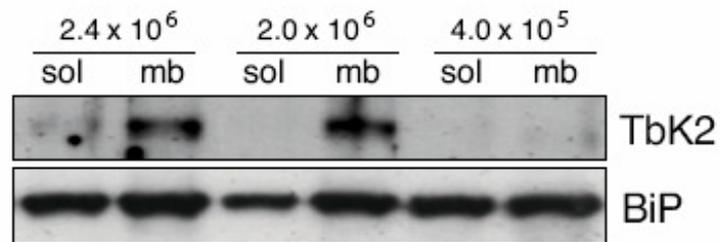


Figura 22 – TbelF2K2 em diferentes fases de crescimento de parasitas sanguíneos. “Western blot” com anticorpos anti-TbelF2K2 (TbK2) e anti-TbBiP (BiP). Foram aplicados ao gel 10 μ g das frações solúvel (sol) e enriquecida de membrana (mb) de parasitas sanguíneos coletados na fase de crescimento logarítmica ($2,4 \times 10^6$ parasitas/ml), e após 12 horas ($2,0 \times 10^6$ p/ml) e 24 horas ($4,0 \times 10^5$ p/ml). A densidade indicada corresponde ao número de parasitas vivos na cultura.

IV.7 – TbeIF2K2 em parasitas sanguíneos tratados com BAPTA

Visto que a ativação de quinases de eIF2 α em células eucarióticas é uma importante resposta da célula a diferentes situações de estresse celular [47], durante o andamento deste trabalho foram feitas várias análises na tentativa de detectar um estresse em *T. brucei* que levasse à ativação da quinase TbeIF2K2. A principal dificuldade encontrada nesta investigação foi a obtenção de um método que permitisse tal detecção. Apesar disso, resultados preliminares e ainda inconclusivos obtidos com parasitas sanguíneos tratados com tapsigargina, um inibidor da Ca-ATPase do retículo endoplasmático (SERCA), que leva a um aumento da concentração de Ca²⁺ citoplasmático e sabidamente ativa PERK em células de mamíferos por causar estresse de proteínas mal-dobradas no retículo [86], sugerem que a variação na concentração de Ca²⁺ intracelular afeta a atividade de TbeIF2K2 (dados não mostrados). Durante o ciclo de vida do *T. brucei*, as concentrações citoplasmáticas de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_c) variam. Na forma sanguínea, parasitas “slender” apresentam maior [Ca²⁺]_c que parasitas “stumpy”. O declínio da [Ca²⁺]_c coincide com o início da diferenciação da forma “slender” para a forma “stumpy” [87].

Dada a existência de variações na [Ca²⁺]_c que parecem ser relevantes durante a diferenciação do tripanossoma, optamos por investigar mais a fundo a influência do Ca²⁺ na atividade de TbeIF2K2. Para isso, parasitas sanguíneos foram tratados com BAPTA-AM, um quelante de Ca²⁺ citoplasmático [88]. Parasitas sanguíneos tratados com três concentrações diferentes de BAPTA, 10 μ M, 25 μ M e 50 μ M, foram analisados. Após o fracionamento, a 4° C, das proteínas solúveis e de membrana (solubilizadas com triton X-100), o precipitado restante, contendo restos celulares e proteínas não solubilizadas com triton, foi ressuspensão em uréia 6 M. A análise da presença de TbeIF2K2 nas frações solúvel e de membrana, e também na fração ressuspensa em uréia, mostra que existe uma alteração no fracionamento da quinase em parasitas tratados com BAPTA, que passa a concentrar-se na fração com uréia (amostras tratadas com BAPTA), e não na fração de membrana (controle) (Figura 23A).

Proteínas resistentes à solubilização por Triton X-100, um detergente não-iônico, a 4° C podem estar associadas a “lipid rafts”. Se este for o caso, a proteína será solubilizada pelo detergente a temperaturas mais altas [89; 90]. Assim, parasitas sanguíneos foram tratados com BAPTA (25 µM), e as frações solúvel, de membrana e ressuspensa em uréia foram preparadas a temperatura ambiente, e não a 4° C. A quinase TbeIF2K2 presente nos parasitas tratados com BAPTA volta a ser solubilizada por Triton quando o extrato é preparado a temperatura ambiente e, portanto, está presente nessa amostra na fração de membrana, assim como a quinase dos parasitas não-tratados (Figura 23B). Estes resultados sugerem que, em parasitas sanguíneos tratados com BAPTA, TbeIF2K2 passa a ser parte de uma “lipid raft”.

É possível que a alteração no fracionamento da quinase seja importante para sua ativação/desativação. A resistência de uma proteína à solubilização, a 4° C, por detergentes não-iônicos, e a solubilização da mesma a temperaturas mais elevadas, é um indicativo de que ela seja um componente de “lipid rafts”, como mencionado. A existência de “lipid rafts” já foi observada em *T. brucei* [89; 91]. A alternância entre uma região de membrana normal e um “raft” pode levar a alterações na atividade de uma proteína, caso da tirosina-quinase Lyn, que fosforila o receptor de IgE e é mais ativa quando parte de um “raft” [90]. Analogamente, é possível que a resistência à solubilização de TbeIF2K2 em células tratadas com BAPTA seja um reflexo de alterações em sua atividade catalítica. Análises subsequentes serão necessárias para avaliar esta possibilidade.

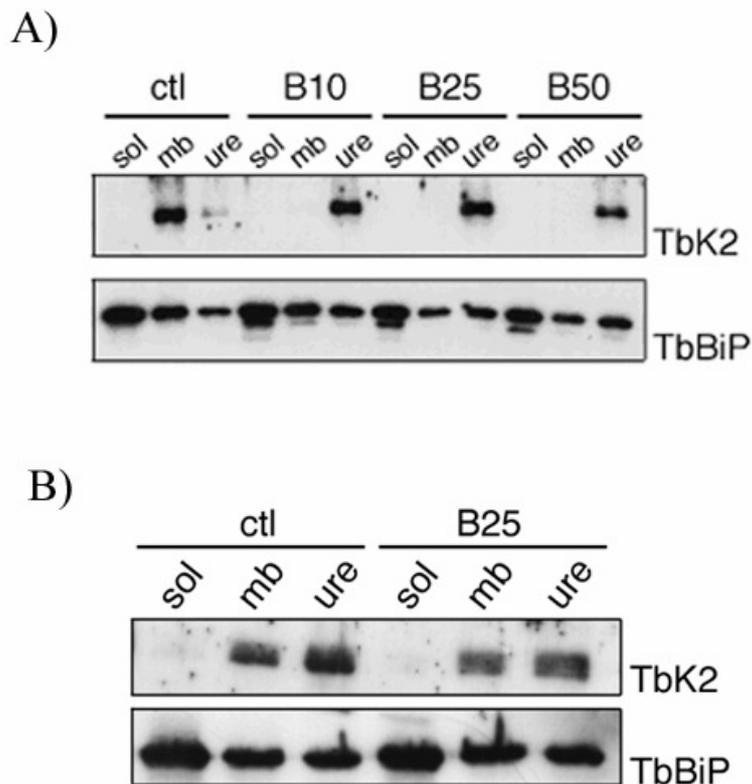


Figura 23 – Tratamento com BAPTA altera o fracionamento de TbelF2K2. “Western blots” com os anticorpos anti-TbelF2K2 (TbK2) e anti-TbBiP (TbBiP), conforme indicado. Foram aplicados ao gel 0,75 μ l das frações solúvel (sol), enriquecida de membrana (mb) e precipitado (restante após a separação da fração de membrana) ressuspensão em uréia (ure) de parasitas sanguíneos 427 controle (ctl) e tratados com BAPTA-AM 10 μ M (B10), 25 μ M (B25) e 50 μ M (B50), conforme indicado. **A)** Amostras preparadas a 4^o C. **B)** Amostras preparadas a temperatura ambiente.

V – DISCUSSÃO

A regulação do processo de início da síntese protéica é um importante ponto de controle da expressão gênica em eucariotos. Em tripanossomatídeos, a regulação deste processo é potencialmente de vital importância, visto que a maior parte da regulação da expressão gênica, nesses organismos, ocorre através de mecanismos pós-transcricionais. Neste trabalho, identificamos e caracterizamos duas proteínas participantes do mecanismo de regulação traducional em *T. brucei*.

Uma dessas proteínas, a subunidade α do fator de início de tradução eIF2 de *T. brucei*, TbeIF2 α , é bastante diferente do eIF2 α encontrado em outros eucariotos. A região N-terminal de TbeIF2 α apresenta uma extensão única, confirmada pelo tamanho da proteína detectada em “western blot”. Além desta extensão N-terminal, outra característica singular de TbeIF2 α é o resíduo fosforilável pelas quinases conhecidas de eIF2 α . O aminoácido fosforilado serina, em *T. brucei* é substituído por uma treonina. O fato de a treonina ser realmente o resíduo fosforilado no tripanossoma foi confirmado por ensaios de fosforilação *in vitro*. Assim, a fosforilação do eIF2 α de *T. brucei* é, como em outros eucariotos, um processo bastante específico.

A divergência entre TbeIF2 α e a proteína de outros organismos é evidenciada em ensaios *in vivo* na levedura *S. cerevisiae*. TbeIF2 α não é capaz de substituir funcionalmente eIF2 α da levedura. No entanto, TbeIF2 α truncado, sem a característica extensão N-terminal (TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹), substitui com sucesso eIF2 α de levedura. É provável que a extensão N-terminal de TbeIF2 α gere uma estrutura conformacional bastante distinta da de eIF2 α de levedura, o que impediria a ligação desta proteína ou a outras subunidades de eIF2, ou a outros componentes do processo de síntese protéica de levedura. Sem a extensão N-terminal, TbeIF2 α torna-se mais semelhante à proteína de levedura, sendo funcionalmente ativo. Outras proteínas participantes da iniciação da síntese protéica em *T. brucei*, como as outras subunidades do fator eIF2, ainda não foram caracterizadas. A extensão N-terminal de

TbeIF2 α tem semelhança de seqüência com eIF2 α de outros tripanossomatídeos (*T. cruzi* e *L. major*), sendo portanto bastante provável que esta região seja importante na interação desta proteína com outros fatores do tripanossoma, ainda não caracterizados.

A análise do genoma de *T. brucei* neste trabalho levou à identificação de 3 quinases em potencial de eIF2 α . Comparações de seqüência sugerem que uma dessas quinases, TbeIF2K1, é um ortólogo de GCN2, devido à presença de domínios característicos (domínios RWD e HisRS). As outras duas quinases identificadas, TbeIF2K2 e TbeIF2K3, não apresentam regiões regulatórias semelhantes a outras conhecidas. Foram encontrados ortólogos das 3 quinases tanto em *T. cruzi* quanto em *L. major*. Visto que não conseguimos detectar a expressão das proteínas TbeIF2K1 e TbeIF2K3 nas formas do parasita aqui analisadas, não foi dada continuidade à caracterização destas quinases. A outra proteína caracterizada neste trabalho foi, desse modo, a quinase TbeIF2K2. O domínio N-terminal de TbeIF2K2, seu provável domínio regulatório, é conservado nos ortólogos dos outros tripanossomatídeos, apresentando 31% de identidade e 45% de similaridade com a quinase de *T. cruzi*, e 24% de identidade e 38% de similaridade com a quinase de *L. major*.

A existência dessas 3 quinases em *T. brucei*, assim como das subunidades do fator trocador de guaninas eIF2B (dados não mostrados), sugere que a regulação do início de tradução pela fosforilação de eIF2 α é um mecanismo relevante de regulação da expressão gênica nesse parasita. Foi confirmada, neste trabalho, a atividade de TbeIF2K2 como uma quinase de eIF2 α , já que TbeIF2K2 fosforila com eficiência eIF2 α de levedura e de mamíferos especificamente na Ser51, e TbeIF2 α especificamente na Thr169. Apesar de eIF2 α de mamíferos, de levedura e de *T. brucei* serem substratos de TbeIF2K2, o contrário não é verdadeiro. As quinases GCN2 e PKR não fosforilam eficientemente eIF2 α de *T. brucei*. A incapacidade de GCN2 ou PKR fosforilarem com eficiência TbeIF2 α não é devida apenas à presença de uma treonina no lugar da serina, já que as duas quinases são capazes de fosforilar eIF2 α de mamíferos e de levedura contendo a mutação Ser51Thr [92]. Para algumas quinases, a estrutura primária de seus substratos é o fator mais importante para o seu reconhecimento e fosforilação. A quinase PKA, por exemplo, fosforila com igual eficiência seus substratos nativos ou denaturados, assim como fragmentos derivados da

proteólise do substrato [93]. A proteína eIF2 α denaturada, porém, é fosforilada com menos eficiência pela quinase HRI [94], indicando que o reconhecimento do substrato pelas quinases de eIF2 α provavelmente depende do dobramento correto do substrato, e não apenas de sua seqüência. Para PKR, a eficiência e a especificidade no reconhecimento do substrato eIF2 α dependem, além dos resíduos de eIF2 α próximos à Ser51, do motivo KGYID (em *S. cerevisiae*, resíduos 79-83) e dos resíduos G30 e M44. As quinases PKR e HRI interagem, com alta afinidade, com o motivo KGYID de eIF2 α , o que então permite a interação do resíduo Ser51 com o sítio catalítico da quinase. Essa é também a mesma região que interage com o fator eIF2B (Figura 24) [95]. O motivo KGYID é conservado em *T. brucei*. No entanto, os resíduos correspondentes à G30 e M44 são substituídos, no tripanossoma, por uma serina (S148) e uma isoleucina (I162), respectivamente. Visto que mutações nos resíduos G30 e M44 impedem a fosforilação de eIF2 α [95], as substituições existentes em TbeIF2 α mencionadas podem ser suficientes para que este fator seja fosforilado com pouca eficiência por PKR. É possível, ainda, que outras substituições sejam relevantes para esta baixa eficiência. A extensão N-terminal, no entanto, parece não impedir a fosforilação do TbeIF2 α por GCN2 ou PKR, visto que a proteína truncada TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ também não é um substrato para estas quinases.

O sequenciamento do genoma dos tripanossomatídeos *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, concluído recentemente, mostrou que existem potencialmente poucos reguladores transcricionais nesses parasitas [73]. Apesar da existência de genes que codificam eIF2B e as 3 quinases de eIF2 α , uma delas aqui caracterizada, buscas por GCN4 no genoma de *T. brucei* não detectam nenhum ortólogo em potencial deste ativador transcricional. Como nestes parasitas a regulação da expressão gênica depende principalmente de mecanismos pós-transcricionais, é possível que a regulação da expressão de um ativador transcricional, como GCN4, não seja de grande utilidade para a célula. Assim, apesar de a via de regulação mediada pela fosforilação de eIF2 α ser, aparentemente, conservada nesses parasitas, talvez a fosforilação de TbeIF2 α resulte apenas em uma inibição geral da síntese protéica em situações específicas. Outra possibilidade é que, além da inibição geral da tradução, a expressão de algumas proteínas seja modulada. Porém, no caso dos tripanossomatídeos, tal regulação ocorreria através da ativação direta da tradução de

mensagens específicas, em analogia à ativação da tradução de GCN4 em levedura, e não da ativação da transcrição dos genes que codificam para essas proteínas.

TbeIF2K2 é uma glicoproteína associada à membrana, solubilizada pelo detergente não-iônico Triton X-100, e localizada na bolsa flagelar e em vesículas endossomais do *T. brucei*. A estrutura da proteína indica que o seu domínio catalítico C-terminal é citoplasmático, e que seu domínio N-terminal, provavelmente regulatório, localiza-se no lúmen da bolsa flagelar, sendo assim exposto ao meio extracelular em que o parasita se encontra. É somente através da bolsa flagelar que o parasita realiza os processos de endo e exocitose, e todas as proteínas localizadas na membrana plasmática do parasita passam pela bolsa flagelar antes de atingir a superfície celular [13]. A presença de TbeIF2K2 na bolsa flagelar de *T. brucei* poderia, então, servir como um sensor do meio extracelular, sinalizando para o interior da célula em determinadas situações. Assim, é possível que TbeIF2K2 interaja com compostos extracelulares e, desse modo, module a síntese proteica citoplasmática.

TbeIF2K2 liga-se a TbBiP. Como BiP é uma chaperona, que se liga transientemente a proteínas nascentes e a proteínas mal dobradas no retículo endoplasmático, a ligação TbeIF2K2-TbBiP pode representar a interação transiente entre a quinase recém sintetizada e a chaperona, sem implicações regulatórias. VSGs são proteínas bastante expressas pela forma sanguínea de *T. brucei* [27]. A interação entre TbBiP e VSG, também analisada neste trabalho, não foi detectada (dados não mostrados). Sabe-se que TbBiP interage transientemente com VSG [96]. Devido à grande quantidade de VSG sintetizada pela forma sanguínea do parasita, caso a interação transiente de TbBiP com proteínas recém sintetizadas pudesse ser detectada nos ensaios de co-immunoprecipitação aqui realizados, teria sido possível detectar a interação entre TbBiP e VSG. Como este não foi o caso, é provável que a interação TbeIF2K2-TbBiP mostrada aqui não seja transiente. Assim, a ligação entre TbeIF2K2 e TbBiP pode ser relevante para a regulação da atividade da quinase, em analogia a PERK, já que TbBiP, como TbeIF2K2, também é detectada na superfície do parasita.

Também analogamente a outras quinases de eIF2 α conhecidas, é possível que a fosforilação de TbeIF2K2 seja necessária para sua ativação. Se este for o caso, o maior nível de fosforilação basal de TbeIF2K2 na forma sanguínea pode representar uma maior atividade da quinase nessa forma do parasita. Assim, a quinase TbeIF2K2 pode ser regulada diferencialmente nas diversas etapas do ciclo de vida do *T. brucei*. Uma possibilidade é que o domínio N-terminal extracelular de TbeIF2K2 seja capaz de detectar situações de estresse a que apenas parasitas sanguíneos são submetidos, como determinadas situações de carência nutricional. Parasitas sanguíneos dependem da glicose presente no sangue para obter energia [17]. Assim, talvez TbeIF2K2 funcione como um sensor capaz de detectar a diminuição dos níveis de glicose sanguíneos, ocasionando, nesta específica situação de carência nutricional, a fosforilação de TbeIF2 α e a diminuição dos níveis gerais de síntese protéica celular, de modo a economizar energia. Neste trabalho, no entanto, foram utilizados apenas parasitas crescidos em cultura. Para se determinar se esta fosforilação basal de TbeIF2K2 é realmente verdadeira, e não um artefato observado apenas em parasitas crescidos em cultura, deverá ser analisada, futuramente, a existência de fosforilação na quinase de parasitas sanguíneos crescidos no sangue do hospedeiro mamífero.

Outra possibilidade é que a atividade de TbeIF2K2 seja importante durante o processo de diferenciação do parasita. No sangue do hospedeiro mamífero, parasitas na forma proliferativa “slender” são capazes de detectar o aumento da parasitemia, o que desencadeia a diferenciação para a forma não-proliferativa “stumpy”. TbeIF2K2 poderia ser capaz de detectar o aumento da parasitemia no sangue, talvez ligando-se ao fator indutor de “stumpy” SIF e, assim, diretamente levando à diferenciação do parasita. Até hoje, nem o receptor para SIF, nem o fator propriamente dito, foram identificados. Em parasitas “stumpy”, há uma diminuição dos níveis de síntese protéica [33]. Existe a possibilidade, ainda não testada, de que a atividade quinase de TbeIF2K2 seja a responsável pela diminuição dos níveis de tradução nestes parasitas, participando indiretamente do processo de diferenciação. Neste trabalho, somente parasitas monomórficos, que não respondem ao SIF, foram utilizados. TbeIF2K2 não foi detectada em parasitas sanguíneos monomórficos cuja cultura cresceu até a fase de morte, ou seja, em uma cultura que, após atingir a

densidade máxima, começou a decair devido à morte das parasitas. A perda de TbeIF2K2 nestes parasitas pode ser uma causa, ou uma consequência, da incapacidade do parasita de detectar a alta densidade em cultura e, desse modo, iniciar o processo de diferenciação. Outra distinção entre parasitas “slender” e “stumpy” é a concentração de cálcio citoplasmática, maior na forma proliferativa. O tratamento de parasitas sanguíneos com BAPTA, que leva à diminuição da concentração de cálcio citoplasmática, por ser um quelante deste íon, altera o fracionamento da quinase, que deixa de ser solubilizada, a 4° C, com Triton. Esta alteração não ocorre quando o fracionamento é realizado a temperatura ambiente, sugerindo que, nos parasitas tratados com BAPTA, TbeIF2K2 passa a ser parte de uma “lipid raft”. Esta alteração de fracionamento pode ser importante para a ativação ou desativação da quinase. Caso a quinase insolúvel em Triton (parasitas tratados com BAPTA) seja a quinase ativa, é razoável supor que a diminuição da concentração de cálcio citoplasmática, característica da fase inicial do processo de diferenciação de “slender” para “stumpy”, seja causa desta ativação. Deste modo, a atividade de TbeIF2K2 estaria envolvida com o processo de diferenciação propriamente dito.

Por fim, uma característica marcante de TbeIF2K2 é sua localização específica na célula. Visto que TbeIF2 α está presente por todo o citoplasma do tripanossoma (dados não mostrados), o processo de síntese protéica deve estar também distribuído pelo citoplasma. É improvável, portanto, que a atividade localizada de TbeIF2K2 regule a tradução geral no parasita. Para que o efeito da atividade da quinase seja global, TbeIF2K2 ativa poderia mudar de localização, sendo internalizada por vesículas endocíticas e, desse modo, aproximando-se do substrato citoplasmático. Alternativamente, é possível que TbeIF2K2 atue apenas localmente, regulando a síntese protéica na região próxima à bolsa flagelar do *T. brucei*. O controle local da tradução, em que RNAs mensageiros específicos localizam-se e são traduzidos em determinadas regiões celulares, é um fenômeno importante, que ocorre principalmente em células altamente polarizadas [40], caso do tripanossoma. A regulação localizada da síntese protéica permitiria que o parasita expressasse transcritos específicos, talvez contendo uORFs, em situações em que a quinase estivesse ativa. Até o momento, porém, não temos dados que corroborem qualquer das alternativas.

Concluindo, foram identificadas e caracterizadas, neste trabalho, duas proteínas envolvidas no processo de início da síntese protéica em *T. brucei*, TbeIF2 α e TbeIF2K2. Os dados aqui mostrados e discutidos são relevantes, dada a importância de processos pós-transcricionais para a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. Desse modo, este trabalho ajuda a elucidar uma via regulatória potencialmente importante para estes organismos, porém pouco estudada até este momento.

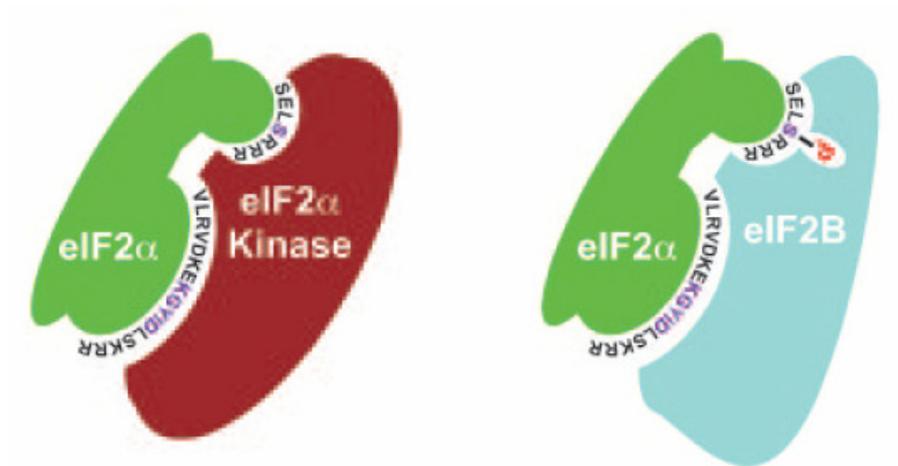


Figura 24 – Região de eIF2 α que interage tanto com as quinases de eIF2 α quanto com o fator eIF2B. (retirado de [95]).

VI – CONCLUSÕES

- TbeIF2K2 é uma glicoproteína associada a membrana, expressa tanto na forma sanguínea quanto na procíclica de *T. brucei*.
- TbeIF2K2 é uma quinase de eIF2 α em *T. brucei*. TbeIF2K2 fosforila eIF2 α de levedura e de mamíferos, especificamente na Ser51, e a proteína de *T. brucei*, na Thr169.
- TbeIF2 α , que não substitui funcionalmente o eIF2 α de levedura, não é fosforilado com eficiência pelas quinases GCN2 e PKR.
- TbeIF2K2 liga-se a TbBiP.
- TbeIF2K2 localiza-se na bolsa flagelar e em vesículas endossomais do tripanossoma.
- A localização celular de TbeIF2K2 sugere um papel desta proteína como um transdutor de eventos extracelulares para regular a síntese proteica geral em *T. brucei*.
- TbeIF2K2 não é detectável em parasitas sanguíneos em fase de morte.
- O fracionamento de TbeIF2K2 é alterado em parasitas tratados com o quelante de Ca²⁺ citoplasmático BAPTA.

VII – BIBLIOGRAFIA

- [1] WHO, http://www.who.int/topics/trypanosomiasis_african/en/
- [2] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, G. Blandin, M. Berriman, J. Crabtree, G. Aggarwal, E. Caler, H. Renauld, E.A. Worthey, C. Hertz-Fowler, E. Ghedin, C. Peacock, D.C. Bartholomeu, B.J. Haas, A.N. Tran, J.R. Wortman, U.C. Alsmark, S. Angiuoli, A. Anupama, J. Badger, F. Bringaud, E. Cadag, J.M. Carlton, G.C. Cerqueira, T. Creasy, A.L. Delcher, A. Djikeng, T.M. Embley, C. Hauser, A.C. Ivens, S.K. Kummerfeld, J.B. Pereira-Leal, D. Nilsson, J. Peterson, S.L. Salzberg, J. Shallom, J.C. Silva, J. Sundaram, S. Westenberger, O. White, S.E. Melville, J.E. Donelson, B. Andersson, K.D. Stuart, and N. Hall, Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309 (2005) 404-9.
- [3] M. Ekwanzala, J. Pepin, N. Khonde, S. Molisho, H. Bruneel, and P. De Wals, In the heart of darkness: sleeping sickness in Zaire. *Lancet* 348 (1996) 1427-30.
- [4] G.B. Lundkvist, K. Kristensson, and M. Bentivoglio, Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology (Bethesda)* 19 (2004) 198-206.
- [5] A. Garcia, D. Courtin, P. Solano, M. Koffi, and V. Jamonneau, Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends Parasitol* 22 (2006) 405-9.
- [6] R. Brun, and O. Balmer, New developments in human African trypanosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 19 (2006) 415-20.

- [7] F. Njiokou, C. Laveissiere, G. Simo, S. Nkinin, P. Grebaut, G. Cuny, and S. Herder, Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect Genet Evol* 6 (2006) 147-53.
- [8] E. Pays, B. Vanhollebeke, L. Vanhamme, F. Paturiaux-Hanocq, D.P. Nolan, and D. Perez-Morga, The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol* 4 (2006) 477-86.
- [9] WHO, <http://www.who.int/tdr/diseases/trypan/direction.htm>.
- [10] K.R. Matthews, The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 118 (2005) 283-90.
- [11] C.Y. He, Golgi biogenesis in simple eukaryotes. *Cell Microbiol* 9 (2007) 566-72.
- [12] P.G. McKean, Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6 (2003) 600-7.
- [13] K. Gull, Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. *Curr Opin Microbiol* 6 (2003) 365-70.
- [14] M.C. Field, and M. Carrington, Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. *Traffic* 5 (2004) 905-13.
- [15] E. Hendriks, F.J. van Deursen, J. Wilson, M. Sarkar, M. Timms, and K.R. Matthews, Life-cycle differentiation in *Trypanosoma brucei*: molecules and mutants. *Biochem Soc Trans* 28 (2000) 531-6.
- [16] K.R. Matthews, Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today* 15 (1999) 76-80.

- [17] K.R. Matthews, J.R. Ellis, and A. Paterou, Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol* 20 (2004) 40-7.
- [18] I. Roditi, H. Schwarz, T.W. Pearson, R.P. Beecroft, M.K. Liu, J.P. Richardson, H.J. Buhring, J. Pleiss, R. Bulow, R.O. Williams, and et al., Procyclin gene expression and loss of the variant surface glycoprotein during differentiation of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 108 (1989) 737-46.
- [19] M. Liniger, S. Urwyler, E. Studer, M. Oberle, C.K. Renggli, and I. Roditi, Role of the N-terminal domains of EP and GPEET procyclins in membrane targeting and the establishment of midgut infections by *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 137 (2004) 247-51.
- [20] S. Besteiro, M.P. Barrett, L. Riviere, and F. Bringaud, Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol* 21 (2005) 185-91.
- [21] J.E. Taylor, and G. Rudenko, Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet* 22 (2006) 614-20.
- [22] L. Marcello, and J.D. Barry, From silent genes to noisy populations-dialogue between the genotype and phenotypes of antigenic variation. *J Eukaryot Microbiol* 54 (2007) 14-7.
- [23] M. Berriman, E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renault, D.C. Bartholomeu, N.J. Lennard, E. Caler, N.E. Hamlin, B. Haas, U. Bohme, L. Hannick, M.A. Aslett, J. Shallom, L. Marcello, L. Hou, B. Wickstead, U.C. Alsmark, C. Arrowsmith, R.J. Atkin, A.J. Barron, F. Bringaud, K. Brooks, M. Carrington, I. Cherevach, T.J. Chillingworth, C. Churcher, L.N. Clark, C.H. Corton, A. Cronin, R.M. Davies, J. Doggett, A. Djikeng, T. Feldblyum, M.C. Field, A. Fraser, I. Goodhead, Z. Hance,

D. Harper, B.R. Harris, H. Hauser, J. Hostetler, A. Ivens, K. Jagels, D. Johnson, J. Johnson, K. Jones, A.X. Kerhornou, H. Koo, N. Larke, S. Landfear, C. Larkin, V. Leech, A. Line, A. Lord, A. Macleod, P.J. Mooney, S. Moule, D.M. Martin, G.W. Morgan, K. Mungall, H. Norbertczak, D. Ormond, G. Pai, C.S. Peacock, J. Peterson, M.A. Quail, E. Rabbinowitsch, M.A. Rajandream, C. Reitter, S.L. Salzberg, M. Sanders, S. Schobel, S. Sharp, M. Simmonds, A.J. Simpson, L. Tallon, C.M. Turner, A. Tait, A.R. Tivey, S. Van Aken, D. Walker, D. Wanless, S. Wang, B. White, O. White, S. Whitehead, J. Woodward, J. Wortman, M.D. Adams, T.M. Embley, K. Gull, E. Ullu, J.D. Barry, A.H. Fairlamb, F. Opperdoes, B.G. Barrell, J.E. Donelson, N. Hall, C.M. Fraser, et al., The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309 (2005) 416-22.

[24] P. Borst, and S. Ulbert, Control of VSG gene expression sites. *Mol Biochem Parasitol* 114 (2001) 17-27.

[25] L. Vanhamme, and E. Pays, Control of gene expression in trypanosomes. *Microbiol Rev* 59 (1995) 223-40.

[26] C. Clayton, and M. Shapira, Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* (2007).

[27] C.E. Clayton, Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *Embo J* 21 (2002) 1881-8.

[28] J.B. Palenchar, and V. Bellofatto, Gene transcription in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 146 (2006) 135-41.

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

- [30] D.A. Campbell, S. Thomas, and N.R. Sturm, Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 5 (2003) 1231-40.
- [31] J.R. Zamudio, B. Mitra, G.M. Zeiner, M. Feder, J.M. Bujnicki, N.R. Sturm, and D.A. Campbell, Complete cap 4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 5 (2006) 905-15.
- [32] G. Mair, H. Shi, H. Li, A. Djikeng, H.O. Aviles, J.R. Bishop, F.H. Falcone, C. Gavrilesco, J.L. Montgomery, M.I. Santori, L.S. Stern, Z. Wang, E. Ullu, and C. Tschudi, A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *Rna* 6 (2000) 163-9.
- [33] M. Brecht, and M. Parsons, Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. *Mol Biochem Parasitol* 97 (1998) 189-98.
- [34] F. Gebauer, and M.W. Hentze, Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (2004) 827-35.
- [35] M. Kozak, Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol Rev* 47 (1983) 1-45.
- [36] C.M. Spahn, R. Beckmann, N. Eswar, P.A. Penczek, A. Sali, G. Blobel, and J. Frank, Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107 (2001) 373-86.
- [37] M. Kozak, Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 361 (2005) 13-37.
- [38] T. Blumenthal, Operons in eukaryotes. *Brief Funct Genomic Proteomic* 3 (2004) 199-211.

- [39] J.E. Dahlberg, and E. Lund, Does protein synthesis occur in the nucleus? *Curr Opin Cell Biol* 16 (2004) 335-8.
- [40] S. Kindler, H. Wang, D. Richter, and H. Tiedge, RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21 (2005) 223-45.
- [41] G.S. Allen, and J. Frank, Structural insights on the translation initiation complex: ghosts of a universal initiation complex. *Mol Microbiol* 63 (2007) 941-50.
- [42] C.M. Abbott, and C.G. Proud, Translation factors: in sickness and in health. *Trends Biochem Sci* 29 (2004) 25-31.
- [43] M.A. Algire, D. Maag, and J.R. Lorsch, Pi release from eIF2, not GTP hydrolysis, is the step controlled by start-site selection during eukaryotic translation initiation. *Mol Cell* 20 (2005) 251-62.
- [44] M.A. Algire, and J.R. Lorsch, Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 10 (2006) 480-6.
- [45] M. Holcik, and N. Sonenberg, Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 318-27.
- [46] T. von der Haar, J.D. Gross, G. Wagner, and J.E. McCarthy, The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11 (2004) 503-11.
- [47] T.E. Dever, Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci* 24 (1999) 398-403.

- [48] R.C. Wek, H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 34 (2006) 7-11.
- [49] C.G. Proud, eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16 (2005) 3-12.
- [50] C. Jousse, S. Oyadomari, I. Novoa, P. Lu, Y. Zhang, H.P. Harding, and D. Ron, Inhibition of a constitutive translation initiation factor 2alpha phosphatase, CREP, promotes survival of stressed cells. *J Cell Biol* 163 (2003) 767-75.
- [51] H. Kubota, Y. Sakaki, and T. Ito, GI domain-mediated association of the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase GCN2 with its activator GCN1 is required for general amino acid control in budding yeast. *J Biol Chem* 275 (2000) 20243-6.
- [52] N. Nameki, M. Yoneyama, S. Koshihara, N. Tochio, M. Inoue, E. Seki, T. Matsuda, Y. Tomo, T. Harada, K. Saito, N. Kobayashi, T. Yabuki, M. Aoki, E. Nunokawa, N. Matsuda, N. Sakagami, T. Terada, M. Shirouzu, M. Yoshida, H. Hirota, T. Osanai, A. Tanaka, T. Arakawa, P. Carninci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, K. Kinoshita, P. Guntert, T. Kigawa, and S. Yokoyama, Solution structure of the RWD domain of the mouse GCN2 protein. *Protein Sci* 13 (2004) 2089-100.
- [53] J. Boudeau, D. Miranda-Saavedra, G.J. Barton, and D.R. Alessi, Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* 16 (2006) 443-52.
- [54] J. Narasimhan, K.A. Staschke, and R.C. Wek, Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J Biol Chem* 279 (2004) 22820-32.
- [55] T.E. Dever, Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* 108 (2002) 545-56.

- [56] M. Dey, C. Cao, A.C. Dar, T. Tamura, K. Ozato, F. Sicheri, and T.E. Dever, Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2alpha substrate recognition. *Cell* 122 (2005) 901-13.
- [57] J.L. Cole, Activation of PKR: an open and shut case? *Trends Biochem Sci* 32 (2007) 57-62.
- [58] J.J. Mohrle, Y. Zhao, B. Wernli, R.M. Franklin, and B. Kappes, Molecular cloning, characterization and localization of PfPK4, an eIF-2alpha kinase-related enzyme from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 328 (Pt 2) (1997) 677-87.
- [59] W.J. Sullivan, Jr., J. Narasimhan, M.M. Bhatti, and R.C. Wek, Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. *Biochem J* 380 (2004) 523-31.
- [60] K.L. Perry, K.P. Watkins, and N. Agabian, Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (1987) 8190-4.
- [61] R. Dhaliya, C.R. Reis, E.R. Freire, P.O. Rocha, R. Katz, J.R. Muniz, N. Standart, and O.P. de Melo Neto, Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 140 (2005) 23-41.
- [62] R. Dhaliya, N. Marinsek, C.R. Reis, R. Katz, J.R. Muniz, N. Standart, M. Carrington, and O.P. de Melo Neto, The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 2495-507.
- [63] Y. Yoffe, J. Zuberek, A. Lerer, M. Lewdorowicz, J. Stepinski, M. Altmann, E. Darzynkiewicz, and M. Shapira, Binding specificities and potential roles of

- isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 5 (2006) 1969-79.
- [64] J.A. Batista, S.M. Teixeira, J.E. Donelson, L.V. Kirchhoff, and C.M. de Sa, Characterization of a *Trypanosoma cruzi* poly(A)-binding protein and its genes. *Mol Biochem Parasitol* 67 (1994) 301-12.
- [65] D.M. Woodcock, P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael, and M.W. Graham, Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 3469-78.
- [66] T.E. Dever, J.J. Chen, G.N. Barber, A.M. Cigan, L. Feng, T.F. Donahue, I.M. London, M.G. Katze, and A.G. Hinnebusch, Mammalian eukaryotic initiation factor 2 alpha kinases functionally substitute for GCN2 protein kinase in the GCN4 translational control mechanism of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 4616-20.
- [67] T.E. Dever, L. Feng, R.C. Wek, A.M. Cigan, T.F. Donahue, and A.G. Hinnebusch, Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* 68 (1992) 585-96.
- [68] D.A. Mitchell, T.K. Marshall, and R.J. Deschenes, Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9 (1993) 715-22.
- [69] M. Johnston, and R.W. Davis, Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 4 (1984) 1440-8.

- [70] R.S. Sikorski, and P. Hieter, A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122 (1989) 19-27.
- [71] T. Maniatis, Fritsch, F., Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [72] D.L. Alexander, K.J. Schwartz, A.E. Balber, and J.D. Bangs, Developmentally regulated trafficking of the lysosomal membrane protein p67 in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 115 (2002) 3253-63.
- [73] A.C. Ivens, C.S. Peacock, E.A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M.A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S.M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C.V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R.M. Coulson, A. Cronin, A.K. Cruz, R.M. Davies, J. De Gaudenzi, D.E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A.C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J.C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T.M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M.A. Quail, E. Rabbinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J.C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D.C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D.F. Smith, J.M. Blackwell, K.D. Stuart, B. Barrell, et al., The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309 (2005) 436-42.
- [74] N.M. El-Sayed, P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Worthey, A.L. Delcher, G. Blandin, S.J. Westenberger, E. Caler,

G.C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. Aslund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D.A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J.F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P.T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A.C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M.J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C.R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J.C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J.L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S.L. Salzberg, D.O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A.J. Simpson, E. Sisk, M.T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P.N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C.M. Fraser, K.D. Stuart, and B. Andersson, The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309 (2005) 409-15.

[75] S.K. Hanks, and T. Hunter, Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* 9 (1995) 576-96.

[76] Phyre, www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre.

[77] R.J. Kelley, M.J. Brickman, and A.E. Balber, Processing and transport of a lysosomal membrane glycoprotein is developmentally regulated in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 74 (1995) 167-78.

[78] F. Paturiaux-Hanocq, N. Zitzmann, J. Hanocq-Quertier, L. Vanhamme, S. Rolin, M. Geuskens, M.A. Ferguson, and E. Pays, Expression of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma gambiense* in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* shows that the cell type dictates the nature of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attached to the glycoprotein. *Biochem J* 324 (Pt 3) (1997) 885-95.

- [79] M.J. Brickman, J.M. Cook, and A.E. Balber, Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment in African trypanosomes. *J Cell Sci* 108 (Pt 11) (1995) 3611-21.
- [80] K.J. Schwartz, R.F. Peck, N.N. Tazeh, and J.D. Bangs, GPI valence and the fate of secretory membrane proteins in African trypanosomes. *J Cell Sci* 118 (2005) 5499-511.
- [81] A. Bertolotti, Y. Zhang, L.M. Hendershot, H.P. Harding, and D. Ron, Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2 (2000) 326-32.
- [82] M.J. Gething, Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10 (1999) 465-72.
- [83] T.L. Ung, C. Cao, J. Lu, K. Ozato, and T.E. Dever, Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *Embo J* 20 (2001) 3728-37.
- [84] B. Reuner, E. Vassella, B. Yutzy, and M. Boshart, Cell density triggers slender to stumpy differentiation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in culture. *Mol Biochem Parasitol* 90 (1997) 269-80.
- [85] E. Vassella, B. Reuner, B. Yutzy, and M. Boshart, Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J Cell Sci* 110 (Pt 21) (1997) 2661-71.
- [86] R.J. Kaufman, Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13 (1999) 1211-33.

- [87] D.F. Stojdl, and M.W. Clarke, Trypanosoma brucei: analysis of cytoplasmic Ca²⁺ during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp Parasitol* 83 (1996) 134-46.
- [88] E.L. Ridgley, Z.H. Xiong, and L. Ruben, Reactive oxygen species activate a Ca²⁺-dependent cell death pathway in the unicellular organism Trypanosoma brucei brucei. *Biochem J* 340 (Pt 1) (1999) 33-40.
- [89] P.W. Denny, M.C. Field, and D.F. Smith, GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett* 491 (2001) 148-53.
- [90] D.A. Brown, Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology (Bethesda)* 21 (2006) 430-9.
- [91] D.P. Nolan, D.G. Jackson, M.J. Biggs, E.D. Brabazon, A. Pays, F. Van Laethem, F. Paturiaux-Hanocq, J.F. Elliott, H.P. Voorheis, and E. Pays, Characterization of a novel alanine-rich protein located in surface microdomains in Trypanosoma brucei. *J Biol Chem* 275 (2000) 4072-80.
- [92] J. Lu, E.B. O'Hara, B.A. Trieselmann, P.R. Romano, and T.E. Dever, The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase PKR will phosphorylate serine, threonine, or tyrosine at residue 51 in eukaryotic initiation factor 2alpha. *J Biol Chem* 274 (1999) 32198-203.
- [93] P.J. Kennelly, and E.G. Krebs, Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266 (1991) 15555-8.
- [94] G. Kramer, and B. Hardesty, Phosphorylation reactions that influence the activity of eIF-2. *Curr Top Cell Regul* 20 (1981) 185-203.

- [95] M. Dey, B. Trieselmann, E.G. Locke, J. Lu, C. Cao, A.C. Dar, T. Krishnamoorthy, J. Dong, F. Sicheri, and T.E. Dever, PKR and GCN2 kinases and guanine nucleotide exchange factor eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B) recognize overlapping surfaces on eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 3063-75.
- [96] J.D. Bangs, E.M. Brouch, D.M. Ransom, and J.L. Roggy, A soluble secretory reporter system in *Trypanosoma brucei*. Studies on endoplasmic reticulum targeting. *J Biol Chem* 271 (1996) 18387-93.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)