

Teresa Cristina Leandro de Jesus

PROTEÍNAS QUINASES ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO
ESTRESSE EM *TRYPANOSOMA*

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

São Paulo

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Teresa Cristina Leandro de Jesus

PROTEÍNAS QUINASES ENVOLVIDAS NA REGULAÇÃO DO
ESTRESSE EM *TRYPANOSOMA*

Orientador: Prof. Dr. Sergio Schenkman

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

São Paulo
2010

Jesus, Teresa Cristina Leandro de

Proteínas quinases envolvidas na regulação do estresse em *Trypanosoma* Teresa Cristina Leandro de Jesus – São Paulo, 2010.

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

Título em inglês: Protein kinases involved in stress regulation in *Trypanosoma*.

1. *Trypanosoma brucei*; 2. *Trypanosoma cruzi*; 3. quinase; 4. RNAi; 5. acidocalcissomos; 6. reservossomos

Trabalho realizado na Disciplina de Biologia Celular do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq e INV) e National Institute of Health (NIH)

“Até que o sol não brilhe, acendamos
uma vela na escuridão”. *Confúcio*

Aos meus pais que sempre iluminaram o meu caminho.

Agradecimentos

Aos meus pais Rosângela e Rubens, por tudo e mais um pouco.

Aos meus tios Conceição e Armando pelo apoio e por me acolherem durante esses anos e sempre me considerarem como uma filha.

Ao Vinícius, por todo amor, companheirismo, paciência e compreensão nas intermináveis horas de espera.

A minha avó Tereza e ao Tio Pedro pelo carinho e apoio incondicional.

A toda minha família (trecho Uberaba-São Paulo) que sempre me apoiou e compreendeu a minha ausência.

Ao Sergio Schenkman pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos, pelo entusiasmo e pelo exemplo de pesquisador que ama o que faz.

Ao Dr. Roberto Docampo e a Dra. Silvia Moreno por me receberem em seu laboratório, pelas críticas e sugestões valiosas para este trabalho.

A Dra. Beatriz Castilho pelos ensinamentos e sugestões para o trabalho.

Aos queridos e eternos amigos do lab que sempre me incentivaram, ajudaram e me animaram nas horas alegres e difíceis:

A Sheila amiga (Sheilictha!) pela amizade, pelo companheirismo e por estar sempre a postos para me ajudar seja para discutir um dado de FACS ou sobre aquele livro/filme/novela MEGA legal! Ou mesmo para descobrir quem sai ou não no Paredão!

A Janete (Hihihhi) pelo carinho, pela ajuda constante e pelas conversas sobre tudo. Amiga eterna de Heroes, 24 h e Marisa!

A Renata (Biroskinha) pela amizade, incentivo, inúmeras discussões e figuras. Por ser “parceira de qual é a música” e “sempre ter seus momentos”.

Ao Bruno Mococa (Mocks) pelo apoio e carinho apesar de sempre “ter vergonha de seus amigos” e pelos abraços (poucos, mas verdadeiros!).

Ao Thiago (Thiaguito guito guito) pela amizade, pela ajuda não só nos experimentos, mas também no mundo dos computadores! E pela eterna expressão: Ah verão...!

Ao Leonardo (Leonel) por ser uma das melhores aquisições do lab, pela ajuda mais que constante, pelo incentivo, por ser companheiro de gosto musical e pela amizade.

Ao Alberto pela ajuda, pela amizade e por nos ensinar o rico vocabulário “chilenês”.

Ao Antonio (Antonio Nunes) pela amizade, companheirismo e nos introduzir no mundo extraterrestre de Varginha.

A Carla Avila (Carlotinha Linda!) por ter sido sempre uma amiga presente, pupila dos “bruceis” e ter me ajudado nos feriados prolongados.

A Mariana pelo incentivo e pela ajuda proteômica.

A Fernanda (Mara) pela amizade e por dar um ar fashion sertanejo ao lab.

Aos queridos técnicos sem os quais o lab não funciona:

Claudeci pela ajuda, pelo carinho (apesar de sempre excluir minha bancada) e pelos novos dialetos ensinados.

Claúdio (Coioote) pela amizade, pelas caronas, coiotices, e principalmente pelos 24 h.

Rose (Minha querida), que apesar de não ser do lab, sempre esteve presente conosco. Pela amizade, apoio e ajuda nos meios de cultura malucos!

Aos ex-membros do lab:

Rafael Miyazawa (Rafa) por ter sido mais do que um amigo durante todos esses anos, pelos ensinamentos, cervejas, por ter sido companheiro e presença cativa e cativante em todos os momentos. Enfim por ter esses “japa genes”! Obrigada por tudo sempre!

Julia Cunha (Juliette) por sempre ter me incentivado, pelo carinho, pelas conversas e amizade.

Ludmila Ferreira (Lud) por ser uma super amiga, ter me animado nas horas difíceis e por ter me ensinado tanto.

Luana Umeda (Luanóides) por ter me ajudado muito com este trabalho, pelo carinho e amizade.

Vanessa Coimbra (Van) pelas conversas, ensinamentos e amizade.

Fernando Dossin (Ferdinando) e Carlos Kikuti pela amizade, ensinamentos e incentivo.

Maria Carolina Elias (Chefinha) e Rogério Amino (Roti) pelo carinho, amizade e ensinamentos.

Evânia (Amiguinha), pela amizade e suporte mais do que técnico.

E tantos outros ex-membros e visitantes que contribuíram de alguma forma: Luciana Guityama, Steven, Marília, Carol Yakuza, Renata Kqui, Vivi Ha, Ana Claudia, Paula, Rogério (Colaborador), Ivan, Erick, Tarsis, Alexandra, Bruno, Danielle, Vanina, Fernanda, Elisandra entre outros.

Aos secretários Márcia, Mércia, Cristiane e Marcelo por sempre estarem dispostos a nos ajudar, por resolverem todos os probleminhas e pela amizade.

Aos professores da Disciplina de Biologia Celular pela ajuda e por sempre disponibilizarem seus laboratórios para nossos experimentos: Rosana Puccia, Elaine G.Rodrigues, Luiz R.R.G. Travassos, Zoilo P. de Camargo e Olga F. Gompertz.

Aos membros, ex- membros e técnicos do 8º andar pela ajuda constante, empréstimos de reagentes, conversas e momentos de descontração.

Ao Andrey, Rodrigo e Luizão pela imensa ajuda no biotério e com os monoclonais e pela amizade.

Aos membros, ex-membros e visitantes do Docampo-Moreno's lab: Melina, Roxie Sharon, Veronica, Allie, Noelia, Doug, Todd, Noah, Zhu-hong, Guozhong, Samantha, Melissa, Ashley, Jing, Vicente, Paul, Jianmin, Ranjan, Miyoung, Adriana, Vanina, Isabela (Cupcake), Patricia (Pato), Georgina e Esteban, pelo incentivo, ensinamentos e amizade.

A Dra. Cristina Motta e ao Dr. Kildare Miranda pela ajuda com a microscopia eletrônica.

As ex- alunas do DMIP Nilce Hashimoto e Maria Carolina Moraes pela colaboração.

Ao Dr. Miguel Navarro, ao Dr. Antonio Barquilla e ao Dr. Nilson Zanchin pela ajuda, sugestões e críticas que enriqueceram o trabalho.

Ao Dr. Renato Mortara pelas sugestões e vários reagentes doados.

Aos amigos para toda a vida Raquel, Taiana, Erico e Maíra pela eterna ajuda em Athens e companheirismo em todos os momentos.

A FAPESP, ao CNPq e a Ellison Medical Foundation pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiii
SUMMARY	xv
INTRODUÇÃO	1
Controle da síntese protéica	1
O fator eIF2 α e suas quinases	3
TOR (Target Of Rapamycin)	5
Domínios estruturais de TOR	7
Complexos multiprotéicos de TOR	8
Reguladores <i>upstream</i> da via de TOR	10
Alvos <i>downstream</i> da via de sinalização de TOR	12
TOR e o ciclo celular	16
TOR e doenças	17
Parasitas e estresse	17
<i>Trypanosoma</i>	18
<i>Trypanosoma brucei</i>	19
Ciclo de vida	20
Interferência de RNA (RNAi)	24
<i>Trypanosoma cruzi</i>	25
Ciclo de vida	26
TOR e <i>Trypanosoma brucei</i>	28
<i>Trypanosoma</i> , eIF2 α e quinases	31
OBJETIVOS	33
CAPÍTULO I. Caracterização das quinases TOR-like 1 e TOR2 de <i>Trypanosoma brucei</i>	34
Parte 1. Uma quinase TOR-like está envolvida no controle da biogênese de acidocalcisomos em <i>Trypanosoma brucei</i> .	35
Resumo	35
Artigo: TOR- like 1 kinase is involved in the control of acidocalcisome biogenesis in <i>Trypanosoma brucei</i> .	37

Epitopo Tag para TbTOR-like1	67
Parte 2. Caracterização da quinase TOR2 de <i>Trypanosoma brucei</i>	68
CAPÍTULO II. Localização da quinase de eIF2 α TceIF2K2 em <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
Resumo	77
Resultados	79
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	87
ANEXO I – Materiais e Métodos	96
ANEXO II- Artigo: Novel membrane-bound eIF2 α kinase in the flagellar pocket of <i>T. brucei</i>	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

LISTA DE ABREVIATURAS

- ATP** – adenosina trifosfato
- BSA** – albumina sérica bovina
- DAPI** – 4,6-diamino-2-fenilindole
- DEPC** – dietil pirocarbonato
- DMEM** – *Dulbecco's modified eagle medium*
- DNA** – ácido desoxiribonucléico
- dNTP** – desoxiribonucleotídeo trifosfato
- dsRNA** – RNA de fita dupla (*double strand RNA*)
- eIF** – fator de iniciação de eucariotos (*eukaryotic initiation factor*)
- FACS** – citômetro de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Sorter*)
- FCaBP** – proteína flagelar ligante de cálcio (*Flagellar Calcium Binding Protein*)
- GDP** – guanosina difosfato
- GFP** – proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)
- GTP** – guanosina trifosfato
- HA** – hemaglutinina
- Ig** – imunoglobulina
- IPTG** – isopropyl- β -D-thio-galactoside
- K** – cinetoplasto
- Da** –Dalton(s)
- LB** – meio Luria-Bertani
- LIT** – infusão de triptose e fígado (*Liver Infusion Tryptose*)
- mRNA** – RNA mensageiro
- N** – núcleo
- ORF** – fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*)
- PAGE** – gel de poliacrilamida para eletroforese
- pb** – pares de bases
- PBS** – tampão fosfato-salina
- PCR** – reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PMSF – fluoreto de fenil metil sulfonila
PSS – solução fosfato (*phosphate stock solution*)
RNA – ácido ribonucléico
RNAi – interferência de RNA (*RNA interference*)
rRNA – ácido ribonucléico ribossômico
SDM – meio semi-definido (*semi-defined medium*)
SDS – dodecil sulfato de sódio
SFB – soro fetal bovino
SL – seqüência líder (*Spliced leader*)
SSC – tampão salino sodio –citrato (*Saline Sodium Citrate*)
TAU – urina artificial de triatomínio (*Triatomine Artificial Urine*)
TOR – alvo de rapamicina (*Target of Rapamycin*)
tRNA – ácido ribonucléico transportador
U – unidade enzimática
UTR – região não traduzida (*Untranslated Region*)
UV – ultravioleta

RESUMO

Protozoários do gênero *Trypanosoma* possuem um complexo ciclo de vida, alternando entre hospedeiros vertebrados e invertebrados. A adaptação a essas diversas condições ambientais necessita de rápidas mudanças na expressão gênica para preencher os requerimentos metabólicos ou morfológicos para sobrevivência. Muito pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam estas transformações e sobre as vias de sinalização celular implicadas. Como nestes organismos o controle da expressão gênica ocorre ao nível pós transcricional, decidimos neste trabalho estudar a função de proteínas quinases envolvidas no controle da síntese protéica e no crescimento destes parasitas. Em diversos eucariotos a proteína quinase TOR (Target Of Rapamycin) está envolvida no controle da síntese protéica e crescimento celular frente à disponibilidade de nutrientes ou fatores de crescimento.

Por análise de seqüências de *T. brucei* disponíveis nos bancos de dados do genoma desses parasitas encontramos quatro candidatos para TOR (TbTOR1, TbTOR2, TbTOR-like1 and TbTOR-like 2). Dois complexos TOR em *T. brucei* (TbTORC1 e TbTORC2) foram descritos previamente. No primeiro capítulo desta tese estudamos: TbTOR-like 1 e a comparamos com TbTOR2. TbTOR-like 1 não se encontra em nenhum dos complexos TORC e possui um domínio PDZ não encontrado nas outras TORs de *T. brucei* ou de outros eucariotos. Ela se localiza em grânulos no citosol que após estresse hiperosmótico migram para a periferia celular. Depleção de TbTOR-like 1 causa uma inibição progressiva do crescimento celular, gerando células de tamanho maior que se acumulam na fase S/G2 do ciclo celular. Estas células também apresentam um aumento no número de acidocalcissomos assim como aumentos nos níveis de polifosfato e pirofosfato. Estes dados indicam que TbTOR-like1 parece estar envolvida no controle do crescimento celular e na biogênese de acidocalcissomos respondendo a variações osmóticas do meio.

No segundo capítulo da tese estudamos proteínas quinases envolvidas no controle da síntese protéica através da fosforilação da subunidade α do fator de iniciação eucariótico 2 da tradução (eIF2 α). Estas quinases são ativadas por distintos tipos de estresse. *T. brucei* codifica para três potenciais proteínas

quinases de eIF2 α (Tbelf2K1, K2 e K3). Estudamos mais especificamente a K2. Mostramos que ela é uma glicoproteína transmembrânica localizada na região da bolsa flagelar em ambas as formas de *T. brucei* e nos compartimentos endossomais de *Trypanosoma cruzi*. Estes compartimentos endossomais são denominados de reservossomos e se formam apenas no estágio do parasita que vive no lúmen do tubo digestivo do inseto vetor. Este fato sugere que em ambos os parasitas esta proteína quinase possa estar funcionando como um sensor no transporte de nutrientes e proteínas.

De maneira geral revelamos a existência de pelo menos dois mecanismos pelos quais os tripanossomas percebem e resistem às modificações ambientais durante seu ciclo de vida.

SUMMARY

Protozoa of the genus *Trypanosoma* have a complex life cycle alternating between vertebrate and invertebrate hosts. The adaptation to different environmental conditions requires rapid changes in gene expression to fill up the morphological and metabolic requirements for survival. Very little is known about the mechanisms that control these changes and the signaling pathways involved. As in these organisms the control of gene expression occurs at post-transcriptional level, in this work we decided to investigate the function of protein kinases involved in the control of protein synthesis and growth of these parasites. In several eukaryotes TOR (target of rapamycin) protein kinases are involved in protein synthesis control and cell growth in response of the availability of nutrients or growth factors.

By searching *T. brucei* genomic database we found four candidates for TOR (TbTOR1, TbTOR2, TbTOR-like1 and TbTOR-like 2). Two TOR complexes were previously described in *T. brucei* (TbTORC1 and TbTORC2). In the first chapter of this thesis we study: TbTOR-like 1 and compared it with TbTOR2. TbTOR-like 1 is not present in any of the TORC complexes and has a PDZ domain not found in any of other TORs of *T. brucei*, or other eukaryotes. It is located cytosolic granules that migrate to the cell periphery after hyperosmotic stress. Depletion TbTOR-like 1 causes a progressive inhibition of cell growth, generating enlarged cells that accumulate in S/G2 phase of the cell cycle. These cells also show increased number of acidocalcisomes and augmented levels of polyphosphate and pyrophosphate. These data indicate that TbTOR-like seems to be involved in controlling cell growth and biogenesis of acidocalcisomes responding to osmotic changes in the medium.

In the second chapter of the thesis we studied protein kinases involved in protein synthesis control through the phosphorylation of the α subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α). These kinases are activated by different types of stress. *T. brucei* encodes three potential eIF2 α protein kinases (TbeIF2K1, K2 and K3). We studied more specifically the K2. We showed that it is a transmembrane glycoprotein located in the region of the flagellar pocket in both forms of *T. brucei*, and in the endosomal compartments of *Trypanosoma*

cruzi. These endosomal compartments are known as reservosomes and they are formed only in the parasite's stage that lives in the digestive tract lumen of the insect vector. This fact suggests that in both parasites this protein kinase may be acting as a sensor in the transport of nutrients and proteins.

In conclusion we revealed the existence of at least two mechanisms by which trypanosomes perceive and resist to environmental changes during their life cycle.

INTRODUÇÃO

Controle da síntese protéica

A síntese protéica é um dos mais complexos processos celulares e é um importante ponto de regulação da expressão gênica em eucariotos. Esta regulação ocorre principalmente no início da tradução. É relevante ressaltar que este é o processo que consome a maior parte da energia celular, sob forma de ATP e GTP, além dos fatores protéicos envolvidos neste processo representarem mais de 50% da quantidade total de proteínas celulares (Merrick, 1992).

O controle da síntese protéica em eucariotos é realizado principalmente por dois fatores de início de tradução: eIF2 e eIF4F. O fator eIF2 é formado por três subunidades (α , β e γ), e é responsável por um dos passos principais do processo de síntese protéica, o de levar o Met-tRNA_i^{Met} até a subunidade 40S ribossomal. O fator eIF2 forma um complexo ternário com o tRNA iniciador aminoacilado (Met-tRNA_i^{Met}) e GTP, que então se liga à subunidade 40S ribossomal, associada a eIF3, eIF1 e eIF1A, formando o complexo 43S de pré-iniciação. Este, por sua vez, liga-se ao término 5' do RNA mensageiro através de eIF4F. Este fator é formado por três subunidades: eIF4E que liga-se especificamente ao "cap" (7mGppp) dos mRNAs, eIF4A, uma helicase, e eIF4G, que forma uma ponte entre eIF4A e eIF4E e é responsável por trazer o complexo 43S à extremidade 5' do RNA mensageiro, formando o complexo 48S que migrará na mensagem até encontrar o primeiro códon AUG. Neste ponto, numa reação dependente de eIF5, GTP é hidrolisado, e eIF2.GDP é liberado, juntamente com outros fatores de iniciação, sendo o sítio P do ribossomo ocupado pelo tRNA iniciador. eIF5B promove a hidrólise de outra molécula de GTP, permitindo que a subunidade 60S ribossomal una-se ao complexo, tendo início o processo de alongação da cadeia polipeptídica (Jackson et al., 2010). Um modelo do início da tradução em eucariotos está mostrado na Figura I1. A modulação da atividade dos fatores eIF2 e eIF4F é crucial na determinação dos níveis de tradução geral e de algumas mensagens específicas nas células eucarióticas.

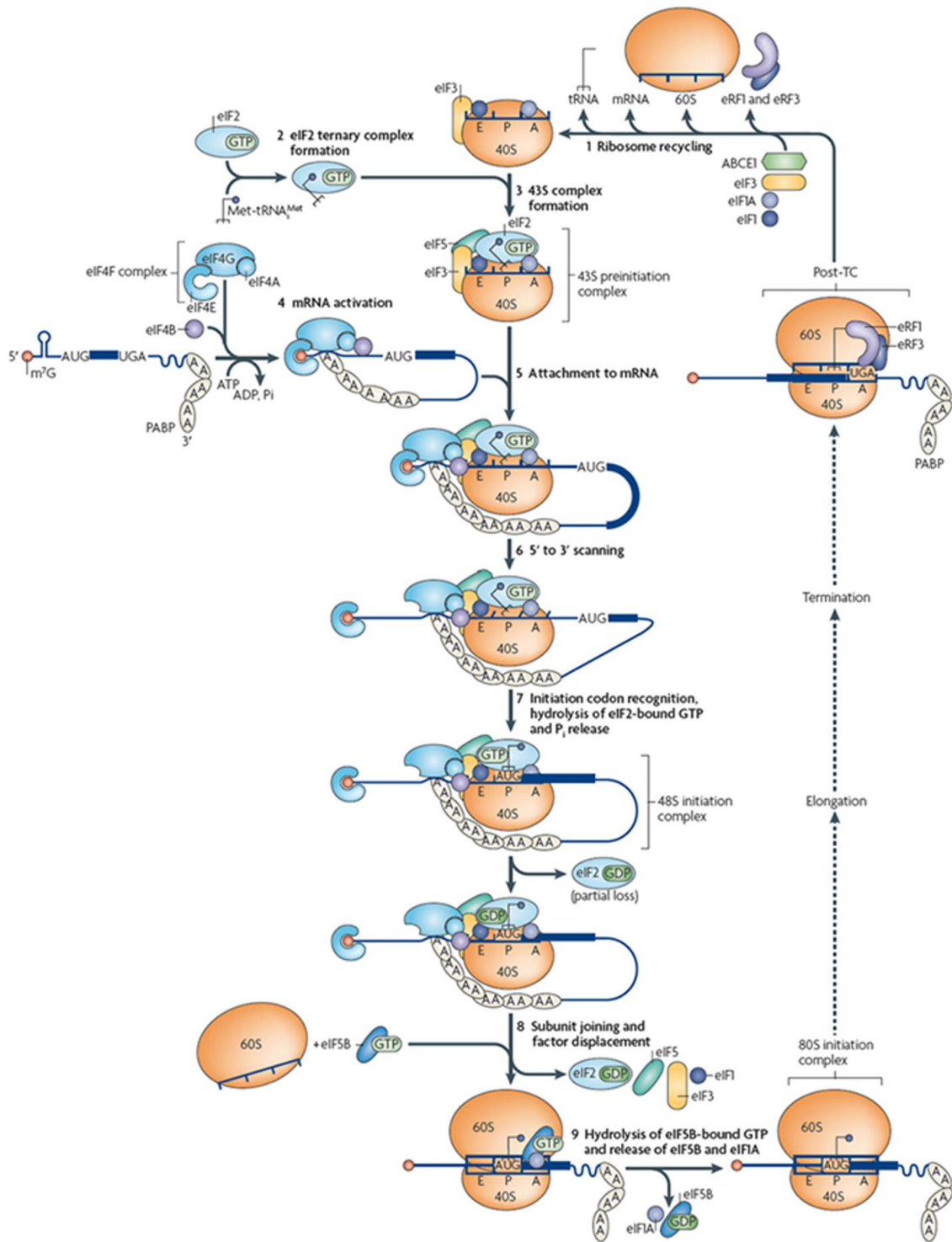


Figura 11. Modelo da via de início de tradução em eucariotos. Reproduzido de (Jackson et al., 2010).

O fator eIF2 α e suas quinases

A subunidade α de eIF2 é o sítio principal de regulação da síntese protéica total nas células e alvo de quinases que são ativadas por diversos mecanismos de sinalização. A fosforilação de eIF2 α na serina 51 inibe o processo de início de tradução por bloquear a troca de GDP por GTP em eIF2 catalisada pelo fator de troca de guaninas eIF2B (Cigan et al., 1993; Dever et al., 1992; Hershey, 1991).

São conhecidas 4 proteínas quinases que podem fosforilar o resíduo Ser⁵¹ de eIF2 α em situações específicas de stress celular. Todas possuem um domínio conservado de quinase e diferentes domínios regulatórios. A quinase HCR (hemin-controlled repressor) ou HRI ativada por privação de heme limita a síntese de globina quando há baixa disponibilidade de heme (Lu et al., 2001). Durante a síntese de hemoglobina, uma molécula de heme é incorporada em cada cadeia de globina. Quando a concentração de heme está alta, este se liga ao segundo domínio de ligação de HRI e mantém a quinase em estado inativo, permitindo a síntese de globina e a formação de hemoglobina (Chen, 2007). Na ausência de heme HRI é ativada por autofosforilação, fosforilando eIF2 α , e inibindo a síntese de globina (Chen, 2007). Em micro-organismos, um ortólogo de HRI foi identificado em *S. pombe* (Zhan et al., 2002).

A proteína quinase PKR (*protein kinase RNA regulated*, também chamada de *DAI-double-stranded RNA activated inhibitor*) é uma enzima ativada por uma dupla fita de RNA durante a replicação viral (Wek and Cavener, 2007). Em células não estressadas PKR está em estado latente, monomérico, devido ao efeito inibitório de seus domínios de ligação a dupla fita de RNA dsRBD (*dsRNA binding domain*) que regulam a sua atividade. Durante a infecção viral, os dsRNA produzidos como intermediários do processo de replicação viral, se ligam aos domínios dsRBD, fazendo com que a enzima forme dímeros, desencadeando sua autofosforilação e sua conseqüente ativação (Cole, 2007). A inibição da tradução de mensagens celulares resultantes bloquearia a propagação de células infectadas e conseqüentemente também a tradução de proteínas virais (Garcia et al., 2007).

PERK (*PKR- like endoplasmic reticulum kinase*) é uma quinase ativada em resposta a várias condições, mas todas resultando no mau funcionamento do processo de dobramento da proteína no retículo endoplasmático (Wek and Cavener, 2007). PERK é uma proteína transmembranar localizada no retículo endoplasmático (RE). O seu N-terminal se localiza no lúmen do RE e atua como sensor à estresses. O C-terminal está voltado para o citossol e tem atividade de proteína quinase (Harding et al., 1999; Ron, 2002). A PERK é mantida em um estado inativo pela ligação da chaperona BiP ao domínio sensor localizado no lúmen do RE (Ron, 2002). Quando se acumula proteínas não dobradas, BiP se dissocia de PERK, levando a sua dimerização, auto-fosforilação e como consequência a fosforilação de eIF2 α seguida da inibição da tradução (Ron, 2002). Ortólogos de PERK foram descritos em diversos organismos incluindo mamíferos, *C. elegans* e *D. melanogaster* (Sood et al., 2000).

A quarta quinase é GCN2 (*general control non-derepressing kinase-2*). É a única quinase de eIF2 α presente em *S. cerevisiae*. Ela é ativada por baixos níveis de aminoácidos e purinas, assim como por baixos níveis de glicose e danos no DNA (Wek et al., 2006). Além do domínio quinase, GCN2 possui um domínio semelhante a histidil-tRNA sintetase (HisRS) que medeia a ativação de GCN2 em resposta a baixas concentrações de aminoácidos (Wek et al., 1995). A ativação se dá pela ligação a diversos tRNAs não carregados. A ligação à tRNA carregados também ocorre, mas com menor afinidade (Dong et al., 2000). A ligação do tRNA não carregado ao domínio HisRS ativa o domínio quinase que está adjacente em GCN2 (Dever and Hinnebusch, 2005). A fosforilação de eIF2 por GCN2 em células carenciadas de nutrientes leva a inibição da síntese protéica e limitação do consumo de aminoácidos.

Enquanto altos níveis de eIF2 fosforilado inibem a tradução, níveis moderados de eIF2 fosforilado ainda permitem a ativação traducional de mensagens específicas, como GCN4 em *S. cerevisiae* (Hinnebusch, 1993) e ATF4 em mamíferos (Vattem and Wek, 2004). Estas mensagens contém fases de leitura abertas (uORFs) nas suas seqüências líderes que inibem a varredura do ribossomo de alcançar a ORF principal. Devido a redução de eIF2-GTP, como resultado da fosforilação de eIF2, os ribossomos transpassam as uORFS

e traduzem a ORF principal. GCN4 que ativa diversos genes envolvidos na biosíntese de aminoácidos e no metabolismo (Natarajan et al., 2001) e ATF4 além de regular o metabolismo de aminoácidos também participa em outros programas de resposta ao estresse (Harding et al., 2003).

TOR (Target Of Rapamycin)

As células eucarióticas estão envolvidas em um complexo conjunto de mecanismos regulatórios para modular a síntese e a degradação de proteínas em face de um número grande de variáveis ambientais. Outro importante elemento regulatório para o controle da síntese protéica é a proteína quinase TOR, assim denominada por ser o alvo do imunossupressor rapamicina (**Target of Rapamycin**) (Dennis et al., 1999b). A rapamicina, um imunossupressor e antifúngico natural (também conhecido como *sirolimus* ou RAPA), é um macrolídeo lipofílico produzido por uma linhagem de *Streptomyces hygroscopicus*, que foi originalmente isolada de uma amostra de solo coletada em Rapa-Nui (Ilha da Páscoa) de onde herdou o nome rapamicina.

TOR foi originalmente identificada por mutações, TOR1-1 e TOR1-2, que geravam resistência às propriedades inibitórias do crescimento da rapamicina em *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman et al., 1991; Wullschleger et al., 2006b). Neste mesmo estudo também foi mostrado que TOR requeria um co-fator intracelular para a toxicidade: a peptidil-prolil isomerase FKBP-12 (FK-506 *binding protein* de 12 kDa), que também se liga ao imunossupressor FK-506. O complexo rapamicina-FKBP12 possui um efeito imunossupressivo atuando em alvos de vias de sinalização de células T. O complexo rapamicina-FKBP12 se liga e inibe a quinase TOR que no caso das células do sistema imune é um componente da via de sinalização de interleucina 2 (IL-2) (Jacinto and Hall, 2003a). Estudos subseqüentes em células de mamífero levaram a identificação de TOR nestes organismos (mTOR- mammalian TOR) também conhecida como FRAP (FKBP12 e *rapamycin associated protein*), RAFT (*rapamycin* e FKBP12 *target*), SEP (*sirolimus effector protein*), ou RAPT (*rapamycin target*) (Fingar and Blenis, 2004). Até o presente, todos os eucariotos com genoma examinado (fungos, algas, plantas, vermes, moscas e

mamíferos) contêm pelo menos um gene de TOR (Crespo et al., 2005; Crespo and Hall, 2002; De Virgilio and Loewith, 2006; Menand et al., 2002).

As TORs são proteínas quinases evolutivamente conservadas que regulam o balanço entre a síntese de proteínas e a degradação em organismos unicelulares e multicelulares. Este complexo balanço é mantido via regulação do início da tradução, modulação da biosíntese de ribossomos nos níveis transcricionais e traducionais, controle da atividade de permeases de aminoácidos, coordenação da transcrição de muitas enzimas envolvidas em várias vias metabólicas e controle da autofagia. Um interessante e inesperado achado foi que TOR também parece ter um papel no desenvolvimento embrionário do cérebro, aprendizado e formação da memória (Raught et al., 2001). Mutações de TOR ou inibição por rapamicina mimetizam as respostas celulares de privação de nutrientes, incluindo inibição da síntese de proteínas, mudanças transcricionais, parada do ciclo celular e autofagia em leveduras, *Drosophila* e células de mamíferos (Cardenas et al., 1999; Heitman et al., 1991; Kunz and Hall, 1993; Rohde et al., 2001). A sinalização mediada por TOR ocorre através de uma combinação de fosforilações diretas ou em alvos “downstream”, além da inibição de atividade de proteínas fosfatases.

As proteínas TOR são membros de uma família de proteínas semelhantes à fosfatidilinositol quinases (PI3K), denominada PIKKs (*phosphatidylinositol kinase related kinase*), um grupo grande de moléculas sinalizadoras que ao contrário dos membros da família de PI3K que fosforilam lipídeos, as PIKK funcionam como serina-treonina quinases. Membros da família PIKK incluem também a proteína *ataxia-telangiectasia-mutated* (ATM), ATR/FRP (*ataxia-telangiectasia relacionada* e a proteína *rad3/FRAP* relacionada), a proteína quinase DNA-dependente (DNA-PK), e as proteínas de leveduras Mec1, Rad53 e Tel1. As PIKKs estão envolvidas em diversas funções celulares, como o controle do crescimento, ciclo celular, recombinação e manutenção do comprimento do telômero (Keith and Schreiber, 1995; Raught et al., 2001; Rohde et al., 2001) .

Domínios estruturais de TOR

Como outros membros da família PIKK, as TORs são grandes polipeptídeos (280-300 kDa) que possuem uma região carboxi-terminal com uma seqüência semelhante aos domínios catalíticos das PI3-quinases (Abraham, 2002). TOR possui vários domínios conhecidos de interação proteína-proteína (Figura I2). O complexo FKBP-rapamicina, que inibe a função de TOR, interage com o domínio FRB (FKBP- *rapamycin binding*) em TOR, adjacente ao domínio quinase catalítico (Choi et al., 1996). Em adição aos domínios catalíticos e FRB, as proteínas TOR também contêm aproximadamente 20 repetições HEAT (*Huntingtin, Elongation factor 3*, uma subunidade da proteína fosfatase 2 A e TOR) em tandem no seu N-terminal, agrupadas em dois blocos (Andrade and Bork, 1995; Schmelzle and Hall, 2000). Cada domínio HEAT contém aproximadamente 40 aminoácidos que formam um par de hélices antiparalelas (Groves et al., 1999). Aos domínios HEAT se atribui a função de mediar interação proteína-proteína em complexos multiprotéicos e também processos de transporte celular (Andrade and Bork, 1995). Localizado na região amino terminal dos domínios FRB e quinase encontra-se o domínio FAT (presente nas quinases FRAP, ATM e TRRAP), compreendendo aproximadamente 500 aminoácidos do N-terminal dos domínios FRB e catalítico em TOR (Bosotti et al., 2000). A função do domínio FAT, encontrado apenas em membros da família PIKK, ainda não está elucidada. Ele pode servir como uma estrutura ou como um domínio de interação proteína-proteína, semelhante às repetições HEAT. As PIKKs contêm uma pequena seqüência na extremidade C-terminal que foi denominada de FATC. O domínio FATC ocorre apenas em combinação com o domínio FAT e pode ter uma importante atividade catalítica para as PIKK (Schmelzle and Hall, 2000).



Figura I2. Domínios estruturais de mTOR. Reproduzido de (Jacinto and Hall, 2003b).

Complexos multiprotéicos de TOR

Em leveduras a atividade de TOR é regulada pela disponibilidade de nutrientes, tais como nitrogênio e carbono (Wullschleger et al., 2006a). Semelhantemente a atividade de mTOR é regulada pelos níveis de aminoácidos e glicose (Hara et al., 1998; Inoki et al., 2003; Jung et al., 2010).

Saccharomyces cerevisiae contém duas proteínas TOR, TOR1 e TOR2. E dois distintos complexos funcionais de TOR foram identificados. O complexo TOR1 (TORC1) contém TOR1 ou TOR2 e as seguintes proteínas conservadas: controladora do crescimento 1 (KOG1), LST8 (*lethal with sec-thirteen 8*) e TCO89 (*89-kDa subunit of TOR complex one*) que devem funcionar como proteínas acopladoras de TOR aos seus alvos (Jacinto and Hall, 2003b; Loewith et al., 2002; Reinke et al., 2004) (Figura I3A). O complexo 2 de TOR (TORC2) contém TOR2, AVO1 (*adheres voraciously to TOR2*), AVO2, AVO3, LST8 e BIT 61 (*61-kDa binding partner of TOR2*) (Jacinto and Hall, 2003b; Reinke et al., 2004) (Figura I3B).

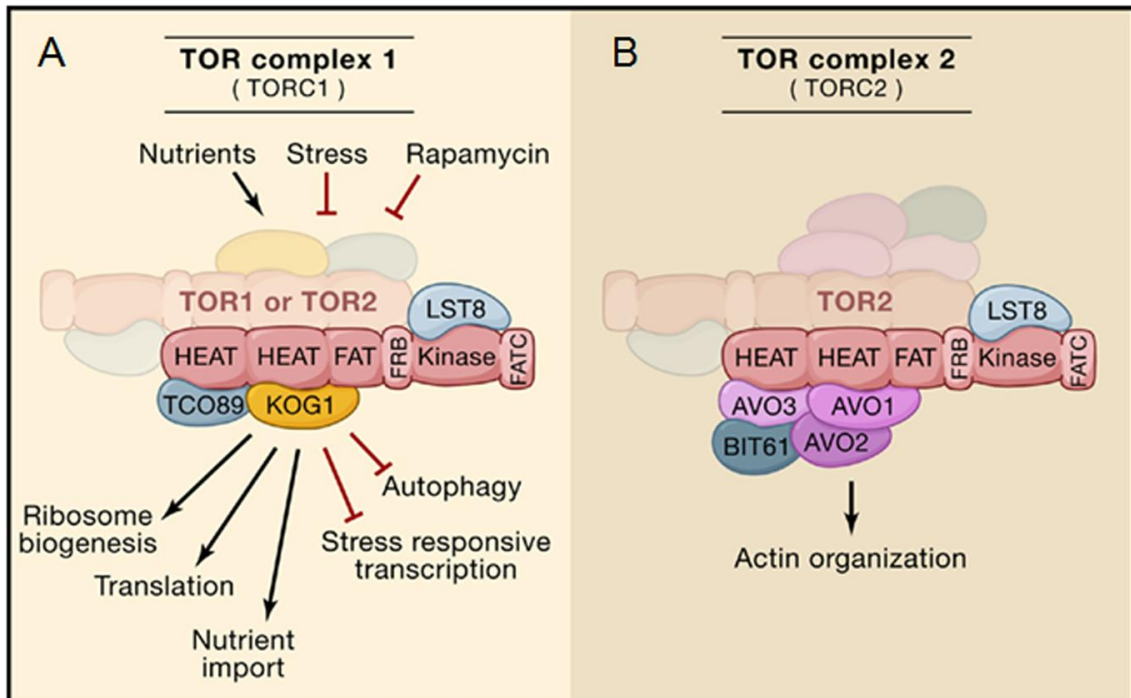


Figura I3. Complexos de TOR de *S. cerevisiae*. (A) TORC1 e seus alvos downstream. (B) TORC2 e seus alvos downstream. Reproduzido de (Wullschleger et al., 2006a)

Semelhantemente à TOR de leveduras, mTOR se liga a várias proteínas para formar dois complexos distintos: mTORC1 (*mTOR complex 1*) que contém raptor (*regulatory associated protein of mTOR*- ortólogo de KOG), GβL/LST8, PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) e DEPTOR (*Disheveled, EGL-10, Pleckstrin, TOR*), enquanto mTORC2 (*mTOR complex 2*) contém rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR* - ortólogo de Avo3), Sin1 (*stress-activated protein kinase-interacting protein* - ortólogo de Avo1), PRR5/protor (*proline rich 5 renal*) e DEPTOR (Hara et al., 2002; Jacinto et al., 2006; Kim et al., 2002; Pearce et al., 2007; Peterson et al., 2009; Sarbassov et al., 2004; Vander et al., 2007; Woo et al., 2007). Os complexos mTORC1 e mTORC2 estão mostrados na Figura 14.

Em levedura, quando as condições de crescimento são favoráveis TOR1 está ativada e as células mantêm uma alta taxa de biogênese de ribossomos, de início da tradução, e de importação de nutrientes. Entretanto quando as células são tratadas com rapamicina, ou carenciadas de nitrogênio ou depletadas de TOR1 e TOR2, a síntese protéica é drasticamente reduzida e a macroautofagia é aumentada e vários fatores de transcrição que respondem a estresse são ativados. Estes processos de TOR do tipo sensíveis a rapamicina são também conservados em mamíferos (Wullschleger et al., 2006a). Já TOR2 regula os aspectos espaciais do crescimento da célula. TORC2 controla a polarização do citoesqueleto de actina dependente do ciclo celular (Jacinto and Hall, 2003b; Loewith et al., 2002). Esta função de TOR2 é insensível a rapamicina e medeia o crescimento polarizado característico das células de levedura (Schmelzle and Hall, 2000; Schmidt et al., 1996). Esta função também é conservada em mamíferos. As figuras 13 e 14 mostram uma representação esquemática da via de TOR em levedura e mamíferos respectivamente, mostrando seus complexos e alvos *downstream*.

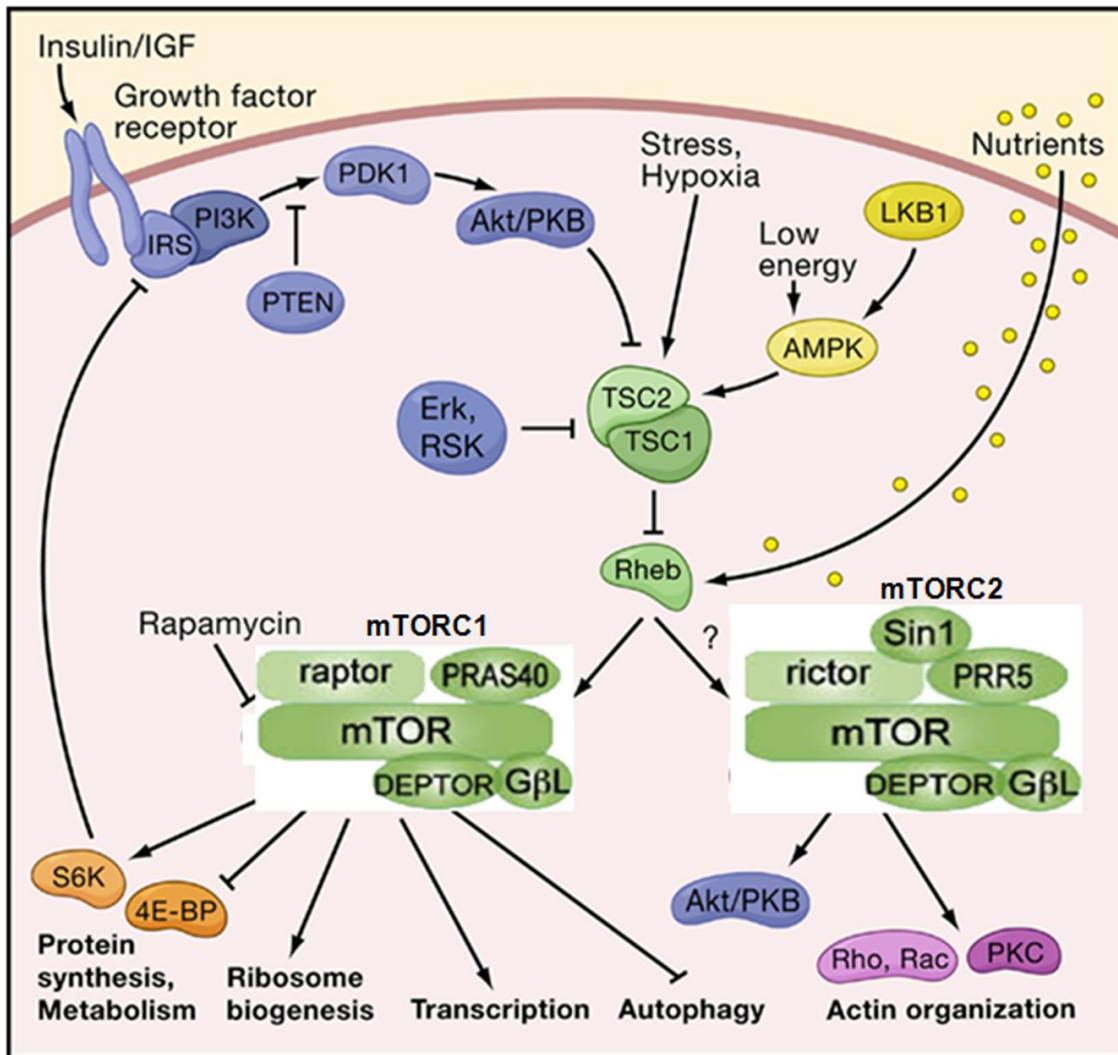


Figura I4. Modelo da via de sinalização mTOR em mamíferos. Os complexos mTORC1 e mTORC2 estão indicados. Modificado de (Wullschlegler et al., 2006a).

Reguladores *upstream* da via de TOR

A via de sinalização de TOR possui quatro principais elementos *upstream* regulatórios do crescimento: fatores de crescimento, nutrientes, energia e estresse.

A via de mTOR responde aos fatores de crescimento via sinalização de PI3K. A ligação de insulina ou IGF (*insulin-like growth factors*) aos seus receptores leva ao recrutamento e fosforilação do substrato receptor de insulina (IRS). Subseqüentemente ao recrutamento de PI3K, esta molécula se liga a IRS convertendo fosfatidilinositol-4,5- fosfato (PIP2) em fosfatidilinositol -3,4,5- fosfato (PIP3). Dentro da via PI3K/Akt a fosfatase PTEN funciona como um

supressor de tumor, fosforilando PIP3 e inibindo a atividade de PI3K (Hara et al., 2002). PIP3 recruta para a membrana PDK1 e Akt resultando na fosforilação de Akt por PDK1. mTOR interage com a via de PI3K através das proteínas supressoras de tumor esclerose tuberosa TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina), que agem como um heterodímero inibindo a via de sinalização de mTORC1 (Dunlop and Tee, 2009) atuando como uma GAP (*GTPase-activating protein*) para a GTPase Rheb pequena (*small GTPase Ras homolog enriched in brain*) (Li et al., 2004;Wullschleger et al., 2006a). TSC2 é fosforilada e inativada por Akt em resposta a insulina (Manning, 2004). Rheb se liga ao domínio quinase de mTOR ativando-a de uma maneira GTP dependente e TSC1-TSC2 inibe mTOR indiretamente revertendo Rheb para uma forma GDP inativa (Zhang et al., 2003). Também foi mostrado que Erk fosforila TSC2, suprimindo a função desta, rompendo o heterodímero TSC1-TSC2 (Brown et al., 1994).

O crescimento celular (acúmulo de massa celular) depende de uma alta taxa de síntese protéica e conseqüentemente um alto nível de energia. mTORC1 percebe a o status de energia da célula através de AMPK (*AMP - activated protein kinase*). Esta é ativada em resposta a baixa energia celular. Quando ativada, AMPK diminui a regulação de processos como a síntese protéica e estimula processos geradores de ATP como a oxidação de ácidos graxos (Wullschleger et al., 2006a).

Foi demonstrado que TOR tem um papel importante na resposta a diferentes estresses ambientais como a hipóxia. Em condições de hipóxia a sinalização de TOR é inibida e a síntese protéica diminuída. Outro tipo de estresse que afeta TOR é o dano ao DNA. A ativação de p53 por dano ao DNA inibe TOR via a sinalização de AMPK-TSC2 (Feng et al., 2005).

A via de mTORC1 também é regulada por nutrientes, especialmente aminoácidos. A privação de aminoácidos, particularmente a ausência de leucina, resulta em uma defosforilação de 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E binding protein*) e S6K (S6 quinase), enquanto adição de nutrientes restaura a fosforilação destas moléculas de uma maneira mTORC1 dependente (Hay and Sonenberg, 2004;Wullschleger et al., 2006a).

Alvos downstream da via de sinalização de TOR

Dentre os processos controlados por TOR, a inibição da tradução em mamíferos talvez seja o mais conhecido. A inibição de TOR, por rapamicina ou por falta de nutrientes, leva ao bloqueio do início de tradução, mediado pelas proteínas ligantes de eIF4E (4E-BP - *eukaryotic initiation factor 4E binding protein*). Quando 4E-BP é fosforilada, em resposta a um sinal de crescimento, ela se desliga do fator eIF4E, que é a proteína ligante do “cap” (m7G(5')ppp(5')N) dos mRNAs mensageiros, e parte do complexo multiprotéico eIF-4F, cuja função é o recrutamento da subunidade 40S ribossomal para a extremidade 5' dos mRNAs (Rohde et al., 2001). No estado defosforilado, 4E-BP se liga ao fator de início de tradução eIF-4E, inibindo a formação do complexo eIF4F, e assim suprime a síntese de proteínas cap-dependente. Restauração de nutrientes provoca a fosforilação em múltiplos sítios de 4E-BP dependente de mTOR, fazendo com que 4E-BP se dissocie de eIF4E, permitindo a tradução cap-dependente (Abraham, 2002; Schmelzle and Hall, 2000).

A proteína TOR de mamíferos também regula a tradução ativando a proteína p70 S6 quinase, que por sua vez fosforila a proteína ribossomal S6 e eIF4B (*eukaryotic initiation factor 4B*). A proteína S6 está presente nos ribossomos e a sua fosforilação é essencial para a fase de alongação (Hara et al., 1998; Hietakangas and Cohen, 2009). S6K também fosforila a quinase do fator de alongação 2 eEF2 (*eukaryotic elongation factor 2*), reduzindo a atividade desta quinase e levando a uma diminuição da fosforilação de eEF2, que está associada com a alongação da cadeia peptídica (Wang et al., 1998; Wang et al., 2008). As proteínas quinases ribossomais S6 (S6K1 e S6K2) regulam a tradução de um grupo de mRNAs que possuem um trato de oligopirimidina 5' terminal (5' TOP). Essa seqüência de 4 a 14 pirimidinas é encontrada na extremidade 5' terminal de mRNAs codificando para várias proteínas ribossomais. Quando o nível de nutrientes está baixo, a tradução de mRNAs contendo 5' TOP é reprimida. A estimulação por nutrientes leva à fosforilação de S6 e conseqüente estímulo da tradução (Abraham, 2002). A atividade de S6K é inibida por inibidores de PI3K e rapamicina indicando que

tanto a sinalização via PI3K como via mTOR são requeridas para a ativação de S6K (Thomas and Hall, 1997).

O controle da tradução via TOR em levedura parece envolver TAP42 (*type 2A-phosphatase associated protein*), um regulador das subunidades catalíticas de PP2A (proteína fosfatase 2A), incluindo PHP21, PHP22 e SIT4 (*suppressor of initiation of transcription*). Algumas mutações em TAP42 conferem resistência a rapamicina e a associação de TAP42 com PHP21/PHP22 e SIT4 é prevenida pela entrada em fase de crescimento estacionária ou por rapamicina (Di Como and Arndt, 1996;Rohde et al., 2001). TAP42 controla os níveis de ativação de GCN2, a quinase do fator eIF2 α de início de tradução, responsável pela resposta à falta de aminoácidos (Cherkasova and Hinnebusch, 2003). Assim, tratamento com rapamicina estimula a fosforilação de eIF2 α por GCN2, levando à inibição no início de tradução. Adicionalmente, a estabilidade do fator eIF4G também é regulado por TOR em levedura (Berset et al., 1998b).

A incorporação de transportadores de nutrientes à superfície da célula e a captura de nutrientes é essencial para o crescimento celular e a viabilidade. TOR também regula os níveis de aminoácidos intracelulares modulando a atividade de aminoácido permeases. TOR regula dois tipos de aminoácido permeases: GAP1 (*general amino acid permease*) e outro tipo incluem as específicas para cada aminoácido, como HIP1 (*histidine permease*) e TAT2 (*tryptophan permease*) (Beck and Hall, 1999;Schmidt et al., 1998). Sob condições de falta de nutrientes TOR inibe TAT2 aumentando sua ubiquitinação e conseqüentemente sua degradação (Beck and Hall, 1999;Schmidt et al., 1998). O contrário ocorre para GAP1, uma vez que sob as mesmas condições pobres em nutrientes TOR ativa GAP1 prevenindo sua ubiquitinação. Ambos os efeitos de TOR são mediados pela mesma serina treonina quinase NPR1 (*nitrogen permease reactivator 1*) (De Craene et al., 2001;Inoki et al., 2005b;Vandenbol et al., 1987). Sob condições de excesso de nutrientes TOR mantém NPR1 fosforilada, assim inibindo-a e levando a degradação de GAP1. Por outro lado, sob condições pobres nutrientes, NPR1 é defosforilada e ativada, resultando na ativação de GAP1 (Inoki et al., 2005b). A ativação de

NPR1 também é mediada pela atividade fosfatase de Sit4-PPHs (Jacinto et al., 2001).

TOR também parece ter uma função de regular a transcrição de rRNA e tRNA (Dennis et al., 1999a). Estudos em levedura e células de mamíferos demonstraram que a rapamicina bloqueia a síntese de ribossomos inibindo a transcrição de genes rRNA dependentes de RNA polimerase I (Pol I), genes de proteínas ribossomais dependentes de Pol II (genes RP), genes tRNA dependentes de Pol III e também inibe o processamento rRNA 35S (Martin and Hall, 2005;van Zyl et al., 1992;Zaragoza et al., 1998).

Em leveduras, TORC1 controla negativamente a transcrição de genes específicos para a privação de nutrientes, regulando a localização nuclear de muitos fatores de transcrição responsivos a nutrientes (Cardenas et al., 1999;Hardwick et al., 1999;Powers and Walter, 1999). mTORC1 também controla a transcrição de muito genes, particularmente genes envolvidos em vias metabólicas e biosintéticas (Peng et al., 2002).

Sob condições de privação de nutrientes, as células sofrem um processo catabólico chamado autofagia. Durante esse processo, um grande número de componentes citosólicos é englobado por uma estrutura de membrana dupla chamada de autofagossomo e são entregues ao vacúolo para degradação e reciclagem dos nutrientes necessários ou para a degradação de componentes tóxicos (Diaz-Troya et al., 2008). Duas linhas de evidências sugerem que a regulação da autofagia está relacionada com a regulação do crescimento mediada por TORC1. Elevados níveis de autofagia inibem o crescimento celular, e células que não possuem os componentes da via autofágica não sofrem uma redução nas taxas de crescimento celular em resposta a inibição de TORC1 (Hietakangas and Cohen, 2009;Scott et al., 2004). TOR controla a autofagia em fungos e eucariotos superiores (Lum et al., 2005). Em leveduras TOR controla negativamente a autofagia através da inibição da quinase ATG1 que medeia a ativação do processo autofágico (Kamada et al., 2000). Estudos anteriores mostraram que homólogos de ATG1 estão envolvidos na autofagia em organismos multicelulares. Super-expressão de ATG1 em células de mamíferos interfere com a sinalização de TOR inibindo

a ativação de S6K, indicando uma ligação entre autofagia e regulação do crescimento celular (Lee et al., 2007;Scott et al., 2007).

TOR controla também muitos aspectos do metabolismo incluindo a biosíntese de aminoácidos, homeostase da glicose entre outros (Wullschleger et al., 2006a). mTORC1 tem um papel importante na adipogênese, uma vez que rapamicina inibe a diferenciação de adipócitos e assim a acumulação de lipídeos (Kim and Chen, 2004). Alguns estudos mostraram que insulina e Akt são essenciais para a diferenciação de adipócitos (Baudry et al., 2006;Peng et al., 2003;Petersen, 2009;Yun et al., 2008). Um recente estudo demonstrou que TSC2 é o alvo primário de Akt que leva a diferenciação de adipócitos. O complexo TSC1-TSC2 regula a diferenciação de linhagens celulares mesenquimais através do controle da atividade de mTORC1 e da expressão do receptor nuclear PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (Zhang et al., 2009).

Como citado acima em leveduras o complexo TORC2 é insensível a rapamicina e controla a polarização ciclo-celular dependente do citoesqueleto de actina. Esta sinalização de TORC2 para o citoesqueleto de actina é feita através da ativação de uma mudança estrutural (*switch*) de Rho1 GTPase. Quando Rho1 está ativada interage e liga-se com PKC1, o que gera um sinal para o citoesqueleto de actina através da via de MAP (*mitogen-activated protein*) quinase. mTORC2 também regula o citoesqueleto de actina, especula-se que este processo seja regulado através de PKC e das GTPases pequenas Rho e Rac (Ikenoue et al., 2008;Jacinto et al., 2004). mTORC2 também vem sendo descrito como insensível a rapamicina, mas um estudo recente mostrou que tratamentos longos com rapamicina provocam a dissociação do complexo (Sarbasov et al., 2006). mTORC2 fosforila Akt (também conhecida como proteína quinase B-PKB) na serina (S)473 e PDK1 também fosforila Akt na treonina (T)308 o que gera uma completa ativação da quinase (Guertin and Sabatini, 2007;Rosner et al., 2009;Yang and Guan, 2007). Como Akt regula positivamente mTORC1, muito se especulou sobre mTORC2 agir como um regulador negativo da autofagia e estudos recentes mostraram que a inibição de mTORC2 induz autofagia e atrofia em células musculares sob condições limitantes de crescimento (Mammucari et al., 2007;Zhao et al., 2007).

Entretanto a indução de autofagia por mTORC2 é mediada por FoxO3 (*forkhead Box O 3*), um fator de transcrição *downstream* de Akt, que está envolvido na expressão de genes envolvidos com autofagia (Jung et al., 2010).

TOR e o ciclo celular

A junção entre crescimento celular e progressão do ciclo celular permite que as células eucarióticas se dividam a um tamanho constante durante uma proliferação contínua e gerem órgãos e organismos de tamanhos específicos. O tamanho celular durante a divisão da célula é sempre modulado por mudanças na disponibilidade de nutrientes (Jorgensen and Tyers, 2004; Kim et al., 2002; Mitchison, 2003; Petersen, 2009). A via de sinalização de TOR coordena esta junção entre crescimento celular e progressão do ciclo celular em resposta a mudanças ambientais como estresse e disponibilidade de nutrientes (Petersen, 2009; Wullschlegel et al., 2006a).

O ciclo celular é dividido em quatro estágios: G1; S (onde ocorre a síntese de DNA); G2 e M (mitose, onde a célula divide). A transição entre G1 e S e entre G2 e M é controlada por mecanismos específicos. Um quinto estágio quiescente chamado G0 corresponde a uma condição de “repouso” onde as células não se dividem.

No início dos anos 90 foi descoberto que rapamicina bloqueava a proliferação de células T impedindo a entrada na fase S (Kay et al., 1991). A entrada das células em G1 para S envolve distintos tipos de ciclinas dependentes de quinases (CDK) e complexos de ciclinas, cada um sendo regulado por proteínas inibidoras de CDK (CDKI) (Sherr and Roberts, 1999), chamadas de p21 (também chamada de CIP1 ou WAF1) e p27 (ou KIP1). Nos seus estados ativos as CDKS fosforilam o produto do gene retinoblastoma (Rb), aliviando seu efeito inibidor no fator de transcrição E2F, necessário para transcrição de proteínas relacionadas a replicação do DNA, promovendo a progressão da fase S.

O tratamento com rapamicina aumenta os níveis do inibidor da ciclina dependente de quinase p27, levando a uma parada na fase G1 do ciclo celular. Entretanto, o papel preciso de mTOR neste processo ainda não é bem

conhecido. Um artigo recente mostrou SGK1 (*serum and glucocorticoid inducible kinase*) como um substrato potencial de mTORC1 que regula a progressão do ciclo celular através de p27 (Hong et al., 2008). mTORC1 induz a fosforilação de SGK1 levando a fosforilação de p27 e sendo sensível a rapamicina (Dunlop and Tee, 2009; Hong et al., 2008).

TOR e doenças

Inibidores de TOR como a rapamicina vêm sendo recentemente usados para o estudo do tratamento de diversas doenças. Os componentes *upstream* e *downstream* de TOR são freqüentemente alterados em um número de tumores humanos. A correlação entre o crescimento do tumor e ativação de mTORC1 sugere que os tumores podem ser sensíveis aos inibidores de mTORC1. A atividade imunossupressora de rapamicina (muito usada em casos de transplantes de órgãos para evitar a rejeição) e seus derivados sugere que essas drogas também possa ser usadas no tratamento de desordens auto-imunes como a artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla e mal de Parkinson (Young and Nickerson-Nutter, 2005). Diabetes tipo 2 e obesidade estão associadas com inabilidade de responderem a insulina. Um mecanismo pelo qual a função de IRS é inibida é via *feedback* negativo de mTOR-S6K, sugerindo também que os inibidores de mTORC1 podem ser efetivos no tratamento de desordens metabólicas envolvendo resistência a insulina. Rapamicina também vem sendo usada para tratamento de doenças cardiovasculares, como na prevenção da reestenose coronária, e também na hipertrofia cardíaca, uma vez que o super crescimento dos cardiomiócitos é dependente da via de sinalização PI3K-mTOR (Inoki et al., 2005a).

Parasitas e estresse

Doenças causadas por protozoários parasitas possuem um grande impacto na saúde mundial. Uma nova idéia terapêutica que vem chamando atenção está centrada em ter como alvo a resposta do parasita a variedade de condições ambientais adversas que encontra ao longo do seu complexo ciclo

de vida, tendo que transitar entre dois hospedeiros. Para isso estes protozoários necessitam de responder as estresses ambientais encontrados para garantir a viabilidade, transmissão e progressão celular da doença (Vonlaufen et al., 2008).

Recentemente uma quinase de eIF2 α foi identificada em *Toxoplasma gondii*, sendo esta ativada sob estresse alcalino e de temperatura, condições de estresse conhecidas por induzir a diferenciação de bradizoítos *in vitro* (Sullivan, Jr. et al., 2004). Em *Plasmodium falciparum* uma proteína quinase de eIF2 (PfK4) com 37% de identidade com o domínio catalítico de quinases HRI de mamíferos também já foi descrita (Mohrle et al., 1997). A habilidade de PfK4 de se ligar ao grupo heme foi proposta como um dos possíveis mecanismos pelos quais o parasita poderia monitorar o ambiente durante o processo de invasão.

Trypanosoma

Este gênero compreende protozoários flagelados, da classe Flagelata, da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae que formam um grupo primitivo de eucariotos. A família Trypanosomatidae engloba diversos parasitas como, por exemplo, o *T. cruzi*, causador da doença de Chagas na América Latina e o *T. brucei*, causador da Tripanosomíase Africana (Nagana em animais e doença do sono em humanos).

Estes protistas unicelulares têm um ciclo de vida complexo alternando entre insetos vetores (triatomíneos para *Trypanosoma cruzi* e a mosca tsé-tsé para *Trypanosoma brucei*). A adaptação as diversas condições ambientais necessita rápidas mudanças na expressão gênica pra preencher os requerimentos metabólicos ou morfológicos para sobrevivência (Cassola et al., 2007). Estes parasitas também possuem a habilidade para sobreviver num amplo numero de condições ambientais conforme eles progridem ao longo dos seus ciclos celulares incluindo extremas flutuações na osmolaridade externa (Rohloff et al., 2003). Muito pouco se sabe sobre os mecanismos que controlam estas transformações e sobre as vias de sinalização celular implicadas. Sabe-se que a diferenciação nas formas infectivas ocorre em

condições de stress, entre elas a falta de nutrientes, como a que existe no final do tubo digestivo do inseto vetor do *T. cruzi*, ou numa célula de mamífero repleta de parasitas, e que as formas diferenciadas entram em programa de baixa atividade transcricional e de síntese protéica (Elias et al., 2001; Marques Porto et al., 2002).

Os tripanosomas também apresentam peculiaridades no mecanismo de controle da expressão gênica e replicação. O controle da expressão gênica nestes parasitas é de fundamental importância para que possam se adaptar às diferentes condições ambientais encontradas pelos diferentes estágios de seu ciclo de vida. A ausência de seqüências promotoras consenso nos tripanossomatídeos sugere que o controle da expressão gênica deva ocorrer a nível pós transcricional, envolvendo o processamento, a estabilidade e/ou a tradução dos transcritos (Teixeira, 1998). Os RNA mensageiros (mRNA) são transcritos como unidades policistrônicas, ou seja, diferentes mensagens em uma mesma unidade de transcrição. O processamento do pré-mRNA envolve a adição na extremidade 5' de uma seqüência líder (SL) de 39 nucleotídeos em um sítio aceptor de *splicing* localizado 30-70 bases a 5' do sítio de início da tradução. Como esta seqüência se origina de outra unidade de transcrição, este processo é denominado *trans-splicing* (2004; Stiles et al., 1999; Ullu et al., 1993). Durante este processo os RNAs precursores são processados pela adição de poli (A) na sua porção 3'. Não foram evidenciados promotores para a RNA polimerase II nas regiões a montante da maioria dos genes que codificam proteínas bem como a presença de potenciais fatores reguladores da transcrição. Assim, a maioria dos genes e até mesmo seqüências não codificadoras são constitutivamente transcritas e o nível de mRNA maduro é regulado pós-transcricionalmente através de estabilização de RNA (Campbell et al., 2003).

Trypanosoma brucei

A Tripanossomíase Africana Humana, também chamada de doença do sono, tem sido ressurgente no Sub-Sahara da África desde os fins dos anos 90 (Barrett, 1999) e hoje 50 milhões de pessoas estão em risco de serem

infectadas com a doença. Embora progressos com controle da doença tenham sido feitos, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em 2005 um número entre 50,0000 a 70,000 casos (2006). A Tripanossomíase Africana Humana é causada por duas subespécies do parasita *T. brucei*, que são transmitidas para o hospedeiro humano por espécies específicas da mosca do gênero *Glossina*, conhecida como tsé-tsé. Ambos os vetores habitam distintas áreas da África, levando a uma divisão epidemiológica dos agentes causadores da doença. No oeste da África, *T.b. gambiense* é transmitido primariamente a humanos pela *G. palpalis*, enquanto no leste da África *G. morsitans* tem um importante papel como vetor transmissor do *T.b. rhodesiense* a humanos, e também a animais domésticos, onde causa uma doença conhecida como Nagana (Fevre et al., 2008). Outra subespécie diretamente relacionada é o *T. brucei brucei*, entretanto esta não é infectiva ao homem e é freqüentemente usada como um modelo para a tripanossomíase em animais de laboratório.

Ciclo de vida

O *T. brucei* apresenta um ciclo de vida digenético. O ciclo de vida envolve formas estágio-específicas que se diferem significativamente em muitos aspectos bioquímicos e metabólicos devido as distintos ambientes em que vivem: no hospedeiro mamífero e no vetor que é a mosca tsé-tsé (Vickerman, 1985).

Quando a mosca pica o hospedeiro as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. brucei* presentes nas glândulas salivares da mosca tsé-tsé são inoculadas na pele e entram na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. No hospedeiro mamífero estas formas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos, que se dividem por fissão binária no sangue, linfa e espaços extracelulares. Uma característica particular do *T. brucei* é que não existem formas intracelulares na tripanossomíase africana. As formas sanguíneas replicativas persistem no hospedeiro mamífero através do processo de variação gênica (Matthews, 2005; McCulloch, 2004). Isto gera a expressão seqüencial de distintas glicoproteínas variáveis de superfície (VSGs) que são ligadas a superfície da membrana por uma âncora de

glicofosfatidilinositol (GPI). O cinetoplasto, que é o DNA mitocondrial nestes organismos, está localizado na porção posterior terminal das células e a atividade mitocondrial está reprimida nestas formas, sendo a geração de energia dependente de reações glicolíticas compartmentalizadas em organelas especializadas chamadas de glicossomos (Parsons, 2004). Tripanossomas proliferam na corrente sanguínea como formas *slender*, sendo estas substituídas por formas *stumpy* não proliferativas, conforme o número de parasitas aumenta (Matthews et al., 2004). Este processo possui dois propósitos. Primeiro, o acúmulo de células paradas na divisão limita o aumento no número de parasitas e assim prolonga a sobrevivência do hospedeiro e aumenta a probabilidade da transmissão da doença. Segundo, a parada uniforme de formas *stumpy* na fase G1 do ciclo celular garante que mudanças morfológicas que ocorrem na transmissão para a mosca *tsé-tsé* podem ser coordenadas com a re-entrada no ciclo celular. O que é importante, pois o posicionamento correto das organelas é crucial para que o ciclo celular das formas procíclicas no intestino da mosca se complete com sucesso (Matthews, 2005).

Após novo repasto sanguíneo pela *tsé-tsé* em hospedeiro infectado, formas procíclicas são geradas, sendo estas capazes de proliferar no intestino da mosca. Formas procíclicas expressam uma capa de superfície distinta das formas sanguíneas; a capa de VSG é perdida e substituída por uma capa composta de prociclinas que também são GPI ancoradas (Roditi and Liniger, 2002). A geração de energia também muda passando a ser de exclusivamente baseada na glicólise para se basear em fosforilação oxidativa na mitocôndria, o que requer ativação metabólica da organela. O cinetoplasto é reposicionado na posição subterminal. Após a proliferação no intestino da *tsé-tsé*, o parasita migra para as glândulas salivares. As formas epimastigotas geradas se aderem à parede da glândula através da membrana do flagelo. Após multiplicação o parasita se diferencia para uma forma não replicativa (tripomastigota-metacíclico), readquirindo a capa de VSG e é liberado no lúmen da glândula salivar em preparação para transmissão no novo hospedeiro mamífero completando o ciclo de vida (Matthews, 2005). Um esquema do ciclo celular está mostrado na Figura 15.

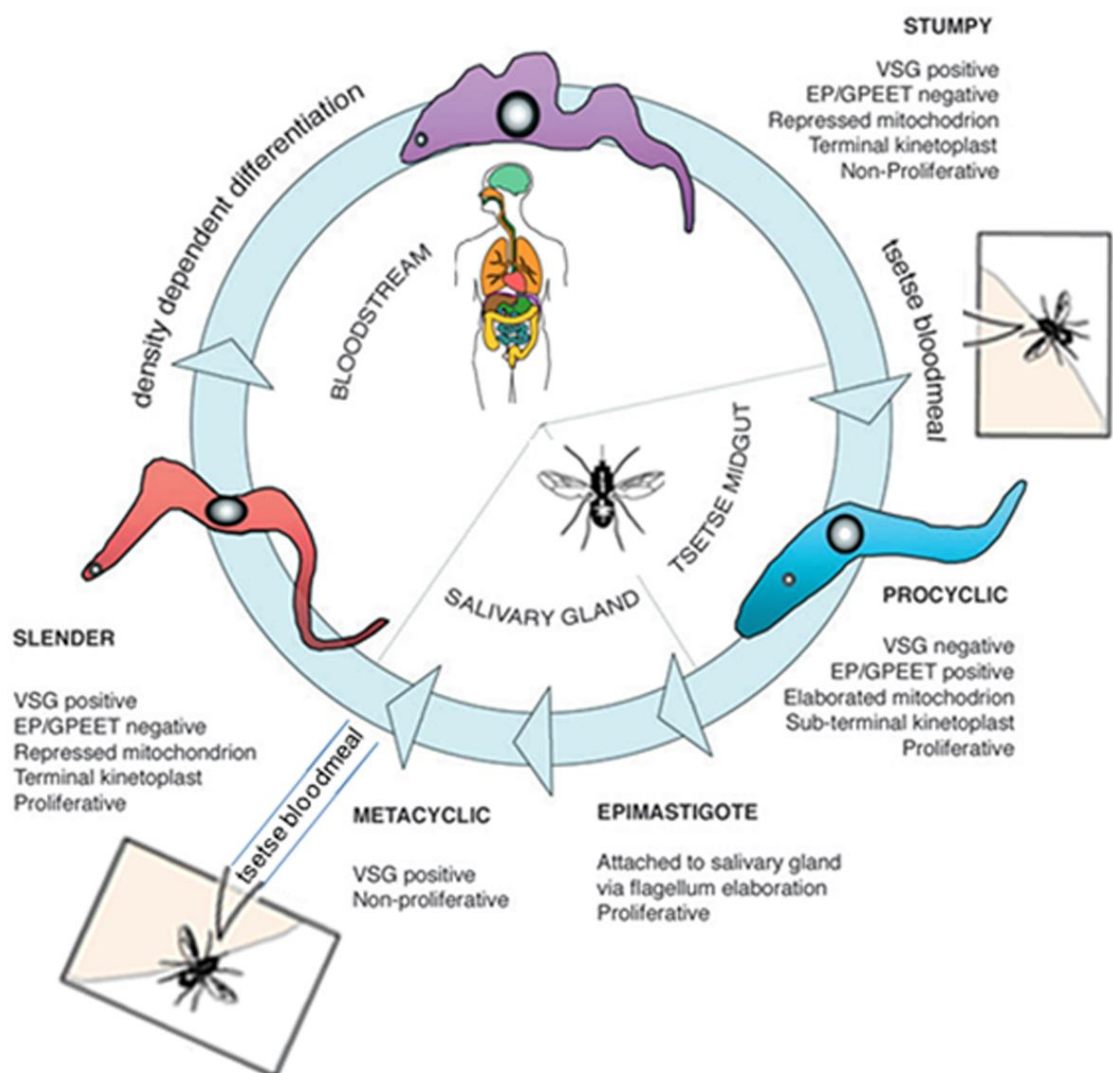


Figura 15. Ciclo de vida do *T. brucei*. As distintas formas do parasita e as características de cada uma delas estão indicadas. Setas indicam os diferentes eventos no ciclo. Modificado de (Matthews et al., 2004).

Nos humanos infectados a doença se desenvolve de um primeiro estágio hemolinfático com sintomas moderados, incluindo febre, dores de cabeça, dores nas articulações, para um segundo estágio onde os parasitas atravessam a barreira sanguínea cerebral e estabelecem a infecção cerebral. No segundo estágio o paciente sofre dores de cabeça severas, perda do sono noturno, desorientação mental, tremores na língua, mãos e pés e sonolência durante o dia. Devido aos sintomas neurológicos da doença do sono freqüentemente ocorrerem tardiamente no curso da doença, ou seja, antes da morte, é sempre assumido que a invasão no sistema nervoso central ocorre tardiamente no curso da infecção. Finalmente, pacientes entram em coma e morrem devido a infecções oportunistas (Gehrig and Efferth, 2008). O tempo do desenvolvimento dos sintomas e a expectativa de vida dependem da subespécie de *T. brucei* com a qual o humano foi infectado. A doença crônica é causada pelo *T. b. gambiense* onde na maioria dos casos o paciente é assintomático por meses ou anos. Quando os sintomas aparecem os parasitas já infectaram o sistema nervoso central. Ao contrário, a infecção aguda é causada pelo *T. b. rhodesiense* em semanas ou meses. Neste caso a doença rapidamente afeta o sistema nervoso central e é fatal em pacientes não tratados (2006;Gehrig and Efferth, 2008).

T. brucei é, além disso, um modelo para estudos de mecanismos envolvendo interações hospedeiro-parasita e aspectos da biologia molecular e celular de protozoários da ordem Kinetoplastidae. Estes parasitas escapam das defesas do hospedeiro mamífero através de atividade imunossupressora (Sternberg, 1998), assim como variação antigênica (Barry and McCulloch, 2001;Pays et al., 2004), e algumas subespécies também desenvolveram resistência a um fator tripanolítico inato (Vanhamme and Pays, 2004). Para estes estudos podem-se realizar ensaios de interferência de RNA, uma ferramenta valiosa e versátil que foi usada neste trabalho, além de estar disponível uma série de outras ferramentas genéticas.

Interferência de RNA (RNAi)

O RNA de interferência ou RNAi foi descoberto há alguns anos como um processo no qual a introdução de uma dupla fita de RNA (dsRNA) em um célula causa a degradação específica do mRNA alvo com a conseqüente inibição da expressão gênica da seqüência específica codificada por esse RNA (Berset et al., 1998b).

Em um curto período de tempo, RNAi mostrou estar presente em diversos organismos eucariotos e tem se tornado um método de escolha para investigar a função de genes em uma variedade de organismos. *T. brucei* foi um dos primeiros organismos no qual a interferência de RNA foi demonstrada. A técnica foi originalmente demonstrada por Gull e colaboradores (Bastin et al., 1998) e por Tschudi e colaboradores (Ngo et al., 1998). Desde então vários grupos geraram linhagens celulares e plasmídeos que integram estavelmente no genoma e expressam RNA de dupla fita (dsRNA) de uma maneira induzível (Shi et al., 2000; Wang et al., 2000; Wickstead et al., 2002; Wirtz et al., 1999; Wirtz and Clayton, 1995).

A via de RNAi em *T. brucei* envolve duas ribonucleases: Dicer e Slicer. Dicer é uma RNase III que gera siRNAs (small-interfering RNAs) a partir de dsRNAs. A enzima contém um domínio PAZ que se liga ao RNA e dois domínios RNase III adjacentes na metade N-terminal da proteína (RNase IIIa e RNase IIIb) que funcionam para degradar dsRNAs em siRNAs. Devido a distância entre os domínios PAZ e RNase III, os siRNAs gerados em *T. brucei* possuem 25 nucleotídeos. Slicer é um membro da família argonauta (AGO) contendo um motivo RNase H que cliva o mRNA. TbAGO1 contém dois domínios: um domínio PAZ semelhante ao encontrado na Dicer, e um domínio PIWI, onde está o sítio ativo da RNase H (Balana-Fouce and Reguera, 2007). Um esquema da maquinaria de RNAi em *T. brucei* está mostrado na Figura I6.

Em tripanosomas, o alvo do RNAi é o mRNA citoplasmático e a degradação pode ser ativada por um RNA dupla fita (dsRNA) sintético inserido nas células por eletroporação ou produzido *in vivo* a partir de transgenes transcritos de promotores da RNA polimerase do fago T7. A expressão pode ser constitutiva ou induzida por tetraciclina utilizando promotores localizados

em ambos os lados do gene para produzir os dsRNA ou ainda através da expressão de um RNA transcrito na forma de “*hairpin*” também por um promotor induzido por tetraciclina (Berset et al., 1998a). Uma vantagem do RNAi sobre o nocaute gênico convencional é que apenas algumas centenas de pares de base da seqüência de um gene são requeridas e o fenótipo é obtido mais rapidamente que a substituição gênica, necessária para gerar o nocaute.

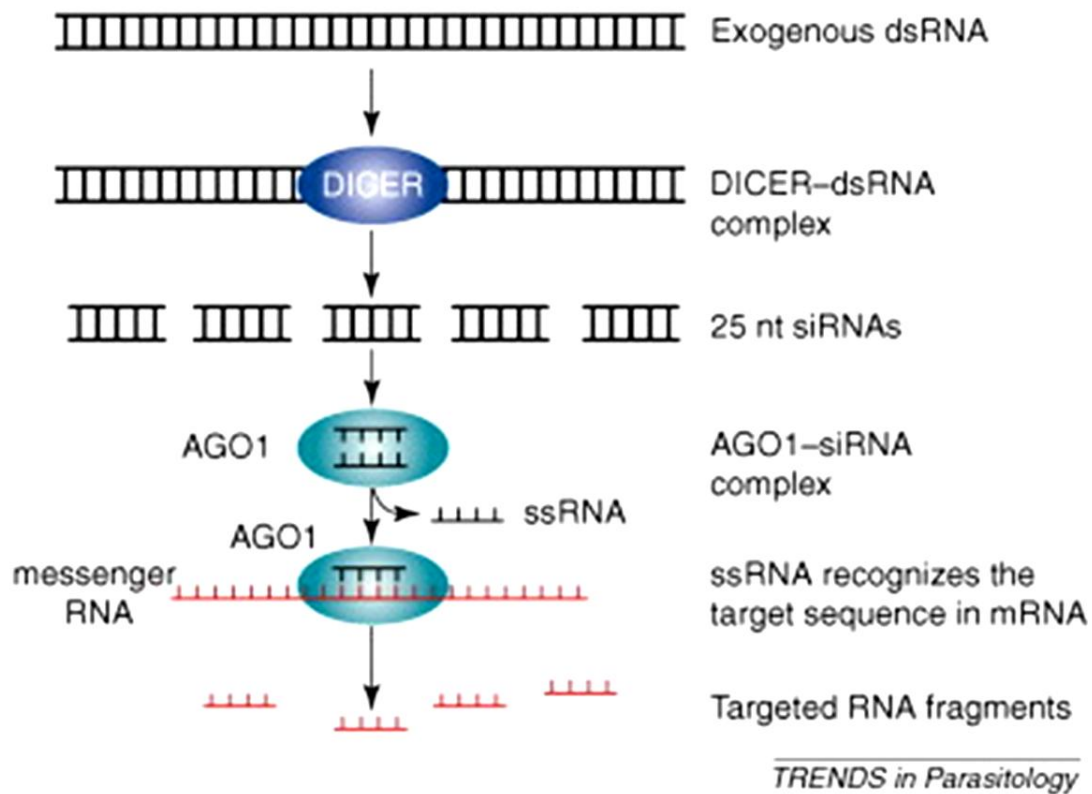


Figura 16. Representação esquemática do sistema de RNAi em *T. brucei*. Reproduzido de (Balana-Fouce and Reguera, 2007).

Trypanosoma cruzi

A Tripanossomíase Americana, também conhecida como doença de Chagas, apesar de ter sido descoberta há 100 anos por Carlos Chagas (Chagas, 1909), permanece como um dos maiores problemas de saúde na América Latina. A doença é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* que tem em seu ciclo de vida uma fase intracelular. A doença de Chagas é transmitida por insetos hematófagos da família Reduvidae, por contato feto-útero durante o

nascimento, por via oral e mais recentemente por transfusão sanguínea em humanos. A organização Pan-americana de Saúde (PAHO) estima que atualmente 7,7 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em 21 países endêmicos desde o sul e sudoeste dos Estados Unidos até a região central da Argentina e do Chile (Sanchez-Sancho et al., 2009).

Ciclo de vida

O ciclo de vida do *T. cruzi* alterna entre um hospedeiro mamífero e o hospedeiro invertebrado, sendo o mais comum o inseto barbeiro do gênero *Triatoma* e *Rodnius*. No inseto hematófago o parasita incorporado junto com o repasto sanguíneo se aloja no intestino médio do barbeiro apresentando-se na forma epimastigota. Nesta fase o parasita replica-se por divisão binária. À medida que os epimastigotas se aproximam da porção final do trato digestivo do inseto diferenciam-se nas formas tripomastigotas-metacíclicos (não replicativas e infectivas). É neste estágio, quando não ocorre mais divisão celular, que o parasita é defecado pelo barbeiro penetrando na pele não íntegra do hospedeiro humano, pelo contato com mucosas, ou pelo tubo digestivo. Uma vez no hospedeiro mamífero, os metacíclicos infectam células dos mais variados tecidos formando um vacúolo parasitóforo. Em seguida, quando a membrana deste vacúolo se rompe os parasitas diferenciam-se em amastigotas, readquirindo a capacidade de proliferação no citossol da célula hospedeira. Ainda no interior de célula, os amastigotas transformam-se em tripomastigotas intracelulares e finalmente em tripomastigotas sanguíneos. Quando as células infectadas se rompem, os tripomastigotas atingem a circulação, podendo invadir novas células ou serem ingeridos pelo barbeiro, onde se transformam em epimastigotas, fechando assim seu ciclo de vida (Burleigh and Andrews, 1995). Um esquema do ciclo de vida do *T. cruzi* está mostrado na Figura 17.

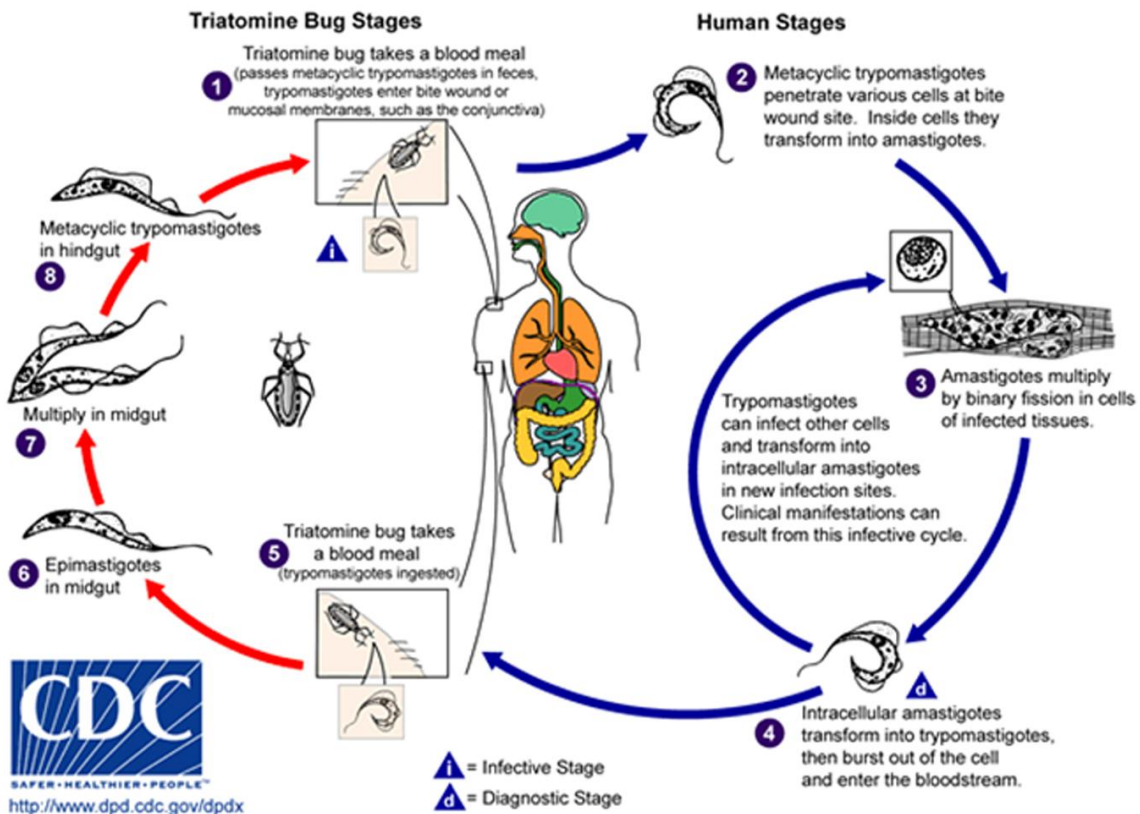


Figura 17. Ciclo de vida do *T. cruzi*. As distintas formas do parasita estão indicadas. Setas indicam os diferentes eventos no ciclo (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>).

Formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos na ausência de multiplicação celular quando as células são submetidas a um “stress” nutricional (Contreras et al., 1985). Esse processo é conhecido como metaciclogênese. No hospedeiro invertebrado, a metaciclogênese ocorre na porção terminal do trato digestivo, onde os epimastigotas aderem à parede do reto antes de se diferenciarem em tripomastigotas metacíclicos (Zeledon et al., 1984). A metaciclogênese pode ser induzida *in vitro* incubando as formas epimastigotas em um meio sintético denominado TAU3AAG, que imita a urina do triatomíneo e induz a adesão dos parasitas ao substrato da mesma forma como ocorre no inseto (Contreras et al., 1985).

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, que se manifesta pouco tempo após a infecção, o paciente apresenta altos índices de parasitemia, sendo os parasitas facilmente encontrados replicando-se em diferentes tecidos e órgãos (Andrade and Andrews,

2005;Soares and dos Santos, 2009). Os sintomas da fase aguda são geralmente suaves, mas crianças e pacientes imunossuprimidos podem desenvolver formas mais severas, com envolvimento cardíaco e encefalomielite. A fase aguda é seguida por uma fase crônica, na qual os pacientes são geralmente assintomáticos e o número de parasitas cai drasticamente (Andrade and Andrews, 2005;Soares and dos Santos, 2009).Cerca de 30% dos pacientes chagásicos desenvolvem a forma crônica sintomática da doença após um período que pode variar de meses a décadas (Andrade and Andrews, 2005). Os sintomas podem incluir cardiomiopatia que pode evoluir para uma cardiomegalia, parada cardíaca e morte. Anormalidades no trato digestivo como megacólon e megaesôfago também são alguns dos sintomas encontrados em pacientes chagásicos crônicos (Prata, 2001).

TOR e *Trypanosoma brucei*

Duas proteínas ortólogas a TOR foram descritas recentemente em *T. brucei*, TbTOR1 e TbTOR2, além de duas outras proteínas com significativa homologia às TORs de leveduras e mamíferos denominadas TbTOR-like 1 e TbTOR-like 2 (Barquilla et al., 2008). Na figura 18 estão mostradas esquematicamente as TbTORs com seus domínios estruturais e os índices de similaridade dos mesmos com relação a mTOR. Já foi demonstrado que o controle do crescimento celular em *T. brucei* é controlado pelas duas TORs através da sinalização por dois distintos complexos de TOR.

Experimentos de co-imunoprecipitação mostraram que TbTOR1 interage com TbRaptor, e também com TbAVO3, sugerindo que as funções básicas de TORC1 são conservadas em *T. brucei*. TbTOR1 controla positivamente o crescimento celular em *T. brucei* através da sinalização do TORC1. As células com reduzidos níveis de TbTOR1 mostram uma localização dispersa de RNA Poll, inibição da síntese protéica e reduzido tamanho celular, assim como demonstrado para outros eucariotos (Honma et al., 2006;Tsang et al., 2003;Zhang et al., 2000).

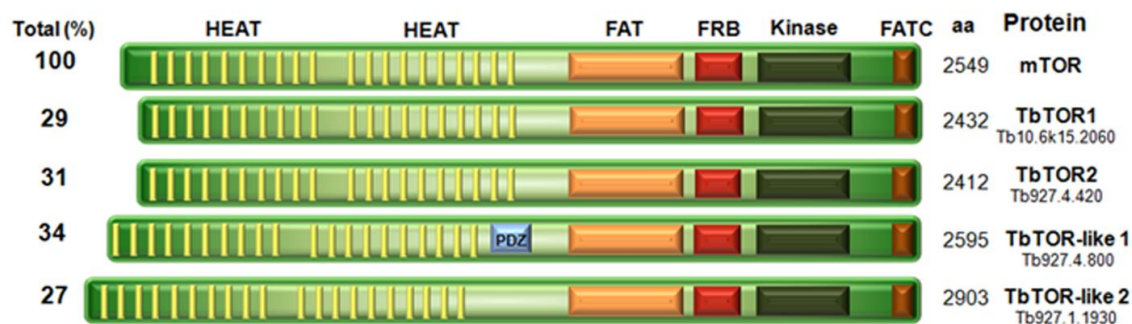


Figura 18. Domínios estruturais de TbTORS e mTOR. A porcentagem de identidade entre as proteínas de *T. brucei* e mTOR estão indicadas a esquerda de cada uma.

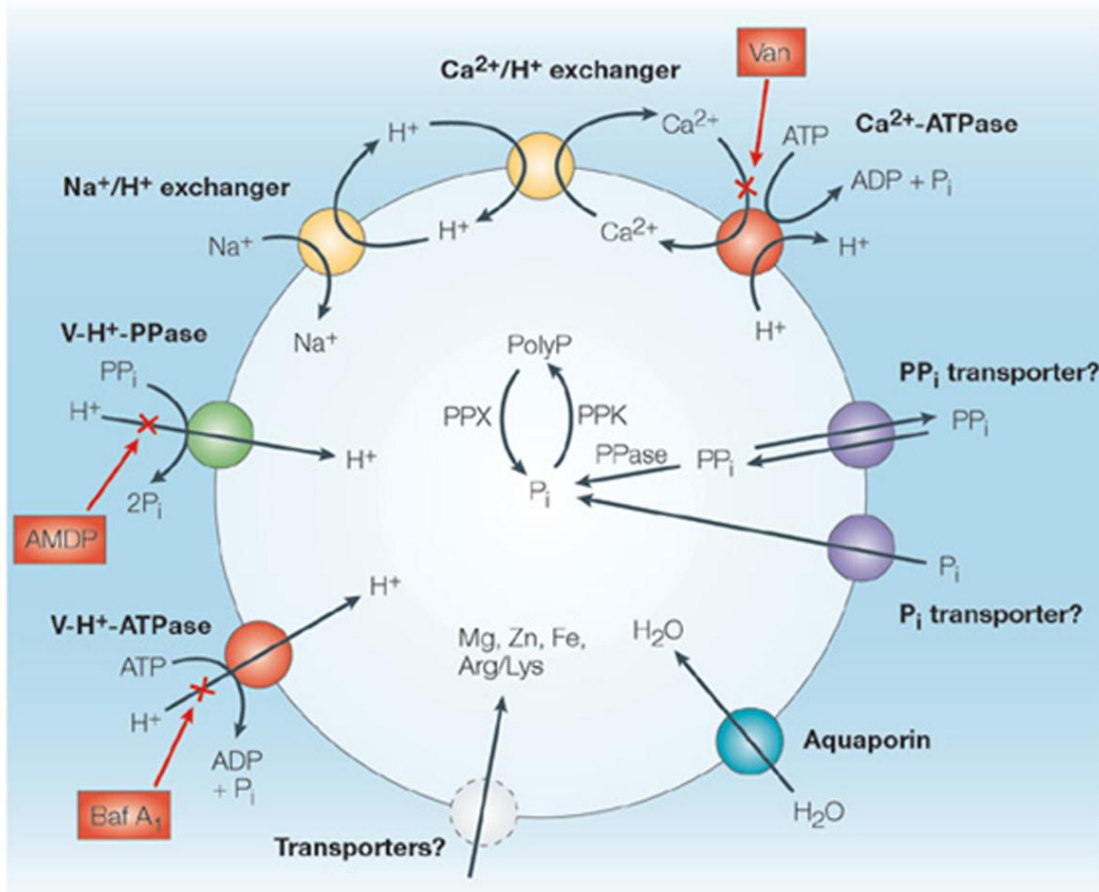
Os mesmos experimentos de co-imunoprecipitação também mostraram que a TbTOR2 se liga a TbAVO3, mas não se liga a TbRaptor, indicando que TbTOR 2 parece agir exclusivamente através da via de sinalização de TORC2. As células depletadas de TbTOR2 não são capazes de segregar suas organelas corretamente durante a citocinese e se tornam células grandes, arredondadas contendo agregados nucleares assim como múltiplos cinetoplastos e flagelos de maneira análoga a que ocorre para TORC2 em células de mamíferos e levedura (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004; Schmidt et al., 1996). Análise ultra-estrutural das células depletadas de TbTOR2 mostrou também uma bolsa flagelar maior neste parasitas (Barquilla et al., 2008). Em tripanossomatídeos o crescimento celular é polarizado pela bolsa flagelar, que é uma região enriquecida em actina e onde ocorre a endocitose e exocitose (Garcia-Salcedo et al., 2004). Depleção de actina em formas sanguíneas de *T. brucei* resulta em defeitos na via endocítica do parasita, gerando células com uma bolsa flagelar maior como o observado para os parasitas sem TbTOR2 (Garcia-Salcedo et al., 2004). Células RNAi para TbTOR2 mostraram que a localização de actina próxima a bolsa flagelar é alterada, resultando num padrão pontuado espalhado por toda a célula. A diminuição da expressão de TbTOR2 também mostrou uma redução na endocitose detectada por fluorescência com concanavalina A. Sendo assim, TbTOR2 parece controlar a organização do citoesqueleto de actina e a endocitose (Barquilla et al., 2008). Mas ao contrário da clássica via de ação da rapamicina que ocorre em outros eucariotos, ensaios de co-imunoprecipitação mostraram que TbFKBP-12-rapamicina se liga exclusivamente a TbTOR2, não

sendo capaz de se ligar a TbTOR1. Sendo assim, foi proposto que a rapamicina inibe a proliferação celular em *T. brucei* através da inibição da sinalização de TORC2 (Barquilla et al., 2008).

TbTORs estão localizadas em distintos compartimentos subcelulares. TbTOR1 (TORC1) está localizada no núcleo e TbTOR2 (TORC2) apresenta um padrão citosólico associado a organelas citoplasmáticas como mitocôndria e retículo endoplasmático (Barquilla et al., 2008). Como não foi detectada interação entre TbTOR-like 1 e TbRaptor ou TbAVO3, é possível que TbTOR-like 1 não esteja envolvida em nenhuma das duas cascatas de sinalização descritas anteriormente (Barquilla et al., 2008). O mesmo ocorreu para TbTOR-like 2. Assim, a presença de TOR like adicionais em *T. brucei* sugere que estas enzimas possam ter outros papéis na sinalização destes parasitas com relação a adaptação a diferentes hospedeiros e ambientes.

T. brucei assim como a maioria dos protistas, apresenta um grande número de organelas ácidas chamadas de acidocalcissomos, que são evolutivamente conservadas desde bactérias até o homem (Docampo et al., 2005). Acidocalcissomos foram primeiro descritos em *T. brucei* (Vercesi et al., 1994) e *T. cruzi* (Docampo et al., 1995) como organelas elétricas densas com um alta concentração de fósforo na forma de pirofosfato (PPi) e polifosfato (Poli P). Outros elementos concentrados na matriz dos acidocalcissomos são: oxigênio, magnésio, cálcio, zinco, ferro e aminoácidos principalmente arginina e lisina (Docampo et al., 2005). A membrana dos acidocalcissomos possui um número de bombas (Ca^{2+} -ATPase, V- H^{+} -ATPase, H^{+} -PPase), trocadores de prótons ($\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$) e canais (aquaporinas) (Figura I9) (Docampo et al., 2005). Estes componentes e a presença de vários transportadores na membrana destas organelas e trocadores de prótons estão implicados no controle do tamanho celular em resposta a diferentes situações osmóticas (Rohloff et al., 2003; Scott et al., 1997; Scott et al., 1998; Scott and Docampo, 2000). Algumas das funções potenciais dos acidocalcissomos são: armazenamento de cátions e fosfato, e sua participação no metabolismo de pirofosfato e polifosfato, homeostasia do cálcio, manutenção da homeostasia do pH intracelular e osmoregulação (Docampo et al., 2005). Poli P é ubíquo por

natureza, sendo encontrado em todos os organismos (Kornberg et al., 1999) e
 interessante Polí P regula a atividade de mTOR (Wang et al., 2003).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 19. Representação esquemática de um acidocalicissomo. Reproduzido de (Docampo et al., 2005).

***Trypanosoma*, eIF2α e quinases**

Muito pouco se sabe sobre o controle da síntese protéica em tripanossomatídeos. O controle da expressão gênica nestes parasitas é de fundamental importância para que eles possam se adaptar às diferentes condições ambientais encontradas pelos diferentes estágios de seus ciclos de vida. O estudo de perfis polissomais dos diferentes estágios do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei* revelou a predominância de monossomos nas formas *stumpy* e procíclicas estacionárias, e de polissomos nas formas *slender* e

proliferativas (Brecht and Parsons, 1998). Este dado reforça a hipótese da existência do controle traducional no desenvolvimento do parasita.

A seqüência ortóloga do fator eIF2 α encontrada no genoma de *T. brucei* apresenta, interessantemente, no lugar da serina 51 conservada em todos os outros organismos eucarióticos analisados, uma treonina. O mesmo resíduo de treonina é encontrado no ortólogo do fator eIF2 α de um outro trypanosomatídeo, a *Leishmania major*. Em levedura foi demonstrado que uma treonina substituindo o resíduo Ser 51 pode ser fosforilada por GCN2, levando à inibição de eIF2B (Lu et al., 1999).

Três quinase putativas de eIF2 foram identificadas em *T. brucei*, TbelF2K1, TbelF2K2 e TbelF2K3 (Moraes et al., 2007). TbelF2K2 que foi a quinase mais estudada no trabalho citado é uma glicoproteína transmembranar e está localizada na região da bolsa flagelar em procíclicos e sanguíneos de *T. brucei*. Baseado nesta localização esta quinase poderia estar envolvida na percepção de proteínas ou no transporte de nutrientes. O domínio catalítico de TbelF2K2 fosforila proteínas eIF2 de leveduras e mamíferos na serina 51. TbelF2K2 também fosforila a forma não usual de eIF2 encontrada em tripanossomatídeos, especificamente na treonina 169, que corresponde a serina 51 em outros eucariotos (Moraes et al., 2007). Enquanto TbelF2K1 parece ser o ortólogo de GCN2, TbelF2K3 não possui homologia com os outros membros da família de quinases de eIF2 com relação ao regiões regulatórias propostas. Seqüências homólogas das três quinases descritas em *T. brucei* estão também presentes nos genomas de *T. cruzi* e *L. major*, havendo dois homólogos potenciais para TbelFK3 em *T. cruzi* (Vonlaufen et al., 2008). Na segunda parte deste trabalho estudamos a localização da quinase eIF2K2 de *Trypanosoma cruzi* (TceIF2K2).

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi tentar entender o papel das proteínas quinases TOR e eIF2 α em *Trypanosoma*.

Objetivos Específicos:

- Determinar a localização celular das proteínas quinases TOR-like1 e TOR2 de *T. brucei* e estudar o efeito da depleção destas proteínas.
- Determinar a localização celular da proteína quinase 2 de eIF2 α durante as diferentes fases do ciclo de vida do *T. cruzi*.

CAPÍTULO I. Caracterização das quinases TOR-like 1 e TOR2 de *Trypanosoma brucei*

Parte 1. A quinase TOR-like 1 está envolvida no controle dos níveis de polifosfato e na manutenção dos acidocalcissomos em *Trypanosoma brucei*.

Artigo: TOR- like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate levels and acidocalcosome maintenance in *Trypanosoma brucei*.

Parte 2. Caracterização da quinase TOR2 de *Trypanosoma brucei*

Parte 1. A quinase TOR-like 1 está envolvida no controle dos níveis de polifosfato e na manutenção dos acidocalcissomos em *Trypanosoma brucei*.

Artigo: TOR- like 1 kinase is involved in the control of polyphosphate levels and acidocalcisome maintenance in *Trypanosoma brucei*.

Autores: Teresa Cristina Leandro de Jesus, Renata Rosito Tonelli, Sheila C. Nardelli, Leonardo Augusto, Maria Cristina M. Motta, Wendell Girard-Dias, Kildare Miranda, Paul Ulrich, Veronica Jimenez, Antonio Barquilla, Miguel Navarro, Roberto Docampo, Sergio Schenkman.

Publicado em *The Journal of Biological Chemistry*, em 21 de Maio de 2010.

Resumo

As quinases TOR (Target of Rapamycin) são proteínas essenciais envolvidas no controle da síntese protéica e na regulação do crescimento celular em eucariotos em resposta a sinais ambientais como nutrientes, estresses e mitógenos. Estudos nas vias de sinalização de mamíferos e leveduras mostraram que a carência de nutrientes inibe a atividade de TOR, o que resulta em uma parada do ciclo celular em G1 e desencadeia um programa de resposta ao stress levando ao bloqueio do início da tradução. A mesma resposta ao stress pode ser observada em células tratadas com rapamicina, um imunossupressor, que se liga a FKBP-12 formando um complexo com TOR.

Por análise de seqüências de *T. brucei* disponíveis no genoma desses parasitas encontramos quatro candidatos para TOR em *T. brucei* (TbTOR1, TbTOR2, TbTOR-like1 e TbTOR-like 2). TbTOR1 e TbTOR2 foram caracterizadas em (Barquilla et al., 2008) em dois complexos TORC1 e TORC2.

Neste trabalho nos focamos na caracterização da proteína TbTOR-like1. Para isso geramos anticorpos contra essa proteína e também realizamos ensaios de RNAi para entendermos um pouco da função da mesma em formas procíclicas e sangüíneas de *T. brucei*.

TbTOR-like 1 não forma os complexos convencionais descritos para TOR e também não se liga a nenhuma das proteínas presentes nestes complexos. Ela, contudo, apresenta um domínio PDZ único não presente em nenhuma TOR já descrita. Nossos dados mostram que a TbTOR-like 1 está localizada em grânulos no citoplasma distintos de outras organelas já caracterizadas. Células com a expressão de TbTOR-like 1 inibida (RNAi) apresentam uma redução na proliferação, gerando parasitas com tamanho aumentado e que permanecem mais tempo na fase S/G2 do ciclo celular. As células nas quais a expressão de TbTOR-like 1 está reduzida também apresentam quantidades aumentadas de vacúolos ácidos, conhecidos como acidocalcissomos envolvidos no controle osmótico deste parasita. Este controle se dá através da presença de polifosfatos e pirofosfato que tem níveis bastante aumentado nas células com menos TbTOR-like 1. Em células normais um choque hiperosmótico causa a localização da proteína que vai do citossol para a periferia celular.

Estes resultados indicam que TbTOR-like 1 poderia ser o link de como estes parasitas conseguem detectar as mudanças osmóticas que sofrem durante o seu ciclo de vida.

TOR-LIKE 1 KINASE IS INVOLVED IN THE CONTROL OF POLYPHOSPHATE LEVELS AND ACIDOCALCISOME MAINTENANCE IN *TRYPANOSOMA BRUCEI* *

Teresa Cristina Leandro de Jesus^{1,2}, Renata Rosito Tonelli¹, Sheila C. Nardelli¹, Leonardo da Silva Augusto¹, Maria Cristina M. Motta³, Wendell Girard-Dias³, Kildare Miranda^{3,4}, Paul Ulrich², Veronica Jimenez², Antonio Barquilla⁵, Miguel Navarro⁵, Roberto Docampo^{2*}, Sergio Schenkman^{1*}

From ¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 04023-062, Brazil, ²Center for Tropical and Emerging Global Diseases and Department of Cellular Biology University of Georgia, Athens, GA 30602, USA, ³Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 21949-900, Brazil, ⁴Diretoria de Programas, Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial, Duque de Caxias, RJ 25250-020, Brazil, ⁵Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, 18100, Spain

Running head: *Trypanosoma brucei* TOR-like 1 kinase

Address correspondence to: Sergio Schenkman, Universidade Federal de São Paulo, R. Botucatu 862 8ºA, 04023-062 São Paulo, SP, Brazil. +55-11-5575-1996. Fax: +55-11-55715877. E-mail: sschenkman@unifesp.br and Roberto Docampo, Center for Tropical and Emerging Global Diseases University of Georgia, 500 D.W. Brooks Drive, Athens, GA 30602, USA + 1-706-542-8104; Fax: 1-706-542-9493; E-mail: rdocampo@cb.uga.edu.

Target of rapamycin (TOR) kinases are highly conserved protein kinases that integrate signals from nutrients and growth factors to coordinate cell growth and cell cycle progression. It has been previously described that two TOR kinases control cell growth in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*, the causative agent of African trypanosomiasis. Here we studied an unusual TOR-like protein named TbTOR-like 1, containing a PDZ domain and found exclusively in kinetoplasts. TbTOR-like 1 localizes to unique cytosolic granules. After hyperosmotic stress the localization of the protein shifts to the cell periphery, differently from other organelle markers. Ablation of TbTOR-like 1 causes a progressive inhibition of cell proliferation, producing parasites accumulating in S/G2 phase of the cell cycle. TbTOR-like 1 knocked down cells have an increased area occupied by acidic vacuoles, known as acidocalcisomes, and are enriched in polyphosphate and pyrophosphate. These results suggest that TbTOR-like 1 might be involved in the control of acidocalcisome and polyphosphate metabolism in *T. brucei*.

African trypanosomiasis or sleeping sickness is a disease caused by the parasitic protist *Trypanosoma brucei* that affects half million people in Sub-Saharan Africa. Transmitted by the tsetse fly vector (*Glossina spp.*), trypanosomiasis represents an important public health problem and has strong impact in economic development of that region. *T. brucei* has a complex life cycle involving different morphological and functional stages. These parasites alternate between insect and mammalian hosts. The adaptation to these diverse environments requires rapid changes in gene expression to fulfill metabolic or morphological changes (1). This parasite also has the ability to survive a wide range of environmental conditions as it progresses through its life cycle including extreme fluctuations in external osmolarity (2).

TOR (Target of Rapamycin) proteins are evolutionary conserved protein kinases that integrate information from energy levels, mitogenic signals, and nutrient supplies regulating cell growth accordingly. Studies on mammalian cells and yeast signaling pathways have shown that nutrient starvation inhibits TOR activities, which results in G1 cell cycle arrest, and triggers a stress response program leading to

a blockade of translation initiation. Similar stress responses can be observed in cells treated with rapamycin, an immunosuppressant drug, which binds to FKBP12, a prolyl-isomerase, forming a complex with the TOR kinase (reviewed in (3) and (4)).

Two distinct aspects of cell growth are regulated by two functionally different TOR kinases in *T. brucei*, termed TbTOR1 and TbTOR2. TbTOR1 and TbTOR2 function in two distinct TOR-containing multiprotein complexes (TORC) conserved along eukaryote evolution, named TORC1 and TORC2. TbTOR1, located in the nucleus, controls the synthesis and accumulation of cell mass through TORC1 signaling whereas TbTOR2, associated with the mitochondrion or endoplasmic reticulum, controls actin cytoskeleton organization and endocytosis through TORC2 (5). Only this latter is sensitive to rapamycin, contrary to what is observed for mammalian cells and yeast, in which TORC1, but not TORC2 is sensitive to rapamycin (6). Surprisingly, two other sequences encode putative kinases with high domain similarity to TOR kinases in *T. brucei*: TbTOR-like 1 and TbTOR-like 2, one of them, TbTOR-like1 is apparently not found in TbRaptor or TbAVO3 containing complexes (5). The presence of additional TOR kinases would suggest that in *T. brucei* these enzymes could have acquired additional roles to those carried out for TORC1 or TORC2, possibly related to their adaptation to different hosts and environments.

In this work we investigated the role of TOR-like 1 protein in *T. brucei*. Among Eukarya TOR kinases, TbTOR-like 1 possesses a unique PDZ domain, which is thought to be involved in protein-protein interactions, mediating binding of a class of submembranous proteins to membrane receptors and ion channels (7). We show that RNAi knockdown produces cells with enlarged acidocalcisomes rich in PP_i, polyphosphate (poly P), which is a polymer of a few to hundreds of phosphate units bound by phosphoanhydride bonds (8). Acidocalcisomes are organelle known to accumulate poly P in *T. brucei* as well as most protists (9). Poly P is known to regulate the activity of mammalian TOR (10) and is

important for cellular adaptation to different stresses (11). Acidocalcisomes were first characterized in *T. brucei* (12) and *Trypanosoma cruzi* (13) and are electron dense membrane-bounded vesicles rich in calcium, sodium, zinc, and magnesium, in addition to PP_i and poly P. These components and several membrane pumps and cation exchangers present in the membrane of acidocalcisomes (14-17) are implicated in the control of cell size in response to different osmotic stresses. We provide evidence that TbTOR-like 1 is implicated in the osmotic responses through control of poly P levels and acidocalcisome size.

Experimental Procedures

Trypanosome cultures and transfections- Procyclic form (PCF) of *T. brucei* strains 427 and 29-13 (18) were maintained at 27°-28°C in SDM-79 medium supplemented with 10% of FBS. For 29-13 strain 50 µg/ml hygromycin and 15 µg/ml of G418 were added to the culture medium to preserve the integrated copies of T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor, respectively. Bloodstream forms (BSF) of *T. brucei* 90-13 (19) were cultured at 37°C at 5 % CO₂ in HMI-9 medium supplemented with 10% FBS and 10% of Serum Plus in the presence of hygromycin (5 µg/ml) and G418 (2.5 µg/ml). Cell densities were determined using a Neubauer chamber, and growth curves were performed using duplicate cultures, diluted to 1 x 10⁶ cells/ml (PCF) or to 1 x 10⁵ cells/ml (BSF) to begin the experiment.

RNAi experiments- For RNAi, a 457 nucleotide fragment of TbTOR-like1 (nucleotides 430-886) of the sequence deposited in the GenBank as XM_839137 was amplified by PCR using primers 5'-CGGATCCCTTCTTGGGAAGCAT TTTGG and 5'-AAGCTTTATACCCTCCAGTC ACG. This sequence encodes a portion of TbTOR like 1 gene, coding fragment 1. For TbTOR2 RNAi, a 436 nucleotide fragment (nucleotides 85-520) from the sequence in the GenBank as XM_839099, we used the primers 5'-GGGATCCGCTGAGGTTGTTAAGCAGGC and 5'-AAGCTTACATGTCGAGAATTCCG. Both pairs of primers incorporated Bam HI and

Hind III sites (underlined nucleotides, respectively) sites at opposite ends of the DNA fragments. Fragments were cloned into pCR 2.1 TOPO (Invitrogen), and subcloned into the Bam HI and Hind III sites of p2T2-177 vector (20). Plasmids were linearized with Not I and introduced into PCF 29-13 and BSF 90-13 by electroporation. Log-phase PCF (2.5×10^7) or BSF (1×10^7) were washed with Cytomix buffer (21) and electroporated with two pulses in the presence of 10 μ g of purified plasmids in a 4 mm cuvette at 1.5 kV voltage and 25 μ F capacitance. After a 24 h recovery in medium, the cells were selected with the addition of 2.5 μ g/ml phleomycin. After selection, the induction of double-stranded RNA was obtained by adding 1 μ g of fresh tetracycline per ml of culture every time the cells were diluted.

Antibodies - Antibodies against Tb TOR-like 1 (fragment 2) were generated by immunizing mice with a recombinant protein expressed in pET 14b containing a 513 bp fragment that was amplified by PCR using the primers 5'-CTCGAGTCTGGTGGCGACGAGGCTG and 5'-AAGCTTAACTTCCCCCCTTGTCGGAG. The recombinant protein was obtained in inclusion bodies and purified by chromatography on nickel chelating resin in the presence of 6 M urea followed by preparative SDS-PAGE. Fragment 3 antibodies were obtained as described (5).

Preparation of whole cell extracts and Western blot analysis- PCF and BSF were harvested by centrifugation (1,500 g for 10 min), washed twice in PBS and resuspended in PBS with 1% SDS and proteinase inhibitors (2 mM benzamide, 1 μ g of leupeptin/ml, 4 μ g of aprotinin/ml, 10 μ g of pepstatin A/ml, 1 μ g of antipain/ml, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM NaF) and broken with 3 cycles of freezing and thawing. The samples were quantified using the BCA protein kit (Pierce), mixed with 2 x SDS-PAGE loading buffer and boiled for 5 min. The cell lysates were resolved by SDS-PAGE and the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad) using a Bio Rad transblot apparatus (Bio-Rad) in 500 mM Tris, 1 M glycine, 0.1% SDS buffer (pH 8), containing

10% methanol. Nonspecific binding was blocked with 5% non-fat milk in PBS-T (PBS containing 0.1% of Tween 20) for 1 h at room temperature. Antibodies were also diluted in PBS-T containing 5% non-fat milk. The membranes were incubated with anti TbTOR-like 1 fragment 2 and 3 at a dilution of 1:300 overnight at 4°C or with anti- α -tubulin monoclonal antibody (Sigma) at a dilution of 1:15,000. After 3 washes of 10 min with PBS-T the membranes were incubated with horseradish peroxidase conjugated goat anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Sigma) diluted at 1:1,500 and 1:10,000 respectively for 1 h. After 3 washes of 10 min each with PBS-T, bound antibodies were detected using a chemiluminescence kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions.

Northern blot analysis- Total RNA was purified from 2×10^8 cells using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Samples of RNA (20 μ g) were separated on a 1% formaldehyde-agarose gel (22) and the gel was stained with ethidium bromide. The RNA was transferred onto a Hybond NX nylon membrane (GE) by capillary transfer and fixed by UV irradiation. The membranes were pre-hybridized and hybridized as described in (23) with probes labeled using the kit Rediprime II random prime labeling system (GE) in the presence of 50 μ Ci of α [32 P]-dCTP (3000 Ci/mmol, New England Nuclear). The tubulin probe used was a fragment of the gene cloned in the pZJM vector (24). The membranes were exposed on a phosphor imaging screen for 24 h and labeling was detected by using Typhoon 9200 image scanner (GE).

Fluorescence experiments- For immunofluorescence, cells were harvested by centrifugation at 1,500 g for 10 min, washed with PBS two times and fixed with 2% *p*-formaldehyde in ice cold-PBS for 20 min and settled onto poly-L-lysine coated slides for 15 min. The fixed cells were then washed 3 times with PBS and permeabilized with 0.3% Triton X-100 for 3 min, washed again with PBS 3 times and blocked with PBS with 3% bovine serum-albumin for 1 h at room temperature. Cells were incubated with mouse anti-TbTOR-like 1 F2 (1:600 dilution), or rabbit anti-HSP70, or rabbit

anti-BiP (both of them gifts from James D. Bangs, University of Wisconsin-Madison Medical School, (25,26) at 1:5,000 dilution), or rabbit anti-aldolase (a gift from Paul A. M. Michels, Université Catholique de Louvain, Belgium, 1:4,000 dilution), or rabbit anti-Dhh1 (a gift from Dr. Samuel Goldenberg, Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Brazil (27), at 1:100), or rabbit anti-TbVP1 (28) at 1:1,000, or rabbit anti-dihydrolipoamide dehydrogenase (DHLADH, provided by Kevin M. Tyler, University of East Anglia, UK, (29) at 1:1,000) all diluted in 3% PBS-BSA for 1 h at room temperature. After 3 washes with PBS the cells were incubated with Alexa-Fluor 546 or 488 conjugated either to goat anti-mouse IgG or Alexa-Fluor 594 conjugated goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) at a dilution of 1:1,000 for 40 min. The cells were washed and counterstained with 1 μ M 4,6-diamidino-2-phenylidole (DAPI) before mounting with Vectashield anti-fading medium (Vector laboratories). Cells were visualized with an Olympus IX-71 inverted fluorescence microscope. Serial images (0.2 μ m) were acquired with a Photometrix CoolSnapHQ charge-coupled device camera driven by DeltaVision software (Applied Precision). Alternatively, serial images (0.2 μ m Z-increment) were collected using a 100 x objective 1.40 NA using the Cell^M software (Olympus Europe) in a motorized Olympus IBX81 microscope. Images were processed by blind deconvolution using Autoquant X 2.1.

For observation of acridine orange accumulation, cells were prepared as described in (28). After incubation with 6 μ M of acridine orange in a buffer containing 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, 50 mM K-Hepes, pH 7.2 (buffer A) for 10 min at 28°C, cells were centrifuged at 2,000 g, resuspended in PBS, adhered to coverslips pre-treated with 0.1% poly-L-lysine and observed on an Olympus IX-71 inverted fluorescence microscope. Images were obtained as above

Cell Cycle Analysis- Cell samples for flow cytometry analysis were prepared as described previously (30). Cells were analyzed with a FACSCalibur using CellQuest software (Becton Dickinson). For image analysis, cells were fixed,

adhered and permeabilized as described above, stained with 10 μ g/ml of DAPI for 10 min and visualized with a fluorescence microscope.

Osmotic stress under constant ionic condition- For osmotic stress under constant ionic strength the following buffers described previously (31) were used: isotonic (64 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.53 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 5 mM HEPES-Na pH 7.4 and 150 mM mannitol - 282 mOsm/l), hypotonic (the same as isotonic but with reduced mannitol concentration to 50 mM - 177 mOsm/l) and hypertonic (the same as isotonic but with increased mannitol concentration to 500 mM - 650 mOsm/l). Samples of 2×10^7 cells were collected, washed twice with PBS and resuspended in 10 ml of isosmotic buffer. To the resuspended cells 500 μ l of the desired buffer (isosmotic, hyposmotic or hyperosmotic) were added and the samples fixed with an equal volume of 4% paraformaldehyde in PBS after the indicated periods of time. The cells were collected by centrifugation, washed once with PBS and adhered to coverslips pre-treated with 0.1% poly-L-lysine for 1 h and processed for immunofluorescence as described above.

Electron Microscopy- For thin section images, trypanosomes were collected and fixed with 2.5% glutaraldehyde, 4% freshly prepared paraformaldehyde and 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) on ice for 1 h and processed as described (32). Images were obtained in a Zeiss EM 902 microscope. For imaging whole cells, PCF were washed twice with filtered buffer A and directly applied to Formvar-coated grids as described previously (33). The images were observed in an energy-filtering Zeiss EM 902 microscope. The number of acidocalcisomes were obtained as in (33).

Quantification of PP_i, long-chain and short-chain poly P- PP_i and poly P were extracted from 2.5×10^7 PCF and 1×10^8 BSF collected by centrifugation and washed 3 times with buffer A (described above). For short-chain poly P and PP_i extraction the cell pellet was resuspended in 100 μ l of buffer A and 200 μ l of ice-cold 0.5 M perchloric acid and left on ice for 30 min. The suspension was centrifuged at 10,000 g for 1 min and the supernatant was neutralized by the

addition of 0.72 M KOH / 0.6 M KHCO₃. Precipitated KClO₄ was removed by centrifugation at 10,000 g for 1 min and the supernatant was used for measuring phosphorus and PP_i released. Long-chain poly P was extracted as described in (33).

Enzymatic assays of poly P and PP_i were performed in triplicate. Assays for short chain poly P were incubated at 35° C for 30 min in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM ammonium acetate, 5 mM magnesium acetate containing the sample and >50 U yeast exopolyphosphatase (34). Background phosphate contamination of each sample was measured in triplicate wells not containing the exopolyphosphatase, and positive control reactions were included on each plate containing a final concentration of 20 μM sodium triphosphate. Reactions were stopped by addition of freshly mixed, malachite green reagent (3 parts 0.045% malachite green and 1 part 4.2% ammonium molybdate/4 M HCl), and absorbance at 660 nm was immediately read on a M2e microplate spectrophotometer (Molecular Devices). Release of phosphate from PP_i was performed for 10 min at 35°C in 50 mM Tris (pH 7.5) containing 5 mM MgCl₂ and 0.1 U of yeast pyrophosphatase (Sigma). Background phosphate controls (no pyrophosphatase) and positive control (20-25 μM potassium pyrophosphate) wells were included in triplicate. Phosphate was measured with malachite green as described above. On all occasions, standard curves of potassium phosphate were included on each plate. Both phosphate content released from poly P and pyrophosphate were normalized to reaction yield as determined by positive controls. Calculations of concentrations of short- and long-chain poly P and PP_i were based in the number of cells used in the extraction (amount of P_i or PP_i / 10⁶ cells).

RESULTS

TbTOR-like 1 sequence contains an unusual PDZ domain. *T. brucei* genome database contains sequences for 4 open reading frames encoding for proteins with sequence similar to mammalian TOR: TbTOR1, TbTOR2, TbTOR-like 1 and TbTOR-like 2. TbTOR1 and TbTOR2

proteins were previously described by Barquilla *et al* (5). TbTOR-like 1 gene is located in chromosome 4 and has 7788 base pairs in length encoding for a 291.11 kDa protein with an isoelectric point of 5.92. The predicted protein contains the conserved sequence domains found in TbTOR1/2, ScTbTOR1/2 and mTOR: HEAT repeats (repeats of an amino acid sequence motif that was first identified in Huntingtin, in Elongation factor 3, in the regulatory subunit of PP2A and in the TOR, which function in transport processes) (35), the FAT domain (found in FRAP, ATM and TRRAP proteins involved in protein-protein interactions) (36), the FKBP12-rapamycin binding domain (FRB) (37), the kinase domain (catalytic domain with homology to phosphatidylinositol kinases), and the FATC domain (found at the extreme carboxyl terminus, always in combination with the FAT domain (36) (Fig. 1A). The main difference between TbTOR-like 1 domain structure and the canonical structure of the TOR kinases is the presence of a PDZ domain (38) between the HEAT repeats and FAT domain.

Subcellular localization of TbTOR-like 1. PDZ domains are usually present in proteins that interact marginally with membranes. Thus, we investigated the subcellular localization of TbTOR-like 1. In immunoblots anti-F2 and -F3 antibodies reacted with a band of 291 KDa, the expected size for TbTOR-like 1 (Fig. 1B). Immunofluorescence using anti-F2 antibodies revealed a granular pattern, which is distributed through the cytosol in PCF and BSF (Fig. 1C). To initially confirm the cellular localization of TbTOR-like 1, RNAi experiments were made in procyclic forms using a vector that generates double strand RNA from a single construct containing the gene segment corresponding to F1. Northern blot analysis shows that RNAi specifically ablated the expression of TbTOR-like 1 (Fig. 2A). Similarly, the levels of protein recognized by immunoblots using anti-F2 or F3 antisera against TbTOR-like 1 decreased. Fig. 2B shows the results for anti-F2, but identical decreases were observed when using anti-F3 antibodies. Knockdown of TbTOR-like 1 is already observed 24 h after RNAi induction with tetracycline, without an immediate effect in cell

growth for PCF (Fig. 3A), or BSF (Fig. 3B). Importantly, the immunofluorescence analysis, showed a convincing decrease in labeling in both PCF and BSF (Fig. 3C), confirming the cellular localization of TbTOR-like 1.

We found that TbTOR-like 1 is in the cytosol and is not associated with major organelles. Its labeling pattern show some colocalization with anti-HSP70 (a cytosolic marker), but differs significantly with respect of anti-aldolase (a glycosomal marker), anti-Dhh1 (a P-body marker), anti-TbVP1 (an acidocalcisome marker), anti-DHLADH (a mitochondrial marker) and anti-BiP (an endoplasmic reticulum marker) localization (supplementary Fig. S1). Cell fractionation studies revealed that, differently from TbTOR2, which is associated with the parasite mitochondria, or with the ER (5), TbTOR-like 1 is found in the soluble fraction and not associated with membranous cell compartments (supplementary Fig. S2).

Phenotypic analysis of TbTOR-like 1 RNAi cell line. It can be noted from Figs. 3A and B that RNAi of TbTOR-like 1 progressively cellular decreased proliferation while protein expression disappears rapidly in PCF and BSF. The effect of proliferation is more pronounced several days following knockdown. In addition, TbTOR-like 1 depleted PCF (but not BSF) appear larger than the non-induced controls, (Fig. 3C, DIC). Morphometric analysis of a large number of cells confirmed this observation. The projected area taken from 2D images revealed that RNAi induced cells were larger than the non-induced controls (Fig. 4).

TbTOR-like 1 depleted PCF are arrested in S/G2 phase of the cell cycle. The increased size of cells lacking TbTOR-like 1 could be due to a delayed progression in the cell cycle, which would also explain the decrease in proliferation rate. Therefore, the cellular DNA content per cell was quantified by flow cytometry after propidium iodide staining, 4 days after RNAi induction with tetracycline. As shown in Fig. 5A the number of PCF in G1 phase of the cell cycle was reduced concomitantly with an increase of cells in the S phase. No effect of tetracycline was observed in control cells (29-13 procyclics) as

shown in Fig. 5B. We also quantified the number of cells containing one nucleus and one kinetoplast (1N1K), 1N2K, 2N2K and abnormal cells (0N1K) in the population using DAPI staining. Cells with 1 nucleus and an elongated kinetoplast corresponding to cells in S phase were also counted as 1N2K. A decrease in 1N1K cells was found with an increased number of other patterns when comparing depleted TbTOR-like 1 cells with control cells, confirming the cell cycle delay with increase in S/G2 (1N2K) cells observed by FACS analysis (Fig. 5C).

Ablation of TbTOR-like 1 increases the size of acidocalcisomes in electron microscopy images. RNAi induced and non-induced populations of PCF were fixed and processed for transmission electron microscopy. As shown in Fig. 6A, knocked down cells had an apparently higher number of electron-dense vesicles when compared to control cells. These electron-dense vesicles appear to correspond to acidocalcisomes, which appear in conventional electron microscopy as electron dense or partially empty vesicles (32). In normal cells the electron density corresponds to cations associated with PP_i and poly P, and these components are lost during the conventional processing for transmission electron microscopy (9,32). Indeed, more stained acidocalcisomes were detected in TbTOR-like 1 depleted PCF when compared to control cells fixed and analyzed by energy-filtering transmission electron microscopy (Fig. 6B), a suitable method to observe acidocalcisomes (32). Quantitative analysis indicated that although the number of acidocalcisomes did not increase significantly when the total population of cells was analyzed, the volume, and area occupied by acidocalcisomes increased significantly (Table I). RNAi of TbTOR-like 1 also promoted a larger accumulation of acridine orange, a weak base that is incorporated into acidic compartments, such as the acidocalcisomes (Fig. 6C).

Ablation of TbTOR-like 1 increases polyphosphate and pyrophosphate levels. Taking into account that knockdown of TbTOR-like 1 seems to increase the size of acidocalcisomes we determined the levels of short- and long-chain poly P and PP_i . As shown in Figs. 7A and C, the

knockdown cells (PCF and BSF) contained higher levels of both types of poly P when compared to control (non-induced) cells, although the increase in short-chain poly P was more evident than that of long-chain poly P. The levels of PP_i also increased significantly when RNAi was induced (Figs. 7B and 7D). In contrast to these results, RNAi of TbTOR2 did not significantly affect the levels of short-chain poly P (supplementary Fig. S3), as compared with control (non-induced) cells. Previous transmission electron microscopy data did not reveal the presence of more electron dense vesicles in TbTOR2 or TbTOR1 knockdowns (5). These results indicate that acidocalcisome size and poly P levels are specifically increased in cells lacking TbTOR-like 1 kinase.

Localization of TbTOR-like 1 change after hyperosmotic stress. Acidocalcisomes are organelles involved in osmoregulation (9,39). Therefore, the increase in acidocalcisomes and poly P levels in cells having less TbTOR-like 1 could therefore suggest that this kinase participates in a signaling cascade affecting acidocalcisome function. To obtain some insight about a possible mechanism of signaling activation by TbTOR-like 1 we subjected PCF (strain 29-13) to hyposmotic and hyperosmotic shocks under constant ionic conditions. Subsequently the cells were fixed and processed for immunofluorescence with anti-TbTOR-like 1 antibody. Upon hyposmotic shock the cells rapidly swell and then recover. Upon hyperosmotic stress cells rapidly shrink and then recover their volume. These processes occur in less than 5 min. As shown in Fig. 8 only under hyperosmotic conditions TbTOR-like 1 granules have a distinct distribution, becoming localized aligned at the cell periphery, while the localization of TbTOR-like 1 remains spread through all the cytosol in control or hyposmotic conditions. The re-localization pattern of TbTOR-like 1 was not observed for aldolase, a glycosome marker (supplementary Fig. S4A), and BiP, an endoplasmic reticulum marker (supplementary Fig. S4B). A partial re-localization to the surface was observed for DHLADH mitochondrial marker (supplementary Fig. S4C).

A possible link between the hyperosmotic stress and polyphosphate was proposed earlier based on a previous observation that adding hyperosmotic solution to *Trypanosoma cruzi* increased the levels of poly P (11). We found that cultivating *T. brucei* in medium supplemented with 0.3 M mannitol reduced growth and also increased poly P levels (Fig. 9A and B). Importantly, upon RNAi induction for TbTOR-like 1 poly P starts to increase as soon after induction, before growth arrest (Fig. 9C and D). As shown before for *T. cruzi*, poly P is high in the lag phase and decreases when the cells grow exponentially.

These results would suggest that cells lacking TbTOR-like 1 would be more sensitive when growing at higher osmolarity. Indeed, this seems to be the case. In the presence of mannitol the effect of knocking down TbTOR-like 1 occurs earlier than in regular medium (Fig. S5).

These results suggest that TbTOR-like 1 kinase participates in the control of osmotic stress response as a consequence of changes in the poly P and acidocalcisomes.

DISCUSSION

In this study we characterized a novel type of TOR-like protein present in *T. brucei* and not previously found in any other Eukarya. Ablation of this TbTOR-like by RNAi leads to a progressive inhibition of cell proliferation, with an increase in the size of acidocalcisomes, and in the content of poly P and PP_i . This protein kinase is found in cytosolic granules dispersed through the cytosol, which specifically re-localizes towards the cell periphery under hyperosmotic conditions. Hyperosmotic conditions increase poly P levels, arrest cell growth, and sensitize parasites to TOR-like 1 dependency. These results suggest a link between TOR-like kinase 1 signaling pathway and cell responses to osmotic stresses.

TbTOR-like 1 is expressed as a cytosolic 291 kDa protein in BSF and PCF of *T. brucei*, and in both forms is required for normal cell growth. The absence of this protein kinase seems to

affect proliferation after several rounds of cell division, suggesting that the growth defect is due to a cumulative effect. A parallel accumulation of poly P and PP_i inside acidocalcisomes, which increase in size and become heavily stained at the electron microscopy level, is observed when compared to control cells. Cellular proteins remain at the same level as judged by quantitative profiles of 2D gel electrophoresis (data not shown).

It is possible that the accumulation of poly P in acidocalcisomes is a consequence of the growth arrest determined by TbTOR-like 1 knockdown. In this regard, conditions that favor growth arrest, such as hyperosmotic stress, also results in increased poly P synthesis, and in potentiation of the effects of TbTOR-like 1 knockdown (Fig. 9). The mechanism by which the absence of TbTOR-like 1 leads to an increased content of poly P is presently unknown but it could be due to a direct effect on enzymes affecting the turnover of poly P, as occurs in bacteria submitted to amino acid starvation (40). Amino acid starvation in bacteria leads to coupled cessation of protein synthesis and stable RNA synthesis, a process known as the ‘stringent response’, that is accompanied by accumulation of poly P. Poly P accumulation is mediated by the alarmone guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) synthesis, which ultimately inhibits an exopolyphosphatase, an enzyme that degrades poly P (40). Together with the cessation of nucleic acid synthesis and continued assimilation of Pi from the medium this results in large accumulations of poly P. Although ppGpp has been found in plants (41) it is not known whether it is present in early branched eukaryotes. In support of the notion that TOR kinases could be involved in poly P metabolism, it has been shown that poly P stimulates mammalian TOR kinase activity *in vitro* and most likely *in vivo* (42). It is important to mention that knockdown of *T. brucei* TOR2 kinase does not cause poly P accumulation, although a substantial growth inhibition and increase in the cell size occurs (5), indicating that poly P accumulation is specific for TbTOR-like 1 knockdown.

Poly P has been shown to be essential for adaptation to various stresses and for survival of bacteria in stationary phase (43-45). Similar studies have been reported in eukaryotic cells, such as yeast (46), fungi (47), and algae (48). It has long been recognized that the poly P content is low during rapid growth and increases under conditions of nutritional imbalance unfavorable for growth in different organisms from bacteria to yeast (49). Knockdown of TbTOR-like 1 might have a similar phenotype to that of nutritional imbalance.

Studies of TOR signaling in yeast, *Drosophila*, and mammals have demonstrated that TOR kinases participate directly in cellular growth and size control. In these organisms ablation of TOR leads to a decrease in cell size by several mechanisms (50,51). One mechanism appears to involve a balance between signaling pathways interfering with cell cycle control and growth (52). In the case of TbTOR-like 1, knocked down PCF are larger than control cells, similarly to what is observed for TbTOR2, but opposite to the TbTOR1 knockdown phenotype (5). In addition, when mammalian TORC1 and *T. brucei* TOR1 expression are reduced, cells arrest in G1 phase of cell cycle (5,53), while TbTOR-like 1-depleted cells accumulate at the S/G2 phase. The increased amount of zoids (ON1K) found here was also observed for TbTOR-like 2 knocked down cells (53). However, in this case cells also accumulate in the G1 phase as found for TbTOR1 RNAi. In contrast, TbTOR2 knocked down cells accumulate in G1 with the formation of multinucleated and multiflagellated cells (5). Differently from TbTOR-like 1, TbTOR2 RNAi resulted in multinucleated cells with an enlarged flagellar pocket without appearance of dense acidocalcisomes. TbTOR1 RNAi causes autophagy events without appearance of dense acidocalcisome granules. All these findings indicate that TOR kinases of *T. brucei* acts through different mechanisms and might have different substrates and/or activators, probably affecting growth, proliferation and cell cycle control at different points as proposed earlier (54,55).

Decrease of TbTORs expression also affects differently PCF and BSF, which may reflect

differences observed in cell cycle control between these stages of the parasite (56). For example, PCF form multinucleated cells, zoids and other abnormal cell types when TbTOR 1 expression is reduced (53), while in BSF these effects are not observed (5). When TbTOR-like 2 expression is reduced, cells accumulate at S/G2 in PCF, generating zoids and multinucleated cells, while no effect is evident in BSF when the same protein is ablated (53). In the present case PCF delay in S/G2 is more evident than in BSF (data not shown). The mechanism by which TbTOR-like 1 and other TbTOR affect *T. brucei* cell cycle requires further investigation. Nevertheless, one possibility is that a delay in S/G2 phase might occur by inhibition of *de novo* nucleotide synthesis due to decrease of free phosphate resulting from the accumulation of poly P. Alternatively, the delay in the cell cycle could be directed by a similar mechanism found in the fission yeast, in which TOR 1 affects the MAP kinase control of cell cycle progression (52). In this sense, it is relevant that the osmotic stress in *Schizosaccharomyces pombe* cross talk with TOR signaling (57). A similar cross talk might occur for TbTOR-like 1.

One unique characteristic of TbTOR-like 1 is the presence of the PDZ domain. This domain is involved in the scaffolding and assembly of multi-protein complexes at various subcellular sites, which suggest their participation in several aspects of cellular physiology such as receptor or channel clustering, cell junction formation, and intracellular signaling events (58). Our results unequivocally demonstrate that TbTOR-like 1 has a cytosolic distribution in dispersed granules as RNAi knockdown abolishes immunofluorescence labeling. This result is compatible with the formation of multi-protein complexes between the kinase and other unidentified proteins and this is supported by the fact that upon gel filtration of soluble extracts, TbTOR-like 1 eluted with sizes corresponding to proteins from 200 to 650 kDa (data not shown). Moreover, TbTOR-like 1 does not co-localize with any of the markers used to label specific

organelles, suggesting that it might form a new type of structure. Perhaps the presence of PDZ domain is involved in this different type of cytosolic complex. In contrast, TbTOR 1 is nuclear and TbTOR 2, that lacks PDZ domain, seems to be associated with the ER, or the mitochondrial membrane (5), as found for yeast and mammalian TORC complexes (59-63). It is important to mention that the identification of other partners of TbTOR-like 1, whether it affects translation, and its substrates, as well as demonstration of kinase activity will be necessary to characterize this protein.

A relevant finding of this work is that hyperosmotic stress changes momentarily the localization of TbTOR-like 1. Immunofluorescence labeling revealed that it becomes clustered near the parasite surface, differently from glycosomes, ER and stress granules. Some cellular reorganization of the single trypanosome mitochondrion is noticed, suggesting that it could participate in the same signaling pathway. As PDZ domains are found in several types of dynamic protein-protein interactions (64), it is tempting to speculate that changing protein localization during osmotic stress is important for TbTOR-like 1 function. A next step would be to identify proteins that interact with the PDZ domain of TbTOR-like 1.

Taken together, the present results characterize a new type of TOR-like enzyme, which might have an important adaptive role in *T. brucei*. As we could not access all parasite stages found in the insect forms, or during transition between insect and mammalian host, it is possible that TbTOR-like 1 would have other specific roles in addition to be able to detect nutritional variations. In these different situations, *T. brucei* must be able to detect changes in osmolarity to modify its cell structure and metabolism. Several evidences indicate that acidocalcisomes are effectors of these modifications through the balance of poly P and PP_i complexed with cations (9), but much less is known about how cell signals promote osmotic compensations. TbTOR-like 1 could be this link.

REFERENCES

1. Gull, K. (2001) *Int.J.Parasitol.* **31**, 443-452
2. Vieira, L. L. (1998) *Biochim.Biophys Acta* **1376**, 221-241
3. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) *Cell* **124**, 471-484
4. Jacinto, E. and Hall, M. N. (2003) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 117-126
5. Barquilla, A., Crespo, J. L., and Navarro, M. (2008) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **105**, 14579-14584
6. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M. N. (2002) *Mol.Cell* **10**, 457-468
7. Kornau, H. C., Seeburg, P. H., and Kennedy, M. B. (1997) *Curr.Opin.Neurobiol.* **7**, 368-373
8. Kornberg, A., Rao, N. N., and Ault-Riche, D. (1999) *Annu.Rev.Biochem.* **68**, 89-125
9. Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and Moreno, S. N. (2005) *Nat.Rev.Microbiol.* **3**, 251-261
10. Wang, L., Fraley, C. D., Faridi, J., Kornberg, A., and Roth, R. A. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 11249-11254
11. Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., and Docampo, R. (2001) *J Biol Chem* **276**, 26114-26121
12. Vercesi, A. E., Moreno, S. N., and Docampo, R. (1994) *Biochem.J.* **304**, 227-233
13. Docampo, R., Scott, D. A., Vercesi, A. E., and Moreno, S. N. (1995) *Biochem.J.* **310**, 1005-1012
14. Rohloff, P., Rodrigues, C. O., and Docampo, R. (2003) *Mol.Biochem.Parasitol.* **126**, 219-230
15. Scott, D. A., de Souza, W., Benchimol, M., Zhong, L., Lu, H. G., Moreno, S. N., and Docampo, R. (1998) *J.Biol.Chem.* **273**, 22151-22158
16. Scott, D. A., Docampo, R., Dvorak, J. A., Shi, S., and Leapman, R. D. (1997) *J.Biol.Chem.* **272**, 28020-28029
17. Scott, D. A. and Docampo, R. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 24215-24221
18. Wirtz, E. and Clayton, C. (1995) *Science* **268**, 1179-1183
19. Wirtz, E., Leal, S., Ochatt, C., and Cross, G. A. (1999) *Mol.Biochem.Parasitol.* **99**, 89-101
20. Wickstead, B., Ersfeld, K., and Gull, K. (2002) *Mol.Biochem.Parasitol.* **125**, 211-216
21. Clayton, C. E., Estevez, A. M., Hartmann, C., Alibu, V. P., Field, M., and Horn, D. (2005) *Methods Mol.Biol.* **309**, 39-60
22. Fourney, R. M., Miyakoshi, J., Day, R. S. I., and Paterson, M. C. (1988) *Focus* **10**, 5-7
23. Church, G. M. and Gilbert, W. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 1991-1995
24. Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E., and Englund, P. T. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 40174-40179
25. McDowell, M. A., Ransom, D. M., and Bangs, J. D. (1998) *Biochem.J.* **335**, 681-689
26. Bangs, J. D., Uyetake, L., Brickman, M. J., Balber, A. E., and Boothroyd, J. C. (1993) *J.Cell Sci.* **105**, 1101-1113

27. Holetz, F. B., Correa, A., Avila, A. R., Nakamura, C. V., Krieger, M. A., and Goldenberg, S. (2007) *Biochem.Biophys.Res. Commun.* **356**, 1062-1067
28. Lemercier, G., Dutoya, S., Luo, S., Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., Baltz, T., Docampo, R., and Bakalara, N. (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 37369-37376
29. Schoneck, R., Billaut-Mulot, O., Numrich, P., Ouaiissi, M. A., and Krauth-Siegel, R. L. (1997) *Eur.J.Biochem.* **243**, 739-747
30. Hammarton, T. C., Clark, J., Douglas, F., Boshart, M., and Mottram, J. C. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 22877-22886
31. Kocic, I., Hirano, Y., and Hiraoka, M. (2001) *Cardiovasc.Res.* **51**, 59-70
32. Miranda, K., Docampo, R., Grillo, O., and de Souza, W. (2004) *Protist.* **155**, 395-405
33. Fang, J., Rohloff, P., Miranda, K., and Docampo, R. (2007) *Biochem.J.* **407**, 161-170
34. Ruiz, F. A., Luo, S., Moreno, S. N., and Docampo, R. (2004) *Microsc.Microanal.* **10**, 563-567
35. Andrade, M. A. and Bork, P. (1995) *Nat.Genet.* **11**, 115-116
36. Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E. L. (2000) *Trends Biochem.Sci.* **25**, 225-227
37. Choi, J., Chen, J., Schreiber, S. L., and Clardy, J. (1996) *Science* **273**, 239-242
38. Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E., and Blake, D. J. (1997) *Bioessays* **19**, 469-479
39. Rohloff, P., Montalvetti, A., and Docampo, R. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 52270-52281
40. Brown, M. R. and Kornberg, A. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **101**, 16085-16087
41. Takahashi, K., Kasai, K., and Ochi, K. (2004) *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **101**, 4320-4324
42. Wang, L., Fraley, C. D., Faridi, J., Kornberg, A., and Roth, R. A. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 11249-11254
43. Ault-Riche, D., Fraley, C. D., Tzeng, C. M., and Kornberg, A. (1998) *J Bacteriol.* **180**, 1841-1847
44. Rao, N. N., Liu, S., and Kornberg, A. (1998) *J Bacteriol.* **180**, 2186-2193
45. Rao, N. N. and Kornberg, A. (1996) *J Bacteriol.* **178**, 1394-1400
46. Castro, C. D., Meehan, A. J., Koretsky, A. P., and Domach, M. M. (1995) *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 4448-4453
47. Yang, Y. C., Bastos, M., and Chen, K. Y. (1993) *Biochim.Biophys Acta* **1179**, 141-147
48. Pick, U. and Weiss, M. (1991) *Plant Physiol* **97**, 1234-1240
49. Harold, F. M. and Harold, R. L. (1965) *J Bacteriol.* **89**, 1262-1270
50. Jacinto, E. and Hall, M. N. (2003) *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **4**, 117-126
51. Wang, X. and Proud, C. G. (2009) *Trends Cell Biol* **19**, 260-267
52. Petersen, J. (2009) *Biochem Soc.Trans.* **37**, 273-277
53. Monnerat, S., Clucas, C., Brown, E., Mottram, J. C., and Hammarton, T. C. (2009) *BMC.Res.Notes* **2**, 46
54. Barquilla, A. and Navarro, M. (2009) *Autophagy.* **5**, 256-258
55. Barquilla, A. and Navarro, M. (2009) *Cell Cycle* **8**, 697-699
56. Tu, X. and Wang, C. C. (2004) *J Biol Chem* **279**, 20519-20528
57. Lopez-Aviles, S., Grande, M., Gonzalez, M., Helgesen, A. L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J. B., and Aligue, R. (2005) *Mol Cell* **17**, 49-59
58. Charest, A., Lane, K., McMahon, K., and Housman, D. E. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 29456-29465

59. Diaz-Troya, S., Perez-Perez, M. E., Florencio, F. J., and Crespo, J. L. (2008) *Autophagy*. **4**, 851-865
60. Wedaman, K. P., Reinke, A., Anderson, S., Yates, J., III, McCaffery, J. M., and Powers, T. (2003) *Mol.Biol.Cell* **14**, 1204-1220
61. Desai, B. N., Myers, B. R., and Schreiber, S. L. (2002) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 4319-4324
62. Drenan, R. M., Liu, X., Bertram, P. G., and Zheng, X. F. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 772-778
63. Kim, J. E. and Chen, J. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 14340-14345
64. Feng, W. and Zhang, M. (2009) *Nat Rev Neurosci.* **10**, 87-99

FOOTNOTES

* We thank Claudio Rogerio de Oliveira, Luana Umeda and Mariana Leão de Lima for experimental help support and Beatriz A. Castilho and Nilson Zanchin for helpful suggestions. This work was supported by grants from FAPESP, FAPERJ, CNPq and INCTV-CNPq. TCLJ was supported in part by a training grant or the Ellison Medical Foundation to the Center for Tropical and Emerging Global Diseases. PU was supported by a postdoctoral fellowship of the American Heart Association. RD was supported by U.S. National Institutes of Health grant AI-077538.

The abbreviations used are: TOR, target of rapamycin; TORC, TOR complex; PCF, *T. brucei* procyclic form; BSF, *T. brucei* bloodstream form; Poly P, Poly phosphate; DIC, differential interference contrast; DAPI, 4,6- diamidino-2-phenylidole.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Identification and localization of TbTOR-like kinase in PCF and BSF of *T. brucei*. (A) Shows a schematic representation of TbTOR-like 1 and its structural domains. The portion used for RNAi (F1) and those used for antibody generation (F2 and F3) are indicated. (B) Immunoblot analysis of whole cell extracts of PCF (strain 29-13) with antibodies generated against TbTOR-like 1 (F2 and F3), and a pre-immune serum (PI). Molecular weight markers are indicated on the left. (C) Immunofluorescence analysis showing localization of TbTOR-like 1 in 29-13 PCF and 90-13 BSF with anti-TbTOR-like antibodies (F2, in red). The figure also shows DAPI staining (blue), the merged fluorescent images, and differential interference contrast (DIC) images of the same field. Scale bars = 10 μ m.

Fig. 2. *T. brucei* shows decreased mRNA and protein levels of TbTOR-like 1 after ablation by RNAi. (A) Northern blot analysis of PCF (29-13) containing an integrated copy of the RNAi construct p2T7-177 TbTOR-like 1. RNAi was induced by the addition of 1 μ g/ml of tetracycline for 7 days. Total RNA of RNAi induced cells (+Tet) and non-induced cells (-Tet) were extracted, separated in formaldehyde-agarose gel and analyzed by Northern blot. Twenty μ g protein were loaded per lane and the gel stained with ethidium bromide to quantify the ribosomal RNA (rRNA). Blotted Nylon membranes were then hybridized with two different probes (F1 or F2) of TbTOR-like 1, or with a tubulin probe as a loading control. (B) Immunoblot analysis after RNAi of TbTOR-like 1. Untreated (-

Tet) and tetracycline treated (1 µg/ml) (+Tet) PCF containing the integrated p2T7-177 TbTOR-like 1 vector were collected after 6 days and processed for immunoblot analysis using anti-TbTOR-like 1 antibody (F2). Molecular weight markers are shown on the left.

Fig. 3. TbTOR-like 1 ablation by RNAi causes a progressive cell growth inhibition in PCF and BSF of *T. brucei*. Growth curve of tetracycline induced (+Tet) or non-induced (-Tet) PCF (A) and BSF (B). At day 4 and 3 cells were diluted again to the initial dilution (1×10^6 /ml and 3×10^5 /ml for PCF and BSF, respectively). The numbers are mean values \pm standard deviation of triplicate experiments. The differences were statistically significant for PCF at day 6, 7 and 8 ($p = 0.011$, 0.003 , 0.025 , respectively) and for BSF at day 3 and 4 ($p = 0.023$ and 0.038 , respectively). Lower panel: immunoblot of whole cell extracts of the same cells treated with tetracycline collected at the indicated days and revealed with anti-TbTOR-like 1 (F2) or with anti-tubulin antibodies as a loading control. (C) Immunofluorescence analysis of PCF and BSF TbTOR-like 1 RNAi cell lines, induced (+Tet) or not (-Tet) with tetracycline and using anti-TbTOR-like 1 (F2, red). Figure also shows DAPI staining (blue) and the merged fluorescence images of the same field. Corresponding DIC images are shown as well. Scale bars = 10 µm.

Fig. 4. TbTOR-like 1 ablation causes an increase in cell size. PCF were induced (+Tet, black bars) or not (-Tet, white bars) with tetracycline for 4 days, fixed and adhered to coverslips as described under Experimental Procedures and images taken using DIC. Binaries were generated using the ImageJ software and the area of each cell image quantified. The graph shows the distribution of *T. brucei* projected surface area. The two distributions were statistically different ($p < 0.05$) based on a non-parametric t-student test ($n=98$ and 100 for non-induced and induced RNAi, respectively). No significance difference was observed for PCF 29-13 in the presence compared to absence of tetracycline.

Fig. 5. A decrease expression of TbTOR-like 1 causes a partial arrest of the cell cycle in S/G2. After 4 days, untreated (-Tet) and 1 µg/ml tetracycline (+Tet) treated PCF of TbTOR-like 1 RNAi cell line (A), or control 29-13 cells (B) were stained with propidium iodide and subjected to FACS analysis for DNA content, or fixed and processed for DAPI staining and microscopic observation under a fluorescence microscope. Panel C show the number of cells ($n = 200$ for each control or TbTOR-like 1 RNAi cell line, induced or non-induced, as indicated) with different numbers of nuclei (N) and kinetoplasts (K). The differences between induced and non-induced TbTOR-like 1 were statistically different for G1 ($p = 0.003$), G2 ($p = 0.0023$) and zoids ($p = 0.012$). The other differences were not statistically significant.

Fig. 6. TbTOR-like RNAi cell line presents an increased number of acidocalcisomes. (A) Transmission electron microscopy images of thin sections of resin embedded PCF previously induced (+Tet) or not (-Tet) for 4 days with tetracycline. Arrowheads indicate some acidocalcisomes. N = nucleus. (B) Transmission electron microscopy of whole PCF attached to Formvar grids after 4 days of treatment without or with tetracycline. In both A and B the dark granules are acidocalcisomes. Scale bars = 2 µm in A and B. (C) Fluorescence images showing the accumulation of acridine orange in RNAi for TbTOR-like 1 cells (+Tet) compared with non-induced cells (-Tet). Upper panel corresponds to PCF and lower panel to BSF. Red pseudo color was generated using Adobe Photoshop. Scale bars = 10 µm.

Fig. 7. TbTOR-like1 ablated cells have higher levels of poly P and PP_i. The levels of short-chain (SC) and long-chain (LC) poly P and the levels of PP_i were measured in non-induced (-Tet) and induced (+Tet) PCF (A and B) or BSF (C and D) after 6 and 4 days with tetracycline, respectively.

The figure shows mean values \pm standard deviation of three experiments measured in triplicate. The differences between non-induced and induced cells were found significant by using t-Student test ($p < 0.005$).

Fig. 8. TbTOR-like 1 re-localizes to the cell periphery in PCF submitted to hyperosmotic conditions. *T. brucei* PCF (29-13) at exponential growth were collected by centrifugation and resuspended with isosmotic (Iso), hyposmotic (Hypo) and hyperosmotic (Hyper) buffers as described under Experimental Procedures. Ten seconds after different buffers treatment, cells were fixed and processed for immunofluorescence with anti-TbTOR-like 1 (F2) antibody (green) in the presence of DAPI (blue). The merged fluorescent images and the merged fluorescence and DIC images are shown as well. Scale bars = 10 μ m.

Fig. 9. Hyperosmotic medium causes a similar increase of poly P as TbTOR-like 1 ablation. *T. brucei* PCF 29-13 (A and B) and PCF containing the p2T7-177 TbTOR-like 1 vector (C and D) were grown in regular medium (closed symbols) or medium with 0.3 M mannitol for PCF 29-13, or with 1 μ g/ml tetracycline for PCF TbTOR-like 1 (open symbols). The number of parasites was counted daily and the amount of short chain poly P measured in triplicate experiments. The numbers are mean values \pm standard deviation. For all values $p < 0.05$. The stars indicate the ratio of poly P levels between cells incubated in presence and absence of tetracycline.

Table I
Morphometric analysis of the acidocalcisomes in *T. brucei* Tor-like 1 mutants

	Number of acidocalcisomes per cell	Mean area (x 10 ³ nm ²)	Mean circularity (nm)	Mean diameter (nm)	Mean volume (x 10 ⁶ nm ³)
(- Tet)	26 ± 8	58.0 ± 35.5	0.92 ± 0.03	286.2 ± 76.6	20.4 ± 20.4
(+ Tet)	31 ± 9	162.0 ± 74.0	0.90 ± 0.01	477.4 ± 106.3	81.2 ± 57.5

Results are expressed as means ± S.D (n=100). The mean area, mean diameter and mean volume differences have significant differences according to Student's *t* test ($P < 0.05$).

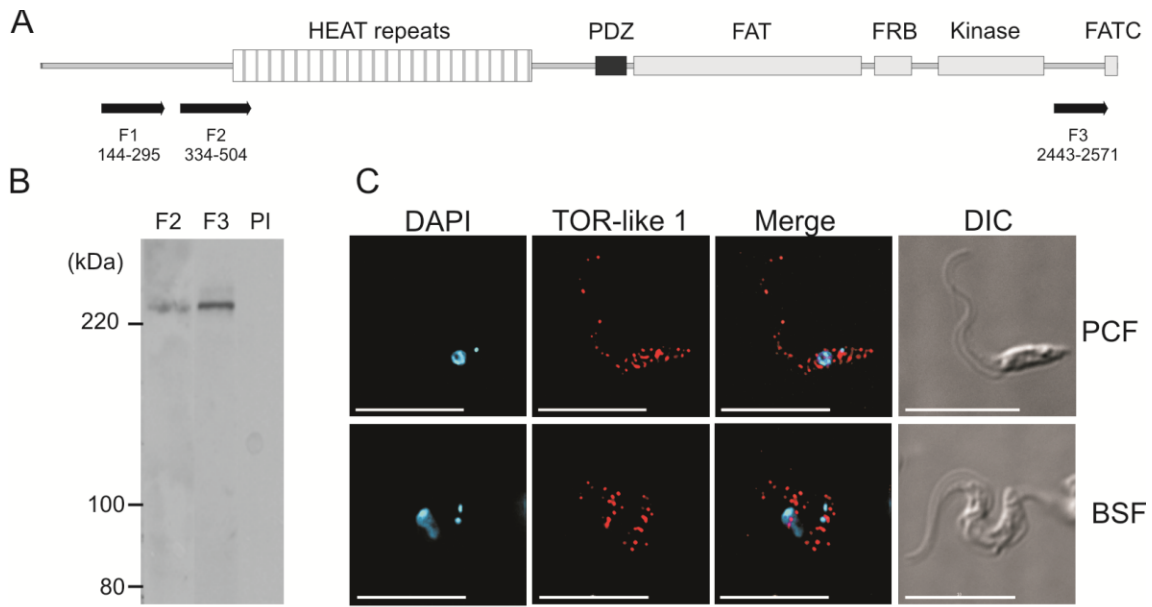


Figure 1

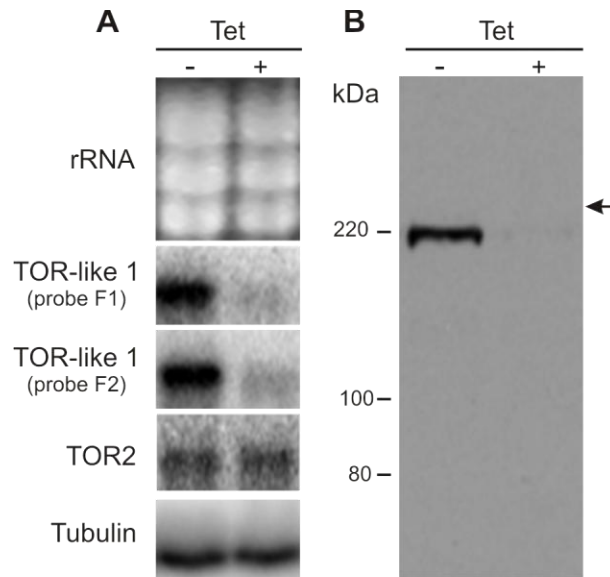


Figure 2

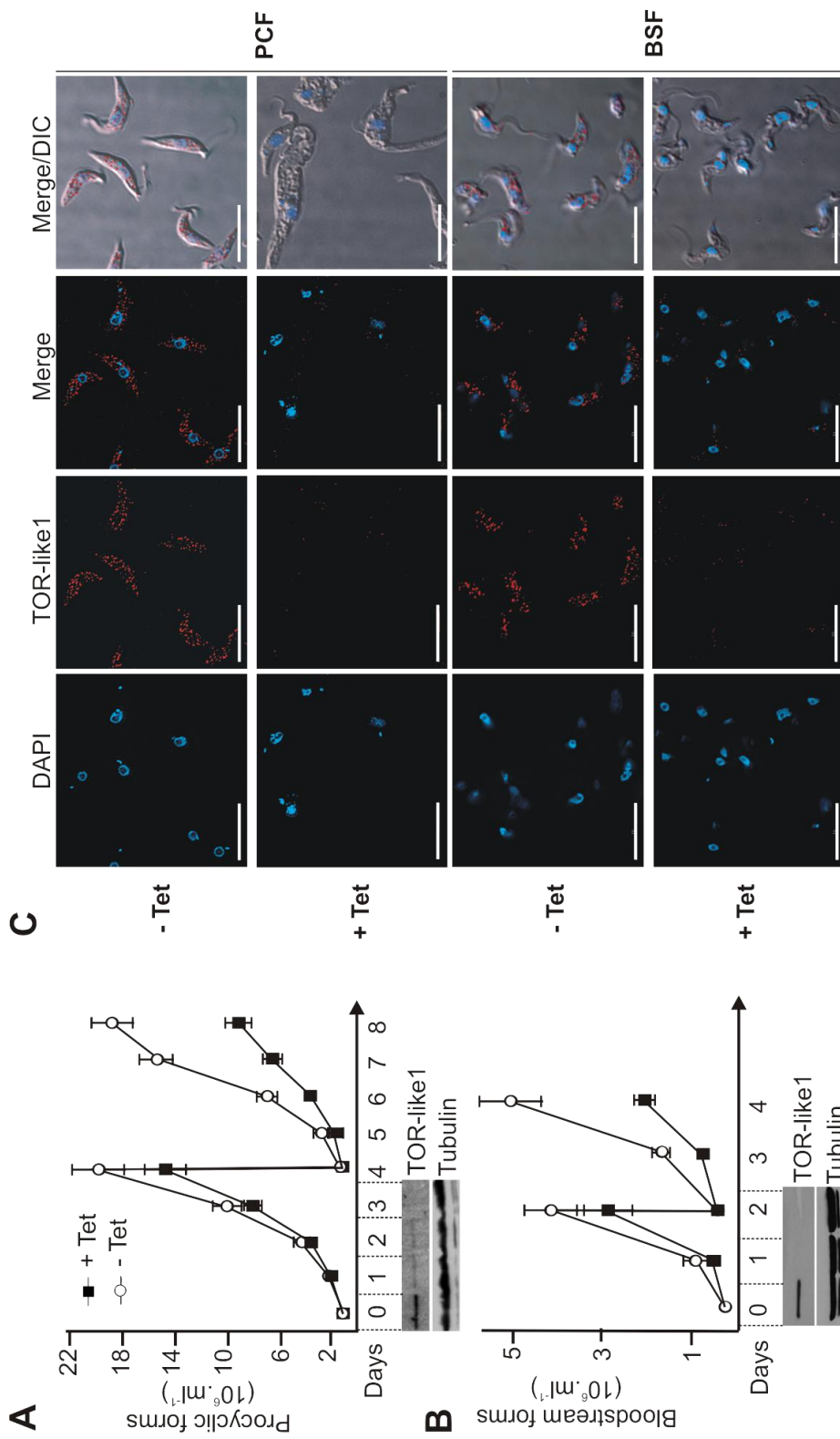


Figure 3

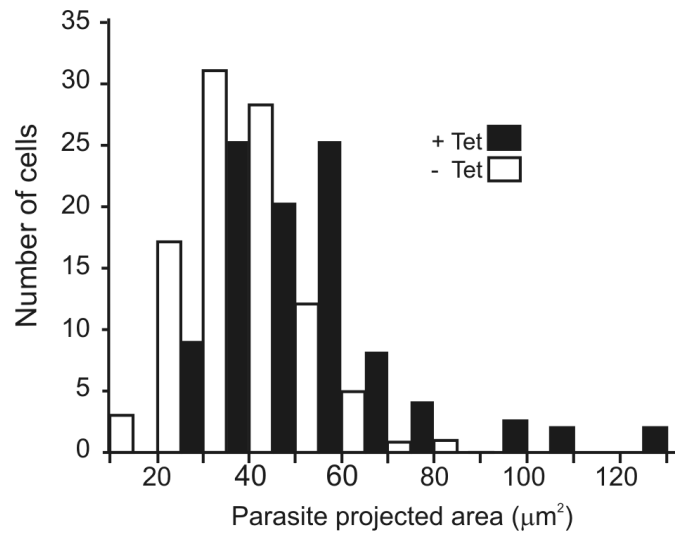


Figure 4

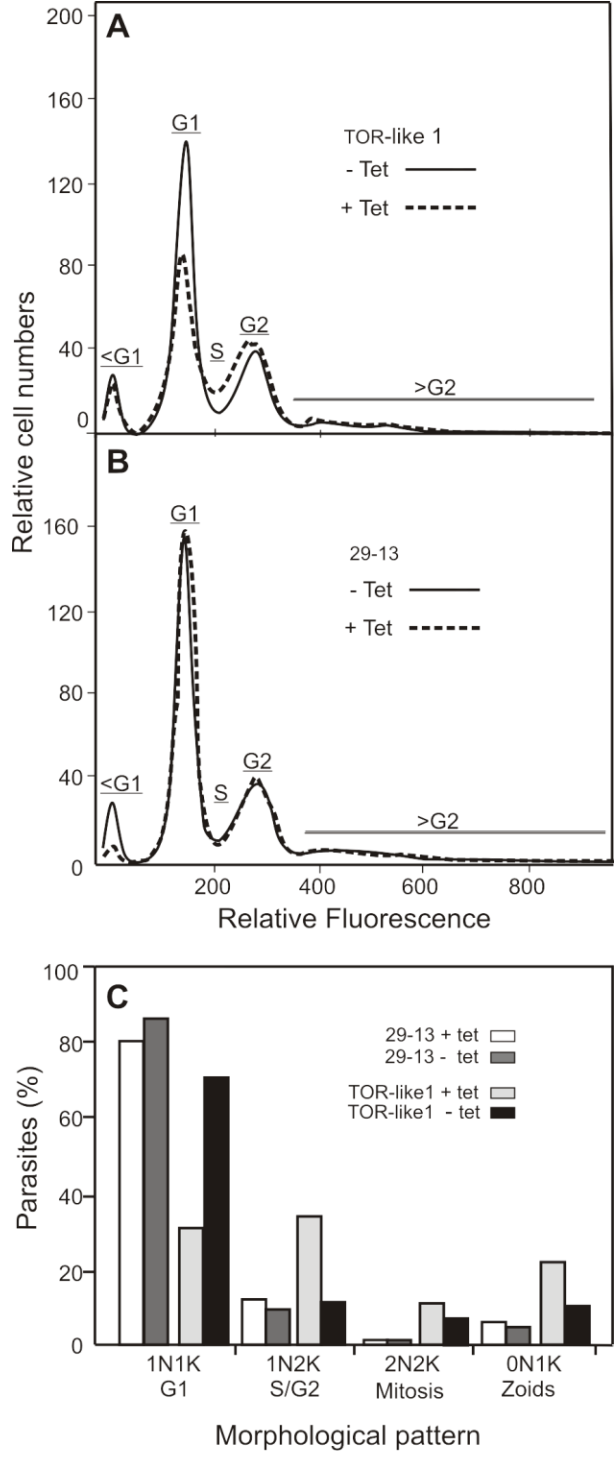


Figure 5

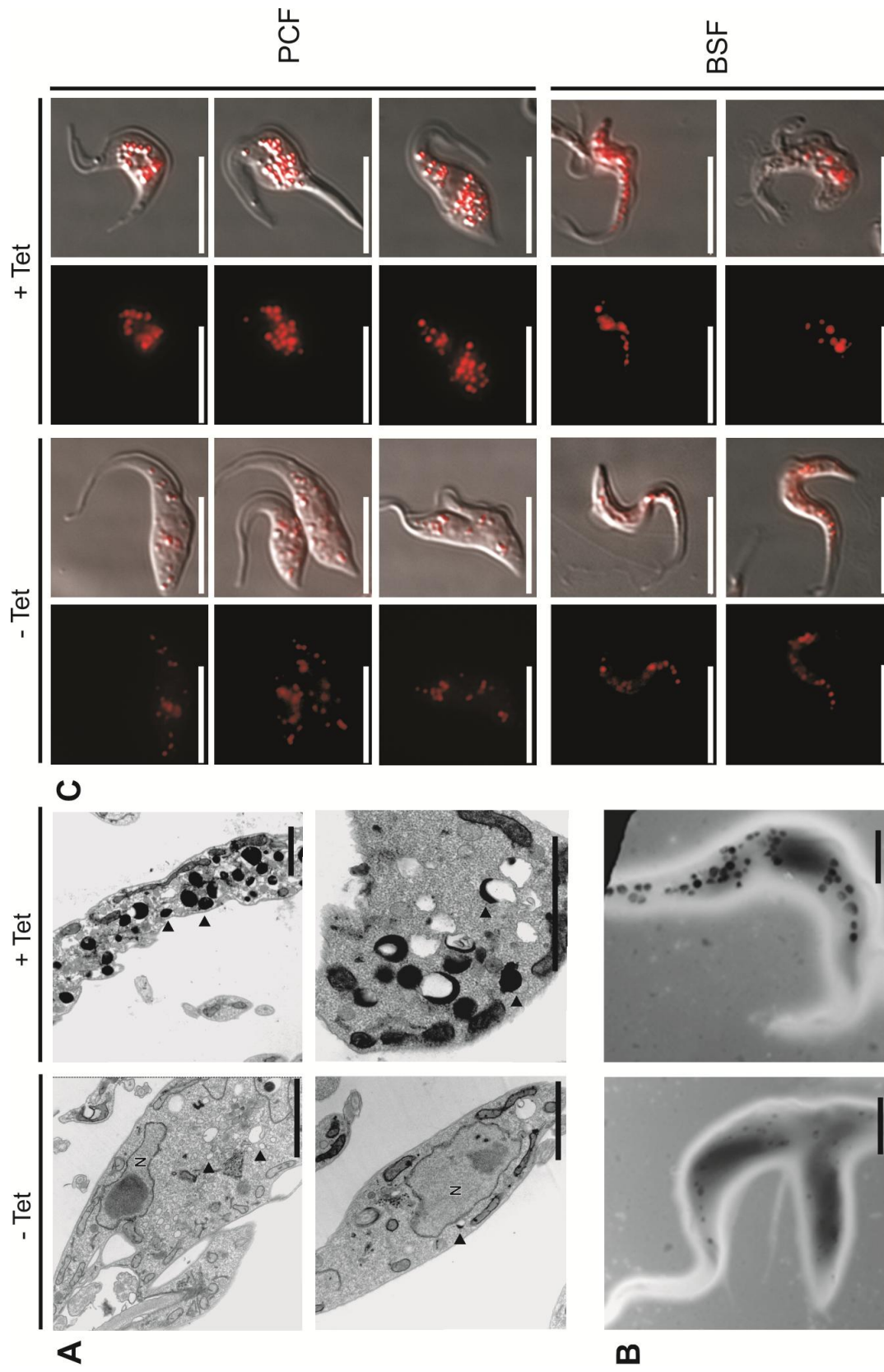


Figure 6

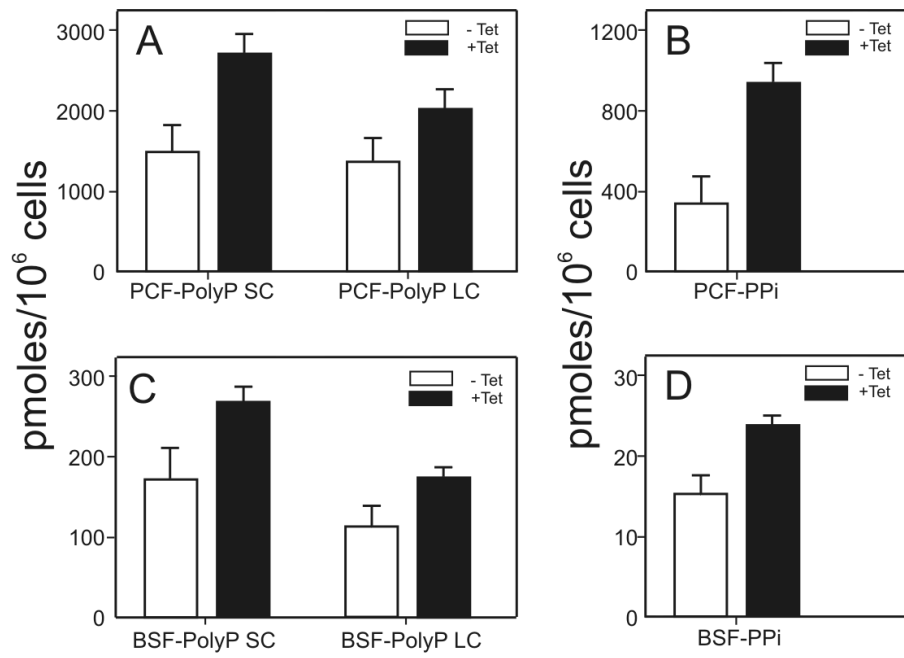


Figure 7

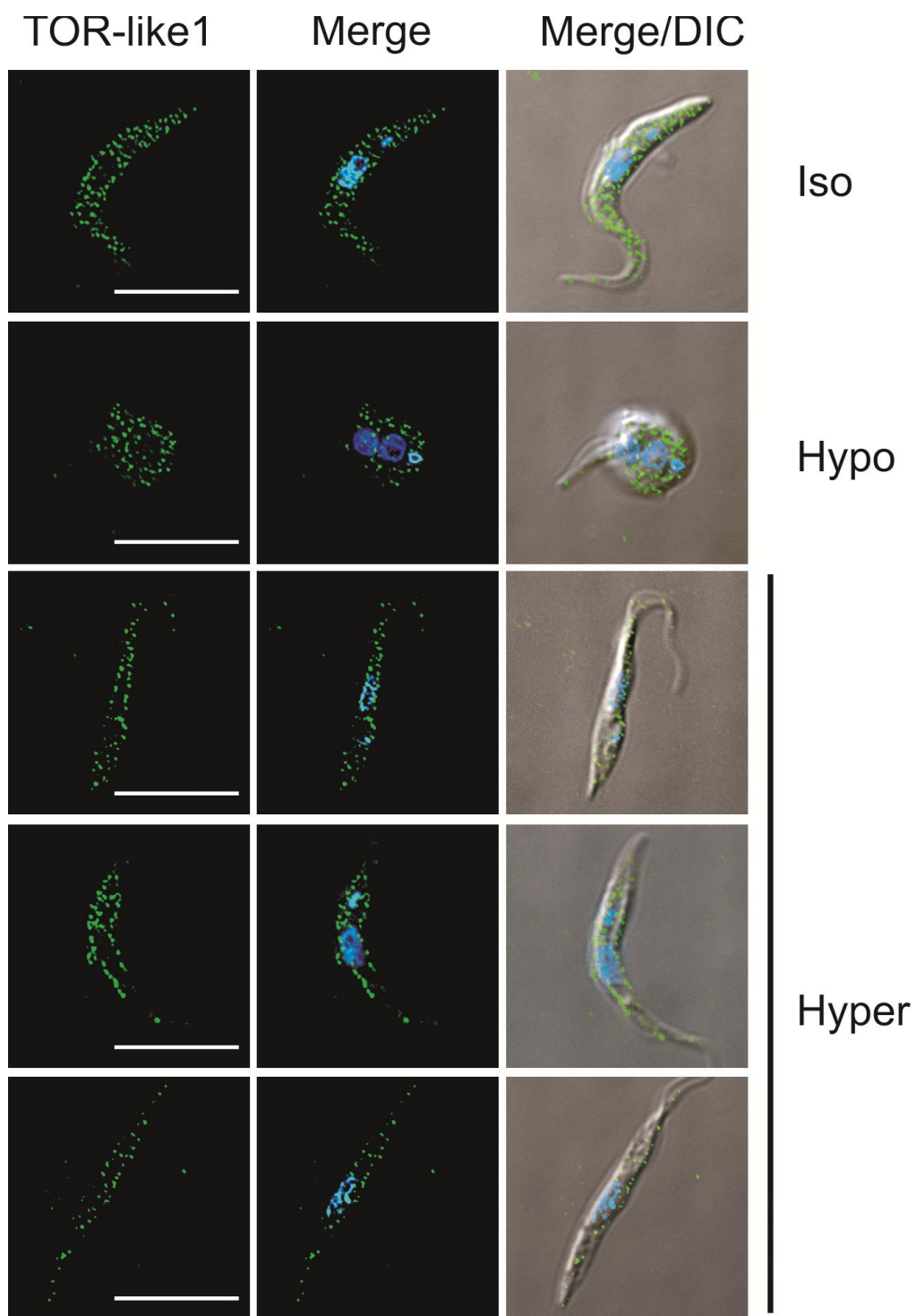


Figure 8

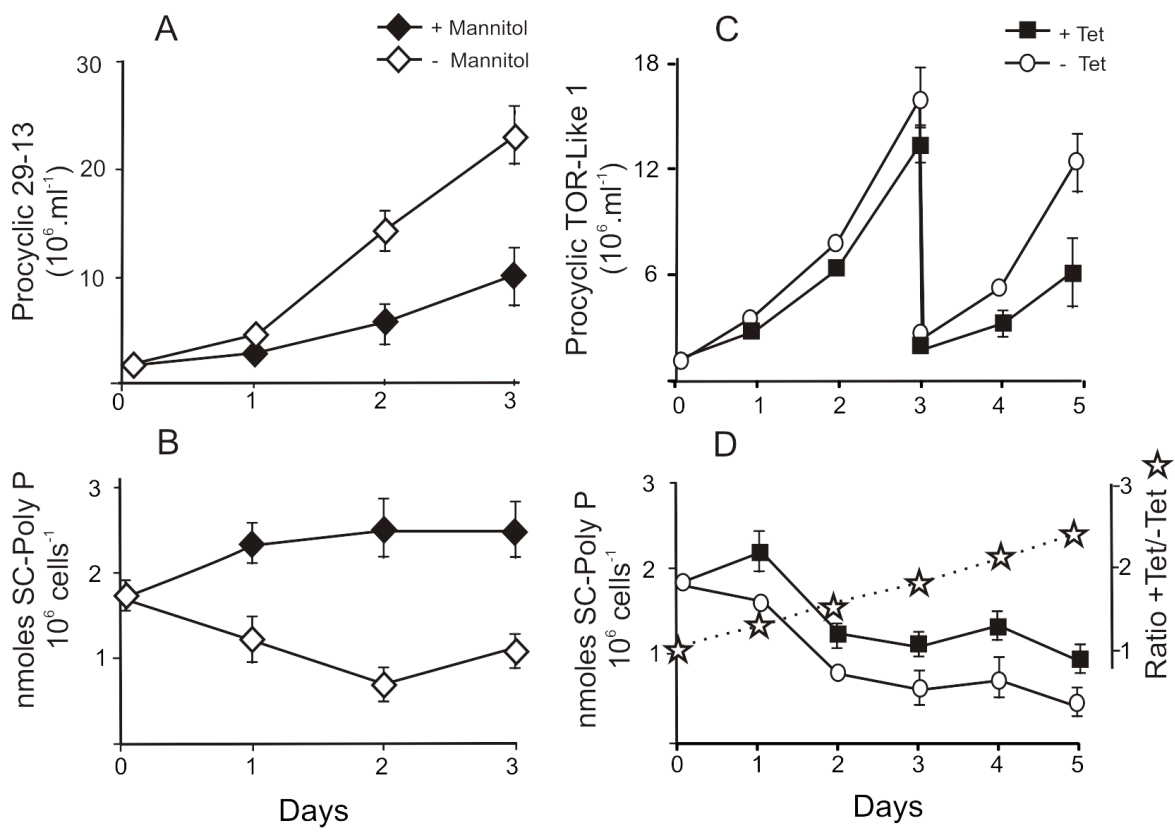


Figure 9

SUPPLEMENTAL DATA

Fig. S1. TbTOR-like 1 does not colocalize with cytosolic, glycosome, acidocalcisome and P-bodies markers in PCF. Exponentially growing PCF (29-13) were collected and processed for immunofluorescence using mouse anti-TbTOR-like 1 fragment 2 together with the following markers: rabbit anti-HSP70 (A), anti-aldolase (B), anti-Dhh1 (C), anti-TbVP1 (D), anti-DHLADH (E) or anti-BIP (F). The antigens were localized by staining with anti-mouse IgG Alexa 488 (green), anti-rabbit IgG 594 (red) and DAPI staining (blue). The bright intensity of colors in merged images were proportionally reduced as compared to the original ones. The images are sections of Z series processed by 3D-deconvolution using Autoquant 2.1 software. Scale bars = 10 μ m.

Fig. S2. TbTOR-like 1 protein is soluble and is not found or interacts with membranous cell structures. PCF trypanosomes were lysed in a phosphate buffer in the absence (Control), or absence of 6 M urea (used for destabilizing non-covalent protein-protein interactions). Whole cell lysate was subjected to a first centrifugation step (13K) (13000 g, 15 min). The 13K control pellet contains plasma membrane and heavy organelles like mitochondria and nucleus. The 13K supernatants were subjected to a second centrifugation step (100,000 g, 60 min) in order to sediment light organelles and light membranes (100K pellets). The soluble fractions correspond to the 100K supernatant. All samples were resuspended in the original volume and content of TbTOR-like 1 in each fraction was assessed by western blot analysis using F3 antibodies.

Fig. S3. TbTOR2 knocked down cells present same levels of poly P as control cells. The levels of short-chain (SC) poly P were measured in non-induced (-Tet) and induced (+Tet) RNAi PCF 6 days after induction with tetracycline. The figure shows mean values \pm standard deviation of three experiments measured in triplicate. The differences between non-induced and induced cells were found not significant by using t-Student test ($p < 0.005$).

Fig. S4. Aldolase (A), DHLADH (B) and BIP (C) localization in PCF treated at different osmotic conditions. PCF (29-13) at exponential growth were collected by centrifugation and resuspended with isosmotic (Iso), hyposmotic (Hypo) and hyperosmotic (Hyper) buffers as described under Experimental Procedures. Ten seconds after the different buffers treatment, the cells were fixed and processed for immunofluorescence with anti-aldolase antibody (green) in the presence of DAPI (blue). The merged fluorescence images and the merged fluorescence and DIC images are shown as well. Scale bars = 10 μ m.

Fig. S5. Parasites maintained at high osmotic conditions shown a more sensitive phenotype for TbTOR-like 1 ablation by RNAi. Growth curves of PCF 29-13 (A) and PCF containing the integrated p2T7-177 TbTOR-like 1 (B) in the absence of tetracycline (-Tet) or in the presence of tetracycline (+Tet) and/or 0.3 M mannitol. At day 3 cells were diluted again. The numbers are mean values \pm standard deviation of triplicate experiments, ($p < 0.05$).

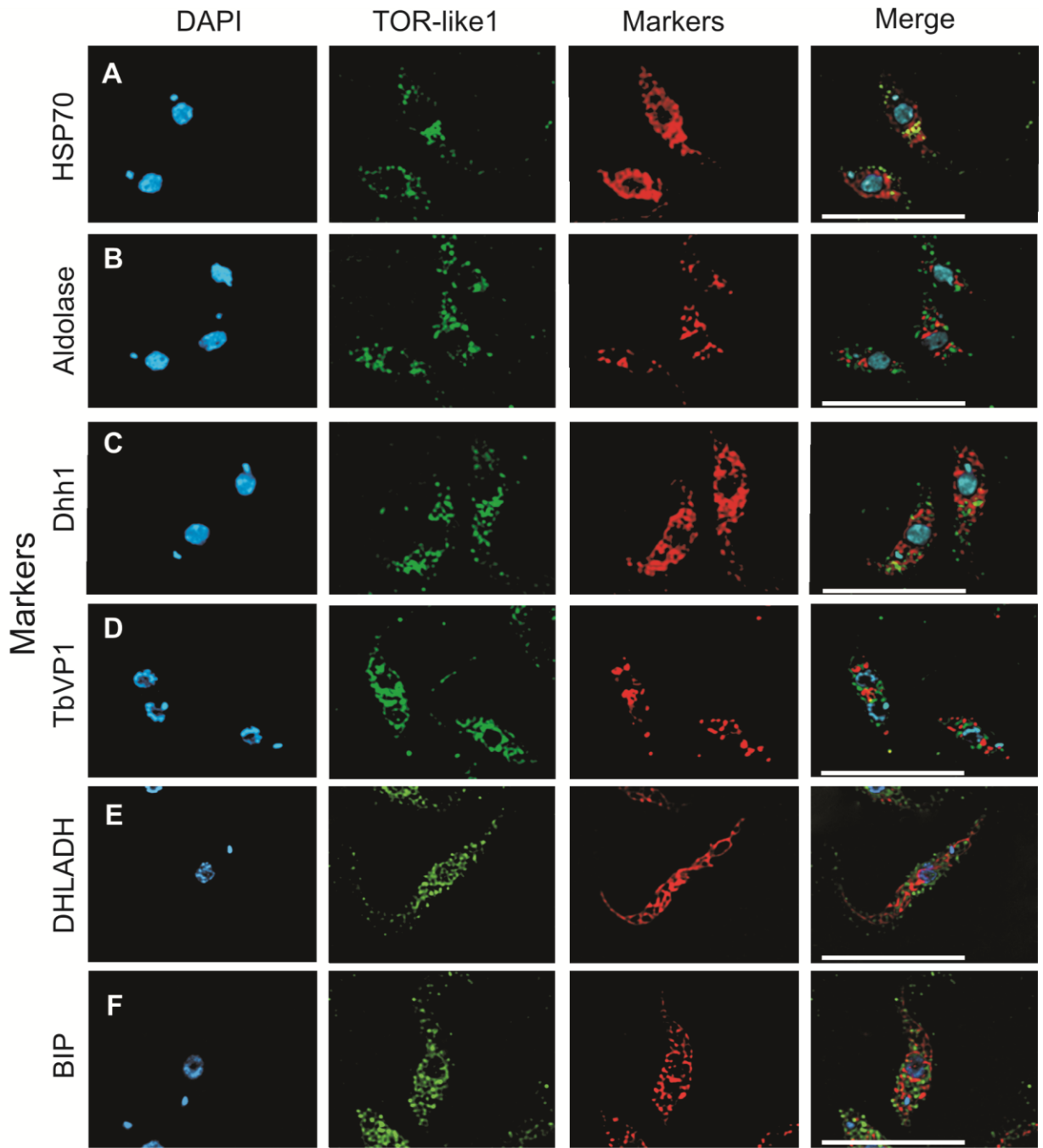


Figure S1

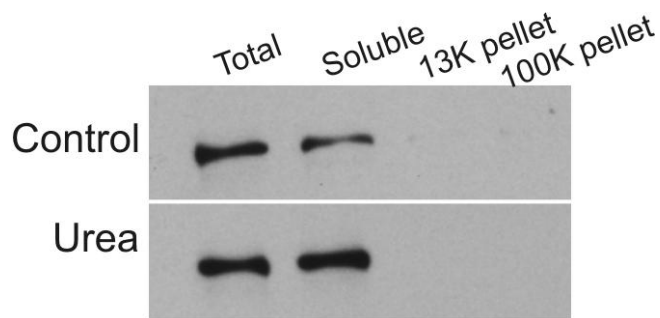


Figure S2

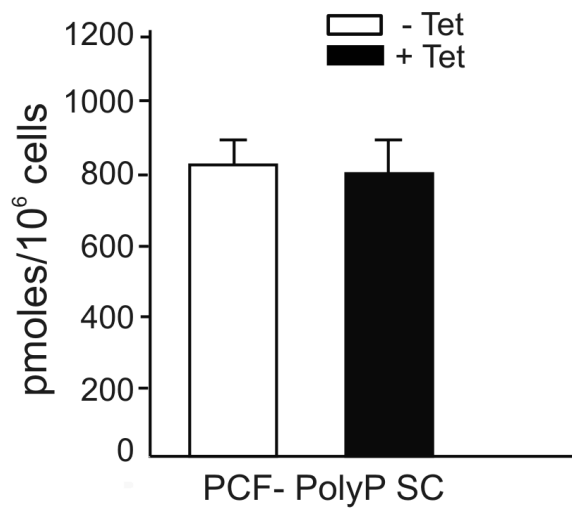


Figure S3

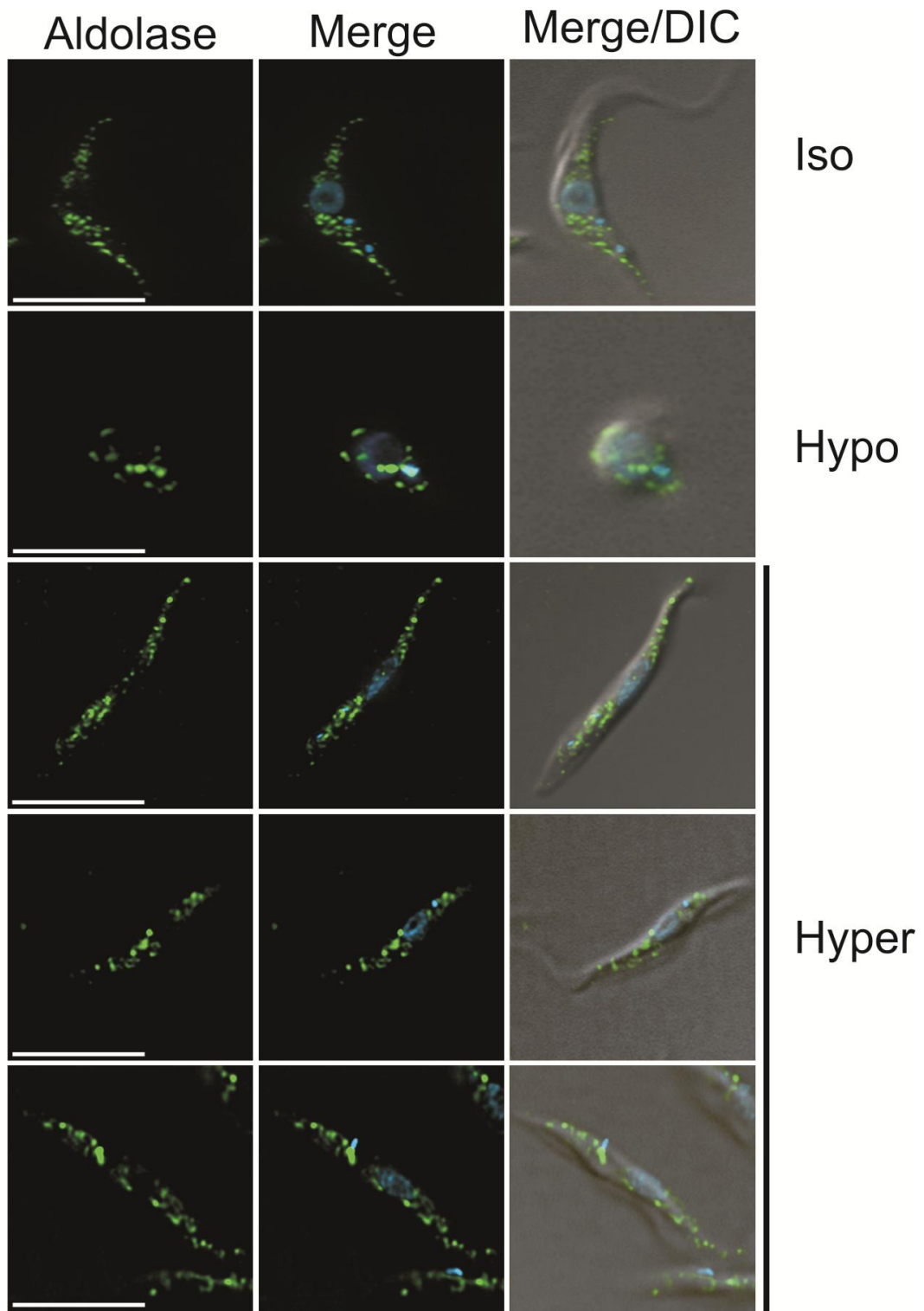


Figure S4a

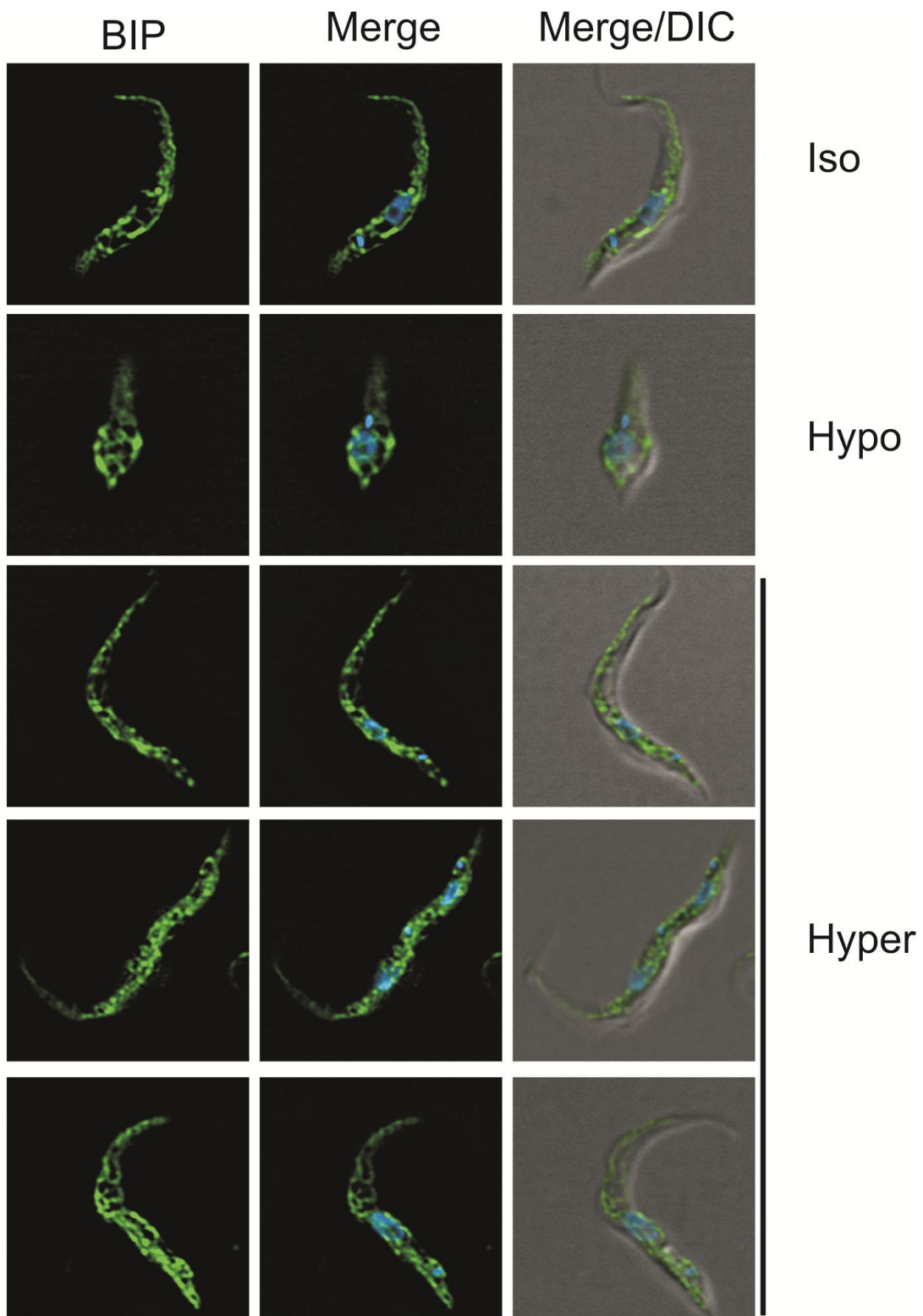


Figure S4b

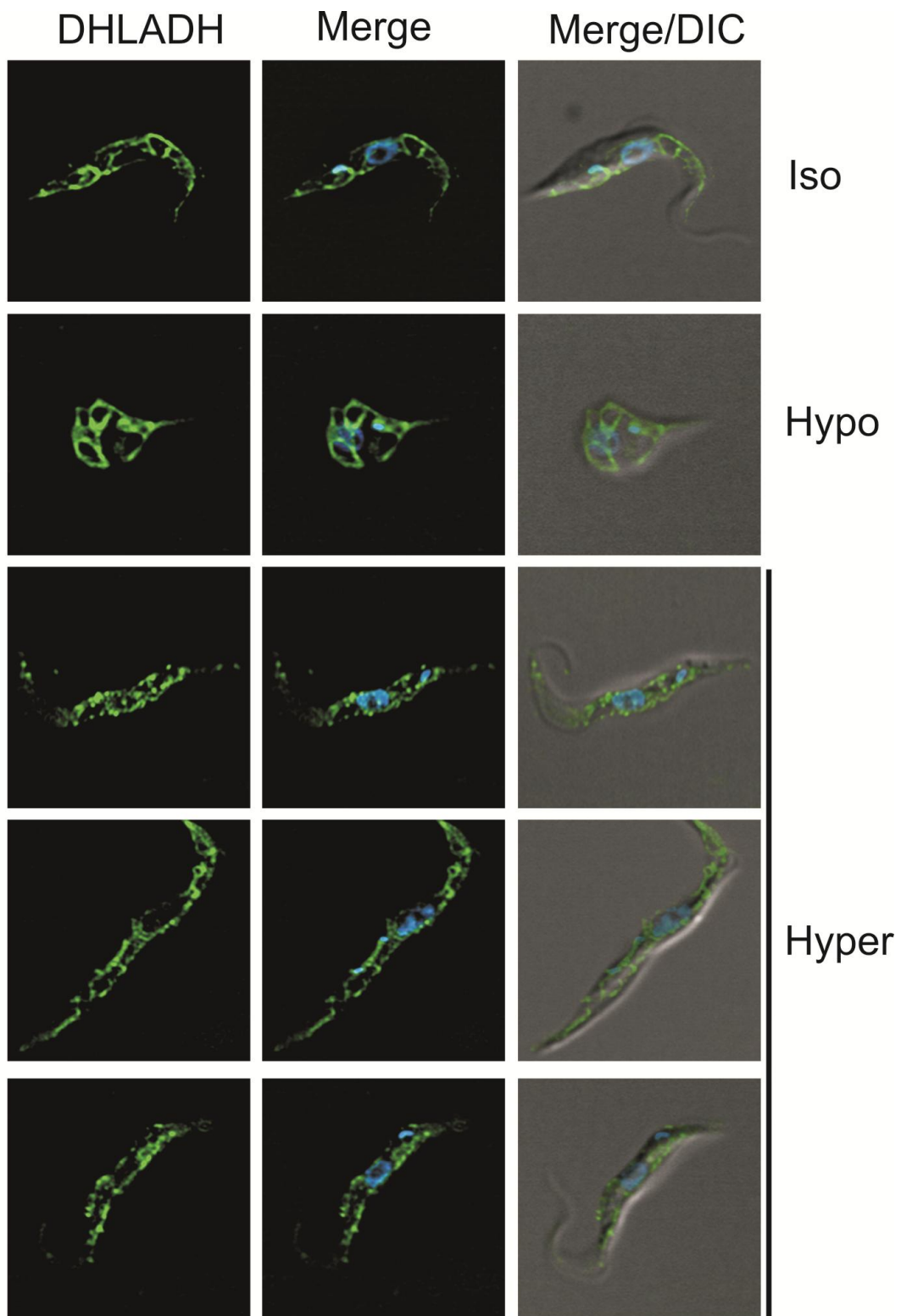


Figure S4c

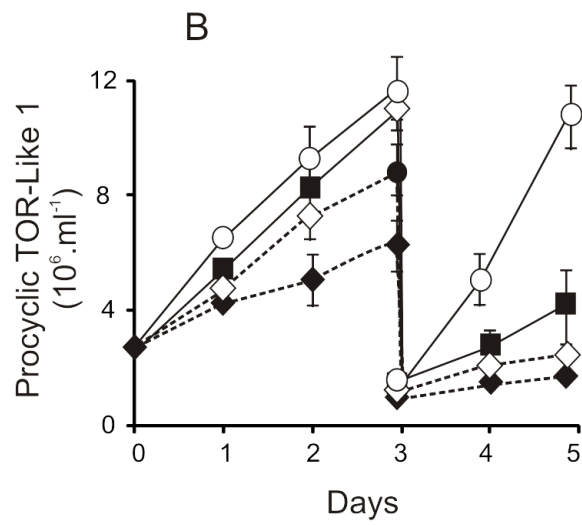
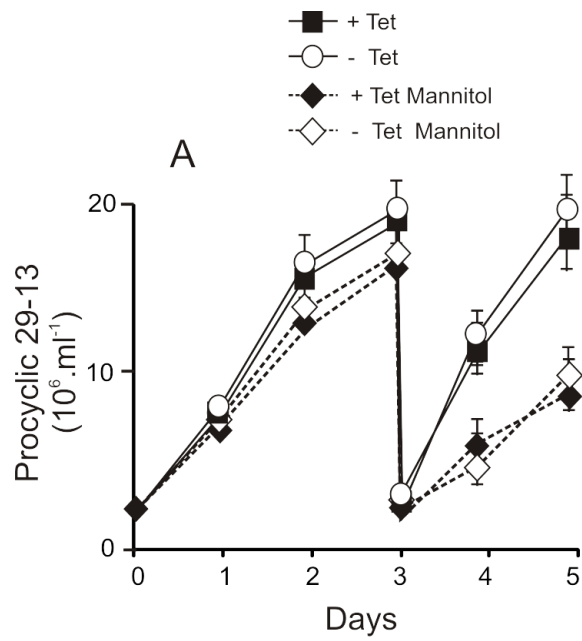


Figure S5

Epitopo Tag para TbTOR-like 1

Outra estratégia que utilizamos para tentarmos localizar TbTOR-like 1 foi a de usar etiquetas (tags). Desenhamos oligonucleotídeos para clonarmos um fragmento de TbTOR-like1 no vetor pMOTag 4H com HA (hemaglutinina) triplo no C-terminal. Por western blot usando as células TbTOR-like1 HA observamos uma banda do tamanho esperado usando um anticorpo monoclonal anti-HA (Sigma). Como controle usamos o extrato total das mesmas células e incubamos com os anticorpos anti TbTOR-like1, mostrando que a banda reconhecida pelos outros anticorpos anti –TbTOR-like 1 é a mesma (Figura 1). Entretanto, quando realizamos ensaios de imunofluorescência para confirmarmos a localização da proteína, não conseguimos obter nenhuma marcação.

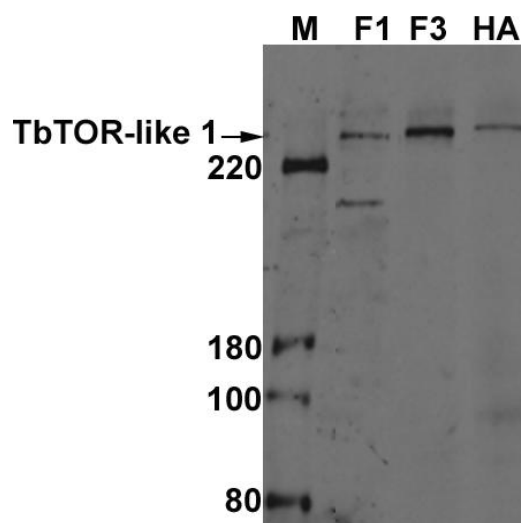


Figura 1. Expressão de TbTOR-like1 usando um tag de HA. Western blot de extrato total de procíclicos de *T.brucei* transfectados com o vetor pMOTag 4H. M-marcador de peso molecular; F1- anti-TbTOR-like1 F1; F3- anti-TbTOR-like1 F3; HA- anti-HA (Sigma). O tamanho dos padrões de massa molecular está indicado à esquerda.

Parte 2. Caracterização da quinase TOR2 de *Trypanosoma brucei*

Em paralelo realizamos alguns experimentos para caracterizar de maneira comparativa a TbTOR2, apesar de que uma descrição de suas propriedades foi feita recentemente por Barquilla e colaboradores (Barquilla et al., 2008).

TbTOR2 apresenta os mesmos domínios conservados de mTOR

O gene de TbTOR2 (GeneBank XM_844192 e *T. brucei* GeneDB Tb927.4.420) está localizado no cromossomo 4 e possui 7239 pares de bases, codificando uma proteína de 270.6 kDa com um ponto isoelétrico de 7.1.

TbTOR2 assim como TbTOR-like 1 e TbTOR1 contém os mesmos domínios estruturais característicos da TOR de mamíferos: repetições HEAT (repetições de uma seqüência de aminoácidos que foi primeiramente identificada em Huntington, no fator Elongação 3 , na subunidade regulatória de PP2A e em TOR) que estão envolvidas em processos de transporte celular (Andrade and Bork, 1995); um domínio de ligação à rapamicina FRB (FKBP-12 Rapamycin Binding)(Choi et al., 1996); um domínio FAT (encontrado nas proteínas FRAP, ATM e TRRAP) que funciona em interações proteína-proteína (Bosotti et al., 2000); um domínio quinase (Kinase) como homologia com as quinases fosfatidilinositol; e um domínio FATC (FAT encontrado no C- terminal da proteína) (Bosotti et al., 2000) (Figura 18).

TbTOR2 está associada a mitocôndria e ao retículo endoplasmático

Para investigarmos a localização de TbTOR2 também geramos um anticorpo policlonal contra um fragmento do N-terminal da proteína correspondente aos aminoácidos 29 a 168. A proteína recombinante foi expressa em *E. coli*, purificada e usada para imunizar coelhos. O anticorpo gerado anti-TbTOR2 reconheceu em Western blot uma banda do tamanho esperado e em ensaios de imunofluorescência pudemos observar para procíclicos e sanguíneos um padrão de marcação organizado com estruturas

interconectadas no citoplasma semelhante à mitocôndria e ao retículo endoplasmático (Figura 1). Para investigarmos que estrutura poderia ser essa, fizemos dupla marcação de anti-TbTOR2 e marcadores específicos para mitocôndria como Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes) (Figura 2), mostrando co-localização entre TbTOR2 e o marcador. Também realizamos dupla marcação de anti-TbTOR2 com o marcador de retículo endoplasmático BODIPY-FL-tapsigargina (Molecular Probes), mostrando que TbTOR2 também parece se associar com o retículo endoplasmático (Figura 3). Como visto posteriormente em (Barquilla et al., 2008) TbTOR2 se apresenta associada a mitocôndria e ao retículo endoplasmático.

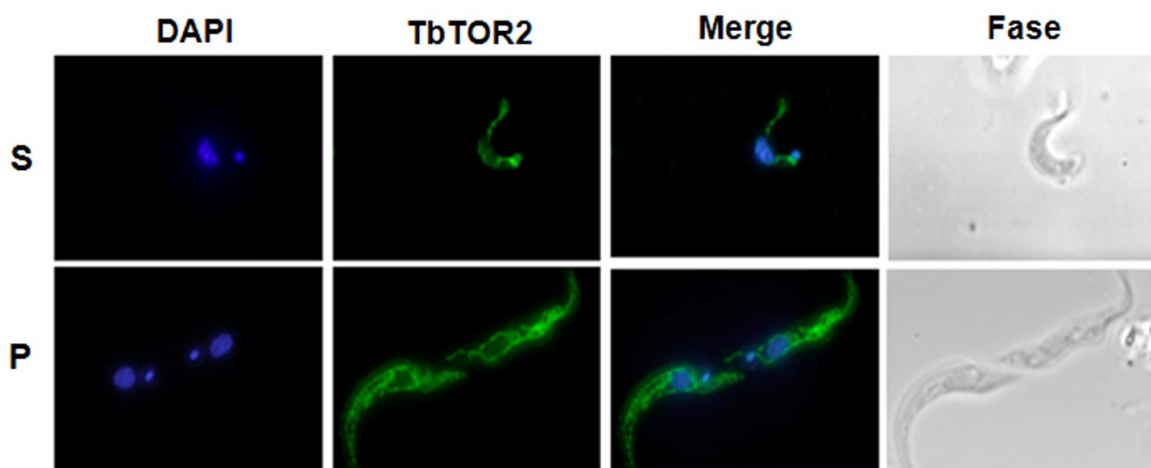


Figura 1. Localização da quinase TOR2 nas formas sanguíneas (S) e procíclicas (P) de *T. brucei*. Imunofluorescência usando anti-TbTOR2. As figuras mostram coloração com DAPI, contraste de fase e as imagens sobrepostas (Merge) do mesmo campo.

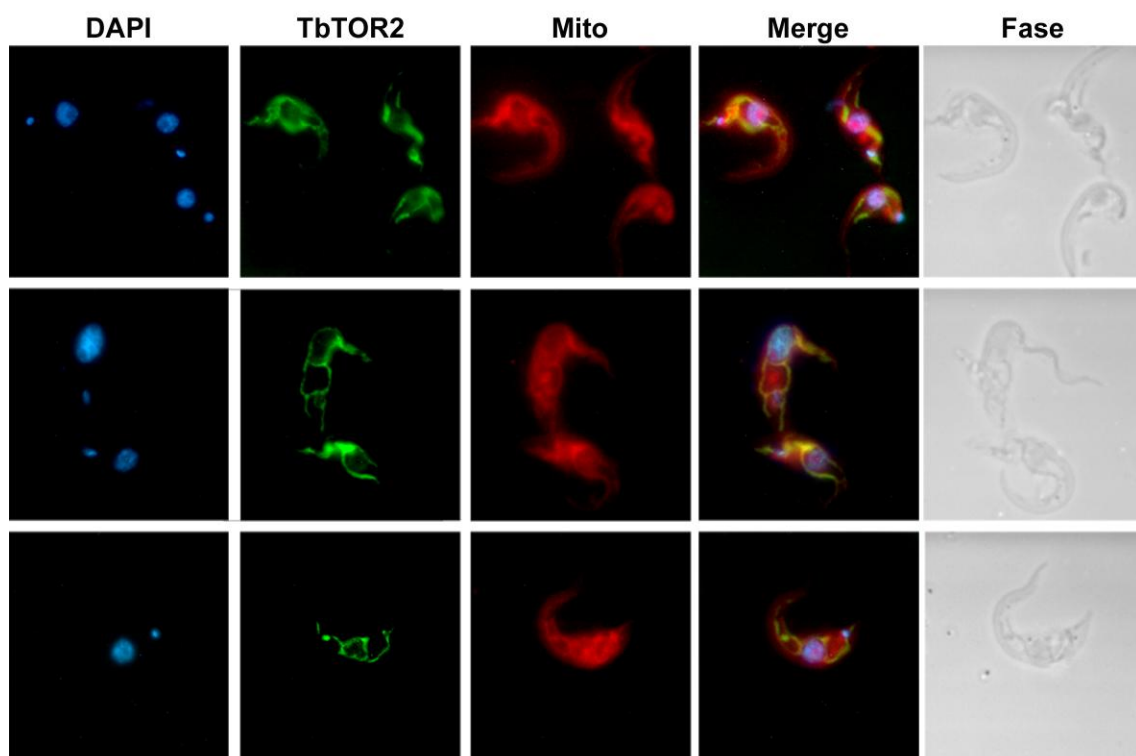


Figura 2. TbTOR2 se encontra associada à mitocôndria. Imunofluorescência das formas procíclicas de *T. brucei* usando anti-TbTOR2 e Mitotracker Red CMXRos (Mito). As figuras mostram coloração com DAPI, contraste de fase e as imagens sobrepostas (Merge) do mesmo campo.

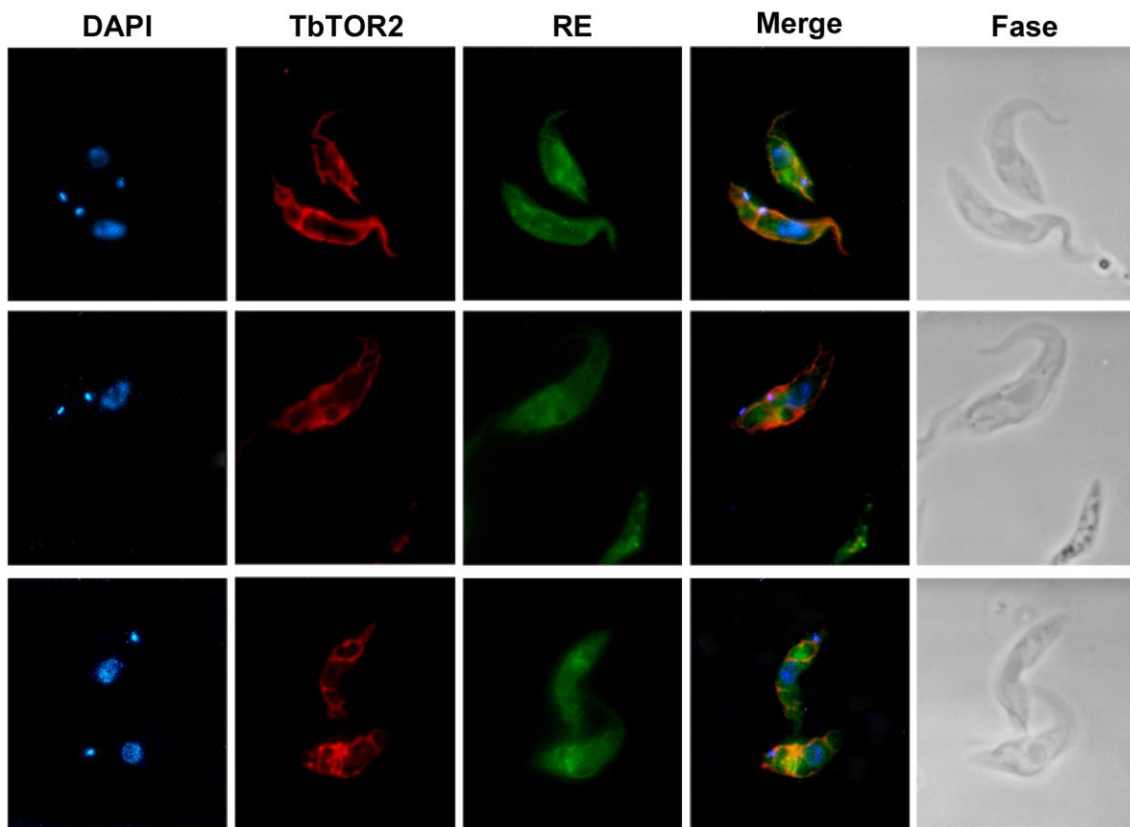


Figura 3. TbTOR2 está associada ao retículo endoplasmático (RE). Imunofluorescência das formas procíclicas de *T. brucei* usando anti-TbTOR2 e BODIPY- FL thapsargin (1 μ M). As figuras mostram coloração com DAPI, contraste de fase e as imagens sobrepostas (Merge) do mesmo campo.

Análise fenotípica da linhagem RNAi TbTOR2

A análise fenotípica de crescimento celular também foi realizada para TbTOR2 e pudemos observar nas células RNAi induzidas uma diminuição no crescimento após ao terceiro dia de indução semelhante ao que ocorre com TbTOR-like1 (Figura 4A). A indução do RNAi com tetraciclina não causa nenhum efeito nas células controle em relação ao crescimento celular como mostrado na Figura 4B.

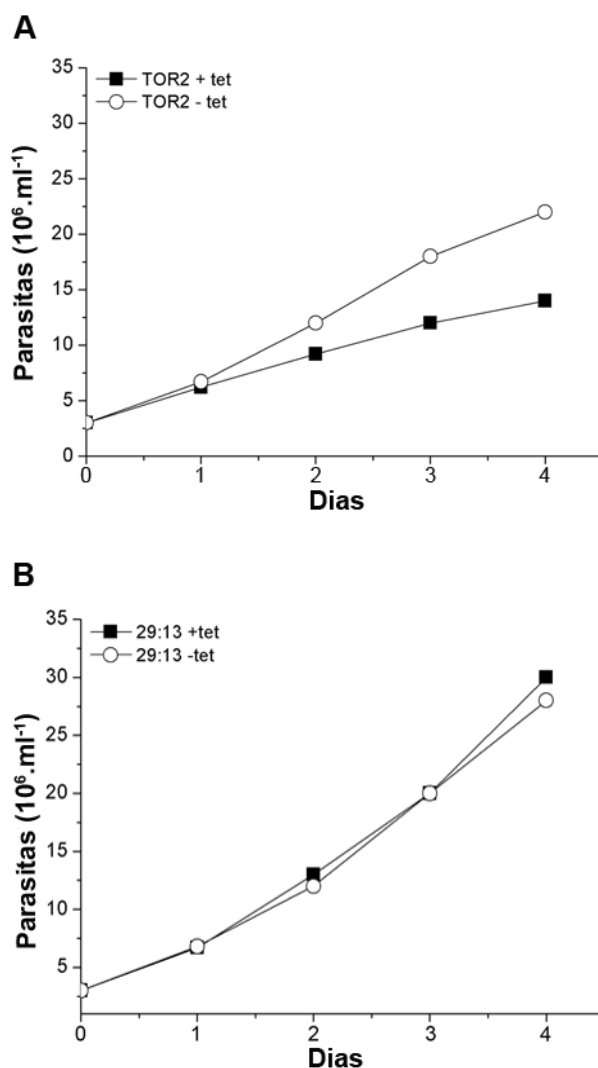


Figura 4. Depleção de TbTOR2 causa uma diminuição progressiva no crescimento celular. (A) Curva de crescimento de formas procíclicas de *T. brucei* contendo o plasmídeo p2T7-177 TOR2 induzidas (+ Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina. (B) Curva de crescimento de procíclicos 29-13 não transfectados tratados (+ Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina.

Efeitos da diminuição da expressão de TbTOR2 no ciclo celular

Para observarmos a progressão no ciclo celular nestas células que tiveram a expressão para TbTOR2 diminuída por RNAi, analisamos o conteúdo de DNA das células após coloração com DAPI. Após 4 dias de indução do RNAi com tetraciclina quantificamos o número de células na população contendo um núcleo e um cinetoplasto (1N1K), 1N2K, 2N2K, e células anormais chamadas de zóides (0N1K). As células com 1 núcleo e cinetoplasto alongado correspondente a fase S do ciclo celular também foram contadas com

1N2K. Observamos um aumento no número de células com 1N2K, assim como uma diminuição em 1N1K. Também foi observado o aumento de zóides e de células multinucleadas e multiflageladas (Figuras 5 e 6A). Outro fenótipo interessante foi o de um aumento no tamanho celular destas células depletadas de TbTOR2 assim como ocorreu para as células RNAi de TbTOR-like 1 (Figuras 6A, B e C). Dados similares foram obtidos por Barquilla e colaboradores (Barquilla et al., 2008).

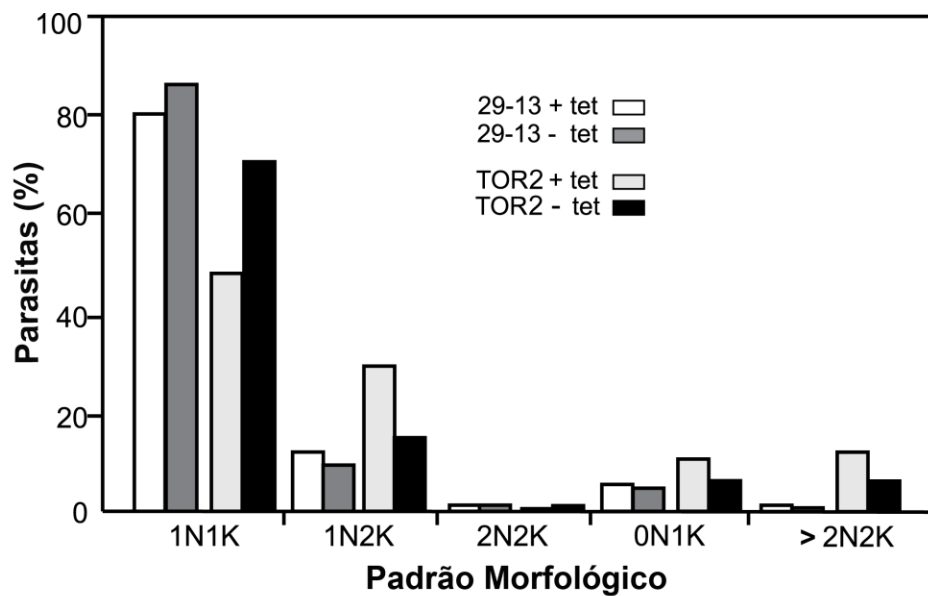
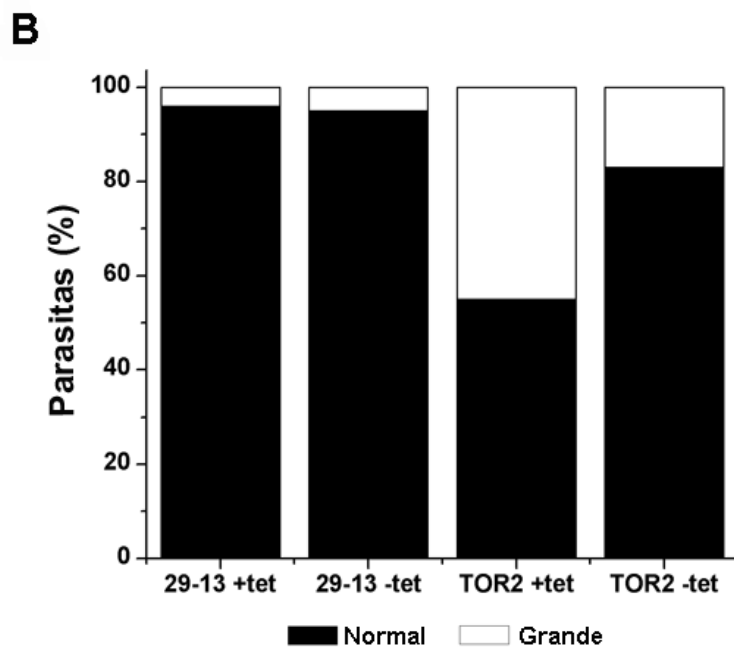
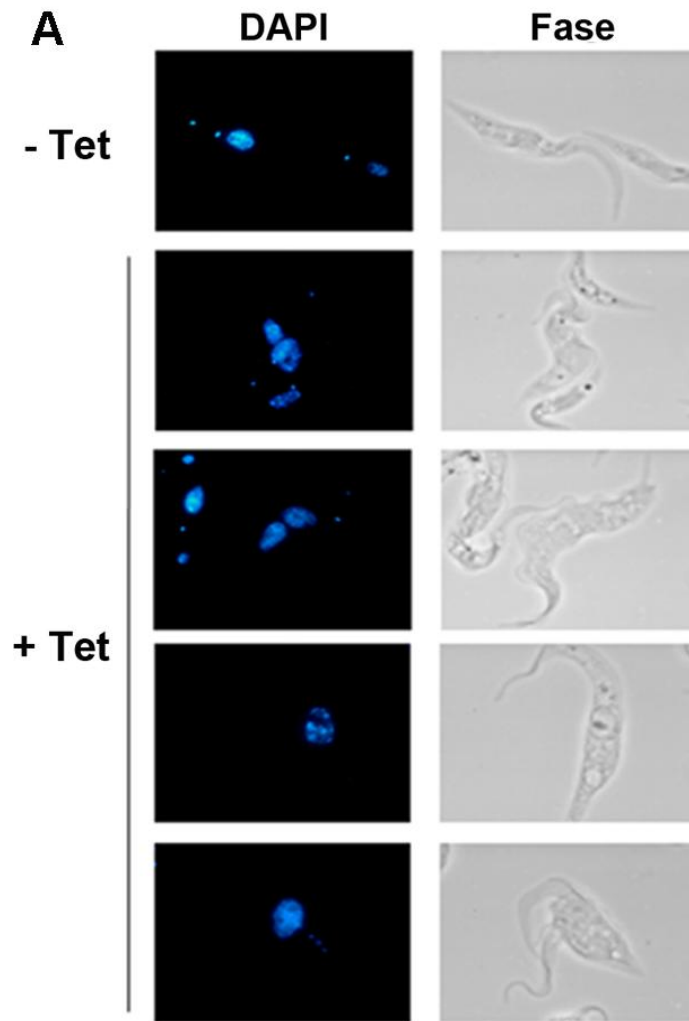


Figura 5. Diminuição na expressão de TbTOR2 causa um aumento de zóides, células multinucleadas e células na fase S/G2 do ciclo celular. Células TOR2 e controle (29-13) tratadas por 4 dias com tetraciclina (+Tet) ou não (-Tet) foram coradas com DAPI e o número de núcleos (N) e cinetoplastos (K) quantificados.



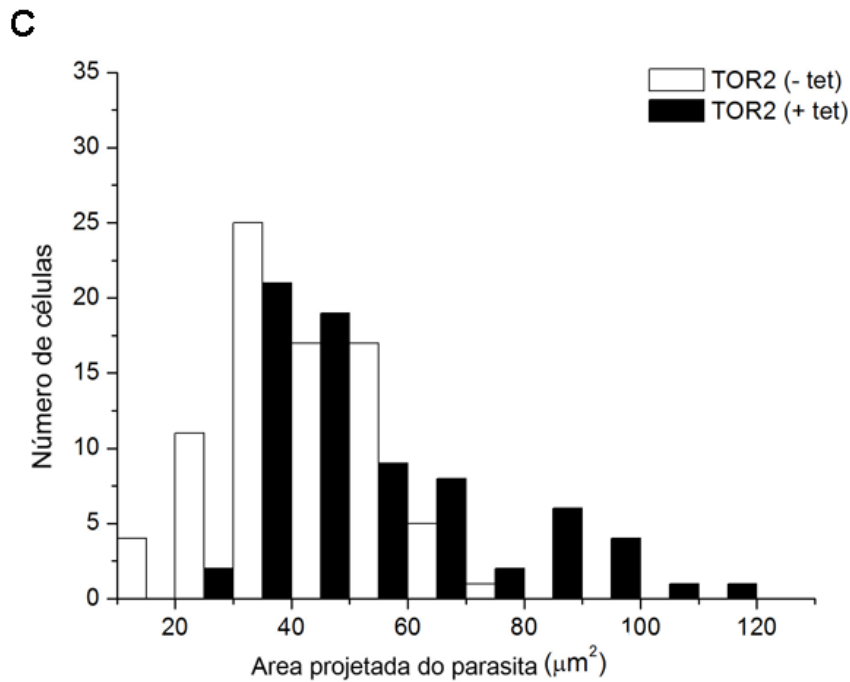


Figura 6. Depleção de TbTOR2 causa um aumento no tamanho celular. (A) Células TOR2 induzidas (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina, coradas com DAPI e visualizadas em microscópio de fluorescência. (B) Porcentagem de procícticos contendo o plasmídeo P2T7-177 TOR2 ou células controle não transfectadas (29-13) tratadas (+Tet) ou não (-Tet) com tetraciclina, visualizadas em microscópio e quantificadas quanto ao tamanho celular (Normais e Grandes). (C) Procícticos TOR2 induzidos (+ tet) ou não com tetraciclina (-tet) tiveram sua área de superfície medida com o auxílio do software Image J. Imagens foram adquiridas e a área de cada imagem quantificada.

Depleção de TbTOR2 não aumenta os níveis de polifosfato

Para determinar se o efeito no aumento nos níveis de polifosfato era específico para TbTOR-like 1, medimos os níveis de polifosfato de cadeia curta para as células controle e RNAi de TbTOR2. Observamos que os níveis de Poli P se mantiveram iguais pra as células TbTOR2 induzidas ou não (controle) com tetraciclina (Figura 7A), indicando ser este um efeito específico para TbTOR-like 1. Para confirmamos que o efeito do aumento da quantidade de Poli P não era um efeito da presença do plasmídeo, pelo fato do RNAi apresentar um pouco de vazamento na sua expressão, medimos os níveis de Poli P de cadeia curta e longa para as células não transfectadas 29-13 comparado com as células de TbTOR-like 1 induzidas ou não com tetraciclina e observamos níveis semelhantes de Poli P para TbTOR-like 1 controle e 29-13

(Figuras 7B e C). Concluimos que este aumento é específico para as células submetidas a RNAi para TbTOR-like 1.

Estes resultados com a TbTOR2 apóiam a idéia de que cada uma destas proteínas quinases responderia a um estresse diferente. Não sabemos no caso de *T. brucei* como seria a cascata de sinalização para cada uma das quinases.

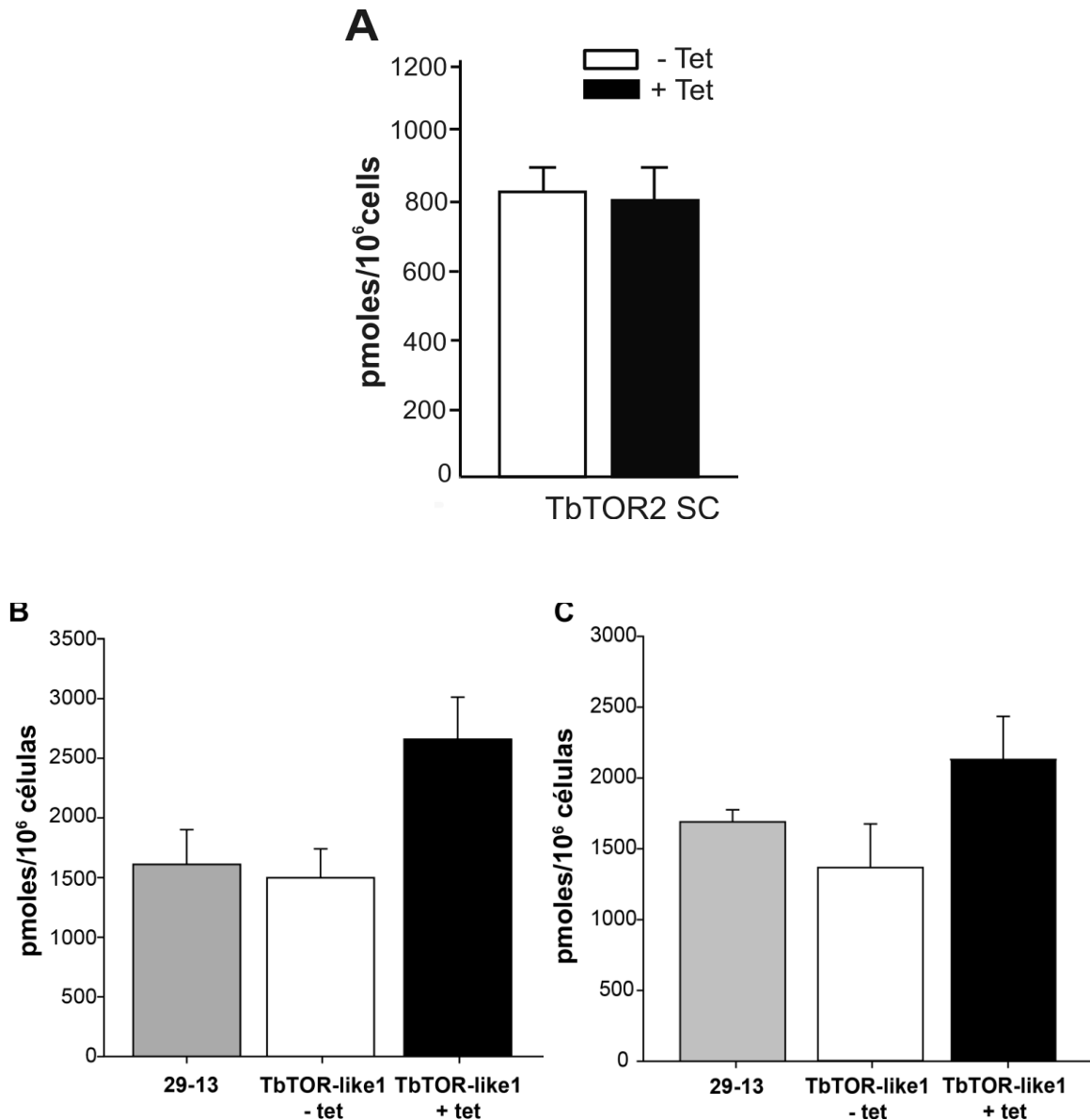


Figura 7. Células depletadas em TbTOR2 possuem os mesmos níveis de polifosfato de cadeia curta. (A) Os níveis de poli P de cadeia curta foram medidos para as células induzidas (+ tet) ou não (-tet) com tetraciclina por 6 dias. (B) Níveis de polifosfato de cadeia curta e (C) de cadeia longa de células 29-13 não transfectadas comparados com células TbTOR-like 1 induzidas ou não com tetraciclina.

CAPÍTULO II. Localização da quinase de eIF2 α TceIF2K2 em *Trypanosoma cruzi*

Resumo

Em paralelo aos estudos sobre as quinases TOR realizamos um trabalho de caracterização das quinases que possivelmente fosforilam o fator de início de tradução eIF2 α de *T. brucei* em colaboração com o laboratório da Prof. Dra. Beatriz Castilho. Este trabalho gerou o artigo: Novel membrane-bound eIF2 α kinase in the flagellar pocket of *T. brucei*, publicado em 2007 (Moraes et al., 2007) (Anexo II). Neste trabalho identificamos três potenciais quinases de eIF2 α (TbeIF2K1-K3). O enfoque do trabalho foi com a quinase TbeIF2K2 onde mostramos que TbeIF2K2 é uma glicoproteína associada à membrana, expressa tanto na forma procíclica quanto na sanguínea de *T. brucei*. Mostramos que seu domínio catalítico é capaz de fosforilar eIF2 α de leveduras e mamíferos na serina 51. TbeIF2K2 também fosforila a forma não usual de eIF2 α presente em tripanossomatídeos, no resíduo treonina 169, correspondente a serina 51 de outros eucariotos. Entretanto, TbeIF2 α não é um substrato para GCN2 ou PKR *in vitro*. TbeIF2K2 está localizada, tanto na forma sanguínea quanto em procíclicos, principalmente na bolsa flagelar, organela que é o local exclusivo de exo- e endocitose nesses parasitas. TbeIF2K2 também pode ser detectada em compartimentos endocíticos, 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*.

Uma vez que a proteína quinase K2 está na bolsa flagelar do *T. brucei* nos propusemos a localizá-la em *T. cruzi* que apresenta importantes diferenças no processo de endocitose e exocitose (Cunha-e-Silva et al., 2006; de Souza et al., 2009; Sant'Anna et al., 2008). No *T. cruzi* além da bolsa flagelar a incorporação de macromoléculas ocorre através do citóstoma. Além disso, na forma epimastigota, há um grande acúmulo de proteínas em lisossomos secundários denominados reservossomos. Estas organelas se formam quando o parasita está em condições de excesso de nutrientes e são consumidas

quando os nutrientes se tornam escassos, como é o caso do parasita nas porções terminais do tubo digestivo do inseto vetor.

Analizamos assim a reatividade de diversos anticorpos gerados contra a TbeIF2K2 e diferentes porções da TceIF2K2. Em resumo, estes anticorpos reconhecem uma banda de tamanho esperado para esta quinase A TceIF2K2 é parcialmente solubilizada com detergentes. Em ensaios de imunofluorescência observamos a localização da quinase em vesículas na região posterior de formas epimastigotas. A marcação em vesículas não é encontrada nas formas metacíclicas e em tripomastigotas derivados de células de mamífero em cultura. Verificamos que a localização de TceIF2K2 é muito semelhante à marcação dos reservossomos obtida com anticorpos anti-cruzipaína. Esses dados mostram que esta proteína quinase tem localização distinta em *T. brucei* e *T. cruzi*. Enquanto que nos primeiros a K2 parece estar controlando a densidade de proteína na bolsa flagelar, e possivelmente na superfície do parasita, no *T. cruzi* ela poderia estar relacionada a um controle de tradução relacionado ao compartimento de acúmulo de reservas intracelulares.

Resultados

Expressão e localização de K2 em *T. cruzi*

Na figura 1A mostramos um alinhamento entre as quinases eIF2K2 de *T. brucei* e *T. cruzi*. Como mostrado na figura 1B, ambas possuem uma seqüência sinal, dois domínios transmembrânicos e um domínio quinase.

Verificamos através de Western blot que eIF2K2 é expressa na forma epimastigota de *T. cruzi*. Nestes experimentos foi detectada uma banda que migra com aproximadamente 160 kDa (Figura 1C). Sempre foi detectada reatividade, tanto em *T. brucei* como em *T. cruzi* para bandas de menor peso molecular. A quinase de *T. brucei* TbeIF2K2 é detectada em extratos celulares enriquecidos com a fração de membrana, ou seja, somente se solubilizava na presença de detergentes. No caso de epimastigotas de *T. cruzi* a proteína permanece insolúvel em extratos obtidos por congelamento e descongelamento e pode ser parcialmente solubilizada com detergente (Figura 2). Como controle, mostramos que a proteína da membrana flagelar, Fa-CaBP (Engman et al., 1989) foi totalmente extraída na presença de detergente.

A

TL_F2 : **N**PERVRAA**S**MOCIA**L**IT**C**GGV**G**CT**E**PT**R**-----**S**PC**G**AK**M**IL**L**AV**T**HS**C**LL**L**Q**D**QA**T**P**R**M**I**D**S**CH**M**W**T**M**I**CG**M**I**S**D**L**U**H**TP**R**V**I**R**D**Q**E**FA**L**PP**L**IG**GL**M**L**F**I**PP**P**AS**D**A : 125
 Tc_F2 : **N**PER**S**H**H**IC**L**IP**I**U**C**HT**I**GL**S**PC**V**ES**T**L**S**K**S**CD**CA**R**A**Q**L**AN**L**IK**W**E**T**ES**AC**D**E**TS**S**IF**TR**ER**HA**SY**FL**IS**A**LL**L**HP**DR**IS**Y**CL**AG**Q**P**M**T**D**IC**GM**R**VE**DE**HT**EV**HQ**D**L**AP**ELL**EG**GL**F**TR**PC**WA**FF**CC : 149

* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120 * 140
 TL_F2 : **C**RC**L**IT**V**Y**D**CT**D**EC**D**Y**D**-----**D**---**Y**DD**A**PH**SE**P**Q**F**FM**SL**S**LR**PR**HA**V**K**A**PE**Y**Y**V**T**S**Q**L**A**T**Q**D**SH**CT**H**C**TP**FT**PH**S**FL**H**W**L**O**V**W**TH**Y**R**C**Q**Y**H**Q**M**IS**LA**C**Y**LS**E**FP**Q**CH**ES**EC**GE**PO**Q**DM**A** : 263
 Tc_F2 : **P**RC**L**Y**E**CP**D**R**G**IE**V**ET**P**EA**FP**CR**T**IS**C**S**D**CE**EP**RS**ET**EP**CF**FM**S**TL**R**PK**SH**Q**AC**E**D**IF**GT**IS**A**HT**D**S**MD**GR**EP**ET**NS**PS**Y**HL**W**AK**Q**AT**HW**MP**RG**AT**WM**RR**FG**ES**Q**D**HS**L**AC**Y**LS**E**S**PC**SE**-EN**L**S**D**H**FL**EV**S**T : 257

* 160 * 180 * 200 * 220 * 240 * 260 * 280 * 300
 TL_F2 : **C**RC**L**IT**V**Y**D**CT**D**EC**D**Y**D**-----**D**---**Y**DD**A**PH**SE**P**Q**F**FM**SL**S**LR**PR**HA**V**K**A**PE**Y**Y**V**T**S**Q**L**A**T**Q**D**SH**CT**H**C**TP**FT**PH**S**FL**H**W**L**O**V**W**TH**Y**R**C**Q**Y**H**Q**M**IS**LA**C**Y**LS**E**FP**Q**CH**ES**EC**GE**PO**Q**DM**A** : 263
 Tc_F2 : **P**RC**L**Y**E**CP**D**R**G**IE**V**ET**P**EA**FP**CR**T**IS**C**S**D**CE**EP**RS**ET**EP**CF**FM**S**TL**R**PK**SH**Q**AC**E**D**IF**GT**IS**A**HT**D**S**MD**GR**EP**ET**NS**PS**Y**HL**W**AK**Q**AT**HW**MP**RG**AT**WM**RR**FG**ES**Q**D**HS**L**AC**Y**LS**E**S**PC**SE**-EN**L**S**D**H**FL**EV**S**T : 257

* 320 * 340 * 360 * 380 * 400 * 420 * 440
 TL_F2 : **V**W**R**CS**Q**-----**S**-----**V**P**Q**IL**AN**Q**PD**HD**AM**PD**DF**FF**T**FN**D**D**L**W**PE**EC**Q**NO**Y**TD**Q**NT**I**V**A**ED**PA**Q**CT**SS**IA**AP**PH**CG**V**Y**PH**FA**Y**PH**FA**AF**TH**RG**FL**Q-----**R**NG**PH**LS**R**FR**Q**DH**I**TV**DF**W**A**T**Q**I : 359
 Tc_F2 : **N**L**S**IL**IQ**CC**Q**D**NE**V**I**S**T**R**E**V**T**E**V**U**S**EA**TER**V**E**CG**CH**D**IR**N**K**Q**U**H**ED**ED**FW**Y**U**L**S**EA**TA**IP**SS**W**AP**IS**W**SA**W**AF**ES**LS**W**AL**FP**ES**LD**TV**E**IL**ER**WT**S**Y**IP**SS**Q**ES**Q**E**S**FA**LR**CP**A**T**Q**I : 446

* 460 * 480 * 500 * 520 * 540 * 560 * 580
 TL_F2 : **D**D**D**DD**PH**EL**IG**R**S**FO**CS**ML**IQ**CS**AN**S**Q**W**AS**PL**FG**W**GES**IP**DEL**S**PL**ML**W**PH**PF**AP**QT**W**IL**S**A**TI**VC**GM**L**PH**IL**PK**AR**-A**N**A**C**Y**D**S**I**EM**W**I**Q**TS**HT**IT**GC**FA**AD**PG**CH**FL**TP**AG**CS**IA**V**F**ESS**FL**IT** : 547
 Tc_F2 : **P**D**W**AD**L**EL**EL**AL**GN**Y**QC**CS**M**HC**Q**CS**M**H**CS**PA**Q**EN**S**CS**EV**S**F**PS**E**ED**IC**AK**L**LL**W**NS**Q**W**S**HL**S**AF**L**W**DR**W**L**Q**W**IT**CV**Q**D**AP**W**H**EN**SS**IG**S**IR**WR**FL**D**PH**TS**A**Q**S**AK**E**IL**S**Y**R**LE**AS**HT**E**C : 555

* 600 * 620 * 640 * 660 * 680 * 700 * 720 * 740
 TL_F2 : **T**A**P**PD**IC**GV**Q**IV**M**G**K**Q**V**W**IS**AM**E**SA**GL**O**U**W**RN**EM**D**D**D**EV**Y**AC**ESS**LS**Q**NS**Q**VS**AT**Q**W**TM**PH**Q**Q**GV**LA**R**IK**CG**EM**W**Q**WH**Q**IG**AN**Y**A**IR**AV**IR**ED**PC**Q**RE**AI**HS**S**U**RN**W**W**V**Y**YS**M**IR**AK**ES : 656
 Tc_F2 : **C**R**S**F**S**IT**L**AE**A**RI**P**ES**T**A**W**CT**IS**M**HH**DS**MA**-----**N**S**Q**DE**S**IS**TR**-----**P**ES**F**CI**Q**IR**NS**WS**Q**LL**F**Q**CP**P**EL**GS**Q**KS**S**VR**SH**PI**IP**VS**AV**ALL**I**DD**N**-E**L**Y**I**Q**E**AV**H**ES**TP**IS**W**W**FF**RA**ML**IR**P**RA : 735

* 760 * 780 * 800 * 820 * 840 * 860 * 880
 TL_F2 : **D**AK**H**GI**W**AD**W**FG**S**VF**CD**EST**GI**LN**T**NS**SA**IC**S**IL**W**I**Q**IV**Y**R**S**CS**L**A**HH**RM**A**PS**LE**AW**H**IL**Q**IV**GV**Y**H**C**Q**TV**H**R**DL**ER**W**IK**V**SD**AG**CH**RI**IG**CG**IC**L**AR**W**Q**TP**IG**W**SA**VE**FG**S**AT**L**LD**DE**RS**F**CC**Q** : 845
 Tc_F2 : **P**ART**I**CI**LD**ED**L**TD**AI**ES**AT**IL**S**H**HT**PH**TR**AS**SD**AC**Y**TV**I**FC**Q**ED**EP**FL**A**HH**VP**PG**FT**LE**MP**PH**L**Q**IS**GL**Q**V**HS**Q**W**GE**CC**LE**FR**IP**ES**SC**H**IE**IG**F**CI**SS**NR**EP**HE**LG**LD**AF**PS**ES**AG**EG**H**AL**AP**T : 864

* 900 * 920 * 940 * 960 * 980 * 1000 * 1020 * 1040
 TL_F2 : **P**L**M**SP**R**CC**Q**CG**S**AT**A**S**D**VF**S**IG**L**AV**E**Y**ET**T**IO**HE**K**IT**L**Q**AP**HE**TS**AL**ED**PP**EA**RR**FO**TE**Q**D**QR**IS**Q**EW**CR**IRE**TW**IR**SG**Q**IC**SA**FL**Q**W**CA**ID**V**Q**VEL**AM**FT**SS**SA**ML**S**W**AK**TP**ED**SN**W**Q**HL**GM**ES : 964
 Tc_F2 : **P**L**M**CP**P**Q**R**GC**D**AP**T**ED**Y**IS**IG**L**AL**EF**V**Q**ET**T**IO**HE**K**IT**L**Q**AP**HE**TS**AL**ED**PP**EA**RR**FO**TE**Q**D**QR**IS**Q**EW**CR**IRE**TW**IR**SG**Q**IC**SA**FL**Q**W**CA**ID**V**Q**VEL**AM**FT**SS**SA**ML**S**W**AK**TP**ED**SN**W**Q**HL**GM**ES : 1063

* 1060 * 1080 * 1100 * 1120 * 1140
 TL_F2 : **S**Q**S**ET**AG**FL**P**SA**N** : 100E
 Tc_F2 : **S**TE**EQ**AT----- : 104I

B

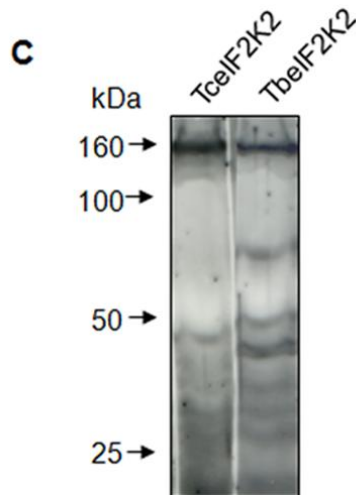


Figura 1. (A) Alinhamento de eIF2K2 de *T. brucei* (TbK2) e *T. cruzi* (TcK2). Os resíduos conservados estão em preto. (B) Esquema das quinases de *T. brucei* (TbelF2K2) e *T. cruzi* (TcelF2K2). Os domínios funcionais estão indicados. (C) eIF2K2 está expressa em *T. cruzi* (TcelF2K2) e *T. brucei* (TbelF2K2). Western blot com anti-TbelF2K2 com $2,5 \times 10^6$ parasitas (epimastigotas e procíclicos) intactos. As bandas do padrão de peso molecular estão indicadas.

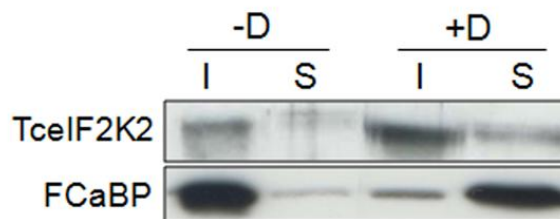


Figura 2. TcelF2K2 é parcialmente solúvel na presença de detergente. Western blot com anti-TbelF2K2 e anti-FCaBP das frações solúveis (S) e insolúveis (I) de parasitas epimastigotas lisados por congelamento/descongelamento e tratados com um tampão na presença (+D) ou ausência (-D) de detergente.

Para determinarmos a localização da quinase em *T. cruzi* testamos diversos anticorpos, inclusive anticorpos monoclonais, uma vez que sempre obtivemos alguma reação cruzada utilizando Western blot. Observamos que a maioria dos anticorpos obtidos contra TcelF2K2 marca vesículas na região posterior da forma epimastigota de *T. cruzi* (Figura 3) diferentemente do que ocorre em *T. brucei* no qual a quinase se localiza na bolsa flagelar (Moraes et al., 2007). Esta localização foi obtida consistentemente utilizando diversos anticorpos. Construímos também um vetor para a expressão no parasita da quinase endógena com uma etiqueta de HA (hemaglutinina) no C-terminal, usando o plasmídeo pTEX (Kelly et al., 1992a). Como mostrado na Figura 4 podemos observar a expressão de uma proteína no tamanho esperado de TcelF2K2 endógena (160 kDa) nos parasitas transfectados, o que não ocorreu nos parasitas controle não transfectados. Entretanto, por imunofluorescência não conseguimos observar nenhuma marcação, talvez pelo fato da proteína ser pouco expressa no parasita.

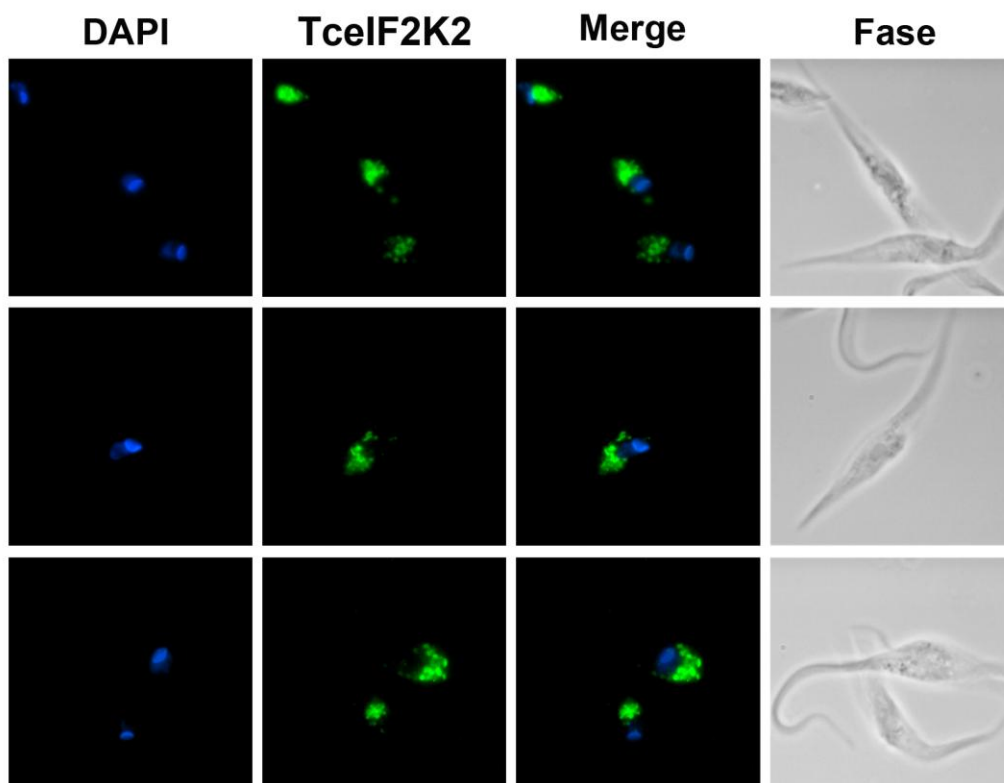


Figura 3. Localização da quinase TcelF2K2 em epimastigotas. Imunofluorescência usando anti-TcelF2K2. As figuras mostram coloração com DAPI, contraste de fase e as imagens sobrepostas (merge) do mesmo campo.

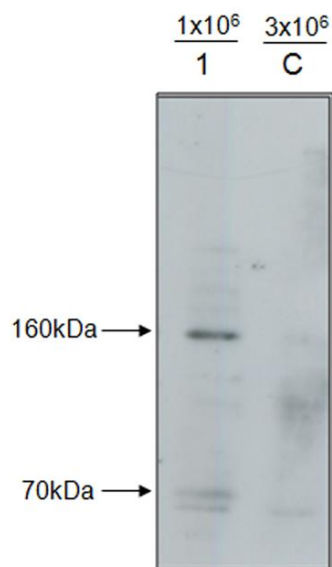


Figura 4. Expressão de TcelF2K2 com tag de HA. Western blot de 1×10^6 e 3×10^6 parasitas epimastigotas usando anti- HA. 1- células transfectadas e C- parasita controle não transfectado. As setas mostram o tamanho dos padrões de massa molecular.

A marcação obtida em epimastigotas não é encontrada em metacíclicos e tripomastigotas de cultura (Figura 5). No segundo painel da Figura 5 podemos observar um metacíclico sem a marcação e um epimastigota que ainda não se diferenciou marcado nas vesículas.

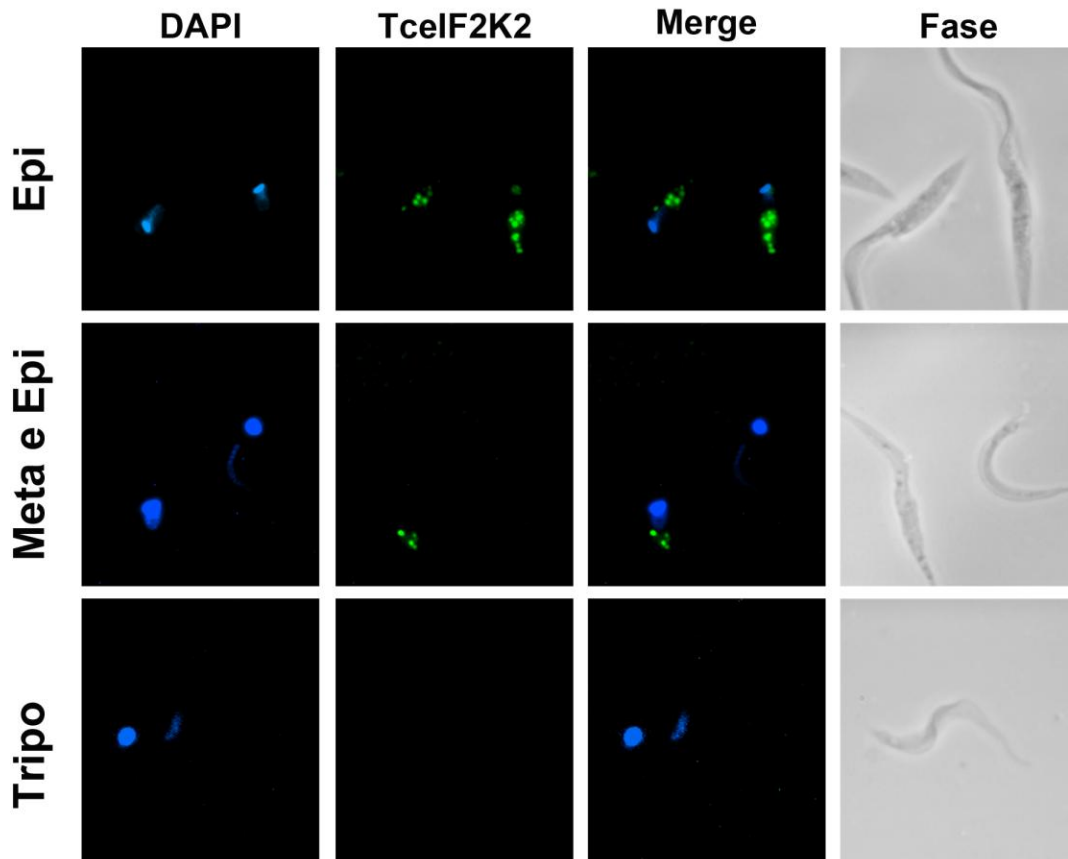


Figura 5. Localização da quinase TcelF2K2 em epimastigotas (epi), tripomastigotas metacíclicos (meta) e tripomastigotas de cultura (tripo) usando anti-TbelF2K2 purificado contra TcelF2K2 recombinante (1:50). As figuras mostram coloração com DAPI, contraste de fase e as imagens sobrepostas (merge) do mesmo campo.

Esse tipo de vesículas parece-se muito com os reservossomos que são responsáveis por armazenar proteínas e lipídeos que serão usadas no outro estágio do parasita (Cunha-e-Silva et al., 2006). O fato da marcação não ser observada em metacíclicos e tripomastigotas de cultura, reforça a idéia de que esta marcação seja nos reservossomos uma vez que esse tipo de compartimento não é encontrado nessas formas do parasita. Estudos mostraram que o volume celular relativo ocupado por estas organelas gradualmente diminui durante a diferenciação, sugerindo que os nutrientes

acumulados sejam utilizados como fonte de energia nessas formas do parasita (Cunha-e-Silva et al., 2006). Para confirmarmos que essas vesículas seriam reservossomos, utilizamos um marcador dessas organelas, o monoclonal 3G4 obtido em nosso laboratório e o nosso soro policlonal anti-TceIF2K2 para uma dupla marcação. Como mostrado na Figura 6 podemos observar uma colocalização de ambos os anticorpos, indicando que TceIF2K2 está localizada nos reservossomos.

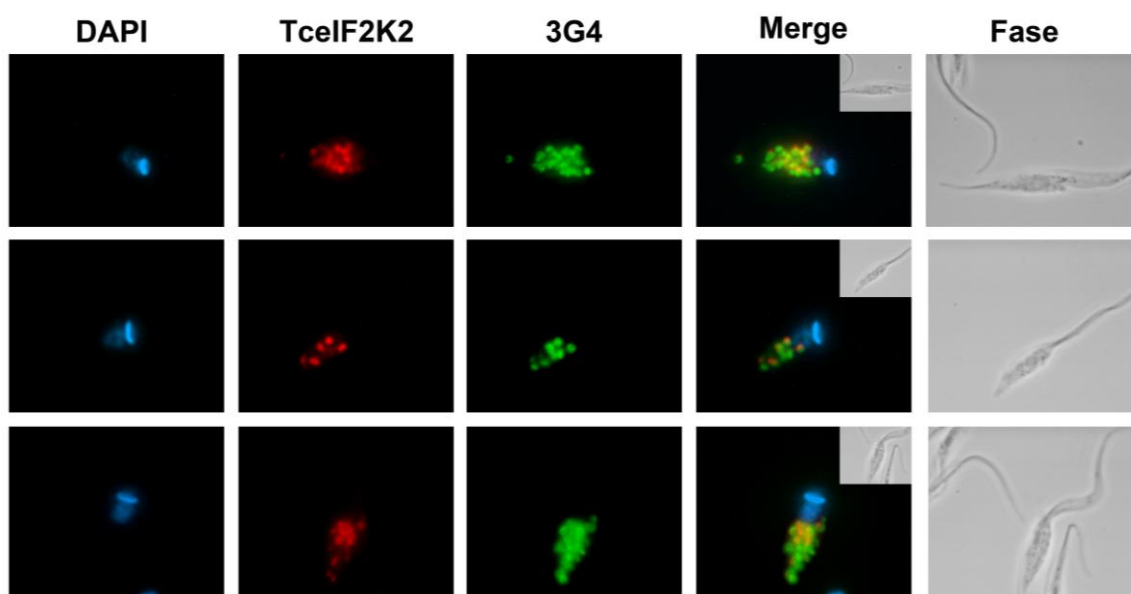


Figura 6. Localização de TceIF2K2 comparada a um marcador de reservossomos. Imunofluorescência das formas epimastigotas de *T. cruzi* usando o monoclonal 3G4 e anti-TceIF2K2. As figuras mostram coloração com DAPI, contraste de fase e as imagens sobrepostas (merge) do mesmo campo.

Os dados sugerem que TceIF2K2 poderia estar envolvida na sinalização celular relacionada ao tráfego intracelular. Em epimastigotas há acúmulo de nutrientes absorvidos no citóstoma (Porto-Carreiro et al., 2000). Com o careciamento de nutrientes, o parasita reverte este tráfego e passa a utilizar o material acumulado nos reservossomos. Sendo uma quinase capaz de fosforilar a proteína eiF2 α , e, portanto capaz de inibir a síntese protéica, esta quinase poderia estar tendo papel análogo ao que talvez ocorra em *T. brucei* onde ela se localiza na bolsa flagelar, local de endocitose e exocitose neste organismo. TceIF2K2 assim como TbeIF2K2 parece estar controlando a

densidade de proteína na superfície do parasita e nos compartimentos endossomais.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

T. brucei e *T. cruzi* são parasitas que apresentam diferentes formas ao longo de seu ciclo de vida com distintas características. Muito pouco se sabe sobre como esses parasitas percebem as mudanças ambientais e quais os sinais e mecanismos envolvidos na transformação de um estágio para outro.

Nesta tese mostramos que apesar de que TbTOR-like1 tenha características semelhantes à outras TOR, ela apresenta características peculiares. TbTOR-like 1 tem uma localização citossólica dispersa em grânulos únicos, que não colocalizam com outras organelas citossólicas. Talvez pela presença de um domínio PDZ, entre as repetições HEAT e o domínio FAT, TbTOR-like 1 esteja envolvida na formação de um diferente tipo de complexo citossólico. Muitas das proteínas contendo domínios PDZ estão localizadas em sítios subcelulares altamente especializados o que sugere seu envolvimento em aspectos específicos da fisiologia celular. Exemplos são alguns receptores ou canais que formam “clusters” (Charest et al., 2001). A presença de PDZ também é observada em proteínas que formam junções celulares e em componentes que tem um papel na organização de diversos complexos de sinalização (Feng and Zhang, 2009).

Um fato importante encontrado neste trabalho é o de que mudanças hiperosmóticas controlam momentaneamente a localização de TbTOR-like 1. É tentador especular que a mudança na localização durante o choque osmótico seja a maneira como ocorre a sinalização mediada por TbTOR-like 1. Neste sentido o domínio PDZ poderia estar envolvido na formação de complexos durante alterações osmóticas.

Já TbTOR2 se encontra no complexo TORC2 e apresenta as funções conservadas de TORC2 de outros eucariotos. É importante notar que uma característica única de TbTORC2 é a sensibilidade desse complexo à rapamicina. TbTOR2 diferentemente de TbTOR-like 1 e TbTOR1, esta última localizada no núcleo, se encontra associada a mitocôndria e ao retículo endoplasmático. Essa localização pode ser essencial para as interações com efetores *downstream* envolvidos na regulação do tráfego de vesículas através do citoesqueleto de actina (Barquilla et al., 2008). Células depletadas em

TbTOR2 apresentam um aumento acentuado no tamanho celular, e análises ultra-estruturais mostraram que estas células também apresentam outras alterações tais como uma bolsa flagelar proeminente e muitas células multinucleadas (Barquilla et al., 2008). Em tripanossomatídeos o crescimento celular é altamente polarizado em direção a bolsa flagelar, uma região rica em actina onde ocorre a endocitose e exocitose (Garcia-Salcedo et al., 2004). Foi observado em formas sanguíneas depletadas em TOR2 alterações na localização de actina e também uma redução na endocitose (Barquilla et al., 2008). Esses dados sugerem que TbTOR2 estaria envolvida na regulação do citoesqueleto de actina e da endocitose.

Estudos de TOR em leveduras, *Drosophila* e em células de mamíferos demonstraram que essas quinases participam diretamente no controle do tamanho e conseqüentemente do crescimento celular. Nestes organismos depleção de TOR leva a uma diminuição no tamanho celular por vários mecanismos (Jacinto and Hall, 2003b; Wang and Proud, 2009). No caso de TbTOR-like 1 as células nocautes são maiores que as células controle semelhantemente ao que é observado para TbTOR2 mas, oposto ao que ocorre para TbTOR1. TbTOR-like 1 e TbTOR2 não são essenciais para *T. brucei*, entretanto a depleção de ambas as proteínas leva a uma diminuição progressiva no crescimento celular. Estes dados sugerem que a ausência de TbTOR-like 1 e TbTOR2 gera um efeito cumulativo que culminaria entre outras conseqüências na diminuição da proliferação celular.

Quando a expressão de mTOR1 e TbTOR1 é reduzida, as células param na fase G1 do ciclo celular (Barquilla et al., 2008; Monnerat et al., 2009), enquanto que para células depletadas em TbTOR-like1 ocorre um acúmulo de células na fase S/G2. Esta parada em S/G2 poderia estar ocorrendo devido a uma inibição da síntese nucleotídeos na presença de Poli P ou TbTOR-like 1 poderia assim como TOR1 afetar o controle de MAP quinase na progressão do ciclo celular (Petersen, 2009). Já para as células depletadas em TbTOR2 o efeito no ciclo celular é diferente. Estas apresentam um acúmulo de células multinucleadas e multiflageladas gerando assim defeitos na citocinese (Barquilla et al., 2008).

Contudo, o dado mais relevante desta tese foi o fato de que células depletadas em TbTOR-like 1 apresentam um maior número de acidocalcissomos assim como níveis aumentados de polifosfato e pirofosfato. Este efeito parece ser específico para TbTOR-like 1 dentre as quinases TOR de *T. brucei* uma vez que não observamos diferenças nos níveis de polifosfato para as células depletadas em TbTOR2 comparadas com as células controle. Por que a ausência de TbTOR-like 1 leva a um aumento do conteúdo de Poli P e PPi ainda não se sabe. Poderia ser um efeito direto nas enzimas envolvendo o *turnover* de Poli P e PPi ou TbTOR-like poderia estar afetando as bombas presentes na membrana dos acidocalcissomos diminuindo a hidrólise de Poli P e PPi. É importante salientar que o enriquecimento de Poli P nas células induzidas foi obtido em duas transfecções diferentes e em mais de um clone de cada, evidenciando que este não seria um resultado provocado pela construção realizada.

Exposições a diferentes condições osmóticas é uma conseqüência do complexo ciclo de vida destes parasitas. A redução de uma pirofosfatase de acidocalcissomos em *T. brucei* leva a uma resposta defeituosa em condições hiposmóticas e também a diminuição da virulência do parasita (Lemercier et al., 2004). Não se sabe ainda como estes parasitas percebem as flutuações osmóticas nos diferentes estágios do ciclo de vida. Várias evidências indicam que os acidocalcissomos contribuem para a resposta ao estresse osmótico através do balanço entre Poli P e PPi complexados com cátions. TbTOR-like 1 poderia assim estar envolvida no controle deste processo.

Em eucariotos, a fosforilação da subunidade α do fator eIF2 é um importante mecanismo na regulação da tradução em resposta a muitos estresses celulares. Na segunda parte deste trabalho mostramos que *T. brucei* e *T. cruzi* possuem uma quinase para eIF2 α localizada em regiões distintas da célula. No *T. brucei* (TbeIF2K2) ela está na bolsa flagelar e no *T. cruzi* (TceIF2K2) se localiza nos reservossomos e é expressa somente nas formas epimastigotas. Reservossomos são organelas que possuem a habilidade de concentrar proteínas e lipídeos obtidos do meio juntamente com enzimas proteolíticas da via secretória (Sant'Anna et al., 2009). São organelas de armazenamento de nutrientes que serão consumidos até que se complete a

diferenciação de epimastigotas em metacíclicos (Cunha-e-Silva NL et al., 2002).

Poucas proteínas foram identificadas e caracterizadas em reservossomos. Entre elas estão duas proteases lisossomais, cruzipáina e serina carboxipeptidase (Sant'Anna et al., 2009). Devido à concentração destas proteases, se hipotetizou que estas organelas seriam o principal sitio de degradação de proteínas a serem usadas como nutrientes neste parasita (Sant'Anna et al., 2009).

No caso de *T. brucei*, interessante, TbeIF2K2 se encontra na bolsa flagelar (Moraes et al., 2007). Devido ao fato de viverem em um ambiente extracelular, a sobrevivência deste parasita está associada com a ingestão de nutrientes extracelulares e evasão do sistema imune do hospedeiro (de Souza et al., 2009). Nestes parasitas toda a via endocítica está concentrada na porção posterior da célula e a ingestão de macromoléculas externas está restrita a bolsa flagelar (de Souza et al., 2009).

Como TbeIF2 α está presente por todo o citoplasma de *T. brucei*, o processo de síntese protéica possivelmente também está distribuído pelo citoplasma (Moraes et al., 2007). Duas hipóteses podem ser formuladas para esclarecer como TbeIF2K2 poderia estar ativando eiF2 α em vista das suas distintas localizações. A primeira é a de que TbeIF2K2 poderia mudar a sua localização, por exemplo sendo internalizada por vesículas endocíticas e desse modo aproximando-se do substrato citoplasmático (Moraes et al., 2007). Outra possibilidade seria que TbeIF2K2 atue apenas localmente, regulando a síntese protéica na região próxima à bolsa flagelar do parasita (Moraes et al., 2007). Em *T. cruzi*, TceIF2 α também se encontra dispersa no citoplasma (dados não mostrados). Apesar de não termos ainda evidências de que a quinase de *T. cruzi* fosforile TceIF2 α , TceIF2K2 poderia ter um papel análogo a quinase de *T. brucei*.

Pelos dados obtidos acima observamos que TbTOR-like 1 está localizada em um complexo citossólico único e após estresse hiperosmótico mudaria sua localização para a periferia celular. Nesse sentido poderíamos sugerir que TbTOR-like1 estaria sinalizando para que os acidocalcissomos ajudem na manutenção osmolaridade celular, talvez atuando direta ou

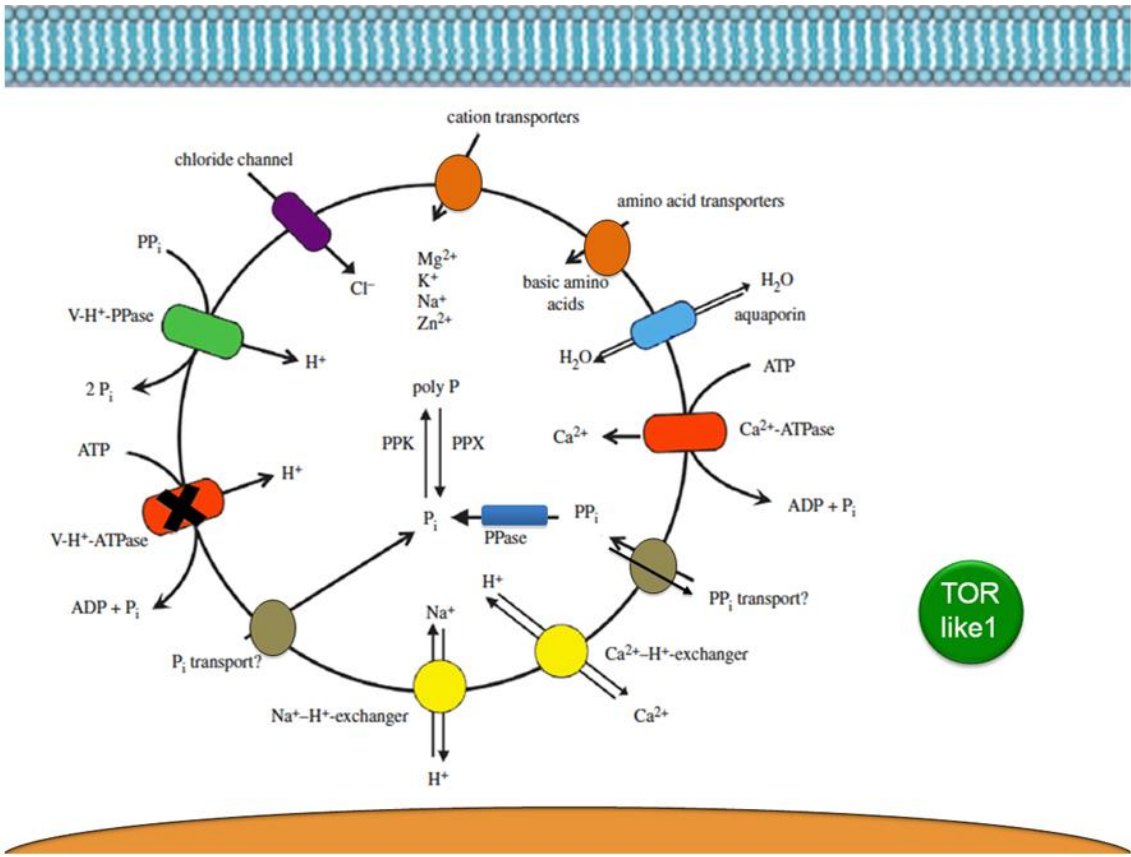
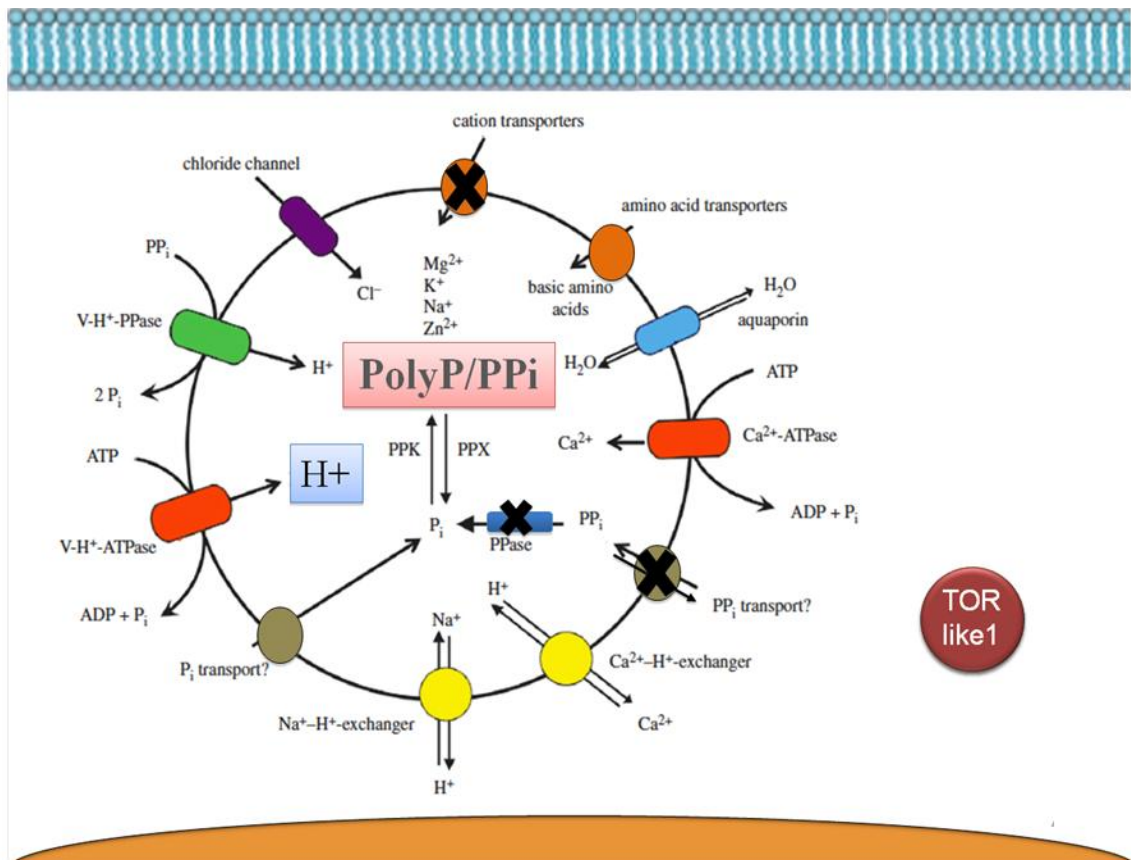
indiretamente sobre algumas das bombas presentes na membrana dessas organelas. Na ausência de TbTOR-like1 os acidocalcissomos poderiam não estar controlando normalmente os níveis de fosfato e este acumulado geraria uma deficiência no controle da osmolaridade. Um modelo hipótese está proposto nas Figuras 1 e 2. Quando TbTOR-like 1 está ativa ela poderia inibir uma das bombas de prótons presentes na membrana dos acidocalcissomos (Figura 1A), uma vez que observamos pelos nossos dados com laranja de acridina, que quando TbTOR-like 1 está inibida temos um acúmulo desse composto nos acidocalcissomos, indicando que estas organelas estariam mais protonadas (Figura 1B). Outra hipótese é a de que TbTOR-like 1 modularia a função dos transportadores de pirofosfato e/ou dos transportadores de cátions também presentes na membrana dos acidocalcissomos. O transporte de cátions para o interior dessas organelas é importante para o funcionamento de uma pirofosfatase (TbVSP1) presente em sua matriz (Lemercier et al., 2004). A função de TbVSP1, é hidrolisar polifosfato e pirofosfato. Sendo assim, quando TbTOR-like 1 está inibida, ela poderia também indiretamente inibir TbVSP1, o que poderia explicar o acúmulo de pirofosfato e polifosfato nos acidocalcissomos (Figura 1B).

No caso do estresse hiperosmótico, já existem dados na literatura que durante este tipo de estresse ocorre maior síntese de polifosfato (Ruiz et al., 2001), e observamos que TbTOR-like 1 se realocaliza na periferia celular, provavelmente se ligando na membrana plasmática através do seu domínio PDZ. Nesta situação TbTOR-like 1 estaria inibida, não podendo atuar sob os transportadores de pirofosfato e de cátions presentes na membrana dos acidocalcissomos (Figura 1C). O polifosfato acumulado nessas organelas, não sendo hidrolisado poderia não estar disponível para o uso na síntese de nucleotídeos, prejudicando a progressão do ciclo celular, causando um atraso na fase S do ciclo, além de causar um aumento do tamanho da célula e conseqüentemente uma inibição do crescimento celular (Figuras 2A e B). TbTOR-like 1 poderia também estar sinalizando para a presença de nutrientes através de uma cascata de sinalização ainda não conhecida, uma vez que ainda não conhecemos os possíveis alvos *downstream* de TbTOR-like 1.

Para TbTOR2 os nossos dados juntamente com os dados obtidos por outros autores indicam que esta quinase além de controlar o citoesqueleto de actina, parece estar também controlando a endocitose via a sinalização de TbTORC2 (Barquilla et al., 2008). TbTOR2 estaria agindo como um sensor de nutrientes, através de mecanismos ainda não conhecidos e assim afetar a estrutura dos filamentos actina e a modulação da entrada de nutrientes.

TceIF2K2 uma quinase presente nos reservossomos, organelas envolvidas na via endocítica do *T. cruzi*, poderia estar atuando também com um sensor de nutrientes e proteínas e regulando a densidade de proteínas na superfície celular. TceIF2K2 sinalizaria para a disponibilidades de nutrientes e acumulação dos mesmos para serem usados durante a diferenciação do parasita, uma vez que nas formas metacíclicas os reservossomos e a quinase estão ausentes. TceIF2K2 poderia também estar sinalizando para a manutenção da transcrição e tradução de proteínas envolvidas na diferenciação, promovendo assim a continuidade do ciclo de vida desse parasita.

Existem muitos dados na literatura sugerindo várias estratégias que estes parasitas usam para resistir aos estresses encontrados ao longo do seu ciclo de vida e assim progredir com sucesso durante a infecção. Interferir com proteínas envolvidas em respostas a estresses neste parasitas é provavelmente uma importante abordagem para a descoberta de novos alvos terapêuticos. Os nossos achados com as quinases estudadas são relevantes para elucidar vias regulatórias até então pouco conhecidas em *Trypanosoma* e podem facilitar entendermos melhor a fisiologia destes parasitas, além de gerar informações para novos alvos de drogas que poderiam bloquear a proliferação ou diferenciação celular. Muito ainda necessita ser estudado sobre estas vias e os resultados obtidos nesta tese são um passo relevante para entendermos como estes protozoários percebem as modificações do meio e sinalizam para a progressão do ciclo de vida.

A**B**

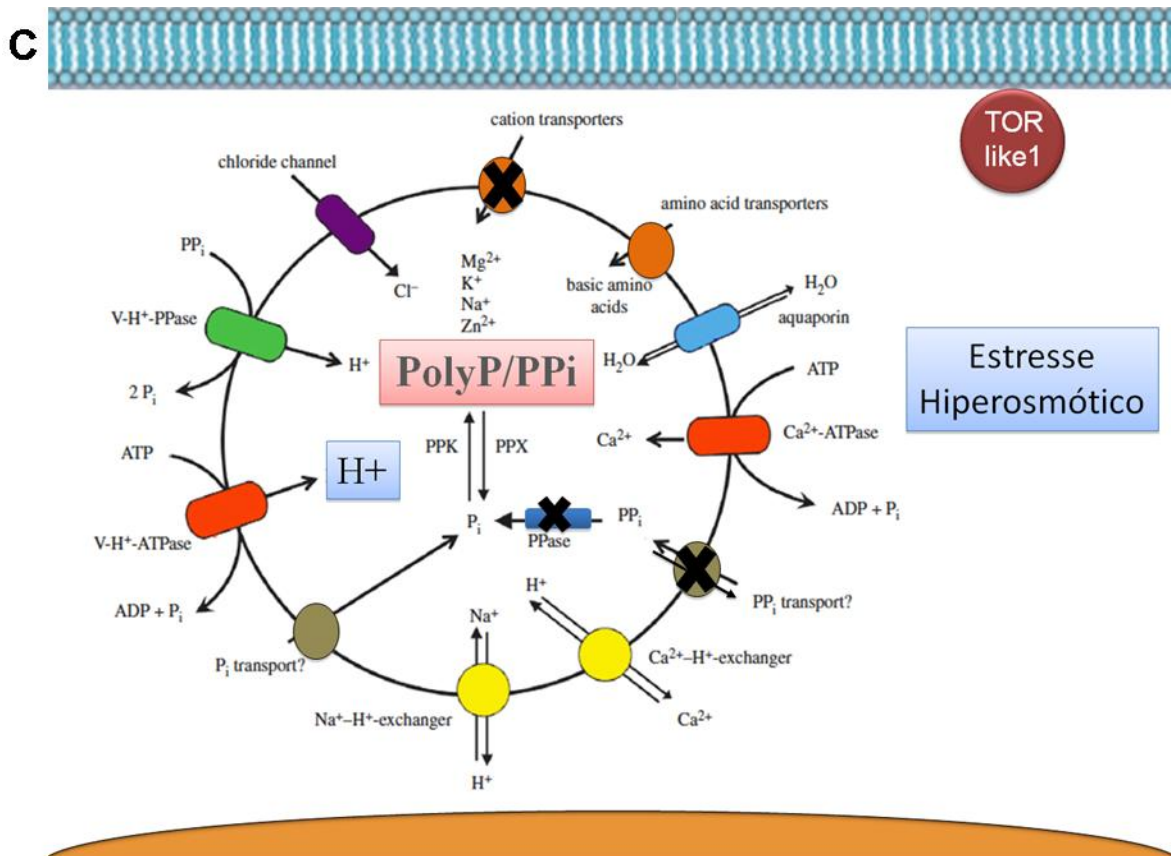


Figura 1. Modelo hipótese do mecanismo de ação de TbTOR-like 1 nos acidocalcisomos. (A) Situação quando TbTOR-like 1 está ativa. (B) Situação quando TbTOR-like 1 está inibida. (C) Situação de estresse hiperosmótico. O símbolo X representa inibição.

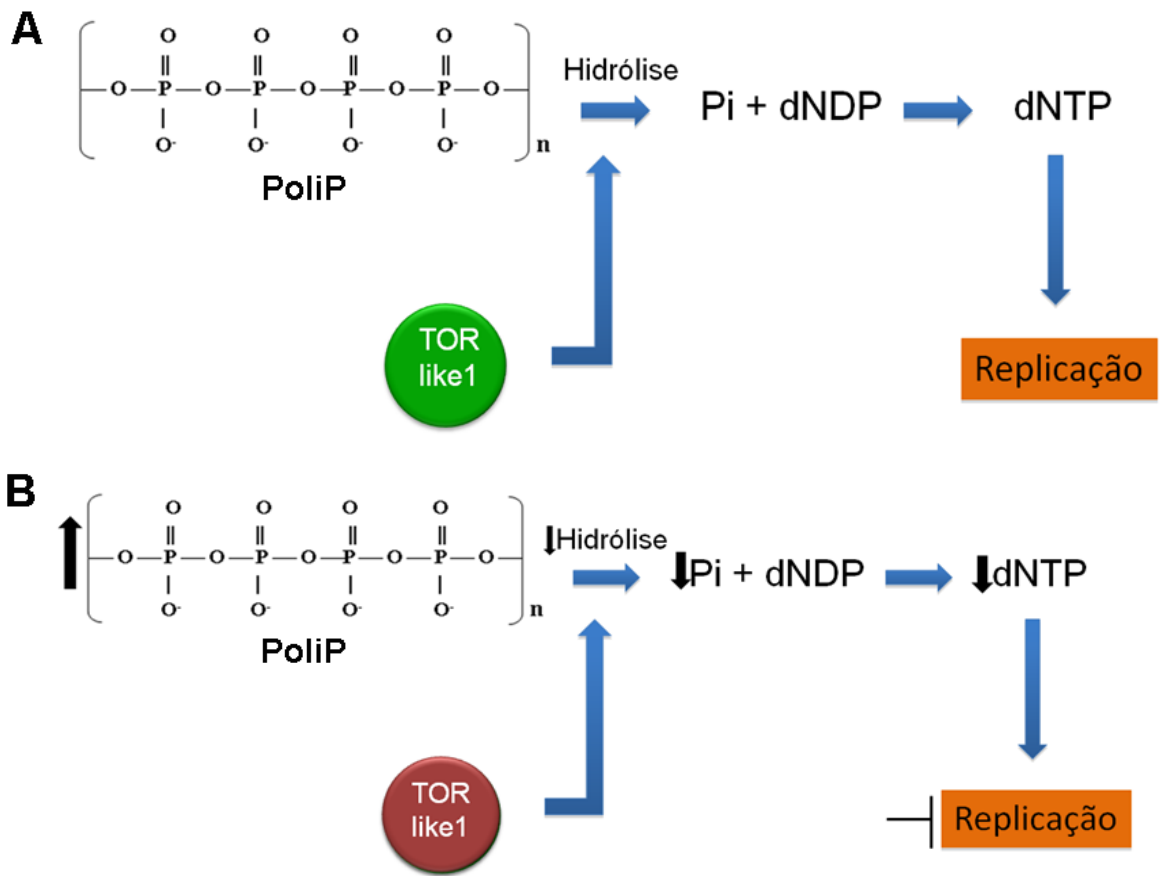


Figura 2. Modelo hipótese do mecanismo de ação de TbTOR-like 1 na síntese de nucleotídeos. (A) Situação quando TbTOR-like 1 está ativa. (B) Situação quando TbTOR-like 1 está inibida. PoliP- polifosfato, Pi- fosfato inorgânico, dNDP- desorribonucleosídeo difosfato, dNTP-desorribonucleosídeo trifosfato, ↑ - aumento, ↓ - diminuição, —| - inibição.

ANEXO I

Materiais e Métodos

Parasitas

- Forma procíclica de *T. brucei* (cepas 427 e 29-13 (Wirtz and Clayton, 1995)) cultivada em meio SDM 79 (Brun and Schonenberger, 1979)(Tabela I) acrescido de 10% SFB a 28°C, na presença de 50 µg/ml de higromicina e 15 µg /ml de geneticina.
- Forma sanguínea de *T. brucei* (cepa 90-13 (Wirtz et al., 1999)), cultivada em meio HMI-9 (Hesse et al., 1995) (Tabela II) acrescido de 10% de SFB e 10% Serum Plus a 37°C e 5% CO₂, na presença de 5 µg /ml de higromicina e 2.5 µg /ml de geneticina.
- Forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y), cultivada em meio LIT (CAMARGO, 1964)(Tabela III) acrescido de 10% de SFB, 0.8% de glicose, estreptomomicina (133 mg/litro) e penicilina (59 mg/litro) a 28°C.
- Forma tripomastigota de cultura de *T. cruzi*, que foram obtidas do sobrenadante de células (LLCMK₂) de mamíferos infectadas e mantidas em meio DMEM (Gibco)(Tabela IV) acrescido de 10% de SFB a 37°C e 5% CO₂.
- Forma metacíclica de *T. cruzi* (cepa Dm28C). Foram obtidas a partir da diferenciação de formas epimastigotas que foram crescidas até atingirem a densidade de 1×10^7 parasitas/ml. As culturas foram centrifugadas por 10 min a 2000 x g e incubadas por 2 horas em meio TAU (Contreras et al., 1985)(NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, tampão fosfato 8 mM, pH 6.0) a 28°C. Em seguida os parasitas foram novamente centrifugados e incubados (período no qual ocorre a diferenciação) em meio TAU3AAG (Contreras et al., 1985)(meio TAU acrescido de 10 mM de glicose, 2 mM de Ac. L-aspartico, 50 mM de Ac. L-glutâmico, 10 mM de L-prolina) a 28°C. Após 96 horas de incubação, os parasitas presentes no sobrenadante do meio de cultura consistiam de tripomastigotas metacíclicos.

Tabela I**Preparo de meio SDM 79 para procíclicos:**Protocolo utilizado para 1L

MEM	7,0 g
MOPS	5,0 g
Meio 199	2,0 g
HEPES	3,8 g
Glicose	1,0 g
NaHCO ₃	2,0 g
Piruvato de Na	0,1 g
L – alanina	0,2 g
L – arginina	0,1 g
L – glutamina	0,3 g
L – metionina	0,07 g
L – phenilalanina	0,08 g
L – prolina	0,6 g
L – serina	0,06 g
L – treonina	0,35 g
Taurina	0,18 g
Adenosina	0,1 g
Guanosina	0,01 g
Ácido fólico	0,004 g
PABA	0,002 g
Biotina	0,0002 g
MEM α nyo essenciais	6 ml
MEM α	10 ml
Penicilina	0,059 g
Estreptomicina	0,133 g

Completar o volume para 990 ml H₂O MQ e agitar por 45 min.

Acertar o pH para 7.3 com NaOH

Acertar o volume para 1000 ml

Esterilizar com filtro de 0,22 µm

Tabela II**Preparo de meio HMI-9 para forma sanguínea**Protocolo utilizado para 1 litro

IMDM 9 (GIBCO Cat.No. 12440)	800 ml
SFB (10%)	100 ml
Serum Plus10% (JRH Cat.No.14001)	100 ml
Hipoxantina estoque	10 ml
Ácido batocuproína dissulfônico (conc.final 50 µM)	0,028 g
Cisteína (conc.final 1.5 mM)	0,182 g
Acido Pirúvico	0,110 g
Timidina	0,039 g
2-mercaptoetanol	14 µl
pH 7,3	
Esterilizar com filtro de 0,20 mm	

Hipoxantina estoque

Dissolver 0,4 g de NaOH em 100 ml de água e adicionar 1,36 g de hipoxantina

Congelar em alíquotas de 10 ml

Tabela III**Preparo de meio LIT para forma epimastigota:**Protocolo utilizado para 1 litro

NaCl	4,0 g
KCl	0,4 g
Na ₂ HPO ₄	8,0 g
Triptose	5,0 g
Infusão de fígado (Liver Infusion Broth)	5,0 g

Solução de Hemina dissolvida em 0,1 M de 1 ml trietalonamina (10 mg/ml)

Autoclavar por 20 min

Tabela IV

Preparo de meio DMEM para forma tripomastigota de cultura:

Protocolo utilizado para 1L

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-Gibco	8,3 g
NaHCO ₃	3,7 g
Penicilina	0,059 g
Estreptomicina	0,133 g

Acertar o pH para 7,2 – 7,3. Esterilizar com filtro de 0,20 µm.

Oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos usados para amplificar os fragmentos do gene da proteína TbTOR-like 1:

TBTOR1NFOR: 5' – CCT CGA GCT TCT TGG GAA GCA TTT TGG – 3'

TOR1TBREV: 5' – AAG CTT TAT ACC CTC CAG TCA CG – 3'

TBTOR1BamFOR: 5' – CGG ATC CCT TCT TGG GAA GCA TTT TGG – 3'

TOR1F2FORXho: 5'- CTC GAG TCT GGT GGC GAC GAG GCT G -3'

TOR1F2REVVind: 5'- CTC CCG ACA AGG GGG GAA GTT AAG CTT- 3'

Oligonucleotídeos para epitopo tagging de TbTOR-like 1 em *T. brucei*:

TbTORL1-pMOF : 5'-CTT GCA GAA CGT AGC GAG TCA AGT CGA CCG TCT
TAT TGA AGA AGC AAC AAG TCT TGA TAA TCT TGC TGA GGC ATA TAT
AAC TGG TTG GGC ACC GTT CTG GGG TAC CGG GCC CCC CCT CGA G-
3'

TbTORL1-pMOR: 5'- CAT GAA AAA GGG AAA AAA AAA CAT GAT ATA CCT
CCT TTT CCG CGC CCC TCG TCA ACA CAG TGC AGT AAA ACA CGA TGT
TGC TTC TGC TCC CTG GTG TCC ATG GCG GCC GCT CTA GAA CTA GTG
GAT-3'

Oligonucleotídeos usados para amplificar os fragmentos do gene da proteína TOR2:

TBTOR2BamFOR: 5' – GGG ATC CGC TGA GGT TGT TAA GCA GGC – 3'

TOR2TB REV: 5' – AAG CTT ACA TGT CGA GAA TTC GC – 3'

Oligonucleotídeos usados para amplificar os fragmentos do gene da proteína K2

K2 TM FOR Nde: 5'- CAT ATG ATC CGA GAA GTT GAT AGG - 3'

K2 TM REV Bam: 5'- GGA TCC TTA TGT ATT CCC TGT ATC TGT G - 3'

K2Tc Xba FOR: 5'- TCT AGA ATC TGC CTC CAG TGA TGG - 3'

K2Tc Not REV: 5'- GGC CGC TTA CGA TTT TTT CTC - 3'

K2Tc Not FOR: 5'- GCG GCC GCA TAA ATT GCG CG - 3'

K2Tc Bam STOP: 5'- GGA TCC TGT GTT TTG AGT AAA CTC - 3'

Oligonucleotídeos para seqüenciamento:

M13 F "sequencing primer" 5' – CCCAGTTCACGACGTTGTAAAAC – 3'

M13 R "sequencing primer" 5' – AGCGGATAACAATTTTCACACAGG – 3'

Extração de DNA genômico de *T. brucei* O DNA genômico foi extraído de $6,0 \times 10^8$ parasitas recolhidos por centrifugação e lavados em PBS e ressuspensos em 500 μ l de NaCl 150 mM. Os parasitas eram lisados adicionando-se gota a gota desta suspensão a 5 ml de uma solução de 150 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM EDTA; 1% SDS, por grama de parasita mantida a 65°C. O lisado era incubado com 100 μ g/ml de proteinase K a 45°C por 3 h e o DNA extraído com fenol-clorofórmio e tratado com RNase como descrito (Sambrook et al., 1989).

PCR, clonagem, e sequenciamento de DNA As reações de polimerização em cadeia (PCR) eram realizadas em aparelho DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) por 10 ciclos de 94°C/ 50 s, 40°C/ 50 s, 72°C/ 1 min, seguidos por 35 ciclos de 94°C/50 s, 50°C/ 50 s, 72°C/ 1 min, seguidos por 72°C por 10 min e 4°C por tempo indeterminado. As reações de PCR para o epitopo tag eram realizadas por 1 ciclo de 94°C/1 min, seguidos por 35 ciclos de 94°C/45 s, 72°C/1 min, seguidos por um ciclo de 72°C/ 1min e 4°C por tempo indeterminado. As reações continham 100 ng de DNA, 10 pmol de cada oligonucleotídeo, dNTPs 0,12 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão de

PCR 1X. A análise dos produtos de PCR, e demais fragmentos de DNA eram feitas em gel de agarose e quando necessários os fragmentos purificados com o kit Sephaglas™ BandPrep Kit da Amersham Pharmacia. Os produtos de PCR eram clonados usando o vetor pCR2.1-TOPO da Invitrogen de acordo com as instruções do fabricante. Os demais métodos de análise de manipulação de DNA, preparo de plasmídeos, clonagem, transformação de bactérias foram feitos utilizando técnicas já padronizadas. As reações de seqüenciamento eram realizadas em aparelho ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER (Perkin Elmer).

Transfecções de *T. brucei* Formas procíclicas de *T. brucei* em fase exponencial de crescimento (2.5×10^7) eram centrifugadas 7 min a 1500 g, lavadas uma vez com tampão de eletroporação Cytomix (Clayton et al., 2005) e ressuspensas em 0,45 ml de do mesmo tampão. Esta suspensão juntamente com 10 µg de plasmídeo linearizado eram misturados em uma cubeta de eletroporação de 4 mm (mantida no gelo) e pulsadas duas vezes com 25 µF e 1,6 kV em eletroporador (Biorad). Após o pulso, as células eram diluídas em 10 ml de meio SDM-79 com antibióticos (geneticina e higromicina). Para seleção eram adicionadas as culturas 2,5 µg/ml de fleomicina (construções para RNAi) ou 50 µg/ml (construção epitopo HA) no dia seguinte à eletroporação, a cultura era diluída em série em duas placas de 24 poços, usando meio condicionado pelo crescimento com *T. brucei* mais os antibióticos (geneticina e higromicina). Quando as células selecionadas atingiam a densidade de 4×10^6 /ml elas eram repicadas normalmente e mantidas em cultura, ou congeladas a -80°C em meio contendo 10% de glicerol. Para as transfecções na forma sanguínea (cepa single marker) foram usadas 1×10^7 células e o procedimento utilizado era o mesmo que para procíclicos. Os parasitas eram eletroporados, diluídos em 10 ml de meio HMI-9 com geneticina (2,5 µg/ml) e higromicina (5 µg/ml) distribuídos em 0,5 ml nos poços de uma placa de 24 wells. A seleção era aplicada no dia seguinte adicionando o mesmo volume de HMI-9 mais fleomicina 5 µg/ml em cada poço. Quando as células chegavam a 2×10^6 /ml elas eram repicadas e mantidas em cultura, ou congeladas a -80°C em meio contendo 10% de glicerol.

Transfecções de *T. cruzi* Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento (1×10^7 parasitas/ml) eram centrifugados 10 min a 2000 g, lavados uma vez com tampão de eletroporação TCEB (NaCl 137 mM, HEPES 21 mM [pH 7], KCl 5 mM, Na_2HPO_4 5,5 mM e glicose 0,77 mM) (Ramirez et al., 2000) e ressuspensas em 0,4 ml de TCEB para 5×10^7 . Esta suspensão juntamente com 30 μg do plasmídeo pTEX K2 HA previamente linearizado com a enzima *NotI* foi misturada em uma cubeta de eletroporação de 4 mm (mantida no gelo) e pulsada duas vezes com 500 μF e 0,45 kV em eletroporador (Biorad). Após o pulso, as células eram diluídas em 10 ml de meio LIT. No dia seguinte era adicionado ao meio 250 μg de geneticina para a seleção e dois dias depois era também adicionado sangue humano fresco coletado com heparina para um volume final de 20%.

RNAi de *T. brucei* Para a construção para RNAi de TbTOR-like 1 foi amplificado por PCR um fragmento de 457 nucleotídeos (nucleotídeos 430 a 886) da seqüência depositada no GenBank como XM_839137 usando os primers TBTOR1BamFOR e TOR1TBREV. Para TbTOR2 foi usado um fragmento de 436 nucleotídeos (nucleotídeos 85 a 420) da seqüência do GenBank XM_839099 e amplificado usando os primers TBTOR2BamFOR e TOR2TBREV. Ambos os pares de primers continham em suas seqüências os sítios de *BamHI* e *HindIII* para posterior inserção no vetor para RNAi p2T7-177 (Wickstead et al., 2002). Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pCR 2.1 TOPO. Em seguida foram retirados do vetor através de uma digestão com *BamHI* e *HindIII* e inseridos no vetor p2T7-177 (Wickstead et al., 2002), que também foi digerido com as mesmas enzimas para se retirar o fragmento de GFP. Uma vez confirmado as construções por análise de restrição elas eram preparadas em grande quantidade por Midi-Prep (Quiagen) e utilizadas para RNAi em *T. brucei*. Os plasmídeos foram linearizados com a enzima *NotI* e introduzidos em procíclicos da cepa 29-13 e sanguíneos da cepa 90-13.

Análise de fenótipos por curva de crescimento As densidades celulares eram determinadas usando uma câmara de Neubauer. As curvas de

crescimento eram feitas em duplicatas de cada cultura, sendo iniciadas com 1×10^6 células/ml (procíclicos) ou 1×10^5 células/ml (formas sanguíneas).

Epitopo tagging

TbTOR-like 1. Para a estratégia de epitopo tagging no C-terminal clonamos um fragmento de 1650 pb de *TbTOR-like 1* no vetor pMOTag 4H (4 x hemaglutinina)(Oberholzer et al., 2006) através de uma única reação de PCR. Nesta estratégia o oligonucleotídeo forward, no caso *TbTorL1- pMOF*, foi desenhado de forma que contivesse os últimos 100 pb da ORF sem o códon de parada mais 20 a 25 nucleotídeos necessários para o pareamento com o vetor. Já o oligonucleotídeo reverso *TbTorL1-pMOR* foi desenhado contendo os primeiros 100 pb da região 3' UTR do gene mais 20 a 25 nucleotídeos necessários para o pareamento com o vetor. Através de um único PCR utilizamos o produto amplificado para transfectar procíclicos cepa 427. Os parasitas foram selecionados com higromicina 50 µg/ml.

TcelF2K2. Para a estratégia de epitopo “tagging” no C-terminal clonamos um fragmento de 900 pb de *TcelF2K2* no vetor pTEX (Kelly et al., 1992b). O vetor pTEX com a proteína p57 juntamente com o tag de HA havia sido gerado em nosso laboratório previamente, então a proteína p57 foi retirada do vetor para posterior clonagem dos fragmentos de *eIF2cK2*. Para a construção dois pares de primers foram desenhados para amplificação de dois fragmentos do gene: K2Tc Xba FOR e K2Tc Not REV (300 pb) e K2Tc Not FOR e K2Tc Bam STOP (600 pb). Teve-se o cuidado de inserir os sítios *XbaI* e *BamHI* para posterior clonagem no vetor pTEX. Os dois fragmentos obtidos por PCR foram clonados no vetor pCR 2.1 TOPO e montados juntos no mesmo vetor, de modo que ficasse entre eles o sítio *NotI* que foi inserido nos oligos para criar um sítio único na proteína e no plasmídeo pTEX. Este sítio foi usado para linearizar o vetor e permitir a inserção do tag no gene endógeno. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas e selecionadas com 250 µg/ml de geneticina.

Expressão e purificação de proteínas recombinantes e produção de anticorpos Neste trabalho um anticorpo contra *TbTOR2* e dois anticorpos contra *TbTOR-like 1* foram gerados e nomeados de fragmento 1 e fragmento 2.

Para a produção dos anticorpos anti-TbTOR2 e anti- TbTOR-like 1 fragmento 1 foram usados os mesmos fragmentos usados para as construções no vetor para RNAi. Para a geração dos anticorpos fragmento 2 de TbTOR-like 1 e anti-TceIF2K2 foram escolhidos fragmentos de 513 pb e 503 pb respectivamente que foram amplificados por PCR usando os primers TOR1F2FORXho e TOR1F2REVHind para TbTOR-like 1 F2 e K2TMFORNde e K2TMREVBam para TceIF2K2 ,em seguida ambos os fragmentos foram clonados em PCR 2.1 TOPO TA. Os fragmentos foram posteriormente clonados no vetor para expressão pET14b ou pET28a (Novagen). Bactérias BL21 DE3 contendo os plasmídeos pET14 TOR2, pET14 TOR-like 1F1, pET14 TOR-like 1F2 e pET28 TceIF2K2 eram semeadas em 2 ml de meio LB (triptona 1%, NaCl 0,5%, extrato de levedura 1%) com ampicilina e crescidas a 37°C por 18 h. Após diluição de 1 para 100 no mesmo meio, as culturas eram incubadas a 37°C, com agitação a 200 rpm, até atingir uma absorbância a 550 nm = 0,8. Nesse ponto eram adicionado 1 mM de IPTG e o crescimento continuado por mais 3 h. A seguir as bactérias eram coletadas por centrifugação a 2500 g por 15 min e ressuspensas em PBS a 4°C, na proporção 1,5 ml tampão para cada 100 ml da cultura original. Esta suspensão era então congelada em gelo seco e, após descongelamento, incubada com lisozima 1 mg/ml por 30 min a 4°C. A lise era obtida por ultrassom (sonicador Branson Sonifier 450) e o material insolúvel removido por centrifugação de 10 min a 10000 g Os sobrenadantes (fração solúvel) e os precipitados ressuspensos em tampão com uréia 6 M (fração insolúvel) eram aliqüotados e estocados a -80°C.

Para purificação das proteínas recombinantes TbTOR2 , TbTOR1-like 1 F1 e F2 usamos uma resina quelante de níquel (QIAGEN) previamente carregada com o metal pela passagem de 5 volumes de solução NiSO₄ 50 mM e 3 volumes de tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0). Os extratos bacterianos eram aplicados à coluna e o fluxo bloqueado por 1 h a 4°C. A resina era lavada com 45 volumes de solução imidazol 5 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 6 M, e 30 volumes de solução imidazol 30 mM, NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 6 M. 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 6 M. Para a purificação da

proteína recombinante TceIF2K2 usamos uma resina quelante de níquel (Amersham Biosciences) previamente carregada com o metal pela passagem de 5 volumes de solução NiSO₄ 50 mM e 3 volumes de tampão de ligação (uréia 8 M, Tris-HCl 20 mM, pH 8,0). Os extratos bacterianos eram aplicados à coluna e a resina era lavada com 25 volumes de solução uréia 8 M, Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e 10 volumes de solução imidazol 30 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 8 M. A proteína foi eluída da resina com 5 volumes de solução imidazol 100 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8,0, uréia 8 M. As frações eluídas eram refractionadas em SDS-PAGE (15%). A posição de migração da proteína era identificada por coloração com Coomassie e a região da banda correspondente cortada do gel e a proteína eluída do gel por difusão em água. O eluato era então concentrado em Centricon PL10 (Millipore) e usado para imunizar coelhos (TbTOR2, TbTOR-like 1F1 e TceIF2K2) ou camundongos (TbTOR-like 1 F2 e TceIF2K2) após misturar com um volume de suspensão com adjuvante completo de Freund (Sigma) conforme descrito previamente (Jackson et al., 1993). Os anticorpos gerados contra os fragmentos 3 de TbTOR-like 1 e contra TceIF2K2 foram obtidos conforme descrito em (Barquilla et al., 2008) e (Moraes et al., 2007) respectivamente.

Purificação de anticorpos Para purificar os soros anti-TbTOR-like1 F1, anti-TbTOR2 e anti-TceIF2K2 imobilizamos as respectivas proteínas recombinantes em coluna de Níquel-agarose (Amersham Biosciences). A coluna era primeiramente equilibrada com 10 volumes de uma solução de Tris-HCl 20 mM pH 7,4. Em seguida a proteína recombinante ressuspensa nesta mesma solução era passada 4 vezes pela coluna e imobilizada pela passagem de 5 volumes de formaldeído 1% em Tris-HCl 20 mM pH 7,4. A coluna era então lavada com 5 volumes de PBS e o soro diluído 1:10 em PBS era nela aplicado. Após lavagem com 10 volumes de coluna de PBS os anticorpos específicos eram eluídos em 6 frações de 500 µl de uma solução de trietilamina 0,1 M pH 11,5. O pH dos eluatos era neutralizado com Tris-HCl 1 M pH 7,4.

Preparo de extrato protéico de *T. brucei* e *T. cruzi* Culturas contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células eram centrifugadas a 1500 g por 10 min e,

após lavagem com PBS, novamente centrifugada a 1500 g por 2 min. Os parasitas eram ressuspensos em tampão PBS com 1% SDS e inibidores de proteases (PMSF 1 mM, benzamidina 2 mM, leupeptina 1 µg/ml, pepstatina A 10 µg/ml, aprotinina 4 µg/ml e antipaína 1 µg/ml) e fosfatases (pirofosfato de sódio 10 mM e fluoreto de sódio 1 mM). A suspensão de parasitas era homogeneizada por agitação vortex e a lise feita por congelamento/descongelamento, seguido por nova homogeneização e centrifugação a 10000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante (extrato) era armazenado a -80°C. As amostras foram quantificadas usando o kit BCA protein assay (Pierce), misturadas com tampão de amostra para SDS-PAGE 2X com beta mercaptoetanol e fervidas por 5 min. Para a preparação de extrato protéico enriquecido com fração de membrana plasmática, após a separação do sobrenadante (extrato), o precipitado foi ressuspense 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 (extrato enriquecido com fração de membrana) foi armazenado a -80°C.

Western blot Após resolução em géis de poli-acrilamida 6% (SDS-PAGE), as proteínas eram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Biorad) usando um tampão contendo Tris base 500 mM, glicina 1M, SDS 0,1%, pH 8.3 e 10% de metanol. A membrana era então bloqueada com solução de leite 5% em PBS-Tween 0,1% por 1 h e incubada durante a noite a 4°C com os seguintes anticorpos primários na mesma solução de bloqueio: anti-TbTOR-like 1 fragmento 1 (diluição 1:4000), ou anti-TbTOR-like 1 fragmento 2 (diluição 1:300), ou anti-TbTOR-like 1 fragmento 3 (diluição 1:300), ou anti-TceIF2K2 (diluição 1:500), ou anti-Tbelf2K2 (Moraes et al., 2007) (diluição 1:500), ou anti-Tbelf2K2 DQ (usado a 1:300), ou anti-Tbelf2K2 purificado com TceIF2K2 recombinante (usado a 1:200), ou anti-FCaBP (diluição 1:500), ou monoclonal anti-HA (Sigma, diluição 1:200), ou monoclonal anti-tubulina (Sigma, diluição 1:15000). Em seguida, as membranas eram lavadas por três vezes por 10 min com PBS-Tween 0,1%. Após as lavagens, as membranas eram incubadas com anticorpo secundário anti-coelho HRP (para TOR-like1 fragmentos 1 e 3) e anti-camundongo HRP (para TbTOR-like 1 fragmento 2, HA e tubulina) na

diluição 1:10000 (na mesma solução usada para incubação do primário) por 1 h a temperatura ambiente. Foram repetidas as lavagens com PBS-Tween. As membranas eram reveladas com o reagente ECL (“ECL™ Western Blotting Analysis System”, Amersham Biosciences), e filmes “Hyperfilm™ MP”, Amersham Biosciences.

Extração de RNA e Northern blot O RNA dos parasitas era extraído com “TRizol LS Reagent” (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em geral 1×10^8 parasitas eram precipitados e ressuspensos em 500 μ l do Trizol. Ao final do processo o RNA era ressuspenso em 40 μ l de H₂O tratada com DEPC e armazenado a -80°C .

Os RNAs totais (20 μ g) foram desnaturados em formamida/formaldeído e analisados em gel de agarose 1% em tampão MOPS contendo 2% de formaldeído como descrito (Fourney et al., 1988). Após a eletroforese o gel era corado com brometo de etídio 0,1 μ g/ml em H₂O MilliQ por 30 min e o RNA transferido para uma membrana de Nylon (Hybond NX- GE) previamente umedecida em água usando-se uma solução de SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 M, pH 7) por capilaridade. Os RNAs foram fixados na membrana por exposição a radiação UV em um trans-iluminador. As membranas de Nylon foram hibridizadas como descrito (Church et al., 1979). Brevemente, as membranas de Nylon foram pré-hibridizadas com a solução de Na₂HPO₄ 0,5 M, SDS 7%; BSA 1% por 1 h a 65°C (50% *phosphate stock solution*, PSS) e depois hibridizadas na mesma solução com as sondas marcadas com 5 μ l de α [³²P] dCTP (3000 Ci/mmol) a 65°C por 18 h. As membranas foram lavadas 2 vezes (30 min cada) com 50% PSS, SDS 1% e EDTA 1 mM a 65°C e expostas em cassetes do Phosphorimager durante 1-2 dias a temperatura ambiente. As sondas foram marcadas com o kit Ready-To-Go DNA Labelling Beads (Amersham Pharmacia) e purificadas em resina G50 Sephadex para separar os nucleotídeos não incorporados. Para reutilizar o blot a membrana foi fervida por 20 min em uma solução contendo Tris-HCl 20 mM pH 7,5 e SDS 0,5%.

Experimentos de fluorescências Para imunofluorescências 5×10^6 parasitas, foram centrifugados por 10 min a 1500 g, lavados duas vezes com 1 ml de

PBS e novamente ressuspensos em 1 ml de PBS. Aproximadamente 40 μ l desta suspensão eram adicionados a uma lâmina tratada previamente com 0,1% de poli-L-lisina. O excesso de líquido era retirado após 5 min, e os parasitas aderidos à lâmina fixados com paraformaldeído 2% gelado por 20 min. Os parasitas aderidos eram lavados 3 vezes com PBS, e permeabilizados com Triton X-100 0,3% em PBS por 3 min e bloqueados com 3% BSA em PBS por 1 h a temperatura ambiente. Os parasitas foram então incubados com os seguintes anticorpos primários diluídos em PBS-BSA 3% por 1 h a temperatura ambiente: anti-TbTOR-like 1 F2 feito em camundongo (diluição 1:600), ou anti-TbTOR-like 1 F3 (usado a 1:600) ou anti-TbTOR2 (usado a 1:500), ou anti-HSP70 ou anti-BiP (Bangs et al., 1993; McDowell et al., 1998) (cedidos pelo Dr. James D. Bangs, da University of Wisconsin-Madison Medical School, USA, usados a 1:5000), ou anti-aldolase (cedido pelo Dr. Paul A. M. Michels, Université Catholique de Louvain, Bélgica, usado a 1:400), ou anti-Dhh1 (Holetz et al., 2007) (cedido pelo Dr. Samuel Goldenberg, Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Brasil, a 1:100), ou anti-TbVP1 (Lemerrier et al., 2002) (usado a 1:1000) ou anti-DHLADH (Schoneck et al., 1997) (cedido pelo Dr. Kevin Tyler) todos produzidos em coelhos. Para as fluorescências em *T. cruzi* foram usados os seguintes anticorpos primários: anti-TbeiF2K2 (Moraes et al., 2007) (diluição 1:100), ou anti-TbeiF2K2 purificado com TceIF2K2 recombinante (1:50) ou anti-TbeiF2K2 DQ (diluição 1:100) ou anti-TceIF2K2 (usado a 1:100) gerados em coelhos, ou os monoclonais 5D10 A5, 5D10 C6 e 3G4 puros. A seguir os parasitas eram lavados 3 vezes com PBS e incubados por 1 h a temperatura ambiente com DAPI (10 μ g/ml) e anticorpo secundário Alexa-Fluor 546 ou 488 conjugados com anti-IgG de camundongo ou Alexa-Fluor 594 ou 555 conjugado com anti-IgG de coelho (Invitrogen), diluídos em PBS-BSA 3%. Os parasitas eram lavados três vezes com PBS e a lâmina montada com Vectashield (Vector laboratories) para preservar a fluorescência. As lâminas eram observadas com um microscópio invertido de fluorescência Olympus IX-71. Imagens seriais (0.2 μ m) eram adquiridas com uma câmera Photometrix CoolSnapHQ CCD (charge coupled device) acoplada ao microscópio, usando o programa DeltaVision (Applied Precision) e processadas por deconvolução usando o mesmo programa. Alternativamente as imagens

seriais (0,2 μm) eram coletadas usando um microscópio Olympus IBX com o software Cell[^]M e processadas por deconvolução usando o programa Autoquant X 2.1.

Para as lâminas utilizando marcadores citoplasmáticos em procíclicos com anti-TbTOR2, após a incubação com o anticorpo secundário e lavagens os parasitas eram incubados por 20 min com 100 nM de Mitotracker Red CMXRos (Molecular Probes) para a marcação de mitocôndria ou com 1 μM BODIPY-FL-thapsigargin (Molecular Probes) para a marcação de retículo endoplasmático. Em seguida as lâminas eram lavadas com PBS e montadas e visualizadas como descrito acima.

Para observação de acúmulo de laranja de acridina (acridine orange) as células foram preparadas como descrito em (Lemercier et al., 2002). Após incubação com 6 μM de laranja de acridina em um tampão contendo 116 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM MgSO_4 , 5.5 mM glicose, 50 mM K-Hepes, pH 7.2 (tampão A) por 10 min a 28°C, as células foram centrifugadas a 1500 g, ressuspenas em PBS e aderidas à lâminas previamente tratadas com 0.1% de poli-L-lisina e observadas em um microscópio invertido de fluorescência Olympus IX-71. Imagens foram obtidas com uma câmera Photometrix CoolSnapHQ CCD (charge coupled device) acoplada ao microscópio, usando o programa DeltaVision (Applied Precision).

Análise de ciclo celular Para as análises de ciclo celular no citômetro de fluxo, as amostras foram preparadas como previamente descrito (Hammarton et al., 2003). 1×10^6 formas procíclicas ou sanguíneas de *T.brucei* foram centrifugadas a 1500g por 10 min, lavadas uma vez em PBS e novamente centrifugadas a 1500g por 10 min e o pellet foi ressuspendido em 70% metanol/30% PBS e incubados a 4°C durante a noite. No dia seguinte as células eram novamente centrifugadas, lavadas uma vez em PBS e ressuspendidas em 1 ml de PBS contendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de iodeto de propídeo e 10 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A e incubados a 37°C por 45 min. As amostras eram processadas no citômetro de fluxo BD FACSCalibur usando o detector FL2. Os dados foram analisados com o auxílio do programa CellQuest. Para análise do ciclo celular por imagens, as células foram fixadas, aderidas e permeabilizadas

como descrito acima, coradas com 10 µg/ml de DAPI e visualizadas em um microscópio de fluorescência.

Estresse osmótico sob condições iônicas constantes Para este ensaio os seguintes tampões previamente descritos (Kocic et al., 2001) foram usados: isosmótico (64 mM NaCl, 4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 0,53 mM MgCl₂, 5,5 mM glicose, 5 mM HEPES-Na pH 7,4 e 150 mM manitol - 282 mOsm/l), hiposmótico (mesma composição do tampão isosmótico, mas com concentração de manitol reduzida para 50 mM - 177 mOsm/l) e hiperosmótico (mesma composição do tampão isosmótico, mas com concentração de manitol aumentada para 500 mM - 650 mOsm/l). Amostras de 2×10^7 células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 10 µl de tampão isosmótico. A estas células eram adicionados 500 µl do tampão desejado (isosmótico, hiposmótico ou hiperosmótico) e as células eram fixadas com o mesmo volume de paraformaldeído 4% após os tempos indicados. As células foram em seguida centrifugadas, lavadas uma vez com PBS e aderidas à lâminas tratadas com 0,1 % de poli-L-lisina por 1 h e processadas para imunofluorescência como descrito acima.

Microscopia Eletrônica Formas procíclicas de *T. brucei* foram coletadas e fixadas com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão de cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7.3) no gelo por 1 h e processadas como descrito (Miranda et al., 2004). As imagens foram obtidas em microscópio Zeiss EM 902. Para imagem de células inteiras, procíclicos foram lavados duas vezes com tampão A filtrado e aplicados em grades cobertas por Formvar como descrito previamente (Fang et al., 2007). O número de acidocalcissomos foi obtido conforme descrito em (Fang et al., 2007).

Extração de polifosfato de cadeia longa A extração de polifosfato de cadeia longa foi feita como descrito em (Fang et al., 2007). $2,5 \times 10^7$ células foram centrifugadas por 10 min a 1500 g e lavadas duas vezes com tampão A e centrifugadas novamente na mesma velocidade e mesmo tempo. O pellet era então ressuspenso em 500 µl de tampão de lise (GITC 4M, Tris-HCl 50 mM,

pH 7,5), vortexado por alguns segundos e aquecido a 95°C por 5 min. Em seguida as amostras eram sonicadas por 2 s a 20% de intensidade e era adicionado aos tubos 30 µl de SDS 10%, 500 µl de etanol absoluto e 5 µl de “Glassmilk”. As amostras eram vortexadas por alguns segundos e centrifugadas por 30 s a 14000 g. O sobrenadante era removido e o pellet lavado com 500 µl de tampão de lavagem 1x gelado (tampão 2X- Tris-HCL 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA- 10 mM -pH 7.3 /o tampão 1 x era feito com 50% do 2x mais 50% etanol absoluto) e centrifugado novamente por 30 s a 14000 g. Este procedimento era repetido mais duas vezes. Ao pellet final era adicionado 50 µl do tampão Tris–Mg (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e MgCl₂10 mM), 20 µg/ml de RNase, 20 µg/ml DNase e este era incubado a 37°C por 10 min. Em seguida era adicionado as amostras 150 µl de tampão de lise mais 200 µl de etanol absoluto e elas eram centrifugadas por 30 s a 14000 g. O pellet era lavado com 500 µl de tampão de lavagem 1 x e centrifugado 30 s a 14000 g por duas vezes. Ao pellet final era adicionado 50 µl de Tris 50 mM pH 7.5 e este era incubado a 95°C por 2 min, centrifugado a 14000 g por 30 s e o sobrenadante transferido para outro tubo. Este procedimento era repetido por mais duas vezes, obtendo se um total de 150 µl da extração contendo polifosfato de cadeia longa que era usado para as reações enzimáticas descritas abaixo.

Extração de polifosfato de cadeia curta 2,5 x 10⁷ células foram coletadas e lavadas como as células usadas para a extração de poli P de cadeia longa. O pellet era ressuspenso em 100 µl de tampão A e 200 µl de HClO₄ 0,5 M gelado eram adicionados a suspensão celular no gelo por 30 min. Em seguida a amostra era centrifugada a 10000 g por 1 min, o sobrenadante era transferido para um novo tubo e neutralizado com 100 µl de solução neutralizante (KOH 720 mM, KHCO₃ 600 mM). As amostras eram centrifugadas como acima e o sobrenadante transferido para um novo tubo e usado posteriormente nas reações enzimáticas.

Reações enzimáticas para quantificar polifosfato e pirofosfato. Os níveis de polifosfato foram determinados pela quantidade de fosfato liberado após tratamento com um excesso de exopolifosfatase (ScPPX1) e de pirofosfato

com o tratamento com pirofosfatase inorgânica de *S. cerevisiae* (New England Biolabs). A reação enzimática era feita em placa de 96 poços com tampão para ScPPX1 (Tris-HCl 20 mM pH7,5, NH₄OAc 100 mM, MgOAc 5 mM) ou tampão para pirofosfatase inorgânica (Tris-HCl 50 mM pH7,5 e MgCl₂ 5 mM) e 3000 a 5000 unidades das enzimas ScPPX1 ou 0.4 unidades /ml de pirofosfatase inorgânica e 10 µl da amostra extraída de polifosfato (cadeia longa ou curta). Três replicatas de cada extração eram feitas para cada condição. Após incubação a 37°C por 20 min a reação era parada pela adição de 3 partes de Verde de Malaquita 0,045% com uma parte de molibdato de amônia 4,2%, que era previamente filtrada como descrito (Fang et al., 2007). A absorbância a 660 nm era lida usando leitor de placas Spectra MaxM2 (Molecular Devices), e a quantidade de fosfato livre determinada usando uma curva padrão de pmol de fosfato por D660, e tendo como base o número de células para cada extração (quantidade de P ou PPI/ 10⁶ células).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 ng da proteína TceIF2K2 recombinante por poço (volume de 100 µl) diluída em tampão carbonato-bicarbonato (50 mM de Na₂CO₃ e 50 mM de NaHCO₃ pH 9,6) overnight a temperatura ambiente. Em seguida as placas eram lavadas 3 vezes com PBS-Tween, e bloqueadas com solução de leite 1% em PBS-Tween por 2 h, novamente lavadas 3 vezes com PBS-Tween e os poços cobertos com 100 µl dos sobrenadantes dos hibridomas. Após incubação por uma noite a 4°C, as placas eram lavadas 3 vezes como descrito acima e os poços cobertos com 100 µl do anticorpo secundário anti-mouse peroxidase 1:4000 em PBS-Tween, leite 0,1% e incubados por 2 h a 37°C sob agitação no escuro. Novamente as placas eram lavadas 3 vezes com PBS-Tween, 3 vezes com PBS, e reveladas com 50 µl de solução contendo 2 mg de o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) dissolvidos, em 5 ml de tampão contendo 0,1 M de ácido cítrico / 0,2 M de fosfato de sódio pH 5,0, 2,5 ml de H₂O e 10 µl de H₂O₂. As reações eram terminadas pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4 N por poço e a absorbância medida à 492 nm em um leitor de ELISA

Fusão celular para a obtenção de hibridomas

Obtenção de feeder layer de macrófagos Uma camada de alimentação (feeder layer), constituída principalmente de macrófagos, era obtida assepticamente através de lavagem peritoneal de camundongos BALB/c, não estimulados, com 3 ml de meio RPMI gelado. As células peritoneais eram centrifugadas a 200 g por cinco min e ressuspensas em meio RPMI contendo hipoxantina, adenina e timina (HAT) (veja abaixo) gelado, contendo 20% de soro fetal bovino (SFB-livre de endotoxina-Gibco). As células eram contadas em câmara de Neubauer e posteriormente distribuídas em placas de 96 poços (5×10^3 células/poço).

Fusão celular Células da linhagem de mieloma P3U1 (4×10^7 células) eram utilizadas para fusão celular com esplenócitos provenientes do baço do camundongo Balb/C imunizado e selecionado conforme descrito acima. A fusão era realizada através da adição gota a gota de 1 ml de polietilenoglicol (Sigma) à mistura de células, sob agitação e durante um min, mantendo-se sob leve agitação por mais um min a 37°C. Em seguida, acrescentava-se lentamente 10 ml de meio RPMI-1640 à suspensão celular para diluição. As células eram mantidas cinco min e em seguida centrifugadas a 200 g por 5 minutos. O pellet era ressuspenso em meio RPMI-HAT, contendo 20% de soro fetal bovino, sendo as células distribuídas em 5 placas de 96 poços, contendo *feeder layer* de macrófagos, como descrito acima. Dez dias após a fusão iniciava-se o “screening” dos sobrenadantes dos hibridomas produtores de anticorpos reativos contra TcelF2K2 recombinante. Das células que sofreram fusão celular e sobreviveram no meio seletivo foram selecionados os poços que possuíam melhor resposta contra a proteína recombinante (TcelF2K2) em reação de ELISA e em western blot utilizando tanto a proteína recombinante como extratos de parasitas. Os hibridomas considerados positivos foram clonados por diluição limitante em placas de 96 poços (0,5 célula por poço), contendo *feeder layer* de macrófagos em meio RPMI-HAT suplementado com 20% SFB (Gibco). Os clones positivos em ELISA foram expandidos seqüencialmente em placas de 24 e 6 poços, e depois em garrafas de 25 cm², sendo o meio RPMI-HAT substituído por meio RPMI-HT com 20% SFB e

finalmente este foi substituído por meio RPMI suplementado com 20% de SFB. Os clones foram então congelados em 90% de SFB e 10% de DMSO.

ANEXO II

Novel Membrane-Bound eIF2 α Kinase in the Flagellar Pocket of *Trypanosoma brucei*[∇]

Maria Carolina S. Moraes,¹ Teresa C. L. Jesus,¹ Nilce N. Hashimoto,¹ Madhusudan Dey,²
Kevin J. Schwartz,³ Viviane S. Alves,¹ Carla C. Avila,¹ James D. Bangs,³
Thomas E. Dever,² Sergio Schenkman,¹ and Beatriz A. Castilho^{1*}

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil¹; Laboratory of Gene Regulation and Development, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland²; and Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin School of Medicine and Public Health, Madison, Wisconsin³

Received 11 July 2007/Accepted 3 September 2007

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 to -K3). We show here that TbeIF2K2 is a transmembrane glycoprotein expressed both in procyclic and in 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 that 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.

Translational regulation plays a pivotal role in stress adaptation programs in eukaryotes, from yeast to mammals (10). Little is known about translational regulation in trypanosomatids, an early diverging group of organisms in the eukaryotic lineage. Trypanosomes encompass important human pathogens, such as *Trypanosoma brucei*, the agent of sleeping sickness in Africa, *Trypanosoma cruzi*, agent of Chagas' disease in the Americas, and *Leishmania* spp., the agent of the devastating disease leishmaniasis (<http://www.who.int/tdr>). In their di-genetic lifestyle, cycling between insects and mammals, trypanosomes are subjected to the stress of encountering the different physiological milieu of their new hosts and must adapt to these environments. Most gene regulation in these organisms relies on posttranscriptional mechanisms (8). This view is largely based on (i) the fact that their mRNAs are transcribed as polycistronic RNAs that are then trans-spliced with the addition of a 5' leader sequence, (ii) the lack of well-defined RNA polymerase II promoters, and (iii) the paucity of transcriptional regulators. Several examples have been described of mRNAs translated only in a particular stage of differentiation, in a mechanism involving regulatory 3'-un-

translated region sequences (16, 34, 48). General translation may be regulated during the differentiation process in *T. brucei*, as indicated by drastic alterations in polysome profiles (5).

One of the most conserved stress-activated regulatory pathways in eukaryotes involves the inhibition of protein synthesis through the phosphorylation of the alpha subunit of the translation initiation factor 2 (eIF2 α) by a family of protein kinases that are activated by specific signals (10). eIF2, bound to GTP, delivers the initiator methionyl tRNA to the 40S ribosomal subunit in each round of translation initiation. For the formation of the 80S complex at the AUG initiator codon, GTP is hydrolyzed to GDP, with the release of eIF2-GDP. For a new cycle of initiation, GDP must be exchanged to GTP, in a process requiring the guanine exchange factor eIF2B. The phosphorylated form of eIF2 (eIF2 α -P) is a poor substrate for eIF2B but has a much higher affinity for eIF2B than the unphosphorylated eIF2-GDP, acting as a competitive inhibitor.

Whereas high levels of eIF2 α -P block translation, moderate levels of eIF2 α -P, while still allowing protein synthesis to take place, lead to translational activation of specific messages, such as GCN4 in *Saccharomyces cerevisiae* (25) and ATF4 in mammals (50). These messages contain upstream open reading frames (uORFs) in their leader sequences that inhibit the scanning ribosome from reaching the main ORF. Upon a reduction in the amounts of eIF2-GTP, as a result of the phosphorylation of eIF2 α , the ribosomes bypass the uORFs, and translate the main ORF. GCN4 and ATF4 are both bZIP transcriptional activators that regulate downstream responses

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo, Rua Botucatu, 862, São Paulo, SP 04023-062, Brazil. Phone: (55)(11) 5576-4537. Fax: (55)(11) 5572-4711. E-mail: bcastilho@unifesp.br.

[∇] Published ahead of print on 14 September 2007.

aimed at alleviating the initial stress condition. GCN4 activates hundreds of genes involved in amino acid biosynthesis and intermediary metabolism (37). ATF4, besides regulating amino acid metabolism, also participates in other stress remedial programs (22). Thus, eIF2 α phosphorylation can provide a means for both general repression of protein synthesis, as well as gene-specific translational activation.

GCN2, the sole eIF2 α kinase in *S. cerevisiae*, is activated by amino acid deprivation and low levels of glucose or purine (24, 51). Mammals have three other eIF2 α kinases in addition to GCN2: HRI, activated by the lack of heme; PKR, activated by double-stranded RNA and cytotoxic stresses; and PEK/PERK, activated by endoplasmic reticulum (ER) stresses (10, 20, 27–29, 53). Orthologs of PEK/PERK are found in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* and of HRI are found in *Schizosaccharomyces pombe* (44, 52). Recently, another eIF2 α kinase was identified in *Toxoplasma gondii* that is activated under alkaline and temperature stresses (45).

Activation of these kinases is mediated by dimerization and autophosphorylation of specific residues in the catalytic region. This phosphorylation event allows the binding of the substrate (13). Activation is controlled by regulatory domains specific to each type of eIF2 α kinase. For GCN2, the binding of uncharged tRNAs to a region with similarity to histidinyl tRNA synthetase (HisRS domain) promotes its activation (36, 40). In PEK/PERK, an ER transmembrane protein, the regulatory domain located in the lumen of the ER is normally bound to BiP; when unfolded proteins accumulate in the ER, BiP is released from the regulatory domain, which then dimerizes the protein, activating the cytoplasmic kinase domain (4, 32).

Given the relevance of eIF2 signaling in stress remedial programs in all eukaryotes, and the obvious relevance of post-transcriptional regulation in trypanosomatids, we approached this regulatory pathway in *T. brucei*. Here we describe the characterization of an eIF2 α kinase of *T. brucei* that is a membrane-associated protein localized at the flagellar pocket. The data presented here suggest that this kinase has an important role in sensing the state of protein transport in these parasites.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and growth conditions. Standard yeast methods were used (42). Yeast were grown in synthetic complete medium lacking amino acids to select for plasmids and supplemented with 2% glucose or with 2% raffinose or 10% galactose. The yeast strains used in the present study were as follows: H1643 (*MATa ura3-52 leu2-3,-112 trp1- Δ 63 sui2 Δ p1108[GCN4-lacZ] at trp1- Δ 63 [pSUI2 URA3]*) (12), H1894 (*MATa ura3-52 leu2-3,-112 trp1- Δ 63 gcn2 Δ*), J80 (*MATa ura3-52 leu2-3,-112 trp1- Δ 63 gcn2 Δ sui2 Δ [pSUI2 LEU2]*), and J82 (*MATa ura3-52 leu2-3,-112 trp1- Δ 63 gcn2 Δ sui2 Δ [pSUI2^{S51A} LEU2]*) (11).

Parasite strains and growth conditions. *T. brucei* 427 (MITat 1.2) was used in all experiments. Procyclic forms were grown in SDM-79 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 28°C and bloodstream forms in HMI-9 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 10% Serum Plus (JRH Biosciences) at 37°C.

Cloning and plasmid constructions. Genomic DNA was isolated from *T. brucei* procyclic forms. PCR was performed with the indicated primers by using *Taq* DNA polymerase or Platinum *Taq* (Invitrogen). PCR products were cloned in TOPO, completely sequenced, and then transferred to the appropriate vectors. The entire coding sequence of TbeIF2 α was obtained as two fragments, using the oligonucleotides BC340 (GGGGAGCTCATGGCAGCTTACGGT) and BC215R (GGGGAATCTTCCATGCGTGTACCG) for the sequence corresponding to amino acid residues 1 to 263 and oligonucleotides BC215F (GGGGATCCTTTTATGAGGAAAAGTTACCA) and BC335 for residues 125 to 419. For expression in *Escherichia coli*, the complete sequence was obtained by using a ClaI site common to both fragments and introducing it into the

SacI/NotI sites of pET28a(+), generating plasmid pBE495. For expression in yeast from the *GAL1* promoter in a *LEU2* plasmid, a EcoRI-BamHI fragment of pBM272 containing the *GAL1* promoter was ligated with a BamHI-XbaI fragment of pBE495 containing the TbeIF2 α sequence into the EcoRI/XbaI sites of pRS315 (43), generating plasmid pBE498. The expression of TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ in *E. coli* was obtained by cloning the PCR fragment from the TOPO plasmid into the BamHI/NotI sites of pET28a(+), (plasmid pBE501). For its expression from the *GAL1* promoter in yeast, the NcoI(blunt)-NotI fragment from pBE501 was transferred into plasmid pBE498 digested with BamHI(blunt)-NotI, replacing the insert of the wild-type protein with the truncated one (plasmid pBE506). The construction of the mutation T169A was performed by PCR using the oligonucleotides BC215F (GGGGATCCTTTTATGAGGAAAAGTTACCA) and BC400 (GGCAGCAATGCGAATCCTAGCGATTCCGT). The product digested with BamHI-TfiI was used in a three-fragment ligation with fragment TfiI-NotI from the wild-type TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ sequence and pET28a(+)-linearized with BamHI-NotI (pBE520). For the expression of the mutant forms of TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ in yeast, the NcoI(blunt)-NotI fragment of pBE520 was cloned into pBE498 digested with BamHI(blunt)-NotI. The expression of yeast eIF2 α under the control of *GAL1* was obtained by transferring a BamHI-EcoRI blunted fragment from pBE280 (46) into the blunted BamHI site of pBE498. For the expression of the complete TbeIF2 α ^{T169A} in *E. coli*, the AlwNI-NotI fragment of pBE520 and the SacI-AlwNI fragment of pBE495 were cloned into the pET28a(+)-plasmid linearized with SacI-NotI, generating plasmid pBE587.

The kinase domain of TbeIF2K2 (residues 618 to 1009) was amplified with oligonucleotides BC442 (GGATCCATGCCACAACCTCTTTC) and BC445 (GAATTCTCAGTTGGCTGACGG). The amplified product was transferred to pEGST (35) for expression in yeast as a fusion to glutathione *S*-transferase (GST) (pBE553). For raising antibodies, the putative regulatory domains of the kinases were cloned using the oligonucleotides BC436 (AAGCTTTTTC AAGTTGGAAGTCA) and BC437 (CTCGAGTTACTCTTTCTCCG) for TbeIF2K1¹⁰⁶⁸⁻¹²³⁶, BC438 (GAATTCATGCAACCATCAGGGG) and BC441 (AAGCTTTTATATTGGAATGACTC) for TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹, and BC446 (GGATCCATGGACTCTCAAAGTG) and BC450 (CTCGAGTTAATTAGAGAT GTTCTC) for TbeIF2K3¹⁻⁴⁷⁶. The amplified products were transferred to pET28a(+).

The kinase domain of human PKR (amino acids 258 to 551) was transferred as a BamHI-HindIII(blunt) fragment from pC661-1 (30) into the pGEX2T plasmid linearized with BamHI-EcoRI(blunt), generating plasmid pBE527. The mouse eIF2 α coding sequence was obtained from cDNA of brain total RNA by PCR with oligonucleotides BC398 (GGGGATCCATGCCGGGGCTAAGTTG) and BC399 (GGGAATCTTAATCTTCGCTTTGGCTTCC). The amplified product was transferred to the plasmid pET28a(+), generating plasmid pBE526.

Total RNA from *T. brucei* was obtained by TRIzol extraction as described by the manufacturer (Invitrogen) and further purified by precipitation with 2 M LiCl. RNA was treated with DNase (1 U/ μ g), and 0.3 μ g was used in the reaction with SuperScript One-Step RT-PCR using Platinum *Taq* (Invitrogen). The oligonucleotides used for the amplification of the sequences corresponding to the TbeIF2 α mRNA were BC338 (AACGCTATTAGAACAGTTTCT) (spliced leader sequence) and BC334 (GGGTTGATGACCTTACCGATG).

Expression and purification of recombinant proteins. The soluble His₆-TbeIF2 α wild-type and His₆-TbeIF2 α ^{T169A} proteins expressed in *E. coli* BL21(DE3) were purified from cultures induced with 100 μ M IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) at 23°C overnight on nickel chelating resin as described by the manufacturer (QIAGEN). The putative regulatory domains of the kinases TbeIF2K1, TbeIF2K2, and TbeIF2K3 fused with a N-terminal His tag were expressed in *E. coli* BL21(DE3). The insoluble His₆-TbeIF2K1¹⁰⁶⁸⁻¹²³⁶ protein was purified from cultures induced with 1 mM IPTG at 37°C for 2 h by preparative sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The insoluble His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ protein was purified from cultures induced with 1 mM IPTG at 23°C overnight on nickel chelating resin as described by the resin manufacturer. The soluble His₆-TbeIF2K3¹⁻⁴⁷⁶ protein was purified from cultures induced with 1 mM IPTG at 30°C overnight on nickel chelating resin. The soluble His₆-eIF2 α was purified from cultures induced with 400 μ M IPTG at 23°C overnight. The soluble GST-PKR^{KD} (kinase domain) was purified from cultures induced with 400 μ M IPTG at 23°C overnight on glutathione-Sepharose 4B as described by the resin's manufacturer (Amersham).

Preparation of cell extracts. Yeast cell extracts were prepared by agitation with glass beads in phosphate-buffered saline (PBS) containing 2 mM benzamidine, 1 μ g of leupeptin/ml, 4 μ g of aprotinin/ml, 10 μ g of pepstatin A/ml, 1 μ g of antipain/ml, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, and 1 mM NaF. For *T. brucei*, parasites (ca. 5×10^8 cells) were washed in PBS and resuspended in 150 μ l of 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)–150 mM NaCl–2 mM MgCl₂–2 mM EGTA–2 mM benzamidine–1 μ g of leupeptin/ml–4 μ g of

aprotinin/ml–10 μ g of pepstatin A/ml–1 μ g of antipain/ml–1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride–10 mM sodium pyrophosphate–1 mM NaF. After freezing and thawing, the suspension was centrifuged at 10,000 \times g for 15 min. The supernatant was kept as soluble material. The pellet was resuspended in 150 μ l of the same buffer supplemented with 1% Triton X-100. After centrifugation at 10,000 \times g for 15 min, the supernatant was kept as the membrane-enriched fraction. Final insoluble material was solubilized in buffer containing 8 M urea.

Antisera and immunoblots. Antibodies were obtained in rabbits by immunization with the recombinant proteins purified from *E. coli*. Monospecific antibodies to His-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ were obtained by adsorption to the purified recombinant His-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ protein immobilized on a nitrocellulose filter, as described previously (39). For immunoblots, membranes were blocked with 5% nonfat milk in double-distilled H₂O for 1 h at 23°C, followed by incubation with primary antibodies for 1 h at 23°C or overnight at 4°C. The following conditions were used: (i) anti-TbeIF2 α diluted 1:500 in PBS, (ii) purified anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ diluted 1:500 in PBS, (iii) anti-(mammalian)eIF2 α (Cell Signaling) diluted 1:1,000 in Tris-buffered saline (TBS)–0.1% Tween 20–5% bovine serum albumin (BSA), (iv) anti-(yeast)eIF2 α (23) diluted 1:500 in PBS, (v) anti-eIF2 α -P (Bio-source) diluted 1:1,000 in TBS–0.1% Tween 20–5% BSA, (vi) anti-GST (laboratory reagent, 1:5,000 in PBS), and (vii) anti-TbBiP (2) diluted 1:60,000 in PBS–0.1% Tween 20–5% BSA. After washes with 0.1% Tween 20 in PBS or TBS, bound antibodies were detected by using horseradish peroxidase (HRP)-protein A (Amersham Biosciences) diluted 1:4,000 in PBS for anti-TbeIF2 α , anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹, anti-GST, anti-(yeast)eIF2 α , anti-eIF2 α -P, and anti-BiP and by using HRP-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) diluted 1:4,000 in TBS–0.1% Tween 20–5% BSA for anti-(m)eIF2 α . The bound antibodies were detected by using enhanced chemiluminescence (Amersham Biosciences). When necessary, the antibodies were stripped off the membranes by incubation with 100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, and 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7) at 50°C for 30 min.

Immunoprecipitation. Extract (700 μ g) of induced J82 yeast strain carrying the plasmid pBE553 (GST-TbeIF2K2^{KD}) or pEGST (GST) was precleared by incubation with 20 μ l of protein A-Sepharose CL-4B beads (Amersham Biosciences) and preimmune serum in buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, and 1 mM NaF. The supernatant was incubated for 2 h at 4°C with 20 μ l of protein A-Sepharose beads preincubated with anti-GST antibodies. The beads were washed three times with the same buffer, and the material bound to the beads used in the *in vitro* kinase assays.

In vitro phosphorylation assays. Kinase assays using purified PKR or GCN2 were performed as described previously (13). Phosphorylation reactions using the immunoprecipitated GST-TbeIF2K2^{KD} contained 30 μ Ci of [γ -³²P]ATP in buffer containing 4 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM imidazole, 120 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM MnCl₂, and 2 mM magnesium acetate in a volume of 30 μ l. Reactions were allowed to proceed for 1 h at 23°C. Proteins were denatured in the absence of β -mercaptoethanol (to avoid the comigration of the IgG heavy chain and TbeIF2 α), resolved by SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue; the incorporation of radioactive phosphate into TbeIF2 α was detected on a Typhoon phosphorimager.

Tomato lectin uptake and localization studies. Cultured bloodstream cells were washed with HEPES buffered-saline (50 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 70 mM glucose [pH 7.5]) and resuspended at 10⁷/ml in HMI9-BSA (serum-free HMI9 medium supplemented with 0.5 mg of bovine serum albumin/ml) containing tomato lectin-biotin conjugate (TL; Vector Laboratories, Burlingame, CA) at 20 μ g/ml. Cells were incubated at 5°C or 15°C for 30 min, followed by extensive washing with PBS. Washed cells were lightly prefixed with 0.1% formaldehyde and then fixed onto slides with methanol-acetone as described previously (1). Cells were then stained with Alexa 633-streptavidin (Molecular Probes, Eugene, OR) to detect bound and internalized TL. At the same time cells were also stained with rabbit anti-TbeIF2K2 and/or monoclonal anti-p67 (1) to detect the lysosome. Appropriate Alexa 488- and Alexa 633-conjugated goat anti-IgG (Molecular Probes) were used as secondary antibodies. Cells were also stained with 500 ng of DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole)/ml. Serial image stacks (0.2- μ m Z-increment) were collected at 100 \times (PlanApo oil immersion 1.4 NA) on a motorized Zeiss Axioplan Iii equipped with a rear-mounted excitation filter wheel, a triple-pass (DAPI-fluorescein isothiocyanate-Texas Red) emission cube, differential interference contrast optics, and a Orca AG charge-coupled device camera (Hamamatsu, Bridgewater, NJ). All images were collected with OpenLabs 5.0 software (Improvision, Inc., Lexington, MA), and fluorescence images were deconvolved by using a constrained iterative algorithm, pseudocolored, and merged by using Velocity 4.0 software (Improvision).

Dephosphorylation and deglycosylation assays. A total of 5 μ g of total protein from the membrane-enriched fraction was incubated with 20 U of calf intestinal alkaline phosphatase (Promega) in buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 9.3 at

25°C), 1 mM MgCl₂, 100 μ M ZnCl₂, and 1 mM spermidine in a volume of 10 μ l at 37°C for 3 h. Deglycosylation was performed with the membrane-enriched protein fraction (20 μ g) of procyclic parasites, denatured at 100°C for 5 min in buffer containing 50 mM sodium phosphate (pH 5.5), 0.1% SDS, and 50 mM β -mercaptoethanol. After incubation on ice for 10 min, endoglycosidase H (Sigma) was added to the mixture, and the reaction was allowed to proceed for 18 h at 37°C.

RESULTS

Trypanosomatids encode three potential eIF2 α kinases. Sequences for three potential eIF2 α kinases are found in the genome of *T. brucei*, with similar counterparts in other two trypanosomatids, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* (3, 15, 26). We named these proteins TbeIF2K1 through TbeIF2K3. The alignment of the catalytic kinase domains (KD) of the *T. brucei* proteins and the known eIF2 α kinases is shown in Fig. 1. The three proteins contain an insert between domains IV and V, typical of eIF2 α kinases (21). The inserts range from 46 residues in TbeIF2K2 to 119 in TbeIF2K3. These sizes are within the range found for the eIF2 α kinases, of which the extreme is the *T. gondii* TgKA, composed of 615 residues. TbeIF2K3 has another large insert located between domains VIB and VII, which is unusual for this class of kinases. An interesting feature of the *T. brucei* proteins is the site of putative autophosphorylation. As indicated by the boxed arrow in Fig. 1, TbeIF2K2 has a serine residue where all other kinases have a threonine residue. Phosphorylation of this residue in PKR promotes the recognition of the substrate (13). The presence of the serine residue in TbeIF2K2 was confirmed by DNA sequencing. Residue T487 of PKR, indicated with a boxed arrowhead, is an important determinant of specificity for recognition of the substrate. This residue is within an α -helical domain that in eIF2 α kinases is longer than in other class of kinases. This extended configuration, along with its orientation, determines the substrate specificity. This threonine is found in TbeIF2K2 and TbeIF2K3 but not in TbeIF2K1. The remaining residues that are typical of this class of kinases are for the most part conserved in the *T. brucei* proteins, as indicated by the arrowheads in the alignment of Fig. 1. Figure 2 depicts the putative regulatory domains of the three *T. brucei* kinases relative to their catalytic regions. TbeIF2K1 is apparently a GCN2 ortholog, containing a ring finger, WD repeat domain (RWD) and a HisRS-like domain, which in yeast GCN2 are involved in GCN1 and uncharged tRNA binding, respectively. The HisRS-like region of TbeIF2K1 was detected by the Phyre prediction engine (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre). The domain architecture is similar to GCN2, with the RWD and HisRS-like regions flanking the kinase domain. No pseudokinase region was detected in TbeIF2K1. TbeIF2K2 and TbeIF2K3 putative regulatory domains have no similar counterparts in any database, except the other trypanosomatids orthologs. TbeIF2K2 has a predicted N-terminal signal sequence and a potential transmembrane domain, suggesting association with membranes and with a topological similarity to PEK/PERK, i.e., a type I transmembrane protein with a C-terminal cytosolic kinase domain and a large N-terminal ectoplasmic domain.

Reverse transcription-PCR (RT-PCR) indicated that the mRNAs encoding for the three proteins are present in both bloodstream and procyclic forms of the parasite (Fig. 2B).

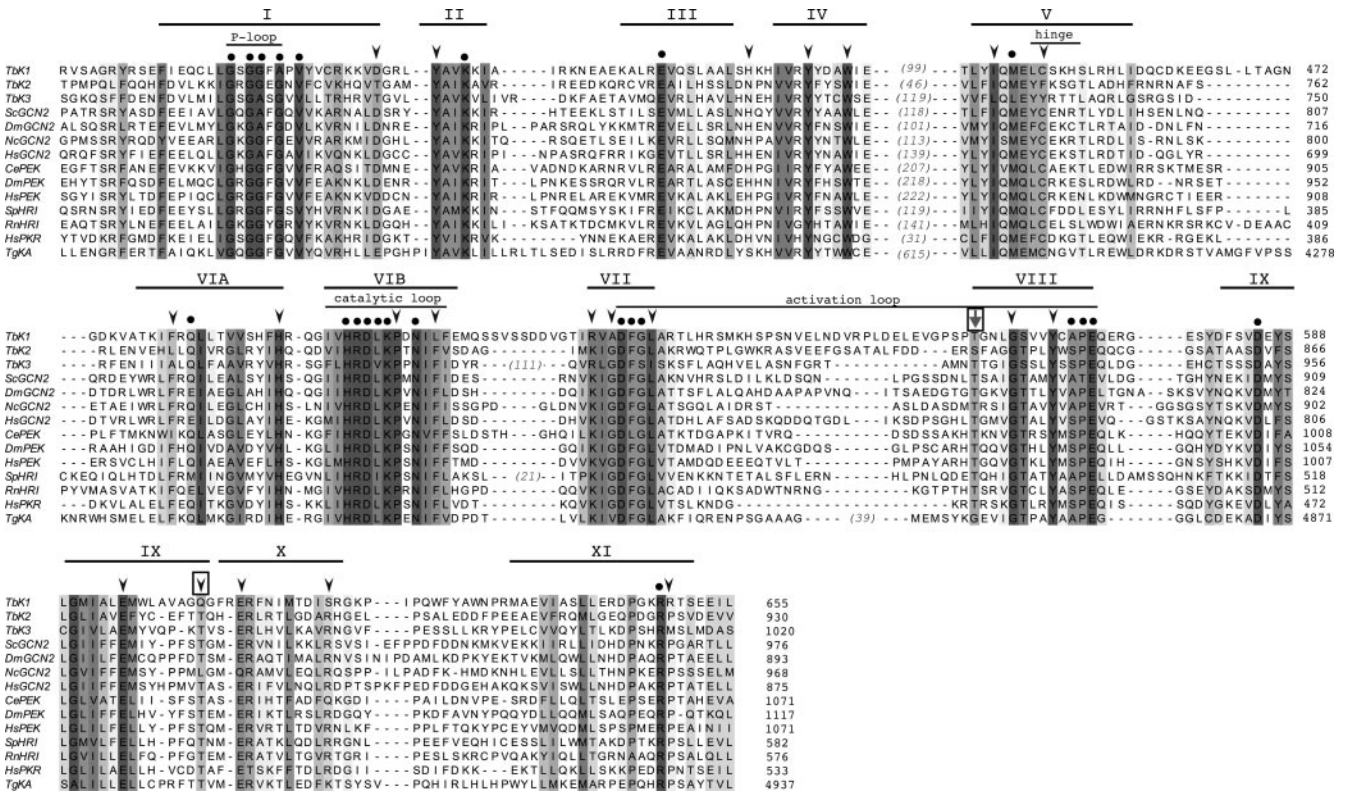


FIG. 1. *T. brucei* encodes three potential eIF2 α kinases. The alignment of the catalytic domains of eIF2 α kinases is shown. Identical residues are indicated in dark gray, and conserved residues are indicated in light gray. Subdomains I through XI are indicated above the sequences, as are the functional regions comprising the catalytic and activation loops. The kinase inserts between subdomains IV and V are indicated by dashes, with the number of residues in parentheses. The dots indicate conserved residues among kinases in general. Arrowheads indicate residues specific to the eIF2 α kinases, with the boxed arrowhead indicating the substrate specificity determinant in PKR. The boxed arrow in subdomain VIII marks the residue in PKR that is autophosphorylated in the active protein. Sc, *S. cerevisiae*; Dm, *D. melanogaster*; Nc, *N. crassa*; Hs, *H. sapiens*; Sp, *S. pombe*; Rn, *R. norvegicus*; Tg, *T. gondii*; Ce, *C. elegans*. GeneDB accession numbers: TbK1, Tb11.02.5050; TbK2, Tb04.1H19.980; TbK3, Tb06.5F5.660. GenBank accession numbers: ScGCN2, NP_010569; DmGCN2, AAC47516; NcGCN2, CAA62973; HsGCN2, Q9P2K8; CePEK, Q19192; DmPEK, AAF61200; HsPEK, AAI26355; SpHRI, Q9UTE5; HsPKR, P19525; TgKA, AY518936.

Antibodies were then raised against the putative regulatory regions of the three proteins. Although for TbeIF2K1 and TbeIF2K3 the antisera recognized the recombinant proteins, no clear signal was detected in immunoblots of whole-cell extracts of the parasites (data not shown). It is possible that these are very low abundance proteins or that they are only translated under specific conditions not tested here. For TbeIF2K2, the antiserum recognized a protein with an apparent molecular mass of approximately 130 to 140 kDa, slightly larger than expected (111 kDa), suggesting that it might be glycosylated (Fig. 2C). Consistent with this observation, the putative ectoplasmic domain (residues 1 to 464) contains four potential Asn-X-Ser/Thr N glycosylation sites (Asn63, -165, -217, and -444). Given the suggestive membrane localization of this protein, which would be unique among eIF2 α kinases in unicellular eukaryotes, we focused this work on the characterization of TbeIF2K2.

TbeIF2K2 is localized to flagellar pocket and endosomal membranes. Indication of the membrane-bound nature of TbeIF2K2 was obtained by partial fractionation of cell extracts. Parasites were lysed in buffer lacking detergents, and the insoluble material was extracted in the same buffer containing 1% Triton X-100. As shown in Fig. 3A, virtually all TbeIF2K2

partitioned to the detergent-solubilized material. As a control, we probed the lower part of the same nitrocellulose membrane with antibodies directed against TbeIF2 α , a cytoplasmic protein (see below). Endoglycosidase H treatment of the membrane enriched fraction resulted in a decrease in size of TbeIF2K2, confirming the presence of N-glycans and thus its import and transit through the ER (Fig. 3B).

Immunofluorescence analysis of *T. brucei* cells using affinity-purified antibodies (Fig. 4A) showed that TbeIF2K2 is highly concentrated in a structure near the kinetoplast in both procyclic and bloodstream parasites, a finding suggestive of the flagellar pocket (Fig. 4B and Fig. 5). Preincubation of the antibodies with the purified recombinant protein abolished the signal, ascertaining the specificity of the reaction (Fig. 4B, bottom panels). We then performed a colocalization analysis with TL, which labels exclusively the flagellar pocket of bloodstream parasites when intact cells are incubated at 5°C to block endocytosis (6, 41) (Fig. 5). The anti-TbeIF2K2 signal for the most part overlapped the TL spot, as shown in panels A to D, confirming the flagellar pocket localization, although weak internal labeling associated with the lysosomal marker p67 was found in some cells (panels E to H, small arrow). Seen more frequently, however, was a strong independent TbeIFK2 signal

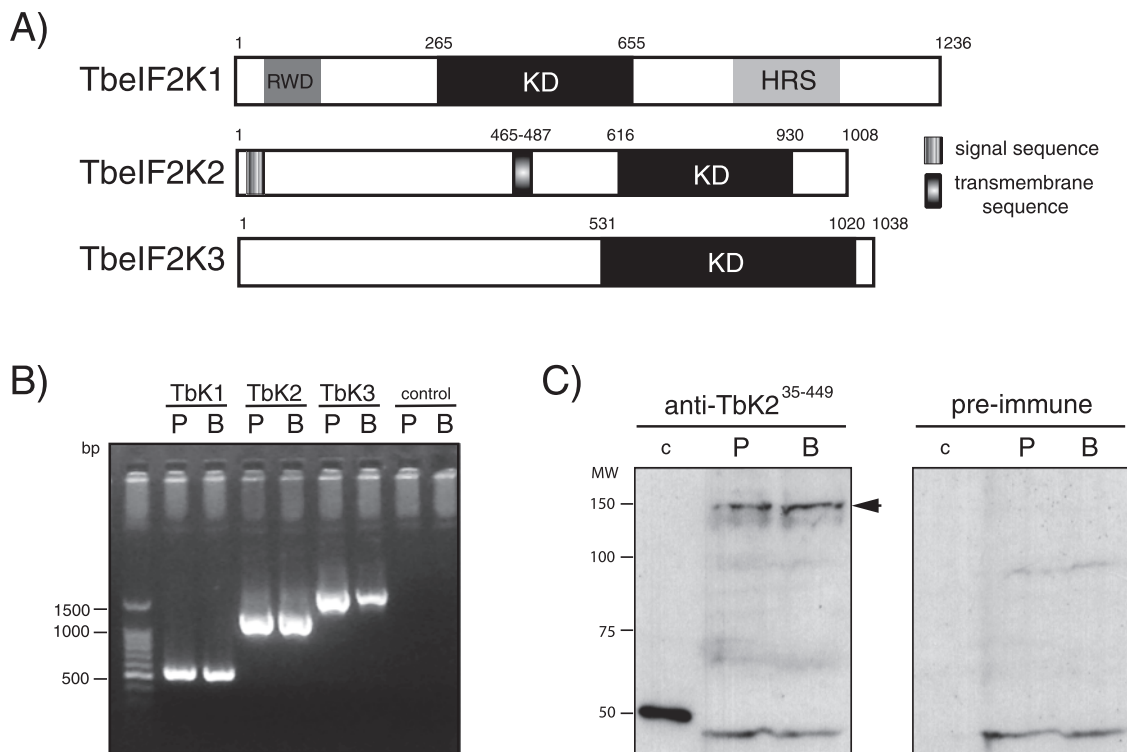


FIG. 2. Domain organization and expression of TbeIF2 kinases. (A) Schematics of the domain organization of the TbeIF2 kinases. Amino acid residue numbers are indicated above the bars, with the residues of the kinase domains (KD) corresponding to the sequences presented in Fig. 1. In TbeIF2K1, RWD indicates the ring finger, WD domain, and HRS indicates the sequence with similarity to histidinyl-tRNA synthetase. (B) Expression of the mRNA for each kinase. RT-PCR products obtained from procyclic (P) and bloodstream (B) forms, using the oligonucleotide pairs BC436-BC437 for TbeIF2K1, BC438-BC441 for TbeIF2K2, and BC446-BC450 for TbeIF2K3, with the expected sizes of 0.5, 1.2, and 1.4 kb, respectively; the controls represent the same DNase-treated RNA preparations used for RT-PCR, subjected to PCR with the primers for TbeIF2K1. (C) Expression of TbeIF2K2. Immunoblot of whole cells of bloodstream (B) and procyclic (P) parasites with anti-His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ serum or with preimmune serum; the lane labeled “c” contains the purified His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ protein that was used for immunization. The arrow indicates the TbeIF2K2 protein. Molecular weight standards (10³) are indicated on the left panel.

in the region between the flagellar pocket and lysosome suggestive of partial endosomal localization (Fig. 5E to H, arrowhead). To investigate this possibility, we performed a TL uptake experiment by incubation of the cells at 15°C. At this temperature, TL is internalized into endosomes but subse-

quent delivery to the lysosome is minimized (6). Under these conditions TbeIF2K2 again colocalized prominently with TL in the flagellar pocket, but a strong colocalization was also apparent in an internal tubular endosome characteristic of the low temperature block (Fig. 5I to L and M to P). This tubular compartment did not stain with anti-p67 consistent with a block in endosome-to-lysosome trafficking (Fig. 5Q to T). These localization data taken together indicate that TbeIF2K2 is in the membrane of the flagellar pocket and that it can be recycled through the endocytic pathway.

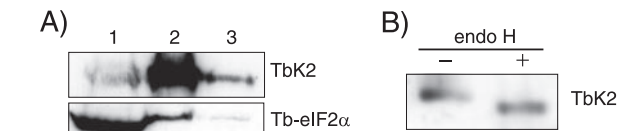


FIG. 3. TbeIF2K2 is a glycosylated membrane associated protein. (A) Partial fractionation. Procyclic forms were lysed by freeze-thawing and centrifuged as described in Materials and Methods. The soluble supernatant was separated (lane 1); the pellet was solubilized in the same buffer containing 1% Triton X-100, in the same volume as the supernatant. After centrifugation, the supernatant was separated (lane 2), and the pellet was solubilized in the same volume of buffer containing 8 M urea (lane 3). Identical volumes of the three samples were subjected to immunoblot analysis with anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ antibodies (TbK2) and with anti-TbeIF2 α serum (Tb-eIF2 α). (B) Endoglycosidase H treatment. Detergent-solubilized membrane fractions of procyclic parasites were treated with endoglycosidase H (+) or incubated under the same conditions without endoglycosidase H (-) and then subjected to immunoblotting with anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ antibodies (TbK2).

The kinase domain of TbeIF2K2 phosphorylates yeast and mammalian eIF2 α . Given the unusual localization of this protein and the sequence divergence relative to other known eIF2 α kinases, we studied the substrate specificity of TbeIF2K2. The putative kinase domain comprising residues 618 to 1009 (TbeIF2K2^{KD}) was expressed in yeast as a fusion to GST, under the control of the galactose-inducible GAL1 promoter. Dimerization of eIF2 α kinases is a requirement for their activation, and fusion of the kinase domain to heterologous dimerization domains, such as GST, results in a constitutively active protein, as shown for PKR and PEK/PERK (4, 47). Expression of GST-TbeIF2K2^{KD} in strain J80, which contains the wild-type yeast eIF2 α protein and lacks the chromosomal copy of GCN2, resulted in the complete inhibition of

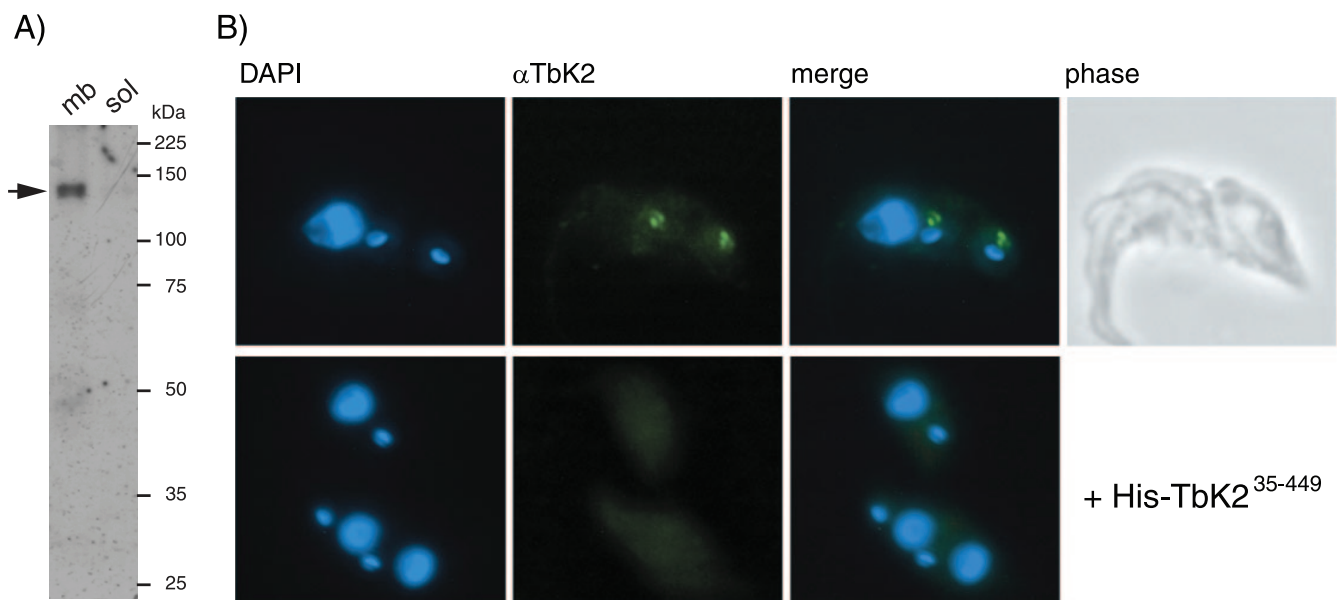


FIG. 4. Localization of TbeIF2K2 in procyclic cells. (A) Affinity-purified anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ antibodies. Immunoblot of membrane and soluble fractions obtained from procyclic parasites using monospecific purified antibodies used in the immunofluorescence assays. (B) Immunofluorescence of procyclic parasites. Immunofluorescence using affinity-purified anti-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ antibodies (α TbK2), followed by anti-rabbit IgG-fluorescein isothiocyanate. Nuclei were labeled with DAPI. The specificity of the signal was ascertained by preincubation of the antibody solution with the purified His₆-TbeIF2K2³⁵⁻⁴⁴⁹ protein, prior to addition to the cells (bottom row).

growth on medium containing galactose (Fig. 6A). When the same protein was expressed in the isogenic strain J82, in which the serine 51 residue of eIF2 α is replaced by alanine, not a target for the eIF2 α kinases, the cells were capable of growing on galactose (Fig. 6A). The expression of GST-TbeIF2K2^{KD} in the J82 cells is shown in a Western blot with anti-GST antibodies (Fig. 6B). Direct evidence for the phosphorylation of eIF2 α by TbeIF2K2 in strain J80 was obtained by immunoblotting total cell extracts, prepared after induction with galactose, using antibodies that specifically recognize the phosphorylated form of eIF2 α (eIF2 α -P) (Fig. 6C). Thus, TbeIF2K2 phosphorylates yeast eIF2 α specifically at S51, therefore inhibiting translation and growth. The efficiency of phosphorylation of eIF2 α by TbeIF2K2 was compared to that of PKR in *in vitro* phosphorylation assays. GST-TbeIF2K2^{KD}, immunoprecipitated from the yeast J82 cell extract, and GST-PKR^{KD}, purified from *E. coli*, were incubated with mammalian eIF2 α purified from *E. coli*, and the reactions were analyzed by immunoblots with anti-eIF2 α -P antibodies and normalized with the levels of total eIF2 α (Fig. 6D). The amounts of the two kinases were equivalent, as judged from probing the upper portion of the membrane with anti-GST antibodies. These experiments, together with the *in vivo* results in yeast, indicated that TbeIF2K2 has the same ability as PKR to recognize and phosphorylate yeast or mammalian eIF2 α , even though there are marked sequence divergences in the regions of these kinases that have been implicated in autophosphorylation and substrate recognition.

TbeIF2K2 phosphorylates TbeIF2 α at T169. Inspection of the trypanosomatid genomic database revealed an ortholog of eIF2 α with conserved features with other known eIF2 α sequences, as shown in the alignment in Fig. 7. Interestingly, however, in place of the residue corresponding to S51 that is

phosphorylated in all eukaryotes, trypanosomatid eIF2 α has a threonine residue. In addition, we noticed that the AUG codon assigned as the initiator for the three inspected trypanosomatid sequences (*T. brucei*, *T. cruzi*, and *L. major*) was not conserved. To ascertain the sequence of the transcript, we performed RT-PCR from total mRNA of *T. brucei* using as a forward primer an oligonucleotide corresponding to the spliced leader sequence and as a reverse primer an oligonucleotide complementary to a conserved region, located just after the putative threonine residue (T169) corresponding to S51 of other eukaryotes. Sequencing of this fragment confirmed the threonine residue and the extension in the N-terminal region in the *T. brucei* eIF2 α (TbeIF2 α), with no homology to any eukaryotic sequence, except the other trypanosomatids' orthologs (Fig. 7A). Using the same experimental approach, we determined that these features were also found in the *T. cruzi* eIF2 α protein (data not shown). To determine whether this extended protein was expressed in *T. brucei*, we raised antibodies against TbeIF2 α . The only protein recognized by the antiserum has the expected size of the extended eIF2 α (Fig. 7B). The difference in size between the endogenous and the recombinant protein used as control is due to the presence of the His tag sequence in the latter.

Given the unusual features of TbeIF2 α , we then addressed whether this protein could substitute for the yeast counterpart and be a substrate for the known eIF2 α kinases. The complete TbeIF2 α sequence was cloned under the control of the GAL1 promoter, in a *LEU2* vector. This plasmid was used to transform yeast strain H1643, which has a deletion of the chromosomal copy of the *SUI2* gene, encoding eIF2 α , and is maintained viable by the presence of the *SUI2* gene in a *URA3* plasmid. This strain is unable to grow in the presence of 5-fluoroorotic acid (5-FOA), which selects for Ura⁻ cells arising

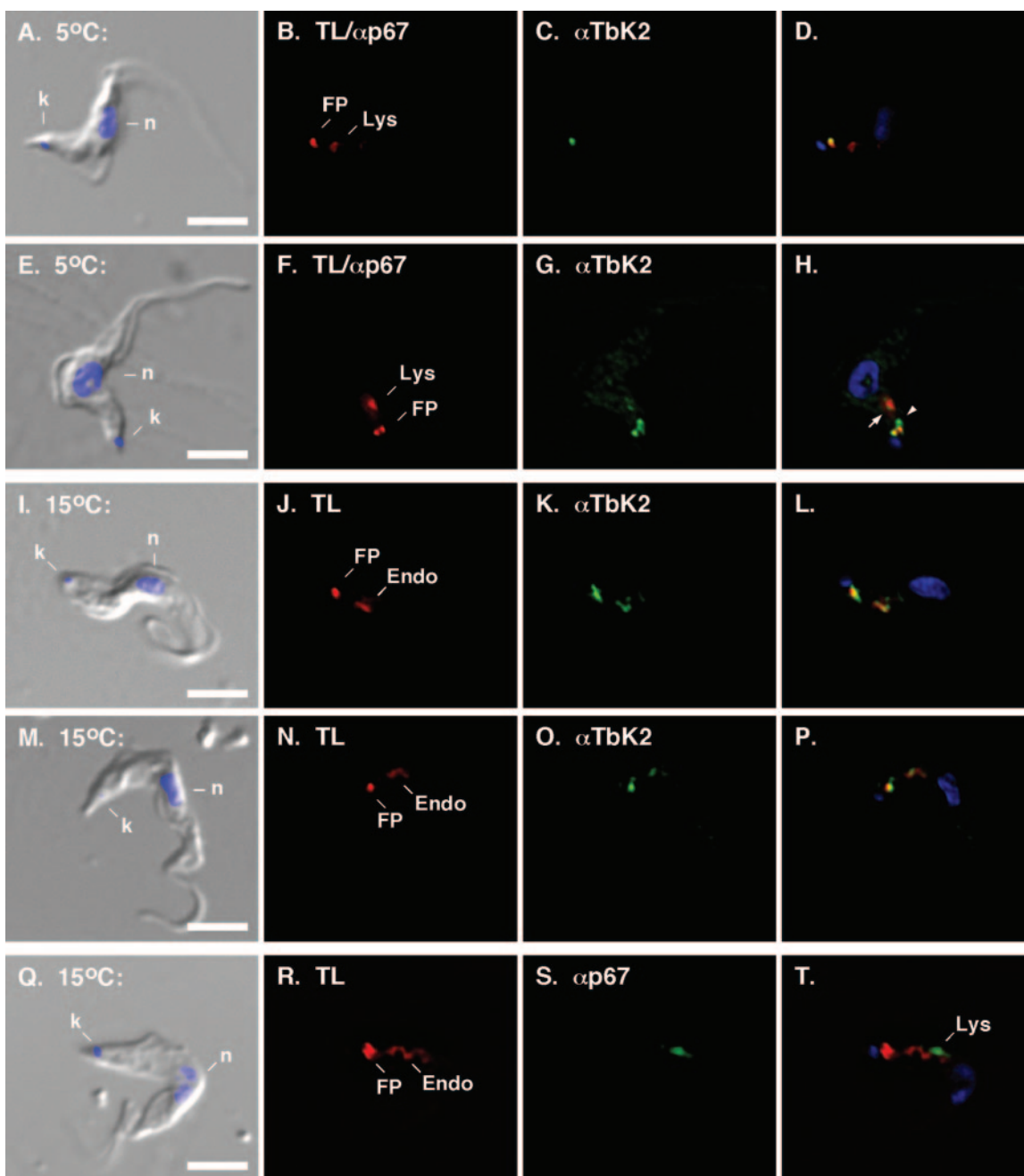


FIG. 5. Localization of TbeIF2K2 in bloodstream cells. Bloodstream trypanosomes were incubated for 30 min with biotinyl TL at 5°C to allow flagellar pocket binding (A to D and E to H) or at 15°C to allow binding and uptake into the endosomal compartment (I to L, M to P, and Q to T) as described in Materials and Methods. Fixed and permeabilized cells were then stained with fluorescent streptavidin to detect bound or internalized TL (red), and as indicated with purified anti-TbeIF2K2 antibodies (α TbK2) and or anti-p67 (middle panels). (A to H) Cells stained with anti-TbeIF2K2 (green) and anti-p67 (red). The discrete positioning of the anterior lysosome and the posterior flagellar pocket allow simultaneous imaging of these organelles in the same channel. (I to P) Cells stained with anti-TbeIF2K2 (green). (Q to T) Cells stained with anti-p67 (green). Merged DAPI/differential interference contrast images are presented in the leftmost panels with kinetoplast (k) and nucleus (n) labeled, and merged three-channel fluorescent images are presented in rightmost panels. The positions of the lysosome (Lys), endosome (Endo), and flagellar pocket (FP) are indicated. The arrowhead in panel H indicates a region of discrete TbeIF2K2 signal, presumably the endosome, that does not colocalize with the nearby flagellar pocket. Bars, 5 μ m.

from the spontaneous loss of the *URA3* plasmid and therefore of the *SUI2* gene. As a control, we used a *LEU2* plasmid expressing yeast eIF2 α from the same promoter. The expression of TbeIF2 α did not allow growth in 5-FOA, indicating that

TbeIF2 α cannot functionally substitute for the yeast eIF2 α (Fig. 8A). Because the presence of the N-terminal extension could hinder the function of TbeIF2 α in yeast, we performed the same assay using a truncated form of the protein

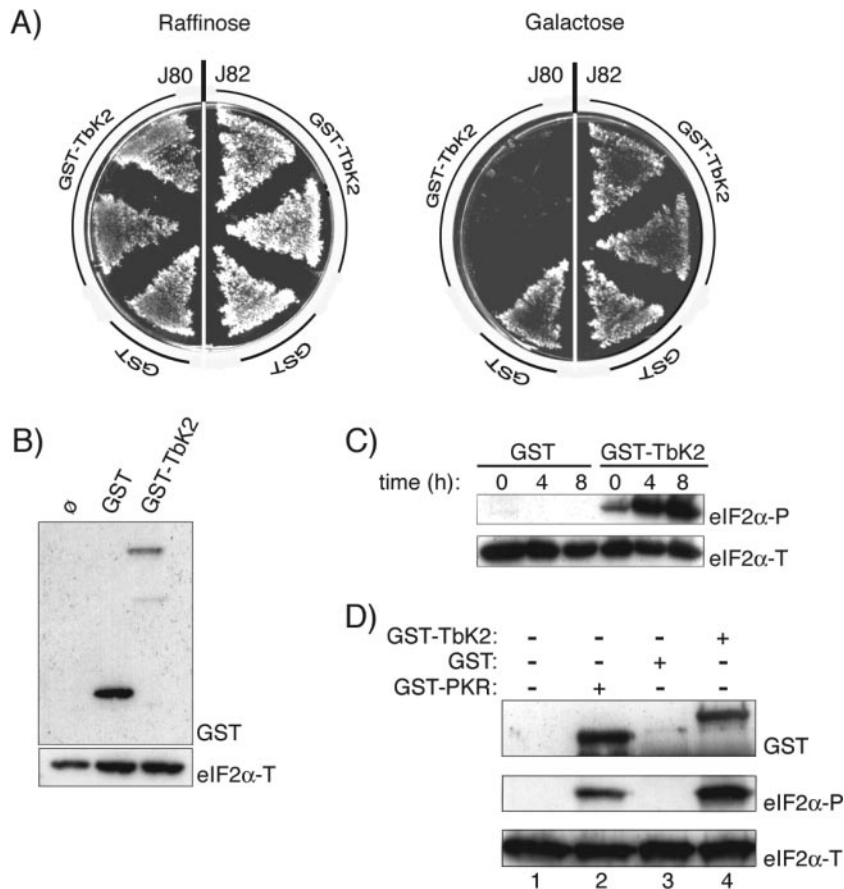


FIG. 6. TbeIF2K2 phosphorylates specifically residue Ser51 in yeast and mammalian eIF2 α . (A) GST-TbeIF2K2^{KD} (GST-Tbk2) was expressed from the inducible GAL1 promoter in yeast strain J80, which contains the wild-type copy of the gene encoding eIF2 α , and in strain J82, which contains the mutant eIF2 α ^{Ser51Ala}. The growth of two independent transformants expressing GST-Tbk2 is shown on raffinose- (left) and on galactose (right)-containing medium. As controls, the growth of the same strains expressing GST from the empty vector is shown (GST). (B) The expression of the proteins was determined by immunoblotting total cell extracts (5 μ g of total protein) prepared from the same isolates as described above of strain J82 and of a strain without plasmid (\emptyset), grown on galactose, using antibodies to GST. As a control, the blot was probed with antibodies against total yeast eIF2 α (eIF2 α -T) after removal of the first antibodies (bottom panel). (C) The phosphorylation of the endogenous eIF2 α was analyzed in strain J80 carrying the vector (GST) or the GST-TbeIF2K2^{KD} expressing plasmid (GST-Tbk2) after 4 or 8 h of induction with galactose, by immunoblotting with antibodies directed to the phosphorylated form of eIF2 α (eIF2 α -P) and normalized with antibodies to total eIF2 α (eIF2 α -T). (D) In vitro phosphorylation assays were performed with mammalian eIF2 α purified from *E. coli* and with GST-TbeIF2K2^{KD} immunoprecipitated from an extract of strain J82 grown in galactose, using as a control GST immunoprecipitated from the same strain carrying the empty vector. As a control for the efficiency of phosphorylation, we used GST-PKR^{KD} purified from *E. coli*. Phosphorylation was detected by immunoblots with antibodies specific for eIF2 α -P and normalized with antibodies against total mammalian eIF2 α (eIF2 α -T). The amounts of the GST fusion proteins in the reactions were determined by immunoblots of the upper portion of the gel using anti-GST antibodies (GST).

(TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹). This truncated protein was functional in yeast, allowing the growth of yeast cells on 5-FOA-containing medium (Fig. 8A). Immunoblots of total cell extracts prepared from independent isolates from the 5-FOA plates showed that TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ was the sole eIF2 α present in these cells (Fig. 8B).

We next addressed whether TbeIF2 α was a substrate for yeast GCN2 by assessing the growth of these isolates on media containing 3-aminotriazole. The isolates expressing either TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ or TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹(T169A) were capable of growth on 3-aminotriazole (data not shown). This is probably due to the formation of a defective ternary complex. Thus, an in vivo assay for GCN2-mediated phosphorylation of TbeIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ was not possible. In vitro phosphorylation assays were then performed with purified TbeIF2 α , PKR, and GCN2. The com-

plete TbeIF2 α , purified from *E. coli* as a His tag fusion, was incubated with purified PKR or GCN2 in the presence of [³³P]ATP. TbeIF2 α was not phosphorylated by GCN2 and only weakly phosphorylated by PKR (Fig. 9). The truncated eIF2 α ¹²⁵⁻⁴¹⁹ protein was not phosphorylated by PKR or GCN2 either (data not shown). To address whether TbeIF2 α was a substrate for TbeIF2K2, GST-TbeIF2K2^{KD} was immunoprecipitated from extracts of strain J82 grown on galactose, using anti-GST antibodies, and used in in vitro phosphorylation assays with purified TbeIF2 α or TbeIF2 α ^{T169A}. TbeIF2K2 was capable of phosphorylating *T. brucei* eIF2 α but not the mutant protein TbeIF2 α ^{T169A} (Fig. 9). These results clearly show that TbeIF2K2 phosphorylates TbeIF2 α specifically at T169. Thus, TbeIF2K2 recognizes yeast, mammalian, and trypanosomatid

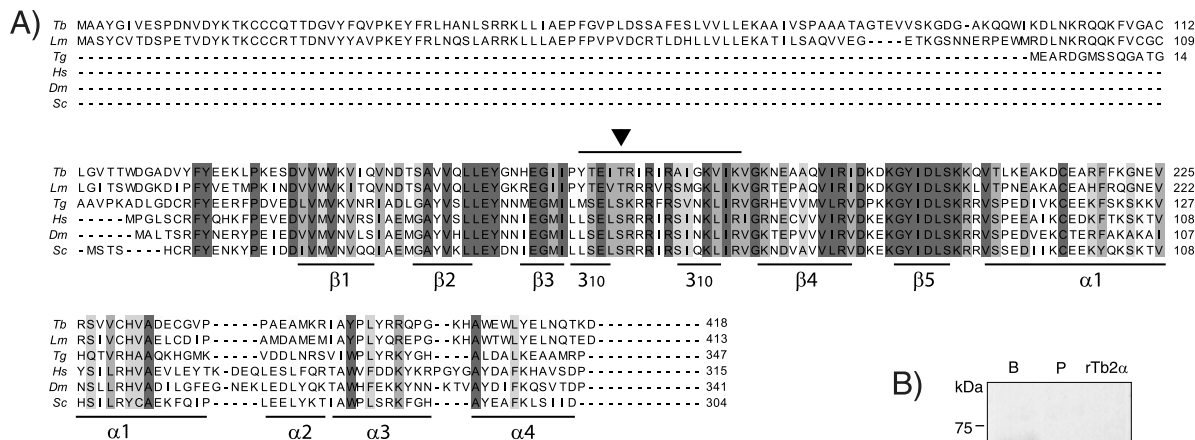


FIG. 7. eIF2 α in trypanosomatids. (A) Alignment of the N-terminal half of *T. brucei* and *L. major* eIF2 α and other characterized eIF2 α proteins. A line above the sequences indicates the unstructured loop encompassing the phosphorylated residue, indicated with an arrowhead. The structural domains of eIF2 α are indicated with lines below the sequences. (B) Immunoblot of total cell extract of intact bloodstream (B) and procyclic (P) form parasites using anti-TbeIF2 α serum; as a control, the lane labeled rTb2 α contains the His₆-TbeIF2 α protein purified from *E. coli*.

eIF2 α , but TbeIF2 α is only efficiently recognized by the trypanosomatid kinase.

Modifications of TbeIF2K2 in bloodstream forms. Two bands corresponding to TbeIF2K2 can be detected on prolonged runs on SDS-7% PAGE of membrane-enriched fractions from bloodstream parasites obtained under normal growth conditions in well-established medium, whereas only one band is seen for procyclics (Fig. 10A). The procyclic protein migrates in a position intermediary between the two bands observed in the bloodstream forms. In analogy to PEK/PERK, which shows a drastic change in migration due to phosphorylation when activated, we reasoned that in the bloodstream forms TbeIF2K2 could be partially activated. To determine whether the slower-migrating protein was phosphorylated, the membrane-enriched fractions were treated with alkaline phosphatase. As shown in Fig. 10, the phosphatase treatment caused a shift of the bloodstream protein to the faster mobility band. In contrast, in procyclics the phosphatase treatment did not alter the mobility of the protein. Thus, in bloodstream forms, a fraction of the TbeIF2K2 protein is phosphorylated under normal in vitro growth conditions. Whether the phosphorylated form of TbeIF2K2 found in bloodstream parasites represents the activated form of the kinase remains to be elucidated.

Bloodstream forms are highly sensitive to high cell densities in culture. While pleomorphic strains differentiate from slender to stumpy forms above a critical density, the monomorphic strain MITat 1.2 used in the present study rapidly die (49). During the present study we found that TbeIF2K2 is affected by the density of the culture of bloodstream forms. Membrane and soluble fractions prepared from parasites obtained from culture samples taken at 12-h intervals, starting from a density of 2.4×10^6 cells/ml were analyzed in immunoblots for

TbeIF2K2. As shown in Fig. 10B, TbeIF2K2 is virtually absent in parasites obtained from the culture in which cell death was evident. As a control, BiP expression was not affected, as shown by probing the same filter with anti-BiP antibodies. These results suggest that TbeIF2K2 may be subject to either downregulation of expression and/or to proteolytic degradation under these conditions.

DISCUSSION

We described here two highly unusual components of translational regulation found in *T. brucei* that seem to be conserved in *T. cruzi* and *L. major*. Considering that these organisms represent a deeply rooted branch of the eukaryotic kingdom, it is interesting that trypanosomatids have evolved an eIF2 α subunit that is divergent from all other eukaryotes, regarding both the threonine residue in place of Ser51 and the unique N-terminal extension. Perhaps most surprising was the discovery of an eIF2 α kinase that is membrane associated and completely constrained to a subcellular structure that is typical of this group of protozoa. Importantly, the data presented here clearly indicated that TbeIF2K2 is a kinase that phosphorylates eIF2 α in a highly specific manner. Its substrate range, however, differs from the known eIF2 α kinases. Although TbeIF2K2 was capable of phosphorylating yeast, mammalian, and the *T. brucei* eIF2 α , neither PKR nor GCN2 efficiently phosphorylated TbeIF2 α in vitro. This difference is not due to the presence in TbeIF2 α of a threonine in the position corresponding to serine 51 since both PKR and GCN2 can phosphorylate yeast or mammalian eIF2 α at a threonine residue in place of S51 (31). The specificity of substrate recognition by PKR is given by a contiguous surface on one face of eIF2 α comprising the S51 region; the kinase determinants G30, A31, and Met44; and the

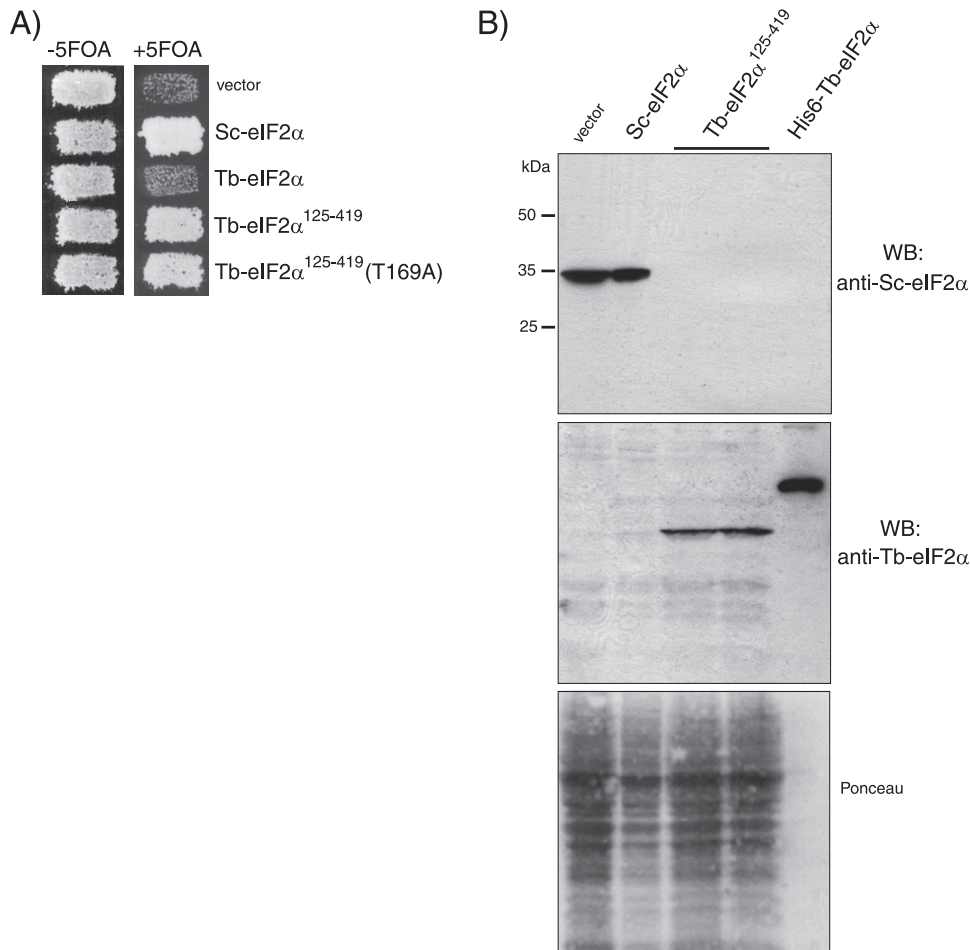


FIG. 8. TbeIF2 α substitutes for yeast eIF2 α . (A) Growth of yeast cells expressing TbeIF2 α . Derivatives of strain H1643 expressing the indicated eIF2 α proteins from the GAL1 promoter were grown on plates containing synthetic medium supplemented with galactose in the presence or absence of 5-FOA. (B) Expression of TbeIF2 $\alpha^{125-419}$ in yeast. Total cell extracts (50 μ g) of two isolates carrying TbeIF2 $\alpha^{125-419}$ and one isolate expressing yeast eIF2 α selected from the 5-FOA plates and of control H1643 cells carrying only the vector were subjected to immunoblotting with anti-TbeIF2 α serum; after stripping the first antibodies, the same membrane was incubated with antibodies against yeast eIF2 α . The bottom panel shows the filter stained with Ponceau S.

invariant peripheral docking site comprised by the KGYID motif, located 28 residues C terminal to the S51 residue (9). Of these, only residues G30 and M44 differ in the trypanosomatids' protein, being replaced by serine and isoleucine, respectively. Mutations in both G30 and M44 abolish phosphorylation of eIF2 α by PKR (14). These substitutions alone could then account for the poor ability of TbeIF2 α to function as a substrate for PKR. However, other divergent residues in TbeIF2 α in positions that are invariant in other eIF2 α in this critical region may also hinder its recognition by PKR. TbeIF2K2 phosphorylation of mammalian, yeast, and *T. brucei* eIF2 α suggests that the substrate-binding sites on this kinase can accommodate a wider range of residues.

Phosphorylation of eIF2 α appears to be relevant as a mechanism of regulation of protein synthesis in these parasites as suggested by the existence of three eIF2 α kinases, one of which we have clearly shown to be a bona fide eIF2 α kinase, and by the presence of orthologs of the five subunits of the GTP exchange factor, eIF2B, of which the regulatory subunits α , β , and δ mediate the inhibitory effect caused by increased levels

of eIF2 α -P in the cells. It is not clear at the moment whether the phosphorylation of TbeIF2 α would result in a downstream regulatory signaling cascade, since there is an apparent lack of transcriptional factors of the bZIP type in trypanosomatids that could function as GCN4 or ATF4 (26). It seems then that this signaling may only involve the downregulation of general translation during specific situations. It is possible that proteins with no transcriptional role might be translated from messages containing uORFs when TbeIF2 α is phosphorylated.

The predicted domain structure of TbeIF2K2 suggests that it is an integral membrane protein with an N-terminal luminal or ectoplasmic domain and a C-terminal cytoplasmic kinase domain. Our findings that it requires detergent for solubilization and that it is N glycosylated are consistent with this interpretation. Surprisingly, however, given its topological similarity to the metazoan ER kinase PEK/PERK, TbeIF2K2 is prominently localized to the flagellar pocket and closely associated endosomal membranes. The flagellar pocket localization was also confirmed by immunofluorescence assays with different antibodies raised against another region of the protein, encom-

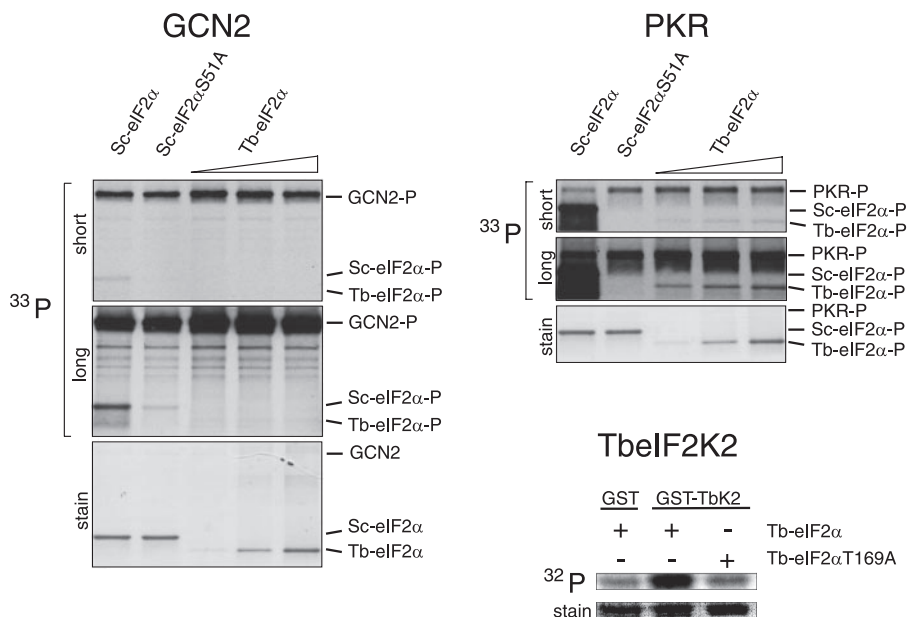


FIG. 9. In vitro phosphorylation of TbeIF2 α . Purified His₆-TbeIF2 α was used in in vitro reactions with purified GCN2 (left panels) and purified PKR (upper right panels) and with immunoprecipitated GST-TbeIF2K2^{KD} (bottom right panels). Controls were purified yeast GST-eIF2 α and GST-eIF2 α ^{Scr51Ala} for the GCN2 and PKR assays and purified His₆-TbeIF2 α ^{Thr169Ala} for the TbeIF2K2 assay. Exposure times are indicated as “short” or “long.” The total protein was visualized on the gels by Coomassie R250 stain.

passing the kinase domain (data not shown). The flagellar pocket is the only site where endocytosis and exocytosis occur in these parasites, and all proteins destined to the plasma membrane are directed to the flagellar pocket before reaching

the parasite surface (19). Trypanosomes have a dense extracellular surface coat composed of variant surface glycoprotein that restricts macromolecular access to the plasma membrane; thus, the flagellar pocket functions as the primary portal for cross talk with the host. In this regard the predicted topology of TbeIF2K2, with a cytoplasmic kinase domain and a potential extracellular regulatory domain, is very suggestive of a role in sensory signaling. A limited repertoire of transmembrane proteins have been characterized in the general endomembrane system of bloodstream trypanosomes, including the lysosomal marker p67 (1), the endosomal marker membrane-bound acid phosphatase (17), and the invariant surface glycoproteins ISG65/75, which recycle between the endosome and cell surface (7). However, none of these is likely to have a role in sensory signaling. Bloodstream trypanosomes do have a flagellar membrane-associated adenylate cyclase with an architecture analogous to that of TbeIF2K2 and that is primarily localized to the flagellum membrane, but ligands for this potential receptor have never been identified (38).

Just what process may regulate TbeIF2K2 activity is currently uncertain, but its localization in the flagellar pocket suggests as one possibility the endocytic cargo load, which is greatly enhanced in the bloodstream stage of the life cycle (18). TbeIF2K2 is constitutively expressed but has a higher basal phosphorylation state in bloodstream parasites, and perhaps this regulates kinase activity which could, in turn, control endocytosis indirectly through translational attenuation of proteins destined to the cell membrane. Another possibility is that TbeIF2K2 activity is regulated during life cycle differentiation. In natural infections pleomorphic bloodstream parasites differentiate in a density-dependent manner from dividing long slender forms to nondividing short stumpy forms that are preadapted for transmission to the tsetse fly (33). Concomitant

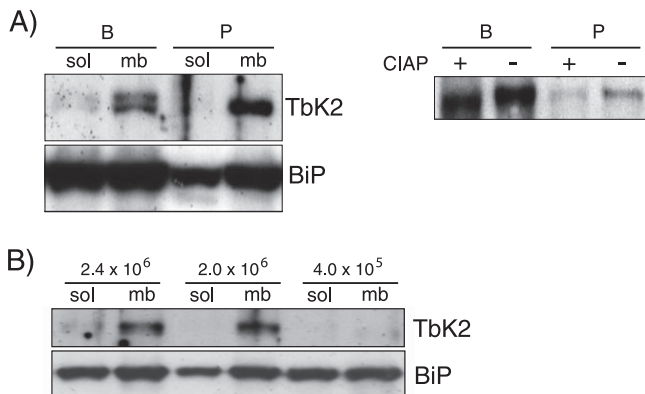


FIG. 10. Modifications of TbeIF2K2 in bloodstream parasites. (A) Phosphorylation of TbeIF2K2. Membrane-enriched (mb) and soluble (sol) fractions (5 μ g of total protein) of bloodstream (B) and procyclic (P) parasites were subjected to immunoblots with anti-TbeIF2K2 antibodies and with anti-BiP serum (left panels) (BiP partitions to both soluble and membrane enriched fractions). Membrane-enriched fractions from bloodstream (B) and procyclic (P) parasites were treated with calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP), and subjected to immunoblot with anti-TbeIF2K2 antibodies (right panel). (B) TbeIF2K2 in high-density cultures of bloodstream forms. Membrane (mb) and soluble (sol) fractions (10 μ g of total protein) from bloodstream forms grown to late logarithmic phase (2.4×10^6 cells/ml), and 12 h (2.0×10^6 cells/ml) or 24 h (4.0×10^5 cells/ml) later were subjected to immunoblotting with anti-TbeIF2K2 antibodies (Tbk2) or anti-BiP (BiP) serum. The indicated number of cells corresponds to live parasites as determined by their motility at each time point.

with this growth arrest phenotype, levels of protein synthesis drop dramatically (5). This “quorum-sensing” process is stimulated by a parasite-derived small molecule called stumpy induction factor (SIF) (49). Neither SIF nor its receptor have been identified, but the location of TbeIF2K2 and its ability to phosphorylate endogenous eIF2 and thereby regulate translation make it an attractive candidate receptor. The loss of TbeIF2K2 in high-density cultures of monomorphic bloodstream trypanosomes, which are resistant to SIF, may be related as a cause or a consequence to this process.

Another issue raised by our study is how an eIF2 α kinase present exclusively in a particularly small area of the cell could regulate general translation. Protein synthesis in *T. brucei* is not restricted to any region of the cell, since ribosomes are spread in the cytoplasm, as seen in many published electron microscopy analysis. TbeIF2 α is also found distributed in the cytoplasm, as judged by immunofluorescence analysis using the antibodies described here (data not shown). We can foresee two possibilities: (i) TbeIF2K2 may regulate localized protein synthesis in the vicinity of the flagellar pocket, or (ii) activated TbeIF2K2 may change cellular localization, for example, by being internalized via endocytic vesicles, with the catalytic domain thus gaining access to a large pool of cytoplasmic eIF2 α . This latter mechanism could perhaps account for the fraction of TbeIF2K2 found in endosomes and that found phosphorylated in bloodstream cells.

The N-terminal ectoplasmic domain of TbeIF2K2 that may serve a regulatory function is conserved in the orthologs of other trypanosomatids. It shares 31 and 24% identity (45 and 38% similarity) with eIF2K2 from *T. cruzi* and *L. major*, respectively. The *T. cruzi* protein is very similar to TbeIF2K2, containing a signal sequence at its N terminus and a transmembrane region in the exact same position as in the *T. brucei* protein. For the *Leishmania* protein, although clearly similar to TbeIF2K2 within the regulatory region, there are several inserts relative to TbeIF2K2. In addition, the signal sequence starts at residue 40, which may not qualify it for directing the protein to the membrane. It will certainly be interesting to localize the eIF2K2 proteins in the cells of both *T. cruzi* and *L. major* since these parasites seem to present slightly distinct exo- and endocytic systems relative to the better characterized membrane network described for *T. brucei*. The putative regulatory N-terminal domain does not show any sequence similarity with PEK/PERK or with any other known or predicted protein, including those of other parasites such as *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trichomonas*, and *Giardia*. These observations taken together indicate that this kinase evolved only in the trypanosomatid lineage, but within it, it has somewhat diverged, perhaps reflecting differences in life cycles and cell biology.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Ronald Wek (University of Indiana) for helpful discussions.

This study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) to B.A.C. and to S.S. and by National Institutes of Health grants AI056866 and AI35739 to J.D.B. M.C.S.M. and T.C.L.J. were supported by doctoral fellowships, and N.N.H. and V.S.A. were supported by postdoctoral fellowships from FAPESP.

REFERENCES

- Alexander, D. L., K. J. Schwartz, A. E. Balber, and J. D. Bangs. 2002. Developmentally regulated trafficking of the lysosomal membrane protein p67 in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **115**:3253–3263.
- Bangs, J. D., L. Uyetake, M. J. Brickman, A. E. Balber, and J. C. Boothroyd. 1993. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*: divergent ER retention signals in a lower eukaryote. *J. Cell Sci.* **105**:1101–1113.
- Berriman, M., E. Ghedin, C. Hertz-Fowler, G. Blandin, H. Renauld, 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. Rabinovitch, 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. Ebley, 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. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* **309**:416–422.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding, and D. Ron. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**:326–332.
- Brecht, M., and M. Parsons. 1998. Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. *Mol. Biochem. Parasitol.* **97**:189–198.
- Brickman, M. J., J. M. Cook, and A. E. Balber. 1995. Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment in African trypanosomes. *J. Cell Sci.* **108**:3611–3621.
- Chung, W. L., M. Carrington, and M. C. Field. 2004. Cytoplasmic targeting signals in transmembrane invariant surface glycoproteins of trypanosomes. *J. Biol. Chem.* **279**:54887–54895.
- Clayton, C. E. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J.* **21**:1881–1888.
- Dar, A. C., T. E. Dever, and F. Sicheri. 2005. Higher-order substrate recognition of eIF2 α by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* **122**:887–900.
- Dever, T. E. 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**:545–556.
- Dever, T. E., J. J. Chen, G. N. Barber, A. M. Cigan, L. Feng, T. F. Donahue, I. M. London, M. G. Katze, and A. G. Hinnebusch. 1993. 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. USA* **90**:4616–4620.
- Dever, T. E., R. C. Wek, L. Feng, A. M. Cigan, T. F. Donahue, and A. G. Hinnebusch. 1992. Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell* **68**:585–596.
- Dey, M., C. Cao, A. C. Dar, T. Tamura, K. Ozato, F. Sicheri, and T. E. Dever. 2005. Mechanistic link between PKR dimerization, autophosphorylation, and eIF2 α substrate recognition. *Cell* **122**:901–913.
- Dey, M., B. Trieselmann, E. G. Locke, J. Lu, C. Cao, A. C. Dar, T. Krishnamoorthy, J. Dong, F. Sicheri, and T. E. Dever. 2005. PKR and GCN2 kinases and guanine nucleotide exchange factor eukaryotic translation initiation factor 2B (eIF2B) recognize overlapping surfaces on eIF2 α . *Mol. Cell Biol.* **25**:3063–3075.
- El-Sayed, N. M., 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 Silva, 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. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**:409–415.
- Engstler, M., and M. Boshart. 2004. Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev.* **18**:2798–2811.

17. Engstler, M., F. Weise, K. Bopp, C. G. Grunfelder, M. Gunzel, N. Heddergott, and P. Overath. 2005. The membrane-bound histidine acid phosphatase TbMBAP1 is essential for endocytosis and membrane recycling in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* **118**:2105–2118.
18. Field, M. C., and M. Carrington. 2004. Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. *Traffic* **5**:905–913.
19. Gull, K. 2003. Host-parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:365–370.
20. Han, A. P., C. Yu, L. Lu, Y. Fujiwara, C. Browne, G. Chin, M. Fleming, P. Leboulch, S. H. Orkin, and J. J. Chen. 2001. Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *EMBO J.* **20**:6909–6918.
21. Hanks, S. K., and T. Hunter. 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9**:576–596.
22. Harding, H. P., Y. Zhang, H. Zeng, I. Novoa, P. D. Lu, M. Calfon, N. Sadri, C. Yun, B. Popko, R. Paulus, D. F. Stojdl, J. C. Bell, T. Hettmann, J. M. Leiden, and D. Ron. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell* **11**:619–633.
23. Hashimoto, N. N., L. S. Carnevali, and B. A. Castilho. 2002. Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. *Biochem. J.* **367**:359–368.
24. Hinnebusch, A. G. 1997. Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors that control initiator-tRNA binding to the ribosome. *J. Biol. Chem.* **272**:21661–21664.
25. Hinnebusch, A. G. 1993. Gene-specific translational control of the yeast *GCN4* gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2. *Mol. Microbiol.* **10**:215–223.
26. Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. 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. Rabinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, et al. 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**:436–442.
27. Jiang, H. Y., and R. C. Wek. 2005. GCN2 phosphorylation of eIF2 α activates NF- κ B in response to UV irradiation. *Biochem. J.* **385**:371–380.
28. Jiang, H. Y., and R. C. Wek. 2005. Phosphorylation of the alpha-subunit of the eukaryotic initiation factor-2 (eIF2 α) reduces protein synthesis and enhances apoptosis in response to proteasome inhibition. *J. Biol. Chem.* **280**:14189–14202.
29. Kaufman, R. J. 2000. The double-stranded RNA-activated protein kinase PKR, p. 503–527. *In* N. Sonenberg, J. W. B. Hershey, and M. B. Mathews (ed.), *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
30. Kawagishi-Kobayashi, M., C. Cao, J. Lu, K. Ozato, and T. E. Dever. 2000. Pseudosubstrate inhibition of protein kinase PKR by swine pox virus C8L gene product. *Virology* **276**:424–434.
31. Lu, J., E. B. O'Hara, B. A. Trieselmann, P. R. Romano, and T. E. Dever. 1999. The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase PKR will phosphorylate serine, threonine, or tyrosine at residue 51 in eukaryotic initiation factor 2 α . *J. Biol. Chem.* **274**:32198–32203.
32. Ma, K., K. M. Vattem, and R. C. Wek. 2002. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **277**:18728–18735.
33. Matthews, K. R., J. R. Ellis, and A. Paterou. 2004. Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends Parasitol.* **20**:40–47.
34. McNicoll, F., M. Muller, S. Cloutier, N. Boilard, A. Rochette, M. Dube, and B. Papadopoulou. 2005. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* **280**:35238–35246.
35. Mitchell, D. A., T. K. Marshall, and R. J. Deschenes. 1993. Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* **9**:715–723.
36. Narasimhan, J., K. A. Staschke, and R. C. Wek. 2004. Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J. Biol. Chem.* **279**:22820–22832.
37. Natarajan, K., M. R. Meyer, B. M. Jackson, D. Slade, C. Roberts, A. G. Hinnebusch, and M. J. Marton. 2001. Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**:4347–4368.
38. Painsavoine, P., S. Rolin, S. Van Assel, M. Geuskens, J. C. Jauniaux, C. Dinsart, G. Huet, and E. Pays. 1992. A gene from the variant surface glycoprotein expression site encodes one of several transmembrane adenylate cyclases located on the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* **12**:1218–1225.
39. Pereira, C. M., E. Sattlegger, H. Y. Jiang, B. M. Longo, C. B. Jaqueta, A. G. Hinnebusch, R. C. Wek, L. E. Mello, and B. A. Castilho. 2005. IMPACT, a protein preferentially expressed in the mouse brain, binds GCN1 and inhibits GCN2 activation. *J. Biol. Chem.* **280**:28316–28323.
40. Qiu, H., J. Dong, C. Hu, C. S. Fracklyn, and A. G. Hinnebusch. 2001. The tRNA-binding moiety in GCN2 contains a dimerization domain that interacts with the kinase domain and is required for tRNA binding and kinase activation. *EMBO J.* **20**:1425–1438.
41. Schwartz, K. J., R. F. Peck, N. N. Tazeh, and J. D. Bangs. 2005. GPI valence and the fate of secretory membrane proteins in African trypanosomes. *J. Cell Sci.* **118**:5499–5511.
42. Sherman, F. 1991. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **194**:3–21.
43. Sikorsky, R. S., and P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:10–27.
44. Sood, R., A. C. Porter, K. Ma, L. A. Quilliam, and R. C. Wek. 2000. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem. J.* **346**:281–293.
45. Sullivan, W. J., Jr., J. Narasimhan, M. M. Bhatti, and R. C. Wek. 2004. Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. *Biochem. J.* **380**:523–531.
46. Thompson, G. M., E. Pacheco, E. O. Melo, and B. A. Castilho. 2000. Conserved sequences in the b subunit of archaeal and eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2 γ . *Biochem. J.* **347**:703–709.
47. Ung, T. L., C. Cao, J. Lu, K. Ozato, and T. E. Dever. 2001. Heterologous dimerization domains functionally substitute for the double-stranded RNA binding domains of the kinase PKR. *EMBO J.* **20**:3728–3737.
48. Vassella, E., J. V. Den Abbeele, P. Butikofer, C. K. Renggli, A. Furger, R. Brun, and I. Roditi. 2000. A major surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei* is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia. *Genes Dev.* **14**:615–626.
49. Vassella, E., B. Reuner, B. Yutzy, and M. Boshart. 1997. Differentiation of African trypanosomes is controlled by a density sensing mechanism which signals cell cycle arrest via the cAMP pathway. *J. Cell Sci.* **110**:2661–2671.
50. Vattem, K. M., and R. C. Wek. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:11269–11274.
51. Yang, R., S. A. Wek, and R. C. Wek. 2000. Glucose limitation induces GCN4 translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**:2706–2717.
52. Zhan, K., K. M. Vattem, B. N. Bauer, T. E. Dever, J. J. Chen, and R. C. Wek. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses. *Mol. Cell. Biol.* **22**:7134–7146.
53. Zhang, P., B. C. McGrath, J. Reinert, D. S. Olsen, L. Lei, S. Gill, S. A. Wek, K. M. Vattem, R. C. Wek, S. R. Kimball, L. S. Jefferson, and D. R. Cavener. 2002. The GCN2 eIF2 α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**:6681–6688.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

World Health Organisation: African trypanosomiasis (sleeping sickness). Fact sheet N° 259 WHO. 2006.

Ref Type: Report

Abraham,RT, 2002, Identification of TOR signaling complexes: more TORC for the cell growth engine: *Cell*, v. 111, p. 9-12.

Andrade,LO, N W Andrews, 2005, The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention: *Nat.Rev.Microbiol.*, v. 3, p. 819-823.

Andrade,MA, P Bork, 1995, HEAT repeats in the Huntington's disease protein: *Nat.Genet.*, v. 11, p. 115-116.

Balana-Fouce,R, R M Reguera, 2007, RNA interference in Trypanosoma brucei: a high-throughput engine for functional genomics in trypanosomatids?: *Trends Parasitol.*, v. 23, p. 348-351.

Bangs,JD, L Uyetake, M J Brickman, A E Balber, J C Boothroyd, 1993, Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in Trypanosoma brucei. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote: *J.Cell Sci.*, v. 105 (Pt 4), p. 1101-1113.

Barquilla,A, J L Crespo, M Navarro, 2008, Rapamycin inhibits trypanosome cell growth by preventing TOR complex 2 formation: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 105, p. 14579-14584.

Barrett,MP, 1999, The fall and rise of sleeping sickness: *Lancet*, v. 353, p. 1113-1114.

Barry,JD, R McCulloch, 2001, Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite: *Adv.Parasitol.*, v. 49, p. 1-70.

Bastin,P, T Sherwin, K Gull, 1998, Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility: *Nature*, v. 391, p. 548.

Baudry,A, Z Z Yang, B A Hemmings, 2006, PKBalpha is required for adipose differentiation of mouse embryonic fibroblasts: *J.Cell Sci.*, v. 119, p. 889-897.

Beck,T, M N Hall, 1999, The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors: *Nature*, v. 402, p. 689-692.

Berset,C, H Trachsel, M Altmann, 1998a, The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, p. 4264-4269.

- Berset,C, H Trachsel, M Altmann, 1998b, The TOR (target of rapamycin) signal transduction pathway regulates the stability of translation initiation factor eIF4G in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, p. 4264-4269.
- Bosotti,R, A Isacchi, E L Sonnhammer, 2000, FAT: a novel domain in PIK-related kinases: *Trends Biochem.Sci.*, v. 25, p. 225-227.
- Brecht,M, M Parsons, 1998, Changes in polysome profiles accompany trypanosome development: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 97, p. 189-198.
- Brown,EJ, M W Albers, T B Shin, K Ichikawa, C T Keith, W S Lane, S L Schreiber, 1994, A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex: *Nature*, v. 369, p. 756-758.
- Brun,R, Schonenberger, 1979, Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication: *Acta Trop.*, v. 36, p. 289-292.
- Burleigh,BA, N W Andrews, 1995, The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells: *Annu.Rev.Microbiol.*, v. 49, p. 175-200.
- Camargo,EP, 1964, Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media: *Rev.Inst.Med.Trop.Sao Paulo*, v. 12, p. 93-100.
- Campbell,DA, S Thomas, N R Sturm, 2003, Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?: *Microbes.Infect.*, v. 5, p. 1231-1240.
- Cardenas,ME, N S Cutler, M C Lorenz, C J Di Como, J Heitman, 1999, The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients: *Genes Dev.*, v. 13, p. 3271-3279.
- Cassola,A, J G De Gaudenzi, A C Frasch, 2007, Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes: *Mol.Microbiol.*, v. 65, p. 655-670.
- Chagas,C, 1909, Nova tripanosomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.g., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem.: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-218.
- Charest,A, K Lane, K McMahon, D E Housman, 2001, Association of a novel PDZ domain-containing peripheral Golgi protein with the Q-SNARE (Q-soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) attachment protein receptor) protein syntaxin 6: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 29456-29465.
- Chen,JJ, 2007, Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2alpha kinase: relevance to anemias: *Blood*, v. 109, p. 2693-2699.
- Cherkasova,VA, A G Hinnebusch, 2003, Translational control by TOR and TAP42 through dephosphorylation of eIF2alpha kinase GCN2: *Genes Dev.*, v. 17, p. 859-872.

Choi,J, J Chen, S L Schreiber, J Clardy, 1996, Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP: *Science*, v. 273, p. 239-242.

Church,GM, P P Slonimski, W Gilbert, 1979, Pleiotropic mutations within two yeast mitochondrial cytochrome genes block mRNA processing: *Cell*, v. 18, p. 1209-1215.

Cigan,AM, J L Bushman, T R Boal, A G Hinnebusch, 1993, A protein complex of translational regulators of GCN4 mRNA is the guanine nucleotide-exchange factor for translation initiation factor 2 in yeast: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 90, p. 5350-5354.

Clayton,CE, A M Estevez, C Hartmann, V P Alibu, M Field, D Horn, 2005, Down-regulating gene expression by RNA interference in *Trypanosoma brucei*: *Methods Mol.Biol.*, v. 309, p. 39-60.

Cole,JL, 2007, Activation of PKR: an open and shut case?: *Trends Biochem.Sci.*, v. 32, p. 57-62.

Contreras,VT, J M Salles, N Thomas, C M Morel, S Goldenberg, 1985, In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 16, p. 315-327.

Crespo,JL, S Diaz-Troya, F J Florencio, 2005, Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: *Plant Physiol*, v. 139, p. 1736-1749.

Crespo,JL, M N Hall, 2002, Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*: *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, v. 66, p. 579-91, table.

Cunha-e-Silva, C Sant'Anna, M G Pereira, I Porto-Carreiro, A L Jeovanio, W de Souza, 2006, Reservosomes: multipurpose organelles?: *Parasitol.Res.*, v. 99, p. 325-327.

Cunha-e-Silva NL, G C Atella, I A Porto-Carreiro, J A Morgado-Diaz, M G Pereira, W de Souza, 2002, Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*: *FEMS Microbiol.Lett.*, v. 214, p. 7-12.

De Craene,JO, O Soetens, B Andre, 2001, The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 43939-43948.

de Souza,W, C Sant'Anna, Cunha-e-Silva NL, 2009, Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa: *Prog.Histochem.Cytochem.*, v. 44, p. 67-124.

De Virgilio,C, R Loewith, 2006, Cell growth control: little eukaryotes make big contributions: *Oncogene*, v. 25, p. 6392-6415.

Dennis,PB, S Fumagalli, G Thomas, 1999b, Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 9, p. 49-54.

Dennis,PB, S Fumagalli, G Thomas, 1999a, Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation: *Curr.Opin.Genet.Dev.*, v. 9, p. 49-54.

Dever,TE, L Feng, R C Wek, A M Cigan, T F Donahue, A G Hinnebusch, 1992, Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast: *Cell*, v. 68, p. 585-596.

Dever,TE, A G Hinnebusch, 2005, GCN2 whets the appetite for amino acids: *Mol.Cell*, v. 18, p. 141-142.

Di Como,CJ, K T Arndt, 1996, Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases: *Genes Dev.*, v. 10, p. 1904-1916.

Diaz-Troya,S, M E Perez-Perez, F J Florencio, J L Crespo, 2008, The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals: *Autophagy.*, v. 4, p. 851-865.

Docampo,R, W de Souza, K Miranda, P Rohloff, S N Moreno, 2005, Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man: *Nat.Rev.Microbiol.*, v. 3, p. 251-261.

Docampo,R, D A Scott, A E Vercesi, S N Moreno, 1995, Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*: *Biochem.J.*, v. 310 (Pt 3), p. 1005-1012.

Dong,J, H Qiu, M Garcia-Barrio, J Anderson, A G Hinnebusch, 2000, Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain: *Mol.Cell*, v. 6, p. 269-279.

Dunlop,EA, A R Tee, 2009, Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms: *Cell Signal.*, v. 21, p. 827-835.

Elias,MC, R Marques-Porto, E Freymuller, S Schenkman, 2001, Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 112, p. 79-90.

Engman,DM, K H Krause, J H Blumin, K S Kim, L V Kirchhoff, J E Donelson, 1989, A novel flagellar Ca²⁺-binding protein in trypanosomes: *J.Biol.Chem.*, v. 264, p. 18627-18631.

Fang,J, P Rohloff, K Miranda, R Docampo, 2007, Ablation of a small transmembrane protein of *Trypanosoma brucei* (TbVTC1) involved in the synthesis of polyphosphate alters acidocalcisome biogenesis and function, and leads to a cytokinesis defect: *Biochem.J.*, v. 407, p. 161-170.

Feng,W, M Zhang, 2009, Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in the postsynaptic density: *Nat.Rev.Neurosci.*, v. 10, p. 87-99.

Feng,Z, H Zhang, A J Levine, S Jin, 2005, The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 102, p. 8204-8209.

Fevre,EM, B V Wissmann, S C Welburn, P Lutumba, 2008, The burden of human african trypanosomiasis: *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, v. 2, p. e333.

Fingar,DC, J Blenis, 2004, Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression: *Oncogene*, v. 23, p. 3151-3171.

Fourney,RM, J Miyakoshi, R S I Day, M C Paterson, 1988, Northern blotting: efficient RNA staining and transfer: *Focus*, v. 10, p. 5-7.

Garcia,MA, E F Meurs, M Esteban, 2007, The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control: *Biochimie*, v. 89, p. 799-811.

Garcia-Salcedo,JA, D Perez-Morga, P Gijon, V Dilbeck, E Pays, D P Nolan, 2004, A differential role for actin during the life cycle of *Trypanosoma brucei*: *EMBO J.*, v. 23, p. 780-789.

Gehrig,S, T Efferth, 2008, Development of drug resistance in *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma brucei gambiense*. Treatment of human African trypanosomiasis with natural products (Review): *Int.J.Mol.Med.*, v. 22, p. 411-419.

Groves,MR, N Hanlon, P Turowski, B A Hemmings, D Barford, 1999, The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs: *Cell*, v. 96, p. 99-110.

Guertin,DA, D M Sabatini, 2007, Defining the role of mTOR in cancer: *Cancer Cell*, v. 12, p. 9-22.

Hammarton,TC, J Clark, F Douglas, M Boshart, J C Mottram, 2003, Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin: *J.Biol.Chem.*, v. 278, p. 22877-22886.

Hara,K, Y Maruki, X Long, K Yoshino, N Oshiro, S Hidayat, C Tokunaga, J Avruch, K Yonezawa, 2002, Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action: *Cell*, v. 110, p. 177-189.

Hara,K, K Yonezawa, Q P Weng, M T Kozlowski, C Belham, J Avruch, 1998, Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism: *J.Biol.Chem.*, v. 273, p. 14484-14494.

Harding,HP, Y Zhang, D Ron, 1999, Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase: *Nature*, v. 397, p. 271-274.

Harding,HP, Y Zhang, H Zeng, I Novoa, P D Lu, M Calfon, N Sadri, C Yun, B Popko, R Paules, D F Stojdl, J C Bell, T Hettmann, J M Leiden, D Ron, 2003,

An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress: *Mol.Cell*, v. 11, p. 619-633.

Hardwick,JS, F G Kuruvilla, J K Tong, A F Shamji, S L Schreiber, 1999, Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 96, p. 14866-14870.

Hay,N, N Sonenberg, 2004, Upstream and downstream of mTOR: *Genes Dev.*, v. 18, p. 1926-1945.

Heitman,J, N R Movva, M N Hall, 1991, Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast: *Science*, v. 253, p. 905-909.

Hershey,JW, 1991, Translational control in mammalian cells: *Annu.Rev.Biochem.*, v. 60, p. 717-755.

Hesse,F, P M Selzer, K Muhlstadt, M Duszenko, 1995, A novel cultivation technique for long-term maintenance of bloodstream form trypanosomes in vitro: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 70, p. 157-166.

Hietakangas,V, S M Cohen, 2009, Regulation of tissue growth through nutrient sensing: *Annu.Rev.Genet.*, v. 43, p. 389-410.

Hinnebusch,AG, 1993, Gene-specific translational control of the yeast GCN4 gene by phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2: *Mol.Microbiol.*, v. 10, p. 215-223.

Hofmann,WA, L Stojiljkovic, B Fuchsova, G M Vargas, E Mavrommatis, V Philimonenko, K Kysela, J A Goodrich, J L Lessard, T J Hope, P Hozak, P de Lanerolle, 2004, Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II: *Nat.Cell Biol.*, v. 6, p. 1094-1101.

Holetz,FB, A Correa, A R Avila, C V Nakamura, M A Krieger, S Goldenberg, 2007, Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*: *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, v. 356, p. 1062-1067.

Hong,F, M D Larrea, C Doughty, D J Kwiatkowski, R Squillace, J M Slingerland, 2008, mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation: *Mol.Cell*, v. 30, p. 701-711.

Honma,Y, A Kitamura, R Shioda, H Maruyama, K Ozaki, Y Oda, T Mini, P Jenou, Y Maki, K Yonezawa, E Hurt, M Ueno, M Uritani, M N Hall, T Ushimaru, 2006, TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients: *EMBO J.*, v. 25, p. 3832-3842.

Ikenoue,T, K Inoki, Q Yang, X Zhou, K L Guan, 2008, Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling: *EMBO J.*, v. 27, p. 1919-1931.

Inoki,K, M N Corradetti, K L Guan, 2005a, Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease: *Nat.Genet.*, v. 37, p. 19-24.

Inoki,K, H Ouyang, Y Li, K L Guan, 2005b, Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control: *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, v. 69, p. 79-100.

Inoki,K, T Zhu, K L Guan, 2003, TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival: *Cell*, v. 115, p. 577-590.

Jacinto,E, V Facchinetti, D Liu, N Soto, S Wei, S Y Jung, Q Huang, J Qin, B Su, 2006, SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity: *Cell*, v. 127, p. 125-137.

Jacinto,E, B Guo, K T Arndt, T Schmelzle, M N Hall, 2001, TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway: *Mol.Cell*, v. 8, p. 1017-1026.

Jacinto,E, M N Hall, 2003b, Tor signalling in bugs, brain and brawn: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 4, p. 117-126.

Jacinto,E, M N Hall, 2003a, Tor signalling in bugs, brain and brawn: *Nat.Rev.Mol Cell Biol.*, v. 4, p. 117-126.

Jacinto,E, R Loewith, A Schmidt, S Lin, M A Ruegg, A Hall, M N Hall, 2004, Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive: *Nat.Cell Biol.*, v. 6, p. 1122-1128.

Jackson,DG, H J Windle, H P Voorheis, 1993, The identification, purification, and characterization of two invariant surface glycoproteins located beneath the surface coat barrier of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: *J.Biol.Chem.*, v. 268, p. 8085-8095.

Jackson,RJ, C U Hellen, T V Pestova, 2010, The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 11, p. 113-127.

Jorgensen,P, M Tyers, 2004, How cells coordinate growth and division: *Curr.Biol.*, v. 14, p. R1014-R1027.

Jung,CH, S H Ro, J Cao, N M Otto, D H Kim, 2010, mTOR regulation of autophagy: *FEBS Lett.*

Kamada,Y, T Funakoshi, T Shintani, K Nagano, M Ohsumi, Y Ohsumi, 2000, Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex: *J.Cell Biol.*, v. 150, p. 1507-1513.

Kay,JE, L Kromwel, S E Doe, M Denyer, 1991, Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin: *Immunology*, v. 72, p. 544-549.

Keith,CT, S L Schreiber, 1995, PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints: *Science*, v. 270, p. 50-51.

Kelly,JM, H M Ward, M A Miles, G Kendall, 1992b, A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*: *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 3963-3969.

- Kelly, JM, H M Ward, M A Miles, G Kendall, 1992a, A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*: *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 3963-3969.
- Kim, DH, D D Sarbassov, S M Ali, J E King, R R Latek, H Erdjument-Bromage, P Tempst, D M Sabatini, 2002, mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery: *Cell*, v. 110, p. 163-175.
- Kim, JE, J Chen, 2004, regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis: *Diabetes*, v. 53, p. 2748-2756.
- Kocic, I, Y Hirano, M Hiraoka, 2001, Ionic basis for membrane potential changes induced by hypoosmotic stress in guinea-pig ventricular myocytes: *Cardiovasc. Res.*, v. 51, p. 59-70.
- Kornberg, A, N N Rao, D Ault-Riche, 1999, Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions: *Annu. Rev. Biochem.*, v. 68, p. 89-125.
- Kunz, J, M N Hall, 1993, Cyclosporin A, FK506 and rapamycin: more than just immunosuppression: *Trends Biochem. Sci.*, v. 18, p. 334-338.
- Lee, SB, S Kim, J Lee, J Park, G Lee, Y Kim, J M Kim, J Chung, 2007, ATG1, an autophagy regulator, inhibits cell growth by negatively regulating S6 kinase: *EMBO Rep.*, v. 8, p. 360-365.
- Lemercier, G, S Dutoya, S Luo, F A Ruiz, C O Rodrigues, T Baltz, R Docampo, N Bakalara, 2002, A vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*: *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 37369-37376.
- Lemercier, G, B Espiau, F A Ruiz, M Vieira, S Luo, T Baltz, R Docampo, N Bakalara, 2004, A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice: *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 3420-3425.
- Li, Y, M N Corradetti, K Inoki, K L Guan, 2004, TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway: *Trends Biochem. Sci.*, v. 29, p. 32-38.
- Loewith, R, E Jacinto, S Wullschleger, A Lorberg, J L Crespo, D Bonenfant, W Oppliger, P Jenoe, M N Hall, 2002, Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control: *Mol. Cell*, v. 10, p. 457-468.
- Lu, J, E B O'Hara, B A Trieselmann, P R Romano, T E Dever, 1999, The interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase PKR will phosphorylate serine, threonine, or tyrosine at residue 51 in eukaryotic initiation factor 2 α : *J. Biol. Chem.*, v. 274, p. 32198-32203.

Lu,L, A P Han, J J Chen, 2001, Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses: *Mol.Cell Biol.*, v. 21, p. 7971-7980.

Lum,JJ, R J DeBerardinis, C B Thompson, 2005, Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 6, p. 439-448.

Mammucari,C, G Milan, V Romanello, E Masiero, R Rudolf, P Del Piccolo, S J Burden, R Di Lisi, C Sandri, J Zhao, A L Goldberg, S Schiaffino, M Sandri, 2007, FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo: *Cell Metab*, v. 6, p. 458-471.

Manning,BD, 2004, Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis: *J.Cell Biol.*, v. 167, p. 399-403.

Marques Porto,R, R Amino, M C Elias, M Faria, S Schenkman, 2002, Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 119, p. 265-271.

Martin,DE, M N Hall, 2005, The expanding TOR signaling network: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 17, p. 158-166.

Matthews,KR, 2005, The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*: *J.Cell Sci.*, v. 118, p. 283-290.

Matthews,KR, J R Ellis, A Paterou, 2004, Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes: *Trends Parasitol.*, v. 20, p. 40-47.

McCulloch,R, 2004, Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress: *Trends Parasitol.*, v. 20, p. 117-121.

McDowell,MA, D M Ransom, J D Bangs, 1998, Glycosylphosphatidylinositol-dependent secretory transport in *Trypanosoma brucei*: *Biochem.J.*, v. 335 (Pt 3), p. 681-689.

Menand,B, T Desnos, L Nussaume, F Berger, D Bouchez, C Meyer, C Robaglia, 2002, Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 99, p. 6422-6427.

Merrick,WC, 1992, Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis: *Microbiol.Rev.*, v. 56, p. 291-315.

Miranda,K, R Docampo, O Grillo, W de Souza, 2004, Acidocalcisomes of trypanosomatids have species-specific elemental composition: *Protist.*, v. 155, p. 395-405.

Mitchison,JM, 2003, Growth during the cell cycle: *Int.Rev.Cytol.*, v. 226, p. 165-258.

Mohrle,JJ, Y Zhao, B Wernli, R M Franklin, B Kappes, 1997, Molecular cloning, characterization and localization of PfPK4, an eIF-2alpha kinase-related

enzyme from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: *Biochem.J.*, v. 328 (Pt 2), p. 677-687.

Monnerat,S, C Clucas, E Brown, J C Mottram, T C Hammarton, 2009, Searching for novel cell cycle regulators in *Trypanosoma brucei* with an RNA interference screen: *BMC.Res.Notes*, v. 2, p. 46.

Moraes,MC, T C Jesus, N N Hashimoto, M Dey, K J Schwartz, V S Alves, C C Avila, J D Bangs, T E Dever, S Schenkman, B A Castilho, 2007, Novel membrane-bound eIF2alpha kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*: *Eukaryot.Cell*, v. 6, p. 1979-1991.

Natarajan,K, M R Meyer, B M Jackson, D Slade, C Roberts, A G Hinnebusch, M J Marton, 2001, Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast: *Mol.Cell Biol.*, v. 21, p. 4347-4368.

Ngo,H, C Tschudi, K Gull, E Ullu, 1998, Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 95, p. 14687-14692.

Oberholzer,M, S Morand, S Kunz, T Seebeck, 2006, A vector series for rapid PCR-mediated C-terminal in situ tagging of *Trypanosoma brucei* genes: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 145, p. 117-120.

Parsons,M, 2004, Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose: *Mol.Microbiol.*, v. 53, p. 717-724.

Pays,E, L Vanhamme, D Perez-Morga, 2004, Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries: *Curr.Opin.Microbiol.*, v. 7, p. 369-374.

Pearce,LR, X Huang, J Boudeau, R Pawlowski, S Wullschleger, M Deak, A F Ibrahim, R Gourlay, M A Magnuson, D R Alessi, 2007, Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2: *Biochem.J.*, v. 405, p. 513-522.

Peng,T, T R Golub, D M Sabatini, 2002, The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation: *Mol.Cell Biol.*, v. 22, p. 5575-5584.

Peng,XD, P Z Xu, M L Chen, A Hahn-Windgassen, J Skeen, J Jacobs, D Sundararajan, W S Chen, S E Crawford, K G Coleman, N Hay, 2003, Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2: *Genes Dev.*, v. 17, p. 1352-1365.

Petersen,J, 2009, TOR signalling regulates mitotic commitment through stress-activated MAPK and Polo kinase in response to nutrient stress: *Biochem.Soc.Trans.*, v. 37, p. 273-277.

- Peterson,TR, M Laplante, C C Thoreen, Y Sancak, S A Kang, W M Kuehl, N S Gray, D M Sabatini, 2009, DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival: *Cell*, v. 137, p. 873-886.
- Porto-Carreiro,I, M Attias, K Miranda, W de Souza, Cunha-e-Silva, 2000, Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes: *Eur.J.Cell Biol.*, v. 79, p. 858-869.
- Powers,T, P Walter, 1999, Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol.Biol.Cell*, v. 10, p. 987-1000.
- Prata,A, 2001, Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease: *Lancet Infect.Dis.*, v. 1, p. 92-100.
- Ramirez,MI, L M Yamauchi, F L de, Jr., H Uemura, S Schenkman, 2000, The use of the green fluorescent protein to monitor and improve transfection in *Trypanosoma cruzi*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 111, p. 235-240.
- Raught,B, A C Gingras, N Sonenberg, 2001, The target of rapamycin (TOR) proteins: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 98, p. 7037-7044.
- Reinke,A, S Anderson, J M McCaffery, J Yates, III, S Aronova, S Chu, S Fairclough, C Iverson, K P Wedaman, T Powers, 2004, TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*: *J.Biol.Chem.*, v. 279, p. 14752-14762.
- Roditi,I, M Liniger, 2002, Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites: *Trends Microbiol.*, v. 10, p. 128-134.
- Rohde,J, J Heitman, M E Cardenas, 2001, The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 9583-9586.
- Rohloff,P, C O Rodrigues, R Docampo, 2003, Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 126, p. 219-230.
- Ron,D, 2002, Translational control in the endoplasmic reticulum stress response: *J.Clin.Invest*, v. 110, p. 1383-1388.
- Rosner,M, C Fuchs, N Siegel, A Valli, M Hengstschlager, 2009, Functional interaction of mammalian target of rapamycin complexes in regulating mammalian cell size and cell cycle: *Hum.Mol.Genet.*, v. 18, p. 3298-3310.
- Ruiz,FA, C O Rodrigues, R Docampo, 2001, Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 26114-26121.

Sambrook,J, E F Fritsch, T Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-Sancho,F, N E Campillo, J A Paez, 2009, *Chagas Disease: Progress and New Perspectives: Curr.Med.Chem.*.

Sant'Anna,C, E S Nakayasu, M G Pereira, D Lourenco, W de Souza, I C Almeida, Cunha-e-Silva NL, 2009, *Subcellular proteomics of Trypanosoma cruzi reservosomes: Proteomics.*, v. 9, p. 1782-1794.

Sant'Anna,C, M G Pereira, L Lemgruber, W de Souza, Cunha e Silva NL, 2008, *New insights into the morphology of Trypanosoma cruzi reservosome: Microsc.Res.Tech.*, v. 71, p. 599-605.

Sarbassov,DD, S M Ali, D H Kim, D A Guertin, R R Latek, H Erdjument-Bromage, P Tempst, D M Sabatini, 2004, *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton: Curr.Biol.*, v. 14, p. 1296-1302.

Sarbassov,DD, S M Ali, S Sengupta, J H Sheen, P P Hsu, A F Bagley, A L Markhard, D M Sabatini, 2006, *Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB: Mol.Cell*, v. 22, p. 159-168.

Schmelzle,T, M N Hall, 2000, *TOR, a central controller of cell growth: Cell*, v. 103, p. 253-262.

Schmidt,A, T Beck, A Koller, J Kunz, M N Hall, 1998, *The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease: EMBO J.*, v. 17, p. 6924-6931.

Schmidt,A, J Kunz, M N Hall, 1996, *TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 93, p. 13780-13785.

Schoneck,R, O Billaut-Mulot, P Numrich, M A Ouaiissi, R L Krauth-Siegel, 1997, *Cloning, sequencing and functional expression of dihydrolipoamide dehydrogenase from the human pathogen Trypanosoma cruzi: Eur.J.Biochem.*, v. 243, p. 739-747.

Scott,DA, W de Souza, M Benchimol, L Zhong, H G Lu, S N Moreno, R Docampo, 1998, *Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi: J.Biol.Chem.*, v. 273, p. 22151-22158.

Scott,DA, R Docampo, 2000, *Characterization of isolated acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi: J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 24215-24221.

Scott,DA, R Docampo, J A Dvorak, S Shi, R D Leapman, 1997, *In situ compositional analysis of acidocalcisomes in Trypanosoma cruzi: J.Biol.Chem.*, v. 272, p. 28020-28029.

Scott,RC, G Juhasz, T P Neufeld, 2007, *Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death: Curr.Biol.*, v. 17, p. 1-11.

Scott,RC, O Schuldiner, T P Neufeld, 2004, Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body: *Dev.Cell*, v. 7, p. 167-178.

Sherr,CJ, J M Roberts, 1999, CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression: *Genes Dev.*, v. 13, p. 1501-1512.

Shi,H, A Djikeng, T Mark, E Wirtz, C Tschudi, E Ullu, 2000, Genetic interference in *Trypanosoma brucei* by heritable and inducible double-stranded RNA: *RNA.*, v. 6, p. 1069-1076.

Soares,MB, R R dos Santos, 2009, Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease: *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, v. 104 Suppl 1, p. 325-332.

Sood,R, A C Porter, K Ma, L A Quilliam, R C Wek, 2000, Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress: *Biochem.J.*, v. 346 Pt 2, p. 281-293.

Sternberg,JM, 1998, Immunobiology of African trypanosomiasis: *Chem.Immunol.*, v. 70, p. 186-199.

Stiles,JK, P I Hicock, P H Shah, J C Meade, 1999, Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*: *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, v. 93, p. 781-807.

Sullivan,WJ, Jr., J Narasimhan, M M Bhatti, R C Wek, 2004, Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control: *Biochem.J.*, v. 380, p. 523-531.

Teixeira,SM, 1998, Control of gene expression in Trypanosomatidae: *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v. 31, p. 1503-1516.

Thomas,G, M N Hall, 1997, TOR signalling and control of cell growth: *Curr.Opin.Cell Biol.*, v. 9, p. 782-787.

Tsang,CK, P G Bertram, W Ai, R Drenan, X F Zheng, 2003, Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR: *EMBO J.*, v. 22, p. 6045-6056.

Ullu,E, K R Matthews, C Tschudi, 1993, Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: Rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts: *Mol.Cell.Biol.*, v. 13, p. 720-725.

van Zyl,W, W Huang, A A Sneddon, M Stark, S Camier, M Werner, C Marck, A Sentenac, J R Broach, 1992, Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*: *Mol.Cell Biol.*, v. 12, p. 4946-4959.

Vandenbol,M, J C Jauniaux, S Vissers, M Grenson, 1987, Isolation of the NPR1 gene responsible for the reactivation of ammonia-sensitive amino-acid

permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA analysis and gene dosage effects: *Eur.J.Biochem.*, v. 164, p. 607-612.

Vander, HE, S I Lee, S Bandhakavi, T J Griffin, D H Kim, 2007, Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40: *Nat.Cell Biol.*, v. 9, p. 316-323.

Vanhamme, L, E Pays, 2004, The trypanosome lytic factor of human serum and the molecular basis of sleeping sickness: *Int.J.Parasitol.*, v. 34, p. 887-898.

Vattem, KM, R C Wek, 2004, Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 101, p. 11269-11274.

Vercesi, AE, S N Moreno, R Docampo, 1994, Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*: *Biochem.J.*, v. 304 (Pt 1), p. 227-233.

Vickerman, K, 1985, Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes: *Br.Med.Bull.*, v. 41, p. 105-114.

Vonlaufen, N, S M Kanzok, R C Wek, W J Sullivan, Jr., 2008, Stress response pathways in protozoan parasites: *Cell Microbiol.*, v. 10, p. 2387-2399.

Wang, L, C D Fraley, J Faridi, A Kornberg, R A Roth, 2003, Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 100, p. 11249-11254.

Wang, X, L E Campbell, C M Miller, C G Proud, 1998, Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors: *Biochem.J.*, v. 334 (Pt 1), p. 261-267.

Wang, X, B D Fonseca, H Tang, R Liu, A Elia, M J Clemens, U A Bommer, C G Proud, 2008, Re-evaluating the roles of proposed modulators of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling: *J.Biol.Chem.*, v. 283, p. 30482-30492.

Wang, X, C G Proud, 2009, Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator: *Trends Cell Biol.*, v. 19, p. 260-267.

Wang, Z, J C Morris, M E Drew, P T Englund, 2000, Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 40174-40179.

Wek, RC, D R Cavener, 2007, Translational control and the unfolded protein response: *Antioxid.Redox.Signal.*, v. 9, p. 2357-2371.

Wek, RC, H Y Jiang, T G Anthony, 2006, Coping with stress: eIF2 kinases and translational control: *Biochem.Soc.Trans.*, v. 34, p. 7-11.

Wek, SA, S Zhu, R C Wek, 1995, The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is

required for activation in response to starvation for different amino acids: *Mol.Cell Biol.*, v. 15, p. 4497-4506.

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

Wirtz,E, C Clayton, 1995, Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor: *Science*, v. 268, p. 1179-1183.

Wirtz,E, S Leal, C Ochatt, G A Cross, 1999, A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*: *Mol.Biochem.Parasitol.*, v. 99, p. 89-101.

Woo,SY, D H Kim, C B Jun, Y M Kim, E V Haar, S I Lee, J W Hegg, S Bandhakavi, T J Griffin, D H Kim, 2007, PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling: *J.Biol.Chem.*, v. 282, p. 25604-25612.

Wullschleger,S, R Loewith, M N Hall, 2006a, TOR signaling in growth and metabolism: *Cell*, v. 124, p. 471-484.

Wullschleger,S, R Loewith, M N Hall, 2006b, TOR signaling in growth and metabolism: *Cell*, v. 124, p. 471-484.

Yang,Q, K L Guan, 2007, Expanding mTOR signaling: *Cell Res.*, v. 17, p. 666-681.

Young,DA, C L Nickerson-Nutter, 2005, mTOR--beyond transplantation: *Curr.Opin.Pharmacol.*, v. 5, p. 418-423.

Yun,SJ, E K Kim, D F Tucker, C D Kim, M J Birnbaum, S S Bae, 2008, Isoform-specific regulation of adipocyte differentiation by Akt/protein kinase Balpha: *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, v. 371, p. 138-143.

Zaragoza,D, A Ghavidel, J Heitman, M C Schultz, 1998, Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway: *Mol.Cell Biol.*, v. 18, p. 4463-4470.

Zeledon,R, R Bolanos, M Rojas, 1984, Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector: *Acta Trop.*, v. 41, p. 39-43.

Zhan,K, K M Vattam, B N Bauer, T E Dever, J J Chen, R C Wek, 2002, Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 by heme-regulated inhibitor kinase-related protein kinases in *Schizosaccharomyces pombe* is important for resistance to environmental stresses: *Mol.Cell Biol.*, v. 22, p. 7134-7146.

Zhang,H, J P Stallock, J C Ng, C Reinhard, T P Neufeld, 2000, Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR: *Genes Dev.*, v. 14, p. 2712-2724.

Zhang,HH, J Huang, K Duvel, B Boback, S Wu, R M Squillace, C L Wu, B D Manning, 2009, Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway: PLoS.One., v. 4, p. e6189.

Zhang, Y, X Gao, L J Saucedo, B Ru, B A Edgar, D Pan, 2003, Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins: Nat.Cell Biol., v. 5, p. 578-581.

Zhao,J, J J Brault, A Schild, P Cao, M Sandri, S Schiaffino, S H Lecker, A L Goldberg, 2007, FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells: Cell Metab, v. 6, p. 472-483.

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](#)