

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

JANAÍNA DE FREITAS NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO DE DOIS HOMÓLOGOS DA PROTEÍNA
DE LIGAÇÃO AO CAP, EIF4E5 E 6, DE *Trypanosoma brucei*
e *Leishmania major***

RECIFE - PE

2012

JANAÍNA DE FREITAS NASCIMENTO

**CARACTERIZAÇÃO DE DOIS HOMÓLOGOS DA PROTEÍNA
DE LIGAÇÃO AO CAP, EIF4E5 E 6, DE *Trypanosoma brucei*
e *Leishmania major***

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

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientador: Dr. Christian Robson de Sousa Reis

Recife, PE

2012

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

N244c Nascimento, Janaína de Freitas

Caracterização de dois homólogos da proteína de ligação ao CAP, EIF4E5 e 6, de *Trypanossoma brucei* e *Leishmania major* / Janaína de Freitas Nascimento. – Recife: O Autor, 2012.

105 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Christian Robson de Sousa Reis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Genética, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

1. Tripanossomíase 2. Tripanossomíase africana 3. Leishmaniose 4. Síntese proteica I Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orientador) II. Reis, Christian Robson de Sousa (coorientador) III. Título.

611.936

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-156



Serviço Público Federal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária
50.732-970, Recife – PE.
Fone/Fax: (81) 21268522

Ata da 184ª sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, realizada no dia 14 de maio de 2012 pela aluna Janaína de Freitas Nascimento.

Às catorze horas do dia 14 de maio de 2012, no Anfiteatro Aloísio Bezerra Coutinho no Departamento de Genética da UFPE, foi efetuada em ato público a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada “**Caracterização de dois homólogos da proteína de ligação ao cap, EIF4E5 e 6, de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major***”, desenvolvida **pela discente Janaína de Freitas Nascimento**, sob a orientação do Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto. Inicialmente o **Dr. Valdir de Queiroz Balbino**, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, abriu a sessão e informou que a Banca Examinadora seria composta pelos seguintes membros: **Dra. Tereza Cristina Leal Balbino** (Departamento de Microbiologia da Fiocruz); **Dr. Tercilio Calsa Junior** (Departamento de Genética); e **Dra. Regina Célia Bressan Queiroz De Figueiredo** (Pesquisadora adjunta da Fiocruz). Em seguida, o Coordenador **Valdir de Queiroz Balbino** entregou a presidência dos trabalhos para o orientador **Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto**, que convidou o candidato a apresentar seu trabalho em cerca de 40 minutos. Após a apresentação, a presidente da banca convidou os membros da Banca Examinadora para comporem a mesa e iniciou a sessão de arguição na seguinte ordem: **Dra. Tereza Cristina Leal Balbino** (membro interno); **Dr. Tercilio Calsa Junior** (membro interno); e **Dra. Regina Célia Bressan Queiroz De Figueiredo** (membro externo). Finalizadas as arguições, todas em forma de diálogo e tendo, a aluna, respondido a todas as questões formuladas, a Banca Examinadora deliberou em sessão secreta, tendo atribuído ao mestrando a menção final “**Aprovado**” por unanimidade. O resultado foi apresentado pelo presidente dos trabalhos **Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto** que anunciou que a aluna **Janaína de Freitas Nascimento** faz jus doravante ao título de **MESTRE EM GENÉTICA** pela Universidade Federal de Pernambuco. A sessão foi encerrada às 17h30min e, para constar, eu, **Valdir de Queiroz Balbino**, lavrei e assinei a presente ata, assinada também pelo Orientador e pelos membros da Banca Examinadora. **Recife, 14 de maio de 2012.**

Banca Examinadora:

Dra. Tereza Cristina Leal Albino

Dr. Tercilio Calsa Junior

Dra. Regina Célia Bressan Queiroz De Figueiredo

Orientador:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coordenador do Programa:

Dr. Valdir de Queiroz Albino

*À minha mãe e à minha irmã, por nunca terem
desistido.*

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Osvaldo pela oportunidade, confiança e pela orientação.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM – FioCruz pela estrutura disponibilizada.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus, porque sem Ele, nada.

À minha mãe pelo exemplo de fé e perseverança.

À minha irmã pela sua companhia constante.

Aos meus tios Francisco e Liliane, por terem me acolhido como filha.

Ao meu pai e minha família, pelo apoio.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPE pelos ensinamentos.

Aos co-orientadores de bancada e amigos Dr. Éden Ribeiro e Dra. Danielle Moura que, mesmo distantes, ofereceram todo o suporte e atenção nas maiores dificuldades.

Aos amigos do CPqAM: Ana Paula, Artur, Bruna, Camila, Christian, Diego, João, Larissa, Lígia, Ludmila, Mariana Marques, Mariana Donato, Marília, Rômulo e Tamara por tornarem a convivência tão proveitosa, com destaque para Amaranta, Danielle, Diogo, Kelly e Vladimir por fazerem das noites de sexta-feira mais divertidas, e ainda, de forma especial a Rodrigo pelo companheirismo, amizade e paciência devotados.

Aos amigos de uma vida inteira: Bruno Farias, Bruno Reis, Débora, Edvaldo, Igor, Jussýêgles, Laís, Liz, Monya, Raiana, Renata e Tamiris por estarem ao meu lado em todos os momentos, e especialmente à Manuela pela sua amizade incondicional.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram dessa caminhada e me ajudaram a chegar até aqui.

Obrigada!

*O princípio da sabedoria é adquirir a sabedoria.
Com tudo o que possuis, adquiere o
entendimento.*

Provérbios 4:7

RESUMO

Os tripanossomatídeos são protozoários unicelulares que apresentam uma biologia molecular bastante divergente dos demais eucariotos e são responsáveis por doenças negligenciadas que afetam milhares de pessoas. A carência de drogas mais eficazes contra estes patógenos justifica a busca da compreensão dos seus processos celulares. Um desses processos é a síntese proteica que, nos eucariotos, é dividida em quatro etapas, sendo a primeira, a iniciação, a mais complexa. A iniciação da tradução é dependente dos fatores de iniciação eucarióticos (eIFs), dentre os quais destaca-se o complexo eIF4F, cuja subunidade eIF4E é responsável pelo reconhecimento do *cap* presente na extremidade 5' do mRNAs. Em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* foram identificados seis homólogos conservados de eIF4E, sendo os EIF4E5 e 6 identificados mais tardiamente. O presente trabalho buscou contribuir com a caracterização funcional destas proteínas, iniciando-se com uma análise comparativa das suas sequências onde foram identificados motivos conservados presentes em outros homólogos de eIF4E. Em *T. brucei*, experimentos de localização subcelular mostraram que ambas as proteínas são citoplasmáticas, porém com alguma localização nuclear. Utilizando RNAi na fase procíclica do parasita, somente *TbEIF4E5* mostrou-se essencial a viabilidade celular enquanto que as células depletadas do *TbEIF4E6* apresentaram alterações morfológicas. Através da purificação de fosfoproteínas constatou-se que ambos os fatores são fosforilados e a predição *in silico* dos possíveis sítios revelou a presença de múltiplos resíduos passíveis de fosforilação. Já em *L. major* seus respectivos homólogos foram expressos em bactéria e utilizados para a produção de soros policlonais. Esses soros foram capazes de detectar a expressão do *LmEIF4E5* em extratos de formas promastigotas de *Leishmania* enquanto para *LmEIF4E6* não foi observada expressão compatível com o peso molecular esperado. Os resultados e as ferramentas moleculares produzidas contribuem tanto para a compreensão da função desempenhada por estas proteínas, como para o conhecimento do processo de tradução nos tripanossomatídeos.

Palavras-chave: eIF4F, eIF4E, tradução, tripanossomatídeos

ABSTRACT

Trypanosomatids are unicellular protozoans characterized by a divergent molecular biology, when compared to other eukaryotes. They are responsible for neglected diseases which affect thousands of people and the lack of more effective drugs against these diseases justifies a better understanding of their basic processes. One of these is protein synthesis (translation), formally divided into four stages, the first of which, initiation, is the most complex. Translation initiation is entirely dependent on the “eukaryotic Initiation Factors” (eIFs), such as the complex eIF4F. eIF4E is an eIF4F subunit which is responsible for the recognition of the *cap* on the 5' end of mRNAs. Six conserved eIF4E homologues were found in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*, with EIF4E5 and 6 being the latest ones identified. This work aimed to contribute with the functional characterization of these proteins, starting with a comparative analysis of their sequences where conserved motifs also found in other eIF4E homologues were identified. In *T. brucei*, subcellular localization experiments indicated that both proteins are predominantly cytoplasmic, but with minor nuclear localization. Using RNAi in the procyclic stage, only *Tb*EIF4E5 proved to be essential for cell viability, while cells depleted of *Tb*EIF4E6 showed morphological abnormalities. Through phosphoprotein affinity purification, both proteins were observed to be phosphorylated, and the *in silico* prediction of possible phosphorylation sites revealed the presence of multiple putative sites. Regarding the *L. major* homologues, the corresponding proteins were expressed in bacteria and used to produce polyclonal antisera which were able to detect the expression of *Lm*EIF4E5 in *Leishmania* promastigotes. However the expression observed for *Lm*EIF4E6 is not consistent with its expected molecular weight. The results and molecular tools produced in this work contribute not only to the understanding of the functional role of these proteins, but also to the knowledge of the translation process in trypanosomatids.

Key words: eIF4E, eIF4F, translation, trypanosomatids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Família Trypanosomatidae	22
Figura 2. Ciclo de vida dos Trytryp.	24
Figura 3. O parasita e seu vetor	26
Figura 4. Distribuição da tripanossomíase humana Africana mapeada no <i>Atlas of human African trypanosomiasis</i>	28
Figura 5. Distribuição da leishmaniose cutânea e visceral	29
Figura 6. Eletromicrografias de <i>Leishmania major</i>	30
Figura 7. Mapa do genoma de <i>Trypanosoma brucei</i>	32
Figura 8. Esquema da transcrição e <i>trans splicing</i>	34
Figura 9. Iniciação da tradução em eucariotos superiores	38
Figura 10. Complexo eIF4F e parceiros	38
Figura 11. eIF4G: sítios de ligação e estrutura	40
Figura 12. Densidade eletrônica e superfície eletrostática do m ⁷ GTP ligado ao eIF4E de murinos	42
Figura 13. Estruturas de dois complexos eIF4E/7-metil-GDP/eIF4G ou 4E-BP em murinos	43
Figura 14. Representação dos possíveis complexos homólogos ao eIF4F nos tripanossomatídeos	45
Figura 15. Esquema do protocolo de purificação de fosfoproteínas	55
Figura 16. Alinhamento das sequências dos homólogos ao EIF4E em <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Leishmania major</i>	61
Figura 17. Esquema dos cassetes de transfecção em <i>T. brucei</i> utilizados	63
Figura 18. Alinhamento para confirmação de mutagêneses sítio-dirigidas na construção <i>TbEIF4E5</i> -pGEM-T-easy	63
Figura 19. Subclonagem do gene <i>TbEIF4E5</i> nos vetores de interesse	64
Figura 20. Subclonagem do gene <i>TbEIF4E6</i> nos vetores de interesse	64
Figura 21. Western blot para reconhecimento do padrão de expressão das proteínas <i>TbEIF4E5</i> e 6 em extratos de <i>T. brucei</i>	65
Figura 22. Western blot para reconhecimento da superexpressão das proteínas <i>TbEIF4E5</i> e 6 fusionadas ao tag HA	66

Figura 23. <i>Western blot</i> para reconhecimento da superexpressão da proteína TbEIF4E6 fusionada a EYFP	67
Figura 24. Localização da proteína TbEIF4E5-EYFP	68
Figura 25. Localização da proteína TbEIF4E6-EYFP	68
Figura 26. Localização da proteína TbEIF4E5	70
Figura 27. Localização da proteína TbEIF4E6	71
Figura 28. <i>Western blot</i> para reconhecimento das proteínas TbEIF4E5 e 6 no ensaio de fracionamento celular	72
Figura 29. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do gene TbEIF4E5 em meio SM	73
Figura 30. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do gene TbEIF4E5 em meio SDM-79	73
Figura 31. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do gene TbEIF4E6 em meio SM	74
Figura 32. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do gene TbEIF4E6 em meio SDM-79	74
Figura 33. <i>Western blot</i> para reconhecimento das proteínas TbEIF4E5 e 6 no ensaio de purificação de fosfoproteínas	75
Figura 34. Representação gráfica da localização dos sítios de fosforilação preditos para os fatores TbEIF4E5 e 6	77
Figura 35. Representação gráfica da localização dos sítios de fosforilação preditos para os fatores LmEIF4E5 e 6	78
Figura 36. Clonagem dos genes LmEIF4E5 e 6 nos vetores de interesse	79
Figura 37. Expressão das proteínas recombinantes LmEIF4E5-HIS e LmEIF4E6-HIS	80
Figura 38. Expressão das proteínas recombinantes LmEIF4E5-GST e LmEIF4E6-GST	81
Figura 39. <i>Western blot</i> para teste de especificidade dos anticorpos contra as proteínas LmEIF4E5 e 6	82
Figura 40. <i>Western blot</i> para teste de reconhecimento dos anticorpos contra as proteínas LmEIF4E5 e 6 nos extratos proteicos em diferentes espécies de tripanossomatídeos	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doenças causadas pelos TriTryps	25
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados para mutagêneses sítio-dirigidas do gene <i>TbEIF4E5</i>	50
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes <i>LmEIF4E5</i> e 6 com os respectivos sítios de restrição	52
Tabela 4. Homólogos ao EIF4E em <i>Trypanosoma brucei</i>	60
Tabela 5. Homólogos ao EIF4E em <i>Leishmania major</i>	60
Tabela 6. Sítios de fosforilação preditos para <i>TbEIF4E5</i>	76
Tabela 7. Sítios de fosforilação preditos para <i>TbEIF4E6</i>	76
Tabela 8. Sítios de fosforilação preditos para <i>LmEIF4E5</i>	77
Tabela 9. Sítios de fosforilação preditos para <i>LmEIF4E6</i>	78

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 4E-BP – Proteína de ligação ao 4E (*4E binding protein*)
- 4E-T – Transportador do 4E (*4E transporter*)
- aa – Aminoácido
- ATP – Adenosina trifosfato
- BLAST – Ferramenta de comparação de sequências por alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
- BSA - Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)
- BSF – Forma sanguínea de *Trypanosoma brucei* (*Bloodstream form*)
- CDS – Sequência codificante (*Coding sequence*)
- CPE – Elemento citoplasmático de poliadenilação (*Cytoplasmatic polyadenylation element*)
- DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)
- dsRNA – RNA dupla-fita (*Double strand RNA*)
- DSP – Fosfatase de dupla especificidade (*Dual specificity phosphatase*)
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (*Desoxiribonucleic acid*)
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- eIF – Fator de iniciação eucariótico (*Eukaryotic initiation factor*)
- ePK – Proteína quinase eucaritótica (*Eukaryotic protein kinase*)
- EYFP – Proteína fluorescente amarela aumentada (*Enhanced yellow fluorescent protein*)
- GDP – Guanosina difosfato
- GTP – Guanosina trifosfato
- HA – Peptídeo YPYDVPDYA, correspondente aos aminoácidos 98-106 da hemaglutinina do vírus Influenza A
- HAT – Tripanossomíase humana africana (*Human African Trypanosomiasis*)
- IPTG – Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo
- kDa – quilodálton (*kilodalton*)
- kDNA – DNA cinetoplastidial (*kinetoplastid DNA*)
- m⁷GTP – 7-metilguanosina trifosfato (*7-methylguanosine Triphosphate*)
- L2X – Tampão Laemmli 2x (*Laemmli buffer 2x*)
- LB – (Meio) Luria-Bertani

LC – Leishmaniose cutânea (*Cutaneous leishmaniasis*)

LCD – Leishmaniose cutânea difusa (*Diffuse cutaneous leishmaniasis*)

LCM – Leishmaniose mucocutânea (*Mucocutaneous leishmaniasis*)

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LV – Leishmaniose visceral (*Visceral leishmaniasis*)

LMW-PTP – Tirosina fosfatase de baixo peso molecular – (*low molecular weight tyrosine phosphatase*)

MBC – cromossomos megabase (*megabase-size chromosomes*)

Met - Metionina

Mnk1 - proteína quinase MAP de integração de sinal (*MAP-kinase signal-integrating kinases*)

mRNA – RNA mensageiro

NECT – Terapia combinada nifurtimox-eflornitina (*nifurtimox–eflornithine combination therapy*)

OD – Densidade óptica (*Optical density*)

PABP – Proteína de ligação à cauda poli-A (*Poli-A binding protein*)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)

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

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PTP – Tirosina fosfatase (*Tyrosine phosphatase*)

PVDF – Fluoreto de polivinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)

rDNA – DNA ribossomal

RNA – Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RNAi – Interferência de RNA (*RNA interference*)

RNA Pol – RNA polimerase

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

rRNA – RNA ribossomal

SDM-79 – meio de cultura de tripanossomas

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*)

SFB – Soro fetal bovino

SL – Sequência *spliced leader* ou mini-éxon

SNC – Sistema nervoso central

snRNA – Pequeno RNA nuclear (*Small nuclear RNA*)
snoRNA – Pequeno RNA nucleolar (*Small nucleolar RNA*)
SRA – Proteína associada a soro resistência (*Serum resistance associated protein*)
SSR – Região de troca de fita (*Strand switch regions*)
STP – Serina treonina fosfatase (*Serine threonine phosphatase*)
TBS – Solução salina tamponada com Tris (*Tris buffered saline*)
TCA – Ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*)
TE – Tampão Tris-EDTA
TET – Tetraciclina
TriTryps – grupo formado por *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*
tRNA – Ácido ribonucleico transportador
tRNAi – tRNA iniciador
UTR – Região não traduzida (*Untranslated egion*)
VSG - Glicoproteína variante de superfície (*Variant Surface Glycoprotein*)
WHO/OMS – *World Health Organization* - Organização Mundial de Saúde
WT – Linhagem selvagem (*Wild type*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. Tripanossomatídeos.....	20
2.1.1. Ordem Kinetoplastida – Aspectos Gerais.....	20
2.1.2. Família Trypanosomatidae	20
2.1.3. Ciclo de Vida dos Tripanossomatídeos Patogênicos	21
2.1.4. Doenças Causadas pelos Tripanossomatídeos	24
2.1.4.1. Tripanossomíase Humana Africana	26
2.1.4.2. Leishmanioses	28
2.1.5. Biologia Molecular dos Tripanossomatídeos	30
2.1.5.1. Genoma.....	30
2.1.5.2. Transcrição.....	31
2.1.5.3. Processamento em Trans (<i>Trans-Splicing</i>) dos mRNAs	33
2.1.5.4. Controle de Expressão Gênica.....	34
2.1.5.5. Fosforilação.....	35
2.2. Síntese Protéica (Tradução) nos Eucariotos	36
2.2.1. Iniciação da Tradução	37
2.2.1.1. Complexo eIF4F.....	38
2.2.1.2. eIF4A.....	39
2.2.1.3. eIF4G	40
2.2.1.4. eIF4E.....	41
2.3. Iniciação da Tradução em Tripanossomatídeos	43
3. OBJETIVOS	47
3.1. Objetivo Geral	47
3.2. Objetivos Específicos.....	47
4. MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1. Análise das sequências	48

4.2. Cultivo de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i> para preparação de extrato proteico e/ou transfecção	48
4.3. Extração de DNA total de <i>L. major</i>	49
4.4. Procedimentos de amplificação e clonagem no vetor pGEM-T-easy.....	50
4.5. Mutagênese sítio-dirigida.....	51
4.6. Subclonagem de genes selecionados em vetores diversos	52
4.7. Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	53
4.8. Transfecção de <i>T. brucei</i>	53
4.9. Procedimentos de superexpressão de proteínas de fusão e RNAi em <i>T. brucei</i>	54
4.10. Purificação de fosfoproteínas	54
4.11. Fracionamento Celular.....	56
4.12. Imunização em coelho	56
4.13. Purificação de anticorpos por imunoadsorção	57
4.14. Ensaios de <i>western blot</i>	57
4.15. Imunofluorescência.....	58
5. RESULTADOS.....	59
5.1. Análise das sequências dos fatores <i>TbEIF4E5</i> e 6 e <i>LmEIF4E5</i> e 6.....	59
5.2. Subclonagens dos genes <i>TbEIF4E5</i> e 6 em vetores de transfecção em <i>T. brucei</i>	62
5.3 Análise do padrão de migração das proteínas <i>TbEIF4E5</i> e 6.....	65
5.4. Localização subcelular dos fatores <i>TbEIF4E5</i> e 6	67
5.4.1. Localização por superexpressão de proteínas fusionadas a EYFP	68
5.4.2. Localização por imunofluorescência	69
5.4.3. Localização por fracionamento celular	71
5.5. Análise do efeito da depleção dos <i>TbEIF4E5</i> e 6 por interferência de RNA (RNAi) na viabilidade celular	72
5.6. Análise da presença de modificações pós-traducionais por fosforilação	75
5.6.1. Ensaio de purificação de fosfoproteínas	75
5.6.2. Identificação dos possíveis sítios de fosforilação nos homólogos de <i>EIF4E5</i> e 6 de <i>T. brucei</i> e <i>L. major</i>	76
5.7. Análise da expressão dos <i>LmEIF4E5</i> e 6 em células procíclicas de <i>L. major</i>	78
5.7.1 Clonagem dos genes <i>LmEIF4E5</i> e 6	79

5.7.2 Expressão das proteínas recombinantes <i>LmEIF4E5</i> e 6	80
5.7.3 Teste de reconhecimento dos antissoros anti- <i>LmEIF4E5</i> e 6.....	81
6. DISCUSSÃO	84
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS.....	91
9. CURRICULUM LATTES	104

1. INTRODUÇÃO

Importantes doenças negligenciadas são causadas por parasitas unicelulares pertencentes à ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomatidae*. Dentre elas podem ser destacadas a tripanossomíase humana africana ou doença do sono, a doença de Chagas e as leishmanioses cujos agentes etiológicos são *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*, respectivamente. Esses males atingem milhares de pessoas nos países subdesenvolvidos e urgem pelo desenvolvimento de meios eficazes de tratamento, prevenção e erradicação.

Os organismos causadores dessas doenças divergiram cedo na linhagem evolutiva e apresentam importantes características que os diferem dos demais eucariotos, principalmente no que concerne a sua biologia molecular. Seus genes são organizados em grandes *clusters* que são transcritos constitutivamente num processo dito transcrição policistônica. Os grandes transcritos primários são processados por *trans splicing* e poliadenilados para tornarem-se mRNAs maduros para a tradução. Não parece haver regulação significativa da expressão gênica a nível transcricional.

Nos eucariotos superiores, a síntese proteica é um dos últimos estágios da expressão gênica, sendo dividida em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem do ribossomo. Destas, a iniciação é a mais complexa e regulada, onde participam inúmeros dos chamados fatores de iniciação eucarióticos – os eIFs. Dentre estes se destaca o complexo heterotrimérico eIF4F, constituído por três subunidades: eIF4A, uma RNA helicase ATP-dependente da família DEAD-box, eIF4G, a proteína âncora do complexo, responsável por interagir com eIF4A, eIF4E, eIF3, com a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) e com quinase Mnk; e a

subunidade eIF4E, que reconhece a estrutura do *cap* na região 5' do mRNA. A atuação do eIF4F é crítica para a chamada tradução *cap*-dependente.

Embora o processo de iniciação da tradução nos tripanossomatídeos não esteja elucidado, avanços importantes têm sido feitos no sentido de compreender essa importante etapa da síntese protéica. Foram identificados primariamente em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* cinco homólogos do eIF4G (EIF4G1 a 5), dois do eIF4A (EIF4A1 e III) e quatro do eIF4E (EIF4E1 a 4). Vários destes tiveram sua caracterização iniciada em trabalhos já publicados e que apontam para propriedades funcionais inéditas quando comparados com outros organismos. Mais recentemente, com a publicação do genoma completo desses organismos, foram identificados outros dois homólogos ao eIF4E de sequência mais divergente, EIF4E5 e 6. Em etapas prévias, a caracterização destas proteínas foi iniciada com a clonagem dos genes, expressão de proteínas recombinantes e produção de anticorpos policlonais específicos. O presente trabalho dá continuidade à investigação do papel funcional desempenhado por essas proteínas fazendo uso das ferramentas já disponíveis e desenvolvendo outras com maior potencial de esclarecer sua função celular e/ou na síntese protéica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tripanossomatídeos

2.1.1. Ordem Kinetoplastida – Aspectos Gerais

Os tripanossomatídeos são organismos unicelulares pertencentes à ordem Kinetoplastida (por vezes considerada filo ou classe) que por sua vez inclui um grande grupo de protozoários parasitas tanto de plantas como de animais. Os kinetoplastídeos são caracterizados por possuírem uma estrutura intracelular exclusiva localizada em sua grande e única mitocôndria. Essa estrutura em forma de disco, chamada cinetoplasto, consiste em um grande número de moléculas de DNA circular (~20.000 minicírculos, 20-50 maxicírculos) entrelaçadas, o kDNA (Gunn e Pitt, 2012). Todos os kinetoplastídeos possuem um flagelo, que pode ser longo e livre, incorporado na superfície celular para formar a membrana ondulatória, ou ainda pequeno e fechado na bolsa flagelar (Bastin *et al.*, 2000). Outra característica peculiar destes organismos é a presença de uma organela chamada glicosomo que contém as enzimas glicolíticas que, em outros organismos, são normalmente encontradas no citoplasma (Michels *et al.*, 2006).

A ordem *Kinetoplastida* é classicamente dividida em duas famílias: Bodonidae (ordem Bodonida, coprozóicos de vida livre ou parasitas de peixes e invertebrados) e Trypanosomatidae (ordem Trypanosomatida) cujos membros são de importância médica e veterinária (Roberts; Janovy Jr, 2009). Entretanto, com o advento dos estudos moleculares outras classificações têm sido propostas, por exemplo, dividindo-se os kinetoplastídeos em dois novos grupos: Protokinetoplastina (*Ichthyobodo* e *Perkinsiella*) e Metakinetoplastina (outros membros da família Bodonidae e tripanossomatídeos) (Simpson *et al.*, 2006). Como ainda não foi alcançado um consenso sobre a filogenia molecular da ordem Kinetoplastida e a discussão sobre esse aspecto foge ao escopo do presente trabalho, adotar-se-á a taxonomia clássica para a descrição da família Trypanosomatidae.

2.1.2. Família Trypanosomatidae

A família Trypanosomatidae compreende dez gêneros: seis monogenéticos - *Leptomonas*, *Chritidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas* e *Wallaceina*;

quatro digenéticos - *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (Stevens *et al.*, 2001). A taxonomia clássica destes gêneros é baseada na combinação de características morfológicas e de ciclo de vida. Há seis principais tipos morfológicos e dois tipos básicos de ciclos de vida (Figura 1). O ciclo monogenético é completado em um único hospedeiro invertebrado. Enquanto a forma amastigota é comum a todos os ciclos, a forma final em cada um é diferente e característica do gênero. Nos ciclos digenéticos há dois hospedeiros, um invertebrado e o outro é uma planta ou vertebrado. Somente organismos pertencentes ao gênero *Trypanosoma* apresentam a forma tripomastigota que é característica do grupo (Olsen, 1986). Dentre os membros da família Trypanosomatidae, os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os de maior importância médica e veterinária por serem parasitas do homem e/ou animais domésticos.

2.1.3. Ciclo de Vida dos Tripanossomatídeos Patogênicos

As diferenças existentes entre as condições ambientais as quais os tripanossomatídeos estão sujeitos nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, requerem destes organismos um extenso remodelamento celular, mudanças nas principais proteínas de superfície e alterações metabólicas que culminam nas diferentes formas celulares observadas nos seus ciclos de vida (Hammarton, 2007). Apesar de pertencerem à mesma família de parasitas digenéticos, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* (os chamados TriTryps – espécies representativas dos principais grupos de tripanossomatídeos patogênicos e que tiveram seus genomas inicialmente sequenciados (El-Sayed *et al.*, 2005; Berriman *et al.*, 2005; Ivens *et al.*, 2005) apresentam importantes diferenças em seus ciclos de vida no que se refere ao tipo de inseto vetor, tipos morfológicos desenvolvidos e comportamento no hospedeiro vertebrado.

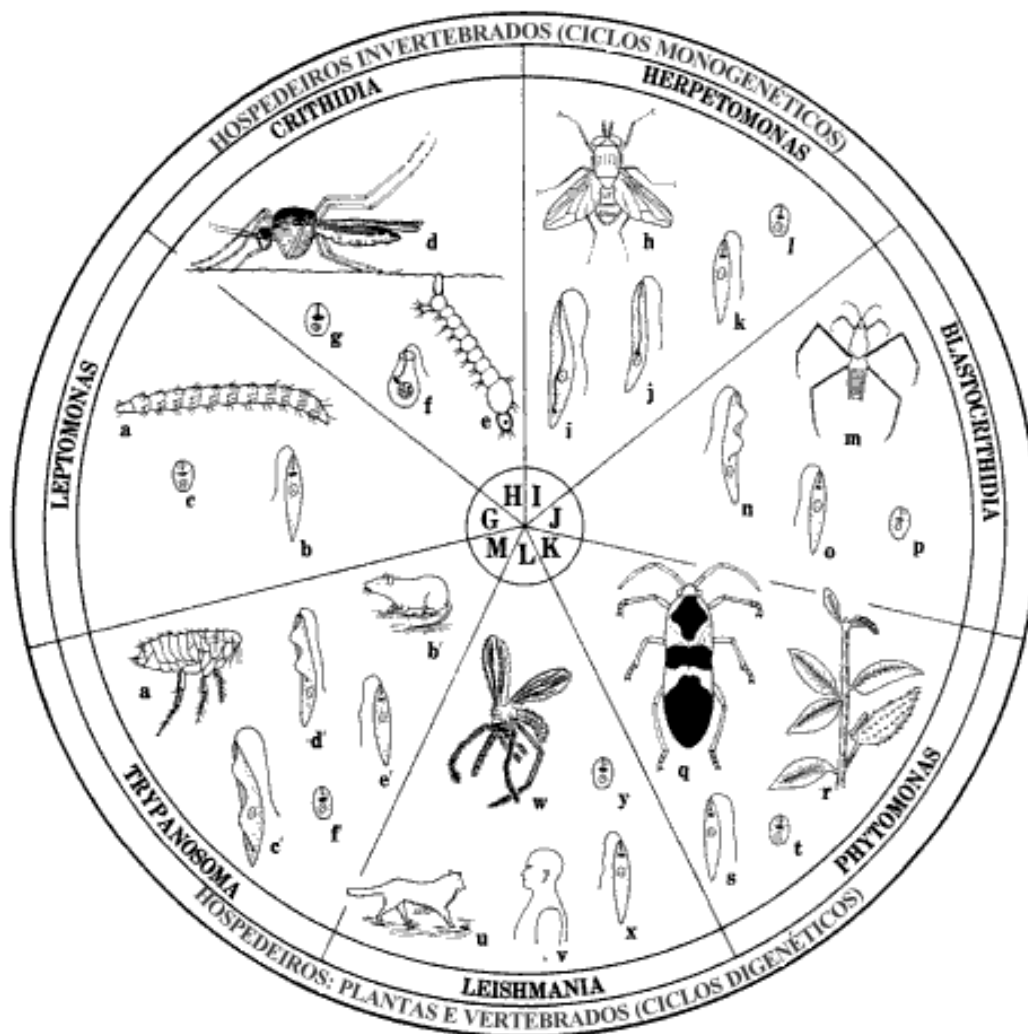


Figura 1. Família Trypanosomatidae – Diferentes aspectos morfológicos e ciclos de vida dos principais representantes. G. Ciclo de vida de *Leptomas ctenocephali* com amastigota e promastigota na pulga de cachorro (*Ctecephalides canis*). H. Ciclo de vida de *Crithidia fasciculata* com amastigota e coanomastigota nos mosquitos. I. Ciclo de vida de *Herptomonas muscarum* com amastigota, promastigota e opistomastigota em moscas. J. Ciclo de vida de *Blastocrithidia gerridis* com amastigota, promastigota e epimastigota em *Gerris remigis* (water strider). K. Ciclo de vida de *Phytomonas elmassiani* com amastigota e promastigota em *Oncopeltus fasciatus* (milkweed bug) e *Asclepias servus* (milkweed). L. Ciclo de vida de *Leishmania donovani* com promastigota em flebotomíneos e amastigotas em células reticuloendoteliais de humanos, cães e outros mamíferos. M. Ciclo de vida de *Trypanosoma lewisi* com tripomastigotas no sangue de ratos e promastigotas, epimastigotas e amastigotas no trato intestinal de pulgas de rato. a. Larva da pulga, b. promastigota, c. amastigota, d. mosquito adulto, e. larva do mosquito, f. coanomastigota, g. amastigota, h. mosca doméstica, i. opistomastigota completamente desenvolvida, j. opistomastigota em desenvolvimento, k. promastigota, l. amastigota, m. water strider, n. epimastigota, o. promastigota, p. amastigota, q. milkweed bug, r. milkweed, s. promastigota, t. amastigota, u. v., hospedeiros mamíferos (cães, humanos), w. flebotomíneo – hospedeiro invertebrado, x. promastigota, y. amastigota, a'. pulga – hospedeiro invertebrado, b'. rato – hospedeiro vertebrado, c'. tripomastigota, d'. epimastigota, e'. promastigota, f'. amastigota. Os gêneros *Rhynchoidomonas*, *Wallaceina* e *Endotrypanum* não estão representados (Adaptado de Olsen, 1986).

***Trypanosoma brucei*:** Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, a mosca tsé-tsé infectada (gênero *Glossina*) injeta tripomastigotas metacíclicos no tecido epitelial do mamífero. Os parasitas entram no sistema linfático e passam para a corrente

sanguínea. Dentro do hospedeiro, eles se transformam em tripomastigotas sanguíneos, se deslocam para outros sítios corporais, atingem outros fluidos (linfa, líquido espinhal), e continuam a replicação por divisão binária. Todo o ciclo do *Trypanosoma brucei* é extracelular. As moscas tsé-tsé tornam-se infectadas com tripomastigotas sanguíneos quando se alimentam do sangue de um hospedeiro mamífero infectado. No trato intestinal da mosca os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicos, se multiplicam por divisão binária, deixam o trato intestinal e se transformam em epimastigotas. Os epimastigotas, por sua vez, alcançam as glândulas salivares da mosca e continuam a se multiplicar por fissão binária. O ciclo na mosca dura aproximadamente três semanas (Figura 2) (Matthews *et al.*, 2004).

***Trypanosoma cruzi*:** Um inseto vetor triatomíneo (“barbeiro”) infectado se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado e libera fezes contaminadas próximas ao local da picada. Tripomastigotas entram no hospedeiro através da ferida ou através de mucosas intactas, como a conjuntiva. As espécies de triatomíneos mais comuns pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células próximas ao sítio de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares. Os amastigotas se multiplicam por divisão binária, se diferenciam em tripomastigotas e são liberadas na circulação sanguínea como tripomastigotas sanguíneos. Essa forma infecta células de vários tecidos e se transforma em amastigotas intracelulares nos novos sítios de infecção. Os tripomastigotas sanguíneos não se replicam, diferentemente do *Trypanosoma brucei*. O inseto barbeiro torna-se infectado ao se alimentar do sangue humano ou animal que contenha parasitas circulantes. Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no trato intestinal do vetor. Os parasitas então se multiplicam e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos infectivos no trato intestinal posterior do inseto (Figura 2) (Tyler e Engman, 2001).

***Leishmania major*:** A transmissão se dá pela picada do inseto flebotomíneo infectado. O vetor injeta a forma infectiva (promastigota) a partir da sua probóscide durante o repasto sanguíneo. Os promastigotas que atingem o ferimento são fagocitados pelos macrófagos e outros tipos de fagócitos mononucleares. As promastigotas se transformam então em amastigotas que se multiplicam por divisão simples e continuam a infectar fagócitos mononucleares. Os flebotomíneos se tornam infectados ingerindo células infectadas durante a refeição sanguínea. No vetor, os amastigotas se transformam em promastigotas no trato intestinal e migram para a probóscide do inseto (Figura 2) (Stuart *et al.*, 2008)

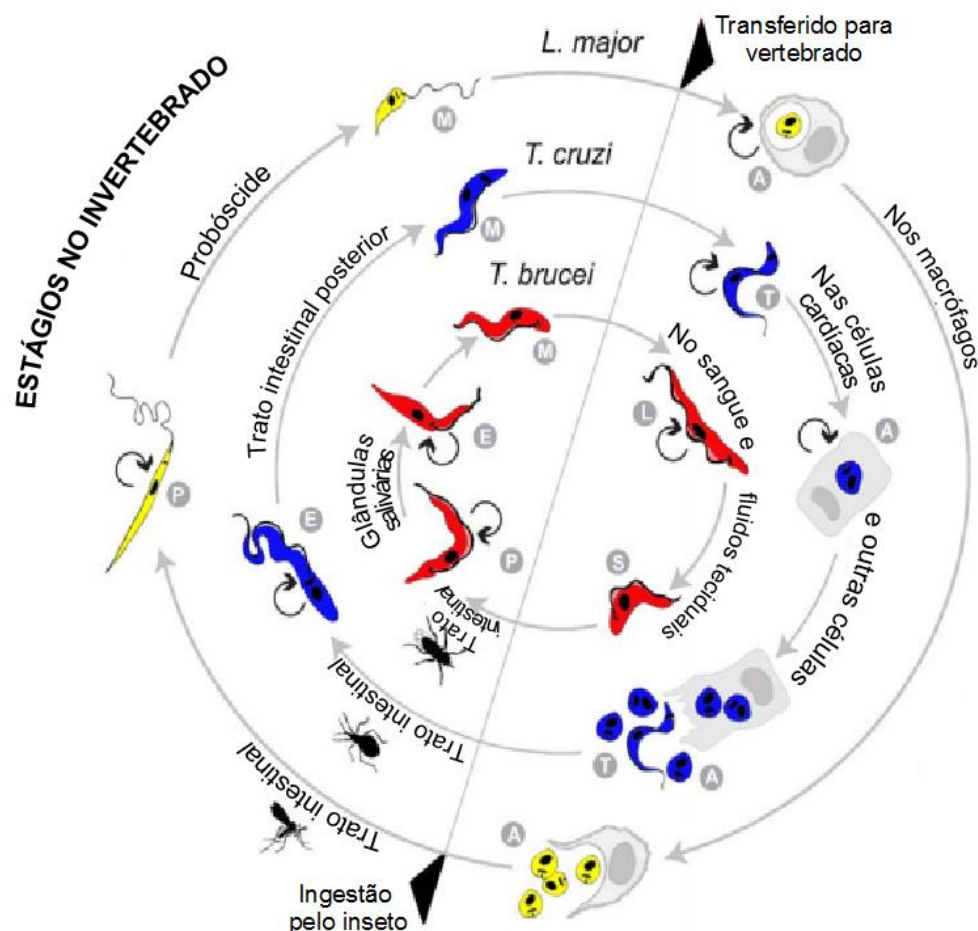


Figura 2. Ciclo de vida dos Trypanosoma. Diagrama mostrando os ciclos de vida de *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei* que são transmitidos por flebotomíneo, inseto barbeiro e mosca tsé-tsé, respectivamente. Os estágios dos ciclos de vida representados são: para *L. major*, promastigotas proliferativos (P) e metacíclicos (M) no flebotomíneo e amastigotas (A) nos macrófagos de mamíferos; para *T. cruzi*, epimastigotas (E) e tripomastigotas (T) no inseto barbeiro e amastigotas (A) e tripomastigotas (T) nas células de mamíferos; para *T. brucei*, epimastigotas procíclicos (P) e metacíclicos (M) na mosca tsé-tsé e formas sanguíneas longas (L) e curtas (S) na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. A seta circular indica os estágios proliferativos em cada ciclo (Adaptado de El-Sayed *et al.*, 2005).

2.1.4. Doenças Causadas pelos Tripanossomatídeos

As doenças humanas mais comuns causadas pelos tripanossomatídeos incluem: a tripanossomíase humana africana (*HAT - human African trypanosomiasis*), ou doença do sono, causada pela infecção por duas das três subespécies de *Trypanosoma brucei*, a doença de Chagas causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e as várias formas de leishmaniose causadas pelas diferentes espécies do gênero *Leishmania* (Kruel, 2007). Essas enfermidades são consideradas pela OMS como doenças negligenciadas, pois compartilham diversas características, dentre elas: são difíceis e caras de gerir (alto custo no diagnóstico, tratamento e monitoramento); não possuem ferramentas apropriadas para o controle; têm baixo investimento em pesquisa e atingem milhares de pessoas todos os

anos nos países em desenvolvimento, que frequentemente vivem em áreas de acesso limitado, dificultando o diagnóstico e tratamento adequados (Molyneux *et al.*, 2005).

As características gerais das doenças causadas pelos TriTryps estão descritas na Tabela 1. A tripanossomíase humana africana e as leishmanioses serão discutidas mais detalhadamente, porém a discussão sobre doença de Chagas não concerne ao presente trabalho.

Tabela 1. Doenças causadas pelos TriTryp

Doenças causadas pelos TriTryp	Tripanossomíase humana africana	Doença de Chagas	Leishmanioses
Principais formas ou estágios da doença	Estágio inicial (hemolinfático) e estágio tardio (SNC)	Fases: aguda, indeterminada e crônica (cardíaca e digestiva)	Formas visceral (LV), mucocutânea (LMC) e cutânea (LC)
Organismos causadores	<i>T.b.gambiense</i> e <i>T.b.rhodesiense</i>	<i>T. cruzi</i>	~21 espécies de <i>Leishmania</i> spp. Ex: <i>L. donovani</i> (LV), <i>L. brazilienses</i> (LMC) e <i>L. major</i> (LC)
Célula/ tecido hospedeira (o)	Extracelular: sangue, linfa, líquido céfalo-raquidiano e espaço intracelular.	Intracelular: citoplasma das células do coração, músculo liso, intestino, SNC e adipócitos	Intracelular: nos fagolisossomos dos macrófagos
Vetores de importância médica	Moscas Tsé-tsé (~20 <i>Glossina</i> sp.)	Triatomíneos (~138 espécies)	Flebotomíneos (~70 espécies)
Transmissão	Picada da mosca infectada, congênita (rara), transfusão sanguínea (rara)	Contaminação pelas fezes infectadas dos triatomíneos, transfusão sanguínea, congênita, transplante de órgãos (raro)	Picada do flebotomíneo infectado
Distribuição geográfica	África Sub-Saariana (~20 países)	Américas do Sul e Central (19 países)	Américas do Sul e Central, Europa, África, Ásia (88 países endêmicos)
População em risco	50 milhões	100 milhões	350 milhões
Infectados	70.000 - 80.000	8 - 11 milhões	12 milhões
Mortes (por ano)	~30.000	14.000	51.000 (LV)

Modificado de Stuart *et al.*, 2008.

2.1.4.1. Tripanossomíase Humana Africana

A tripanossomíase humana africana (HAT - *human African trypanosomiasis*) ou doença do sono ocorre em regiões da África sub-Saariana em que se encontram o inseto vetor – as moscas tsé-tsé (*Glossina sp.*) – e é causada por duas subespécies de *Trypanosoma brucei* (Figura 3). O *Trypanosoma brucei gambiense* causa a forma crônica da doença nas regiões central e ocidental da África sub-Saariana, enquanto *Trypanosoma brucei rhodesiense* causa a forma aguda nas regiões oriental e meridional (Figura 4) (Simarro *et al.*, 2010). Esses patógenos são morfologicamente idênticos entre si e ao *Trypanosoma brucei brucei* (patógeno em animais), mas podem ser distinguidos pelos genes que codificam a proteína associada a soro resistência (SRA) encontrada somente no genoma do *T. b. rhodesiense* e uma glicoproteína específica em *T. b. gambiense* (Radwanska *et al.*, 2002).

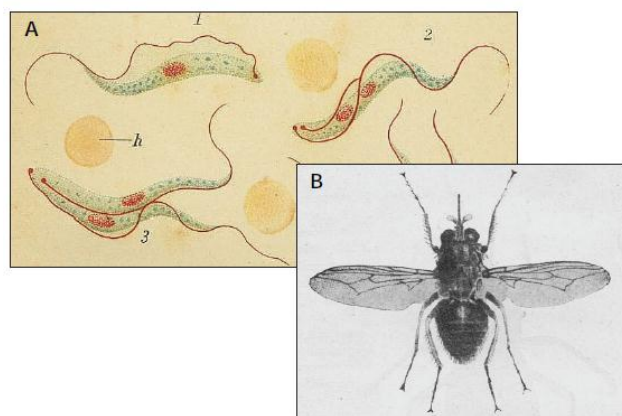


Figura 3. O parasita e seu vetor. A. *Trypanosoma brucei gambiense* (1-3) como visto no fluido cérebro-espinhal dos pacientes com doença do sono. h – eritrócitos. **B.** a mosca vetor tsé-tsé (*Glossina palpalis*). (Adaptado de Lundkvist *et al.*, 2004)

Na fase inicial da infecção, os tripanossomas estão limitados ao sistema linfático e ao sangue. Numa fase posterior, também são vistos no parênquima cerebral e líquido cefalorraquidiano (LCR), mas são geralmente extracelulares. Grandes modificações do sistema imune são observadas na doença do sono. Estas reações exacerbadas imunológicas não protegem o hospedeiro e estão envolvidas em distúrbios imunopatológicos (Lundkvist *et al.*, 2004)

Os tripanossomas são cobertos por um revestimento de superfície composto de uma glicoproteína de superfície variável (VSG – *variant surface glycoprotein*) que protege os parasitas dos fatores líticos no plasma humano, e está associado com o escape do parasita a reações imunológicas. Quando a infecção ocorre, esta glicoproteína é reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro, o que desencadeia a produção de anticorpos IgM e

IgG. Na HAT, uma característica importante é um aumento nos níveis de IgM, incluindo anticorpos específicos e não-específicos contra os tripanossomas. Os anticorpos específicos neutralizam os tripanossomas correspondentes, levando a uma diminuição da parasitemia. No entanto, um subconjunto destes parasitas altera o seu revestimento para um novo tipo de glicoproteína variante de superfície que não é afetada pelos anticorpos circulantes, levando a uma nova proliferação, até que novos anticorpos sejam produzidos. Esta sequência se repete e o sistema imune é, portanto, incapaz de eliminar os parasitas (Vincendeau e Bouteille, 2006).

A tripanossomíase humana africana é fatal se não tratada. O primeiro estágio da doença (hemolinfático) é acompanhado de febre, dor de cabeça, adenopatia, dor nas articulações e prurido. O segundo estágio (meningocefalítico - SNC) é acompanhado por sintomas neurológicos severos incluindo anomalias mentais, sensoriais e do sono. O principal distúrbio do sono é a sonolência diurna com insônia noturna (Kennedy, 2004). As complicações neurológicas da tripanossomíase humana africana no homem são causadas pela presença dos parasitas no sistema nervoso central após estes cruzarem a barreira hematoencefálica. Porém, os mecanismos pelos quais os tripanossomas atravessam essa barreira, que é constituída principalmente pelas células endoteliais microvasculares cerebrais, permanecem desconhecidos (Rodgers, 2010).

A doença do sono causada pelo *T. b. gambiense* tem o seu primeiro estágio tratado com pentamidina, normalmente bem tolerada. Melarsoprol, um derivado baseado em arsênico foi o único tratamento disponível para o segundo estágio por mais de 50 anos. Essa droga causa um amplo espectro de efeitos colaterais, sendo o principal a síndrome encefalopática em 5-10% dos pacientes com 50% de letalidade. Desde o ano 2000, entretanto, a droga de escolha é a combinação nifurtimox–eflornitina (NECT - *nifurtimox–eflornithine combination therapy*) que é mais bem tolerada (Legros *et al.*, 2002). Já a forma da doença causada pelo *T. b. rhodesiense* é tratada em seu primeiro estágio com a droga suramina que possui nefrotoxicidade reversível como efeito colateral, mas é bem tolerada pelo paciente. Para o segundo estágio, entretanto, não se faz uso do eflornitina porque essa subespécie de *T. brucei* é resistente. Assim, a droga de escolha ainda é o melarsoprol (Jennings *et al.*, 2002).

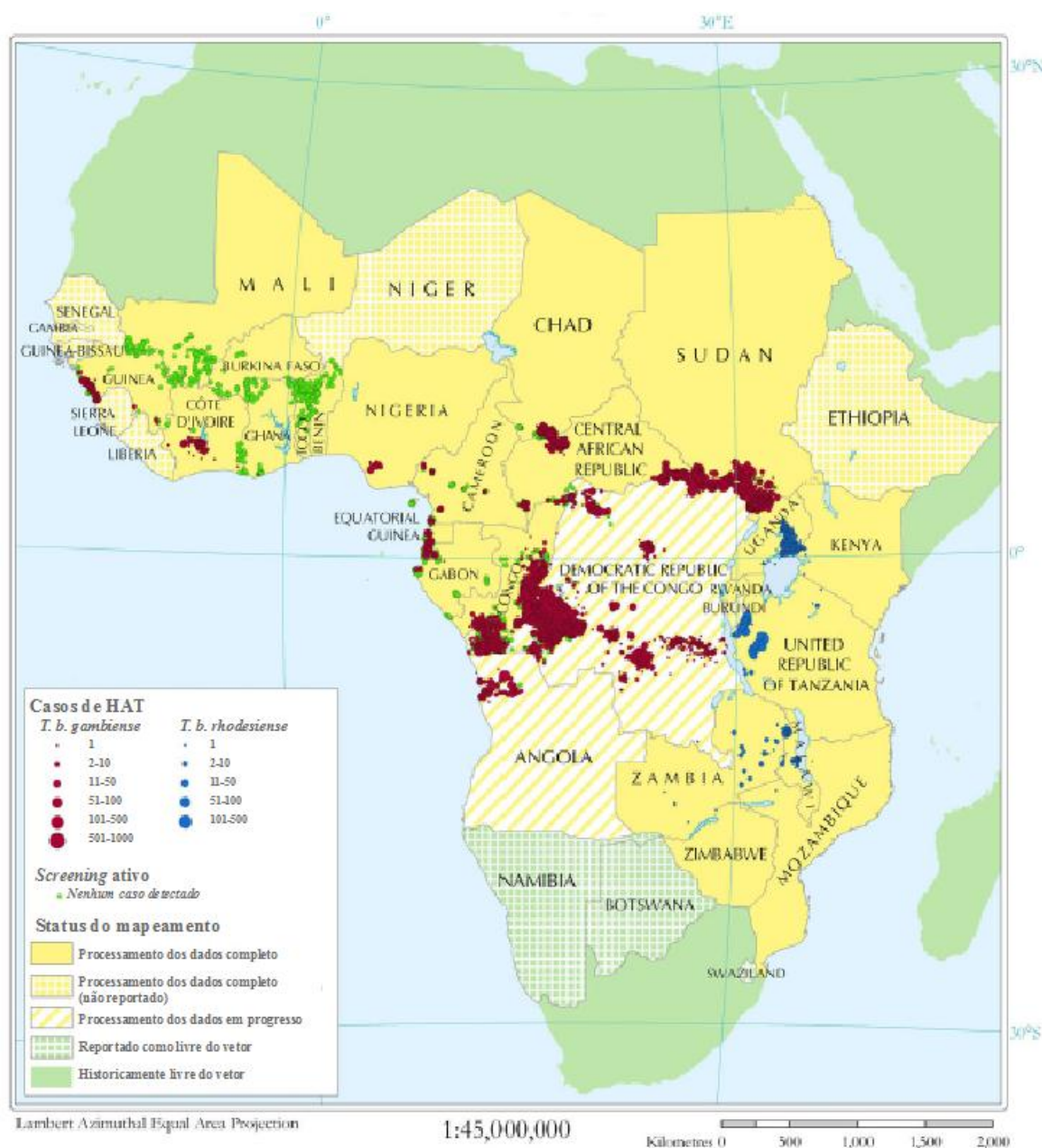


Figura 4. Distribuição da tripanossomíase humana mapeada no *Atlas of human African trypanosomiasis*. Para cada país, os dados processados foram considerados completos quando todas as fontes de dados disponíveis para o período do estudo (2000-2009) foram analisadas e incluídas na base de dados da tripanossomíase humana africana. Fonte: WHO/OMS. (Adaptado de Simarro *et al.*, 2010)

2.1.4.2. Leishmanioses

As leishmanioses podem ser causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* como, por exemplo: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania major* e *Leishmania infantum*. A espécie envolvida depende da distribuição geográfica e a forma clínica desenvolvida também é dependente, dentre outros fatores, da espécie infectante (Santos *et al.*, 2008).

Há quatro formas clínicas diferentes da leishmaniose. A leishmaniose visceral (LV) afeta órgãos internos como o baço e o fígado e é causada pelas espécies do complexo *Leishmania donovani*, que consiste principalmente nas espécies *L. (d) infantum*, *L. (d) donovani* e *L. (d) chagasi*. Já a leishmaniose mucocutânea (LMC) produz lesões que podem levar a destruição e desfiguração das membranas mucosas do nariz, boca e garganta e as espécies responsáveis são *L. (viannia) braziliensis* e *L. (viannia) guyanensis*. A leishmaniose cutânea (LC) pode produzir um grande número de lesões na pele e é causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica*, *L. mexicana* e *L. amazonensis*. A quarta forma clínica é leishmaniose cutânea difusa (LCD), uma variante da leishmaniose cutânea localizada, em que as lesões são disseminadas. A LCD é causada por *L. (mexicana) amazonensis* e *L. aethiopica* (Singh, 2006).

A prevalência global da leishmaniose é estimada em 12 milhões de casos em todo o mundo e a incidência global de todas as formas clínicas é de aproximadamente 2 milhões de novos casos anualmente (1,5 milhões para LC e 500 mil para LV). A LMC se desenvolve como complicação da LC causada pelo subgênero *Viannia* em 5% a 20% dos pacientes não tratados que vivem em área onde a leishmaniose é endêmica. Mais de 90% dos casos de LC ocorrem no Irã, Afeganistão, Síria, Arábia Saudita, Brasil e Peru (Figura 5) (Mitropoulos *et al.*, 2010).

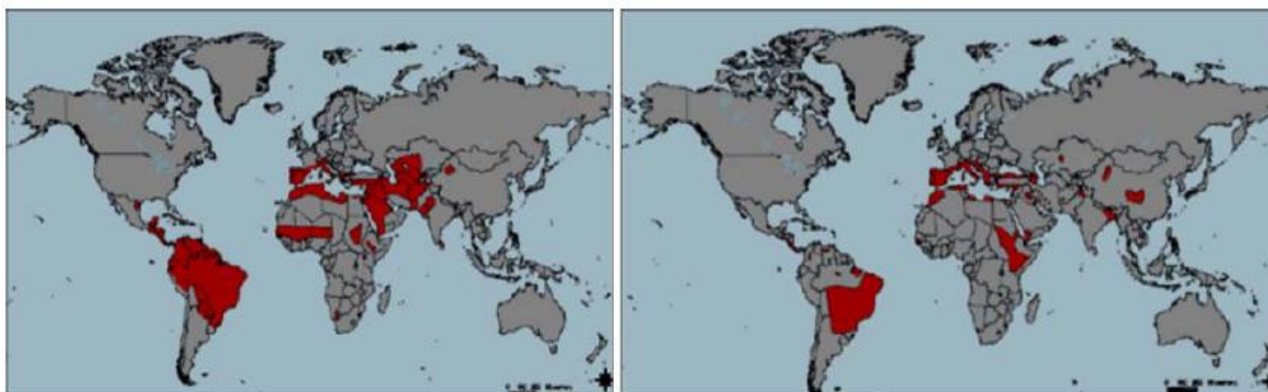


Figura 5. Distribuição da leishmaniose cutânea (esquerda) e visceral (direita). As áreas afetadas estão em vermelho. Fonte: WHO/OMS. (Adaptado de Santos *et al.*, 2008)

As espécies de leishmania são transmitidas pela picada de flebotomíneos fêmeas pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas Central e do Sul) (Sharma e Singh, 2008). Uma vez que o parasita atinja o hospedeiro mamífero, ele tem sua fagocitose mediada por receptores nas células dendríticas epiteliais ou dos macrófagos. O parasita usa os receptores do sistema complemento do hospedeiro para ganhar acesso ao fagolisossomo, onde, apesar do pH ácido (entre 4,5 e 5,0) e proteinases ativas, é capaz de se desenvolver (Figura 6).

Macrófagos ativados e linfócitos T são então recrutados para o local da infecção e a patologia resultante desta depende substancialmente dos fatores genéticos do hospedeiro (Roberts *et al.*, 2000).

Atualmente, as drogas usadas no tratamento das leishmanioses apresentam vários problemas, incluindo a alta toxicidade e muitos efeitos colaterais, levando os pacientes a abandonarem o tratamento e ao consequente surgimento de linhagens resistentes. O tratamento primário inclui antimoniais pentavalentes, principalmente o estibugluconato de sódio e antimoniato de metilglutamina. Nos casos resistentes, outras drogas como pentamidina, anfotericina B e paromomicina são utilizadas como segunda opção, apesar da alta toxicidade para o paciente (Singh e Sivakumar, 2004).



Figura 6. Eletromicrografias de *Leishmania major*. (A) promastigota ligada à superfície de um macrófago. (B) Macrófago infectado com amastigotas ligados a sua superfície (seta branca) e amastigotas internalizados protusos na superfície celular (seta preta). (C) amastigota extracelular mostrando flagelo rudimentar (seta preta) (Adaptado de Roberts *et al.*, 2000)

2.1.5. Biologia Molecular dos Tripanossomatídeos

2.1.5.1. Genoma

Os tripanossomatídeos são organismos diploides, sendo o genoma de *T. brucei* é constituído de 11 pares de cromossomos maiores, de tamanho superior a 1 megabase (Figura 7) (*MBCs* – *megabase-size chromosomes*), aproximadamente 100 minicromossomos (30 a 150 kb) e 5 cromossomos de tamanho intermediário (200 a 900 kb) (Berriman *et al.*, 2005). Já *L. major* (representativo de diferentes espécies de *Leishmania*) e *T. cruzi* apresentam genomas mais fragmentados e contém respectivamente 36 e 28 pares de cromossomos megabase (Ivens *et al.*, 2005). O genoma dos tripanossomatídeos é organizado em grandes clusters que contém vários genes codificantes de proteína na mesma orientação. Em *T. brucei* há 388 clusters de dois ou mais genes unidirecionais. As regiões que separam os clusters gênicos são

chamadas de regiões de troca de fita (*SSRs – strand switch regions*) (Daniels *et al.*, 2010).

Apesar de terem divergido entre 200 e 500 milhões de anos atrás, os genomas dos tripanossomatídeos são altamente sintênicos, com 68% dos genes em *T. brucei* e 75% em *L. major* permanecendo no mesmo contexto genômico. Mesmo com essa conservação, entretanto, muitas inserções, substituições e deleções locais têm sido encontradas dentro das regiões sintênicas nos TriTryps. Essas alterações levam a diferenças fisiológicas e bioquímicas entre esses parasitas (El-Sayed *et al.*, 2005).

2.1.5.2. Transcrição

Todas as espécies de tripanossomatídeos apresentam as RNAs polimerases (RNA Pol) I, II e III, cada uma responsável pela transcrição de alvos específicos. De forma geral, a RNA Pol I transcreve somente os genes de rRNAs, mas, nos tripanossomas africanos, transcreve também os genes codificantes das proteínas variantes de superfície (VSGs) nas formas sanguíneas do protozoário e o gene da prociclina nas fases do parasita presentes no hospedeiro invertebrado (Günzl *et al.*, 2003). Já a RNA Pol II é responsável pela transcrição policistrônica da maior parte dos genes que codificam proteínas, embora as sequências precisas específicas para iniciação e terminação da transcrição não sejam ainda conhecidas. Foram identificados promotores para RNA Pol II apenas nos genes codificadores da sequência *Spliced-leader* (SL), actina e HSP70 (Gilinger e Bellofatto, 2001). Admite-se que a transcrição pela Pol II inicia-se em uma região de troca de fita e esta continua por todo cluster gênico até terminar na próxima SSR ou num sítio específico entre dois policistrons (Martínez-Calvillo *et al.*, 2007). Trabalhos recentes mostraram a correlação entre a posição da histona e os prováveis sítios de início da transcrição, sugerindo que a estrutura da cromatina desempenha um papel fundamental no direcionamento da RNA Pol II para os seus sítios promotores (Siegel *et al.*, 2009). A RNA Pol III, por sua vez, transcreve um número bastante reduzido de RNAs não-codificantes que atuam na transcrição (tRNAs e 5S RNAs) e em outros processo celulares (7SL RNAs) (Figura 7) (Grondal *et al.*, 1989).

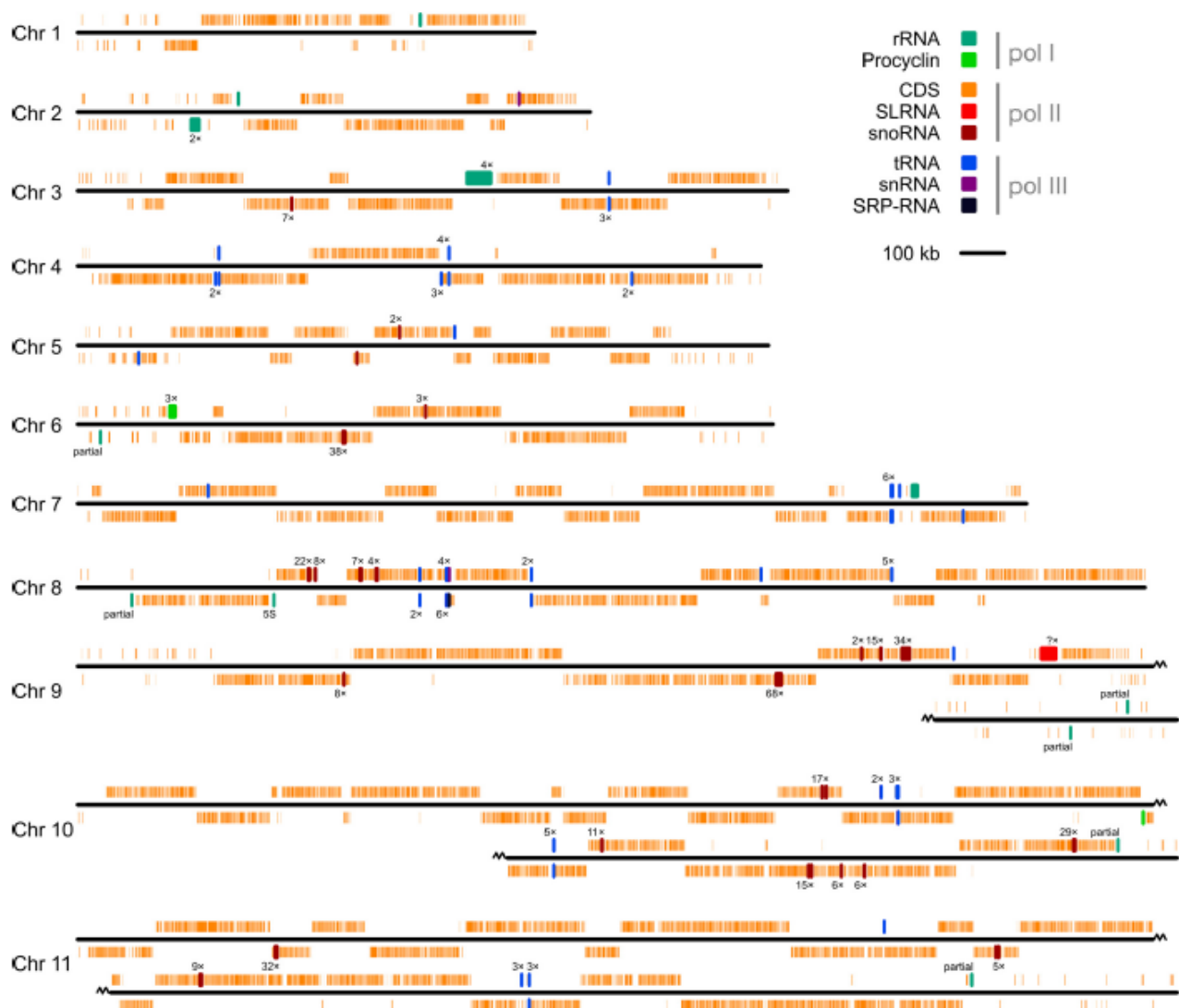


Figura 7. Mapa do genoma de *Trypanosoma brucei*. O mapa mostra a organização dos genes de acordo com a classe e a polimerase que os transcreve. As barras coloridas indicam as posições e os comprimentos dos diferentes elementos genéticos relativos ao esqueleto cromossômico (linha preta). Barras acima da linha indicam a transcrição para a direita; barras abaixo da linha indicam transcrição para a esquerda. Quando elementos similares estão presentes próximos no genoma, estes estão indicados por $n\times$ perto da barra (onde n é o número de elementos). Somente os maiores *contigs* montados estão representados para cada cromossomo. Os cromossomos 9 e 11 foram divididos em duas linhas. (Adaptado de Daniels *et al.*, 2010)

De forma geral, os grandes transcritos primários policistrônicos originados pela RNA Pol II, necessitam ser processados para tornarem-se mRNAs maduros para a tradução. Nos tripanossomatídeos, esse processamento se dá pelas reações de *trans-splicing*, descrita adiante, e poliadenilação.

2.1.5.3. Processamento em Trans (*Trans splicing*) dos mRNAs

Diferente da grande maioria dos eucariotos superiores, em que o processamento dos pré-mRNAs se dá principalmente pela remoção dos íntrons e junção dos éxons via processamento em *cis* (*cis splicing*), os tripanossomatídeos processam os transcritos primários nucleares primordialmente por processamento em *trans* (*trans splicing*) (Campbell *et al.*, 2003). O *trans splicing* é semelhante ao *cis splicing*, mas ocorre entre dois RNAs precursores que são transcritos a partir de diferentes localizações genômicas. Tal processo compreende a clivagem dos grandes transcritos primários policistrônicos acompanhada da adição de uma sequência curta (~40 nt) chamada *Spliced-Leader* (SL ou mini-éxon – derivada de um precursor de 140 nucleotídeos) à extremidade 5' de cada mRNA gerado. O evento que se segue é a poliadenilação na região 3'-UTR do mRNA que, junto com o *trans splicing*, modifica o pré-mRNA policistrônico em mRNAs monocistrônicos maduros prontos para a tradução (Figura 8) (Jäger *et al.*, 2007).

A sequência SL contém na sua extremidade 5' a estrutura do *cap* (m^7GpppN , onde N é qualquer nucleotídeo), que nos tripanossomatídeos é modificado em *cap 4*. O *cap 4* é formado a partir da adição co-transcricional do m^7GTP (7-metilguanosina 5'-trifosfato) ao RNA SL precursor seguida de modificações nos quatro primeiros nucleotídeos. Estas incluem a adição de grupos 2'-O metil nas riboses das quatro bases iniciais do RNA e metilações únicas na primeira (adenosina) e quarta (uridina) bases (Lewdorowicz *et al.*, 2004).

O *cap 4* dos tripanossomatídeos, assim como o *cap* nos eucariotos superiores, desempenha vários papéis em mecanismos biológicos, incluindo transporte de mRNAs entre núcleo e citoplasma, controle da estabilidade dos mRNAs e formação do complexo de iniciação da tradução (Varani, 1997).

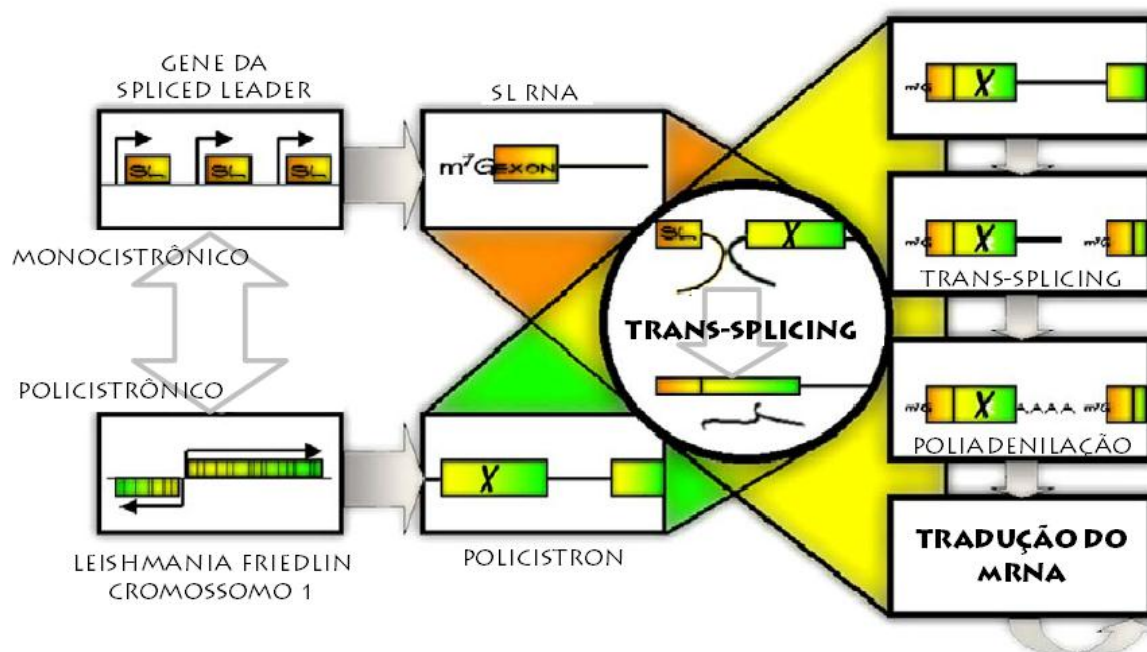


Figura 8. Esquema da transcrição e *trans-splicing*. Transcrição pela RNA Pol II dos genes codificadores de *Spliced-Leader* (SL RNA) repetidos em *tandem* e de regiões policistrônicas codificantes de proteína (exemplificada pelo cromossomo 1 de *L. major*) pela RNA Pol II. A reação bimolecular de *trans-splicing* resulta em um mRNA monocistrônico pronto para a tradução (Adaptado de Campbell *et al.*, 2003)

2.1.5.4 Controle de Expressão Gênica

A organização dos genes dos tripanossomatídeos em unidades policistrônicas significa que a maior parte dos genes é transcrita em níveis equivalentes dentro dos *clusters* policistrônicos e que, conseqüentemente, deve haver mecanismos pós-transcricionais para o controle dos níveis dos mRNAs maduros resultantes e das proteínas produto da sua tradução. A transcrição constitutiva de todo genoma e a regulação dos níveis dos mRNAs em etapas posteriores permitem ao parasita alterar rapidamente a expressão de suas proteínas para sobreviver e adaptar-se as mudanças ambientais entre vetor e hospedeiro (Gomez *et al.*, 2010).

As vias de regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos podem então se dar, principalmente, ao nível de controle da estabilidade (degradação) dos mRNAs e na sua tradução. O atual modelo para degradação dos mRNAs nos tripanossomatídeos envolve duas vias: uma via regulada, rápida e independente da deadenilação do mRNA; uma via constitutiva, dependente de deadenilação. A primeira via é provavelmente limitante para os mRNAs instáveis estágio-específicos e pode envolver mecanismos exclusivos desses parasitas, incluindo aspectos de controle de qualidade do mRNA e a degradação por endonucleases. Já a segunda via é mais lenta e parece estar envolvida

na degradação de mRNAs estáveis e provavelmente de uma subpopulação de mRNAs instáveis (Clayton e Shapira, 2007).

Com relação à tradução e à sua regulação nesses organismos, pouco é sabido. Nos eucariotos superiores a etapa da síntese proteica mais regulada é a iniciação, catalisada pelos fatores de iniciação eucarióticos (eIFs – *eukaryotic initiation factors*) (Haile e Papadopoulou, 2007). Dentre esses fatores, destaca-se o complexo eIF4F que será discutido um pouco mais adiante.

2.1.5.5 Fosforilação

A fosforilação é o principal meio de regulação da atividade proteica. É também um dos principais mecanismos para a regulação das respostas adaptativas aos sinais intra e extracelulares. Muitas vias de sinalização celular são moduladas através da atividade antagonista de quinases e fosfatases que controlam vários processos como vias metabólicas, comunicação intercelular, crescimento e proliferação celular e transcrição gênica. Nos tripanossomatídeos não é diferente e muitas mudanças no padrão de fosforilação proteica durante o ciclo de vida desses parasitas têm sido descritas (Dell e Engel, 1994; Aboagye-Kwarteng *et al.*, 1991).

As proteínas quinases são mediadores de transdução de sinal, transmitindo os sinais ambientais para a célula e coordenando os processos intracelulares. Proteínas quinases eucarióticas (ePKs) são classificadas pela sequência de aminoácidos dos seus sítios catalíticos. De maneira geral, as ePKs são divididas em duas super-famílias: serina/treonina quinases e tirosina quinases (Miranda-Saavedra e Barton, 2007). Com a publicação dos genomas dos TriTryps tornou-se possível a identificação do quinoma desses organismos. A análise genômica revelou 179, 156 e 171 ePKs em *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* respectivamente. Esses números sugerem que a fosforilação realmente consiste em um importante mecanismo de regulação celular nos três tripanossomatídeos e são consideravelmente maiores do que os descritos para outros parasitas unicelulares (Parsons *et al.*, 2005).

Já as proteínas fosfatases são tradicionalmente classificadas de acordo com a preferência pelo substrato, incluindo serina/treonina fosfatases (STP), tirosina fosfatases (PTP), fosfatases de dupla especificidade (DSP) que desfosforilam fosfoserinas, fosfotreoninas e fosfotirosinas, fosfatases de lipídeos (PTEN) e tirosina fosfatases de baixo peso molecular (LMW-PTP) (Wolstencroft *et al.*, 2006). Nos TriTryps, 252 fosfatases

foram identificadas: 86 em *T. cruzi*, 78 em *T. brucei* e 88 em *L. major*. Os três kinetoplastídeos têm representantes das principais famílias de fosfatases: STPs, PTPs, DSPs e PTEN. Fosfatases atípicas e específicas dos kinetoplastídeos, em relação ao total de fosfatases, são 36% em *T. cruzi*, 39% em *T. brucei* e 41% em *L. major*, a maior parte pertencente às subfamílias STP e DSP. A característica mais marcante é a pequena proporção de PTPs presente no fosfatoma dos TriTryps quando comparados a outros eucariotos. A pequena proporção de PTPs, junto com a grande proporção de STPs e fosfatases atípicas e específicas sugere que os mecanismos mediados por fosforilação nesses parasitas pode ter uma ênfase diferente da dos vertebrados. (Brenchley *et al.*, 2007).

Quanto às proteínas alvo de fosforilação nos tripanossomatídeos, um estudo recente analisou por espectrometria de massa 491 proteínas fosforiladas da forma sanguínea de *T. brucei* para, dentre outros, identificar sítios de fosforilação. A maioria dos sítios foi detectada nos resíduos serina (75%) e treonina (21,5%), e em menor proporção nos resíduos de tirosina (3,5%) (Nett *et al.*, 2009). Em *T. cruzi*, 753 proteínas fosforiladas foram analisadas, encontrando 1.494 peptídeos não-reduntantes fosforilados nos resíduos serina (84.1%), treonina (14.9%) e tirosina (1.0%) (Marchini *et al.*, 2011).

2.2. Síntese Protéica (Tradução) nos Eucariotos

A tradução da informação contida nos nucleotídeos do mRNA em aminoácidos nas proteínas resultantes consiste em um processo complexo de múltiplas etapas altamente reguladas, que envolve centenas de proteínas (Alberts *et al.*, 2008). Este processo pode ser dividido em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem do ribossomo. De forma geral, na iniciação o ribossomo se liga ao códon iniciador no mRNA com o metil-tRNA iniciador ligado em seu sítio peptidil (P). No alongamento, os aminoacil-tRNAs entram no sítio aceptor (A) onde ocorre o pareamento com o códon. Se o tRNA é o correto, o ribossomo catalisa a formação da ligação peptídica. Então, os tRNAs e o mRNA são translocados de forma que o próximo códon seja movido para o sítio A, onde o processo é repetido. A terminação acontece quando o códon de parada é encontrado e o peptídeo é liberado do ribossomo. Na última etapa, a reciclagem, as subunidades ribossomais são dissociadas, liberando o mRNA e o tRNA desacetilado (Kapp e Lorsch, 2004)

A etapa mais complexa e regulada da síntese proteica é a de iniciação sendo esta também a etapa onde mais são encontradas diferenças entre grupos distintos de

organismos vivos. Por ser o alvo desse estudo, esta etapa será discutida mais detalhadamente a seguir, com ênfase no complexo de iniciação da tradução eIF4F.

2.2.1. Iniciação da Tradução

A iniciação da síntese protéica nos eucariotos é um processo complexo de múltiplos estágios que requer a participação de pelo menos onze dos chamados fatores de iniciação eucarióticos (eIFs de *eukaryotic Initiation Factors*). A iniciação da tradução no mecanismo *cap* dependente (Figura 9) começa com a formação do complexo ternário entre o Met-tRNA_i e eIF2-GTP. O complexo ternário então se associa com a subunidade menor ribossomal (40S) e essa ligação é facilitada pelos fatores eIF1 e eIF1A, que alteram a conformação da subunidade 40S, e pelo eIF3, completando a formação do novo complexo chamado de 43S (Malys e McCarthy, 2011).

O reconhecimento dos mRNAs para a tradução se dá por sua vez pela ação do complexo eIF4F (eIF4G, eIF4A e eIF4E), que se liga ao *cap* destes através da subunidade eIF4E. O eIF4F também desfaz estruturas secundárias na região 5' não traduzida (5'-UTR) dos mRNAs pela atividade de uma helicase dependente de ATP, o eIF4A, cuja ação é estimulada por proteínas de ligação ao RNA como o eIF4B e, em mamíferos, o eIF4H. A principal função do eIF4F, junto com o eIF3, é direcionar o mRNA para o complexo 43S (Lorsch e Dever, 2010). Já a proteína de ligação a poli(A) (PABP - *Poly(A) Binding Protein*) estimula a iniciação da tradução pela ligação simultânea a cauda poli(A) na região 3' do mRNA e ao eIF4F, o que permite a circularização do mRNA. Isso não só facilita a reinicialização da tradução pelo mesmo ribossomo, como aumenta a afinidade de ligação do eIF4F ao *cap* (Kahvejian *et al.*, 2005).

Uma vez ligado ao mRNA, o complexo 43S se desloca pelo mesmo no sentido 5' para 3', procurando pelo códon iniciador da tradução. Esse processo requer hidrólise de ATP, embora as ATPases envolvidas não tenham sido identificadas. O reconhecimento do códon iniciador nos eucariotos é influenciado pelos nucleotídeos que o flanqueiam, como a sequência de Kozak GCC(A/G)CCAAUGG (na qual o códon iniciador está sublinhado) que é ótima para se definir o início da sequência a ser traduzida (Pisarev *et al.*, 2008). Quando o códon iniciador correto é encontrado pelo pareamento perfeito entre o Met-tRNA_i ancorado no complexo 43S e o AUG do mRNA, há a parada do deslocamento do ribossomo e a hidrólise irreversível do GTP no eIF2-GTP. Com a liberação do eIF2-GDP e dos outros eIFs, a subunidade maior ribossomal (60S) se junta a subunidade menor para formar o ribossomo completo (80S) pronto para aceitar o

aminoacil-tRNA apropriado no sítio A e sintetizar a primeira ligação peptídica (Pestova; Hellen, 2006).

Figura 9. Iniciação da tradução em eucariotos superiores. Mecanismo *cap*-dependente descrito no texto. eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, e eIF5 são 1, 1A, 2, 3, 4A, 4B, 4E, 4G, e 5. (Adaptado de Malys e McCarthy, 2011)

O complexo heterotrimérico eIF4F é formado pela associação estável de suas subunidades eIF4G, eIF4A e eIF4E, gerando uma estrutura com um peso molecular total de aproximadamente 250 kDa. O eIF4F se liga diretamente a estrutura do *cap* no mRNA, via a subunidade eIF4E, e através da sua subunidade eIF4A desfaz estruturas secundárias na região 5'-UTR do mRNA, facilitando a ligação do ribossomo. O eIF4G é a proteína estruturadora do complexo, interagindo com as outras subunidades do eIF4F e com o complexo multimérico eIF3, que se liga diretamente ao ribossomo. O eIF4G também medeia a interação direta do eIF4F com a PABP (Figura 10) (SONENBERG; DEVER, 2003).

Figura 10. Complexo eIF4F e parceiros funcionais. eIF4G interagindo com eIF4A, eIF4E, eIF3 (ligado a subunidade 40 S) e PAPB (ligada a poli(A)) (Adaptado de LIVINGSTONE *et al.*, 2010).

eIF4G pode recrutar a enzima responsável pelo decapeamento do mRNA, Dcp1, quando há a sinalização para degradação do RNA (Ramirez *et al.*, 2002).

2.2.1.2. eIF4A

O fator eIF4A pertence à família das proteínas denominadas de *DEAD*-box, compartilhando com outros membros desta família a presença de oito motivos de aminoácidos altamente conservados mesmo entre bactérias e humanos. Essas proteínas estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo a iniciação da tradução, biogênese do ribossomo e processamento do mRNA. Como esses polipeptídeos estão implicados em várias funções na célula que requerem que se desfaçam as estruturas secundárias do mRNA, constatou-se que essas proteínas agem como RNA helicases. Isso foi comprovado pelo fato das proteínas *DEAD*-box estudadas *in vitro* exibirem uma atividade dependente de ATP e compartilharem similaridades em suas sequências com as DNA helicases (Rogers *et al.*, 1999).

O eIF4A possui aproximadamente 46 kDa e interage com dois sítios independentes do eIF4G: um na sua região central e outra na C-terminal. Apesar da presença de dois sítios de ligação no eIF4G, somente uma molécula de eIF4A participa do complexo (estequiometria da reação 1:1) (Li *et al.*, 2001). Em mamíferos, existem três proteínas caracterizadas como diferentes isoformas do eIF4A. eIF4A_I e eIF4A_{II} são bastante similares, citoplasmáticas e ambas interagem com o eIF4G, mas têm expressão tecido-específica. A última forma identificada, o eIF4A_{III}, é mais divergente, tem localização nuclear e parece estar envolvida na inibição da tradução (Holzmann *et al.*, 2000).

Outros fatores de iniciação interagem com o eIF4A. O eIF4B é uma proteína dimérica de aproximadamente 70 kDa que não tem atividade catalítica independente e funciona estimulando tanto a ligação ao mRNA quanto a atividade helicase dependente de ATP do eIF4A. Já o eIF4H é uma pequena proteína (25 kDa) que também aumenta a atividade de helicase do eIF4A. eIF4B e eIF4H compartilham similaridade em suas sequências no domínio de reconhecimento ao RNA (RRM - *RNA recognition motif*) (Rogers *et al.*, 2001).

2.2.1.3. eIF4G

O eIF4G é a proteína responsável pela montagem do complexo eIF4F, pois contém um motivo de reconhecimento ao eIF4E (Y-X₄-L-Φ, onde X pode ser qualquer aminoácido e Φ é um aminoácido hidrofóbico), além do sítio de ligação a PABP, na sua região N-terminal e segmentos conservados de ligação ao eIF4A e ao eIF3 nas suas regiões Central e C-terminal (Figura 11) (Marcotrigiano *et al.*, 2001). Os mamíferos possuem duas isoformas do eIF4G (eIF4GI e eIF4GII, 46% de similaridade) com uma região C-terminal adicional (ausente em leveduras) que contém um segundo sítio de ligação ao eIF4A e um segmento que interage com uma quinase do eIF4E, a Mnk1 (Figura 11) (Imataka *et al.*, 1998). Existem também duas isoformas na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que compartilham 53% de identidade (Goyer *et al.*, 1993), dois isotipos em plantas (eIF4G e isoeIF4G) (Browning, 1996), e somente uma isoforma em *Drosophila melanogaster* (Hernández *et al.*, 1998).

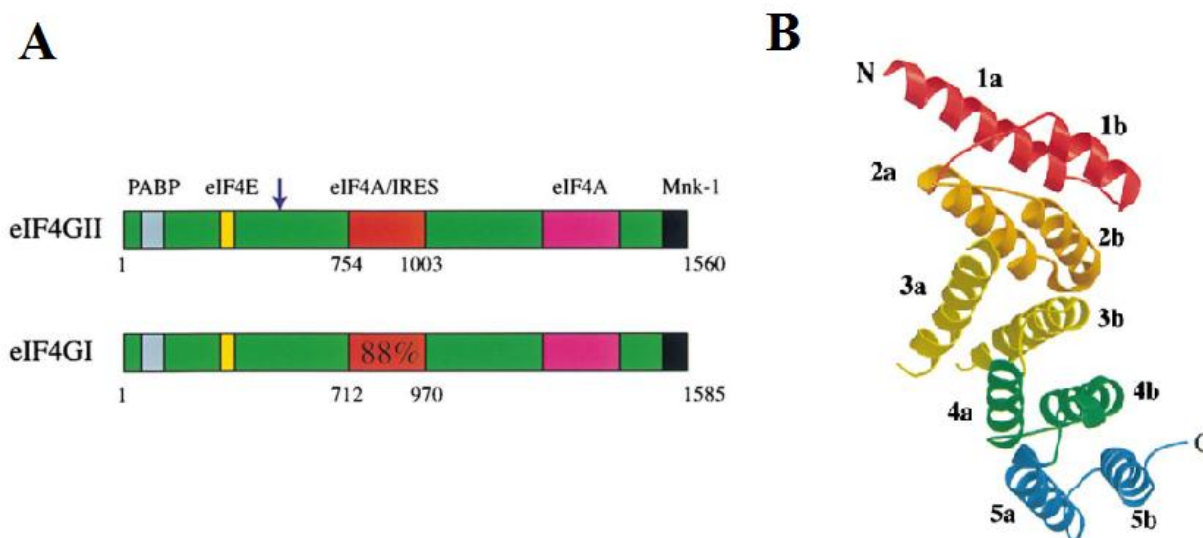


Figura 11. eIF4G: sítios de ligação e estrutura. A. Alinhamento esquemático das isoformas eIF4GI e eIF4GII de humanos, mostrando os motivos de interação conservados: PABP (azul), eIF4E (laranja), eIF4A/IRES (vermelho, central), eIF4A (rosa, C-terminal), Mnk-1 (preto). A similaridade do domínio de ligação ao eIF4A/IRES está representada em percentagem. Um sítio de clivagem por proteases virais e celulares está apontado pela seta. **B.** Estrutura do domínio de ligação ao eIF4A/IRES do eIF4GII. (Adaptado de Marcotrigiano *et al.*, 2001)

O eIF4G celular possui dois sítios de clivagens por proteases específicas celulares e virais, pelas quais ele pode ser clivado em três subprodutos, N- e C-terminal e domínio central, o que leva a sua degradação (Prévôt *et al.*, 2003). Condições virais e não-virais podem levar a degradação do eIF4G, dentre elas privação de nutrientes ou interrupção na

via de transdução de sinal TOR. Essas condições de estresse celular que causam a separação do eIF4G, levam ao bloqueio da tradução *cap*-dependente e ao consequente estímulo da tradução via mecanismos *cap*-independentes (Keiper *et al.*, 1999).

2.2.1.4. eIF4E

O fator de iniciação eucariótico 4E (~ 25kDa) é a proteína de reconhecimento do *cap* presente na região 5' do mRNA e medeia a associação do eIF4F com o mRNA para estimular o mecanismo de iniciação da tradução *cap*-dependente no citoplasma (Sonenberg e Gingras, 1998). Três isoformas do eIF4E foram identificados no mamífero *Mus musculus* (eIF4E-1, 4EHP e eIF4E-3) (Joshi *et al.*, 2004), assim como na planta *Arabidopsis thaliana* (eIF4E, eIFiso4E e nCBP) (Ruud *et al.*, 1998), duas na levedura *Schizosaccharomyces pombe* (eIF4E-1 e eIF4E-2) (Ptushkina *et al.*, 2001), três em *Homo sapiens* (eIF4E1-2 e 4EHP) (Rom *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998) enquanto *Caenorhabditis elegans* contém cinco isoformas (Keiper *et al.*, 2000).

As proteínas pertencentes à família eIF4E apresentam alto conteúdo de resíduos de triptofano. Alguns estão envolvidos na ligação ao *cap* e ao eIF4G e estes foram utilizados para dividir os homólogos ao eIF4E em três classes distintas de acordo com os resíduos correspondentes ao W-43 e W-56 do eIF4E-1 de *H. sapiens*. Os membros da Classe I contêm triptofano em ambas as posições e ligam-se ao *cap*, eIF4G e eIF4E-BPs em mamíferos. Já os membros da Classe II contêm tirosina, fenilalanina ou leucina na primeira posição e tirosina ou fenilalanina na segunda e ligam-se somente ao *cap* e eIF4E-BP. Os membros da Classe III contêm triptofano na primeira posição e cisteína ou tirosina na segunda posição e ligam-se somente ao *cap* e eIF4G (Joshi *et al.*, 2004).

Com relação ao reconhecimento do *cap* pelo eIF4E, este é feito em duas etapas onde a cadeia 5'-fosfato é a âncora primária para o eIF4E. A primeira etapa da ligação é realizada pelo contato específico dos três grupos fosfato do *cap* com três aminoácidos básicos no domínio de ligação ao *cap* do eIF4E (Niedzwiecka *et al.*, 2002). A porção m⁷G da estrutura do *cap* é então “empilhada” entre duas cadeias aromáticas de triptofano, uma interação estabilizada por duas pontes de hidrogênio (Figura 12) (Brown *et al.*, 2007). Dois resíduos de triptofanos conservados no eIF4E, W-43 e W-73, são importantes para a ligação com o eIF4G. O W-73 é encontrado dentro de uma sequência filogeneticamente conservada (S/T)V(e/d)(e/d)FW. A substituição do W-73 por um aminoácido não-aromático faz com que o eIF4E perca a habilidade de interagir com o eIF4G ou com 4E-BP (Rhoads *et al.*, 2007).

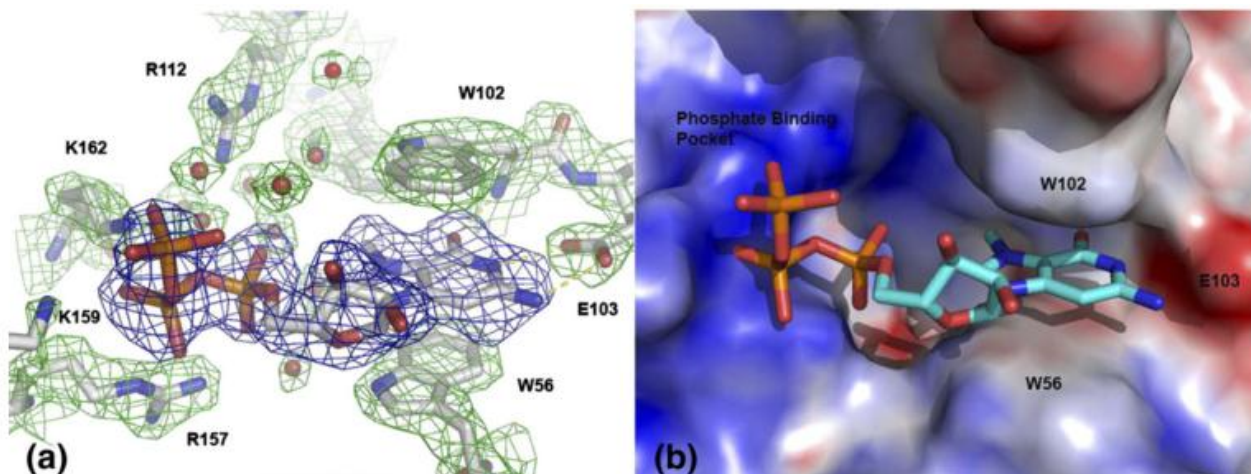


Figura 12. Densidade eletrônica (a) e superfície eletrostática (b) do m⁷GTP ligado ao eIF4E de murinos. O m⁷G do *cap* forma pontes de hidrogênio (pontilhado em amarelo) com a cadeia interna do E103 e o esqueleto amino do W102. A região ligadora de fosfato (*phosphate binding pocket*) tem carga positiva enquanto a região em se encontra inserido o m⁷G é hidrofóbica. A porção m⁷G forma uma pilha paralela com os resíduos W56 e W102. (Adaptado de Brown *et al.*, 2007)

Além do eIF4G, outros parceiros funcionais do eIF4E têm sido identificados, como as proteínas das famílias das 4E-BPs (4E *binding proteins*), os principais reguladores da atividade do eIF4E. Em mamíferos estão presentes três isoformas destas: 4E-BP1 e 4E-BP2, expressas na maioria dos tecidos, e 4E-BP3 de expressão mais restrita (Poulin *et al.*, 1998). A ligação das 4E-BPs ao eIF4E é regulada pelo estado de fosforilação das primeiras: as formas hipofosforiladas das 4E-BPs ligam o eIF4E e previnem a interação eIF4E-eIF4G, dificultando a tradução *cap*-dependente; já as formas hiperfosforiladas liberam o eIF4E possibilitando a interação com eIF4G (Gingras *et al.*, 1999). eIF4G e 4E-BP se ligam na superfície dorsal do eIF4E, oposta ao sítio de ligação ao *cap*, e suas ligações são mutuamente exclusivas (Figura 13) (Marcotrigiano *et al.*, 1999). Alguns outros parceiros do eIF4E incluem: 4E-T (*eIF4E-transporter*) que transporta o eIF4E para o núcleo, p20 que inibe a tradução *cap*-dependente em *S. cerevisiae*, Lipoxigenase 2 que compete pelo sítio de ligação do eIF4E ao eIF4G, Maskin que inibe a tradução de mRNAs que contém CPE em *Xenopus laevis* e Cup que reprime a tradução dos mRNAs *nanos* e *oskar* no desenvolvimento de *D. melanogaster* (Rhoads, 2009).

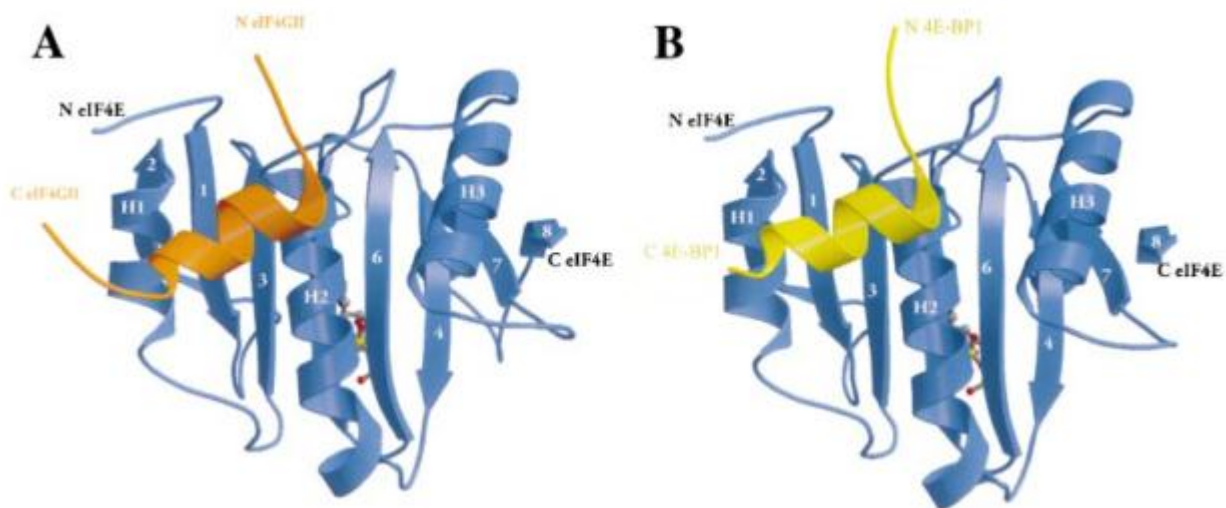


Figura 13. Estruturas de dois complexos eIF4E/7-metil-GDP/eIF4G ou 4E-BP em murinos. eIF4E (azul) liga o 7-metil-GDP (centro, cinza e vermelho) no sítio de ligação ao *cap* na face convexa do eIF4E. **A.** O peptídeo eIF4GII (laranja) forma uma estrutura em forma de L que interage com o N-terminal do eIF4E e duas das três longas α -hélices (H1 e H2) na face côncava. **B.** O peptídeo 4E-BP1 (amarelo) adota uma conformação muito semelhante ao ligar o eIF4E (Adaptado de Marcotrigiano *et al.*, 1999)

A atividade do eIF4E também é modulada diretamente por fosforilação. O estado de fosforilação do eIF4E está positivamente correlacionado com a tradução e o crescimento celular. Tem sido reportado que a fosforilação do eIF4E aumenta a sua afinidade pelo eIF4G e pelo *cap*. O principal aminoácido fosforilado no eIF4E é a serina, especialmente a Ser-209 (Whalen *et al.*, 1996), embora tenha sido demonstrado que essa fosforilação não seja necessária para que o eIF4E exerça sua função na síntese protéica (McKendrick *et al.*, 2001). A quinase responsável pela fosforilação do eIF4E em mamíferos é a Mnk1, que se liga ao eIF4G e regula a atividade do eIF4E (Pyronnet *et al.*, 1999)

O eIF4E participa em outros processos celulares além da iniciação da tradução. São atribuídas a esse fator as funções de transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma, sequestro de mRNAs instáveis bem como a estabilização do mRNA, protegendo-o da degradação no citossol (Strudwick e Borden, 2002).

2.3. Iniciação da Tradução em Tripanossomatídeos

Alguns avanços têm sido feitos na compreensão do processo de iniciação da tradução nos tripanossomatídeos. Em *L. major* e *T. brucei* foram identificados inicialmente vários possíveis homólogos dos fatores de iniciação eucarióticos canônicos componentes do complexo eIF4F: dois para o eIF4A (eIF4AI e III, com o prefixo *Lm* ou *Tb* de acordo

com o organismo onde se encontram), cinco para o eIF4G (eIF4G1 a 5), e quatro para o eIF4E (eIF4E1 a 4) (Dhalia *et al.*, 2005). A caracterização dos homólogos de eIF4A, a partir de estudos com *T. brucei*, revelou que o EIF4AI é o homólogo envolvido na iniciação da tradução, uma vez que sua localização é citoplasmática e sua depleção por RNAi leva à inviabilidade do parasita e à inibição da síntese proteica. Já o EIF4AIII, embora essencial para a célula, têm localização nuclear e não parece estar relacionado a síntese proteica, estando provavelmente implicado em mecanismos de processamentos dos mRNAs (Dhalia *et al.*, 2006).

De uma forma geral, quando comparados a outros eucariotos, e especial os unicelulares, o número de homólogos de eIF4E e eIF4G encontrados nos tripanosomatídeos é bastante elevado, podendo indicar que a iniciação da tradução é mais complexa nesses organismos (Dhalia *et al.*, 2004). Com relação aos homólogos de eIF4G, foram encontrados indícios que ao menos os EIF4G3 e 4 estão mais diretamente envolvidos com o processo de síntese proteica. Sabe-se que, em *L. major*, o homólogo *LmEIF4G3* interage com *LmEIF4E4*, *LmPAPB1* e *LmEIF4AI*, enquanto que *LmEIF4G4* interage com *LmEIF4E3* e também com *LmPAPB1* e *LmEIF4AI*, formando dois possíveis complexos de iniciação da tradução do tipo eIF4F (Figura 14) (Reis, 2009). Em *T. brucei* foram observadas as mesmas interações, indicando a conservação evolutiva do processo nos tripanossomatídeos, mas uma interação entre o *TbEIF4G3* e o *TbEIF4E3* também foi observada, que parece ser exclusiva dessa espécie (Freire, 2010). Ambos os *TbEIF4G3* e 4 são citoplasmáticos e as suas depleções por RNAi causam a perda de viabilidade celular, de forma bastante rápida para o *TbEIF4G3* e com inibição da síntese protéica (Moura, 2011). No que concerne aos EIF4G1, 2 e 5, pouco se sabe a seu respeito mas chama a atenção o fato de apresentarem considerável diferença de tamanho quando comparados aos demais homólogos de eIF4G (*TbEIF4G1*: 1119 aa, *TbEIF4G2*: 879 aa, *TbEIF4G3*: 623 aa, *TbEIF4G4*: 698 aa e *TbEIF4G5*: 750 aa). Até o momento se sabe que são todos de localização citoplasmática e o RNAi dos *TbEIF4G2* e 5 inviabiliza as células procíclicas de *T. brucei* (LIMA, 2009; LIMA, comunicação pessoal).

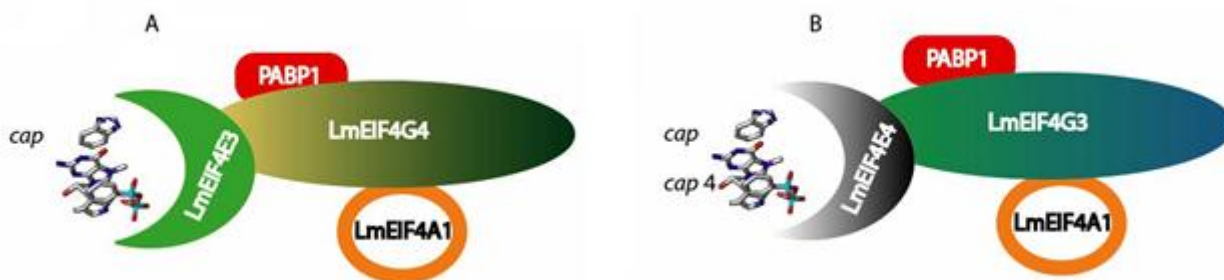


Figura 14. Representação dos possíveis complexos homólogos ao eIF4F nos tripanossomatídeos. A. *LmEIF4G4* com o *LmEIF4A1*, *LmEIF4E3* e *LmPABP1* **B.** *LmEIF4E4* com *LmEIF4G3*, *LmEIF4A1* e *LmPABP1*. (Adaptado de Freire, 2010)

Em *Leishmania*, o primeiro homólogo da proteína de ligação ao *cap* identificado e caracterizado foi o *LeishEIF4E1* (*LmEIF4E1*), que possui localização citoplasmática e demonstrou ser capaz de se ligar a análogos da estrutura *cap*, principalmente no *cap* monometilado (m^7GTP) e no tetrametilado (*cap* 4), característico dos tripanossomatídeos (Yoffe *et al.*, 2004). Posteriormente, Yoffe *et al.*, 2006 descreveram as isoformas *LeishEIF4E1-4* (*LmEIF4E1-4*) quanto a afinidade pelo *cap* e *cap* 4: somente *LeishEIF4E1* e 4 são capazes de ligar as duas formas do *cap*, enquanto que *LeishEIF4E2* se liga ao *cap* 4 e *LeishEIF4E3* interage somente com o *cap* monometilado. Em *T. brucei* os homólogos *TbEIF4E1-4* foram divididos em duas classes distintas: uma classe não envolvida na tradução (*TbEIF4E1-2*) e outra classe envolvida nesse processo (*TbEIF4E3-4*) (Freire *et al.*, 2011). *TbEIF4E1-2* apresentam-se distribuídos por toda a célula e suas depleções isoladas por RNAi não levam a perda viabilidade celular da forma procíclica, embora o duplo-RNAi leve a morte celular. Já *TbEIF4E3-4* são exclusivamente citoplasmáticos, mas somente o RNAi do *TbEIF4E3* leva a morte celular. Entretanto, o duplo RNAi *TbEIF4E1/E4* leva a parada do crescimento celular e inibição da síntese proteica, sem levar à morte imediata. Associados aos dados de interação com as outras possíveis subunidades do eIF4F anteriormente discutidas, *TbEIF4E3* e 4 são acreditados como os homólogos com função mais próxima ao eIF4E canônico.

Com a publicação dos genomas do TriTryps, foram identificados outros dois possíveis homólogos conservados de eIF4E: *LmEIF4E5-6* e *TbEIF4E5* e 6. Embora os quatro primeiros homólogos (eIF4E1-4 de *T. brucei* e *L. major*) estejam num estágio mais avançado de caracterização funcional, estes últimos tiveram a investigação iniciada com a clonagem dos genes em vetores de expressão e a produção de proteínas recombinantes e a anticorpos policlonais anti-*TbEIF4E5-6* (Andrade, 2008). Numa fase preliminar, dados iniciais de quantificação de níveis intracelulares e localização subcelular na fase procíclica

de *T. brucei* também foram obtidos (Nascimento, 2010). Este trabalho dá continuidade a caracterização dessas proteínas, visando identificar sua possível participação na síntese proteica, como parte de complexos do tipo eIF4F, ou em outros processos celulares.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar funcionalmente os homólogos EIF4E5 e 6 de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*.

3.2. Objetivos Específicos

- Investigar a presença de sítios de interação com *cap* e eIF4G pela análise das sequências dos homólogos eIF4E5 e 6 de *T. brucei* e *L. major*;
- Determinar a localização subcelular das proteínas EIF4E5 e 6 em células procíclicas e sanguíneas de *T. brucei*;
- Analisar o fenótipo das células de *T. brucei* na forma procíclica mediante silenciamento gênico das proteínas eIF4E5 e 6;
- Averiguar a presença de modificações pós-traducionais do tipo fosforilação nas proteínas de *T. brucei* e os possíveis sítios-alvo;
- Avaliar a expressão das proteínas eIF4E5 e 6 em *L. major*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Análise das sequências

As sequências analisadas foram obtidas no banco de dados do Gene DB do *Sanger Institute Pathogen Sequencing Unit* (www.genedb.org). Para analisar o grau de similaridade entre as sequências foi utilizada a ferramenta BLASTP no site do *National Center for Biotechnology Information* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Já para identificar possíveis sítios conservados, as sequências proteicas dos homólogos ao eIF4E em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, foram alinhadas utilizando o *software* BioEdit Versão 7.1.3.0 através da ferramenta ClustalW. As sequências do EIF4E humano de *S. cerevisiae* foram utilizadas como *outgroups* do alinhamento (Nº de Acesso GeneDB: P06730 e P07260, respectivamente). Para identificação dos possíveis sítios de fosforilação presentes nas sequências protéicas dos fatores *TbEIF4E5* e *6* foi utilizado o site *PhosTryp – Phosphosite Prediction in Trypanosomatidae* (<http://phostryp.bio.uniroma2.it/>, Acesso em 16/03/2012). Este programa permite ainda o uso de duas representações distintas para identificação dos sítios: a representação binária de padrão ortogonal (menos restritivo) e outra representação com base nos valores de substituição da matriz PAM30 (mais restritivo), levando em consideração ou não a composição do resíduo aminoacídico e estrutura secundária da proteína. (Palmeri *et al.*, 2011)

4.2. Cultivo de *T. brucei* e *L. major* para preparação de extrato proteico e/ou transfecção

As culturas de células de *T. brucei* forma procíclica foram cultivadas a 27°C em meio SDM-79 (LGC) acrescido de soro fetal bovino (10% v/v) e dos antibióticos penicilina e estreptomicina (0,1%, Sigma-Aldrich), para a linhagem selvagem (PCF WT 427). As culturas da forma sangüínea foram cultivadas a 37°C e 5% CO₂ em meio HMI-9 (Sigma-Aldrich), contendo soro fetal bovino (10% v/v) e os antibióticos penicilina e estreptomicina (0,1%) para linhagem selvagem (BSF WT 427). Para a linhagem procíclica utilizada para transfecção (PCF 29-13) foram adicionados ao meio SDM-79 os antibióticos Neomicina (15 µg/mL, GIBCO), Higromicina (25 µg/mL, Invitrogen) para sua manutenção em cultivo.

Em todos os casos o crescimento celular foi monitorado por contagem em câmara de Neubauer. Células de *L. major* da linhagem celular Friedlin, foram cultivadas em meio Schineider (Sigma-Aldrich), adicionado de soro fetal bovino (10% v/v), penicilina e estreptomicina (0,1% v/v).

Para a preparação do extrato protéico total, cerca de 25 ml de meio contendo as células em fase de crescimento exponencial foram centrifugadas por 10 minutos a 660 g. O sedimento foi lavado em 12,5ml de PBS (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7.4), novamente centrifugado, e solubilizado em tampão de amostra para SDS-PAGE (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2- mercaptoetanol, 0,02 azul de bromofenol, 0,125 M Tris-HCl, pH 6.8) e fervido por 5 minutos.

4.3. Extração de DNA total de *L. major*

Para a extração de DNA, células em fase logarítmica de *L. major* foram inicialmente coletadas por centrifugação a 2150 g por 10 minutos a 4°C em tubo Falcon e em seguida lavadas com tampão PBS e centrifugadas nas mesmas condições novamente. As células lavadas foram ressuspensas em tampão GTE (EDTA 10 mM, Tris-HCl pH 8,0, 25 mM e glicose 50 mM) e incubadas com 500 mL de SDS 10% e 100 mL de Proteinase K (10 mg/mL) a 45°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de fenol da solução Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (28:24:1, v/v, pH 8,0) e a solução foi homogeneizada por inversão durante 2 minutos, seguindo nova centrifugação a 2150 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente recuperado para novo tubo Falcon e a extração com fenol descrita anteriormente foi repetida. Após recuperação do sobrenadante a partir da segunda extração com fenol, foram adicionados 500 µL de acetato de sódio (3 M) e 5 mL de isopropanol 100% e foram misturados levemente. O sobrenadante, adicionado de acetato e isopropanol, foi mantido a -20°C por 10 minutos e depois centrifugado a 10600 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 2 minutos a 10600 g e o precipitado seco a temperatura ambiente. O sedimento seco foi ressuspendido em 500 µL de TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) e transferido para um microtubo eppendorf. Foram então adicionados 550 µL de Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, misturado por inversão por 1 minuto e centrifugado a 2150 g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado a este 550 µL de clorofórmio da solução de Clorofórmio hidratado (1:1, v/v, de clorofórmio e água) e foi misturado por inversão por 1 minuto e centrifugado a 2150 g por 3 minutos. Ao

sobrenadante recuperado foi adicionado 50 µL de acetato de sódio 3 M e 1 mL de etanol absoluto e, após homogenização, esse foi mantido a –80°C por no 20 minutos, seguindo-se centrifugação a 10600 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 100 mL de TE 1:10 e estocado a –20°C. O DNA total extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) para visualização da eficiência da extração e quantificação para emprego nas reações de PCR.

4.4. Procedimentos de amplificação e clonagem no vetor pGEM-T-easy

A reação de PCR dos genes *LmEIF4E5* e 6 foi realizada com a enzima Platinum® Pfx DNA polimerase (Invitrogen 2,5 U/µL), na presença de tampão específico, adicionado de MgSO₄ numa concentração final de 1 mM, 10mM de dNTPs, 10mM de cada *primer* (concentração final de 1,0 µM - Tabela 2) e 1µL de DNA total de *Leishmania major* diluído 1:100. As condições de tempo e temperatura das reações foram: 94°C por 15 segundos para desnaturação, 55°C por 30 segundos para anelamento e 1 minuto para a extensão a 68°C. Os fragmentos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) para visualização da eficiência e especificidade da reação.

Tabela 2. Primers utilizados para a amplificação dos genes *LmEIF4E5* e 6 com os respectivos sítios de restrição.

Genes	Primers	Enzima de restrição
<i>LmEIF4E5</i>	5'- TCTGGATCCATGGGAATGAAGAGCGCAACGAT	<i>BamH</i> I (sublinhado)
	3'- TCTGCGGCCGCATCCTTCACCATAGGCGG	<i>Nco</i> I (itálico)
<i>LmEIF4E6</i>	5'- TCTGGATCCATGGCAGATAGCAATCCC	<i>BamH</i> I (sublinhado)
	3'- TCTGCGGCCGCCTTGAACGGGCGAGCGCT	<i>Nco</i> I (itálico)

Os fragmentos amplificados foram submetidos à purificação utilizando o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) conforme orientação do fabricante. Depois de purificados, os fragmentos foram tratados para adição de adeninas às extremidades livres, utilizando a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity

(Invitrogen, 5U/ μ L). Na reação foram utilizados 5 μ L do fragmento obtido na PCR, 1 μ L do dATP 2mM, 5 μ L do tampão específico 10X, 2 μ L da solução MgSO₄ 50mM e 0,2 μ L da enzima, completando-se o volume final para 50 μ L. A reação ocorreu por 20 minutos a 72°C. Após o tratamento, o DNA resultante foi precipitado utilizando NaCl 3M e etanol absoluto e submetido à ligação com o plasmídeo pGEM®-T-easy (Promega) segundo protocolo do fabricante. A reação consistiu de 5 μ L do tampão específico 2X, 1 μ L do vetor pGEM®-T-easy, 2 μ L do fragmento de PCR tratado, 1 μ L da enzima T4 DNA ligase, completando a reação para o volume final de 10 μ L. A reação ocorreu a 4°C por 16 horas. Após a ligação, foi realizada a transformação por choque térmico em células competentes DH10B de *E. coli*. As células transformadas foram semeadas em placas contendo LB-ágar-ampicilina adicionadas de 100 μ L de IPTG 100mM e 20 μ L de X-Gal 50mg/ml, sendo incubadas por 18h a 37° C. Algumas das colônias brancas crescidas nas placas foram inoculados em 2 ml de meio LB contendo ampicilina, crescidos a 37°C por 18 horas e submetidos a minipreparações para extração de DNA (Sambrook e Russell, 2001). Estas minipreparações plasmídicas foram confirmadas por digestão e sequenciamento, e aquelas que continham os insertos esperados foram transformadas em células competentes DH10B de *E. coli* para posterior extração de DNA plasmidial em larga escala por maxipreparação (Sambrook e Russel, 2001).

4.5. Mutagênese sítio-dirigida

Para abolir os sítios de restrição das enzimas *Hind* III e *Bam*H I do gene TbEIF4E5 clonado no vetor pGEM-T-easy foram submetidos a reações de mutagênese sítio-dirigida utilizando o Kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene®), utilizando os primers listados (Tabela 3). A mutagênese sitio-dirigida foi realizada numa reação contendo: 5 μ L de tampão de reação 10 vezes concentrado, 5 μ L da construção TbEIF4E5-pGEM-T-easy (6 μ g/ μ L - 30 μ g), 5 μ L do oligonucleotídeo 1 (25 μ g/ μ L - 125 μ g), 5 μ L do oligonucleotídeo 2 (25 μ g/ μ L -125 μ g), 1 μ L de dNTPs (Stratagene®), 28 μ L de água deionizada e 1 μ L de DNA polimerase PfuUltra HF (2.5U/ μ L). As condições utilizadas na reação de PCR foram: 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 68°C por 1 minuto (14 ciclos). Após a reação, 10 μ L de cada amplificação foram resolvidos em gel de agarose 0.8%, contendo SYBR® Safe (Invitrogen), e visualizados em transiluminador UV. Em seguida, as reações foram digeridas com 1 μ L da enzima *Dpn* I (10 U/ μ L, New England Biolabs) a 37°C/1h, que digere os plasmídeos não-mutagenizados. Bactérias XL1-Blue

eletrocompetentes, previamente preparadas em nosso laboratório, foram transformadas com 1-5 µL das reações de mutagênese (tratadas com Dpn I) através de um choque elétrico de 2kV. Após a descarga elétrica, as bactérias foram inoculadas em 1 ml de meio SOC por 1 hora (para recuperação) e semeadas em placas contendo LB sólido com ampicilina (100 µg/ml, Sigma-Aldrich). Clones transformantes oriundos da mutagênese, foram processados como descrito no item anterior para confirmar a presença das mutagêneses desejadas.

Tabela 3. Primers utilizados para mutagêneses sítio-dirigidas do gene *TbEIF4E5*.

Sentido	Primers	Sítio Mutagenizado
Forward	GCTGCTTTCCAAGTATGCAGTTTCGGCCAACGAATTTAAGG	<i>Hind</i> III
Reverse	CCTTAAATTCGTTGCCGAAACTGCATCAGTTGGAAAGAGC	<i>Hind</i> III
Forward	CTCACAAACCAGGGATCTTTCAACGCGTGAAGTCTC	<i>Bam</i> H I
Reverse	GAGAGTCACGCGTTGAAAGATCCCTGGTTTGTGAG	<i>Bam</i> H I

4.6. Subclonagem de genes selecionados em vetores diversos

Alíquotas de 10µg dos plasmídeos pGEMT-easy-*TbEIF4E5* (mutagenizado) e pET2171-*TbEIF4E6* (já disponível) foram digeridas por 8h a 37°C com as enzimas *Hind* III e *Bam*H I (2µl de cada, New England Biolabs) para recuperar os genes *TbEIF4E5* e *TbEIF4E6*. Da mesma forma os vetores plasmidiais p2216, p2t7-177 e p2477 também foram linearizados por digestão com as mesmas enzimas. Após as digestões os diferentes fragmentos foram purificados com kit *illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). Ambos os genes foram subclonados nos diferentes vetores via ligação com a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), por incubação de 20h a 16°C. As diferentes reações de subclonagem foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* DH5α quimicamente competente para serem processadas por mini e maxi preparações de DNA plasmidial e análise da presença dos respectivos insertos como descrito anteriormente. Procedimento similar foi utilizado para se subclonar os genes *LmEIF4E5* e 6, recuperados do plasmídeo pGEM-T-easy por digestão com as enzimas de restrição *Bam*H I e *Not* I e subclonados nos mesmos sítios do vetor pGEX4T3 (GE Healthcare).

4.7. Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Pré-inóculos de células de *E. coli* BL21 transformadas com as construções plasmidiais pET21d-*LmEIF4E5* foram inicialmente preparados em 20 ml de meio LB na presença de ampicilina (100µg/ml) e incubados a 37°C por 18 horas, sob agitação a 160 rpm. O volume dessa cultura foi inoculado em 250 mL de meio LB com ampicilina (100µg/mL), permanecendo em agitação a 37°C até atingir uma OD (densidade óptica) de 0,5 em um comprimento de onda de 600nm. A partir dessa OD, foi acrescentado IPTG (isopropiltiogalactosídeo), na concentração final de 0,1mM quando, após 3h de agitação, a amostra foi centrifugada e ressuspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE. Dessa suspensão foi retirada uma alíquota de 10µL, que foi fracionada em gel de poliacrilamida 20%, e o resultado pode ser visualizado após coloração do gel com Comassie Blue R-250.

4.8. Transfecção de *T. brucei*

Culturas de parasitas foram monitoradas por microscopia de luz a cada 24 horas até atingirem a fase logarítmica de crescimento (10^6 – 10^7 células/ml), ideal para a transfecção estável. Alíquotas de 2×10^7 células de culturas procíclicas (PCF 29-13) foram incubadas em meio de eletroporação Cytomix (75% Cytomyx: 120mM KCl; 0,15mM CaCl_2 ; 10mM K_2HPO_4 ; 25mM HEPES 2mM EDTA; 5mM MgCl_2 ; pH 7,6/ 25% Tampão Fosfato-Sacarose: 277mM sacarose; 7mM KH_2PO_4 , titulada com K_2HPO_4 ; 1mM MgCl_2 , pH 7,4) com 20µg de DNA da construção plasmidial desejada, previamente linearizada por digestão com enzima *Not* I (New England Biolabs).

Os parasitas foram transfectados em eletroporador para células eucarióticas BTX ECM 830 (Genotronics), por três pulsos elétricos nas condições de 1,5 Kv, 100 µseg de amplitude e 200 mseg de duração de pulso e 10 seg de intervalo entre os pulsos. Os parasitas transformantes PCF 29-13 foram selecionados por 15 dias em 10 ml de meio SDM-79 auto-condicionado (Archer, 2009) suplementado com Higromicina (25 µg/mL), Neomicina (15 µg/mL) e Fleomicina (2,5 µg/mL). Após a seleção as culturas transfectadas foram expandidas em meio SDM-79 suplementado com Higromicina (25 µg/mL), Neomicina (15 µg/mL) e Fleomicina (1 µg/mL).

4.9. Procedimentos de superexpressão de proteínas de fusão e RNAi em *T. brucei*

Alíquotas de células transfectadas com as construções p2216-*TbEIF4E5-6* ou *TbEIF4E5-6-p2477* tiveram a superexpressão das proteínas de fusão induzidas pela adição de tetraciclina (1,0 µg/mL) por 24 a 48 horas. Extratos proteicos das culturas induzidas e não induzidas foram feitos para confirmação da superexpressão através de ensaios de *western blot*. Para isso alíquotas correspondentes à concentração de 2×10^6 células foram ressuspensas em tampão L2X, fracionadas em gel SDS-PAGE e transferidas para membrana PVDF. Para analisar a localização intracelular dos homólogos ao *TbEIF4E5* e 6 fusionados a EYFP em *T. brucei*, alíquotas de 5×10^6 células induzidas com tetraciclina foram lavadas com tampão PBS e incubadas a 4°C por 5 minutos. As células foram então analisadas em microscópio confocal TCPS SP2 AOBS – Leica Microsystems®.

Para os experimentos de RNAi, células transfectadas com as construções no p2t7:177 foram induzidas pela adição de tetraciclina (1 µg/mL) e mantidas juntamente com culturas controle não induzidas. O experimento foi feito com células mantidas em dois meios de cultura diferentes: SDM-79 (Brun e Schonenberger, 1979) e SM (Cunningham, 1977). O crescimento das culturas e alterações fenotípicas foram monitoradas a cada 24 horas por contagem de células em câmara de *Newbauer* (utilizadas para plotar curvas de crescimento) e alíquotas das culturas referentes à 2×10^7 células foram retiradas a cada dia para confirmação do efeito de RNAi por ensaios de *western blot*.

4.10. Purificação de fosfoproteínas

Este procedimento foi realizado utilizando-se o sistema *PhosphoProtein Purification Kit* (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Inicialmente, uma alíquota da cultura de 2×10^8 células da forma procíclica de *T. brucei* foi centrifugada a 2650 g a 4°C e lavada com HEPES 50 mM pH 7,0. O sedimento foi ressuspensado em 5 ml de tampão de lise (25 mM MES, 1M NaCl, 0.25% CHAPS) contendo inibidores de proteases e a nuclease benzonase e então incubado por 30 minutos a 4°C, sendo brevemente agitado a cada 10 minutos. Após o período de incubação, o lisado celular foi centrifugado a 10.000 g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração protéica foi determinada através do método de Bradford. Após o equilíbrio da coluna de

purificação de fosfoproteínas, um volume de lisado contendo 0,1 mg/mL foi passado pela mesma permitindo que todas as proteínas fosforiladas ficassem retidas na coluna de afinidade. Em sequência a coluna foi lavada com tampão de lise e a fração não-ligada foi coletada e armazenada para avaliar a eficiência da purificação e para análise das proteínas não fosforiladas. Para obtenção da fração protéica fosforilada foram realizadas quatro eluições utilizando o tampão de eluição de fosfoproteínas (fosfato de potássio 50 mM e NaCl 50 mM) (Figura 15). A concentração protéica de todas as eluições foi determinada através do método de Bradford, e amostras das eluições e da fração não-ligada foram fracionadas em SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF para detecção das proteínas de interesse através de ensaios de *western blot*.

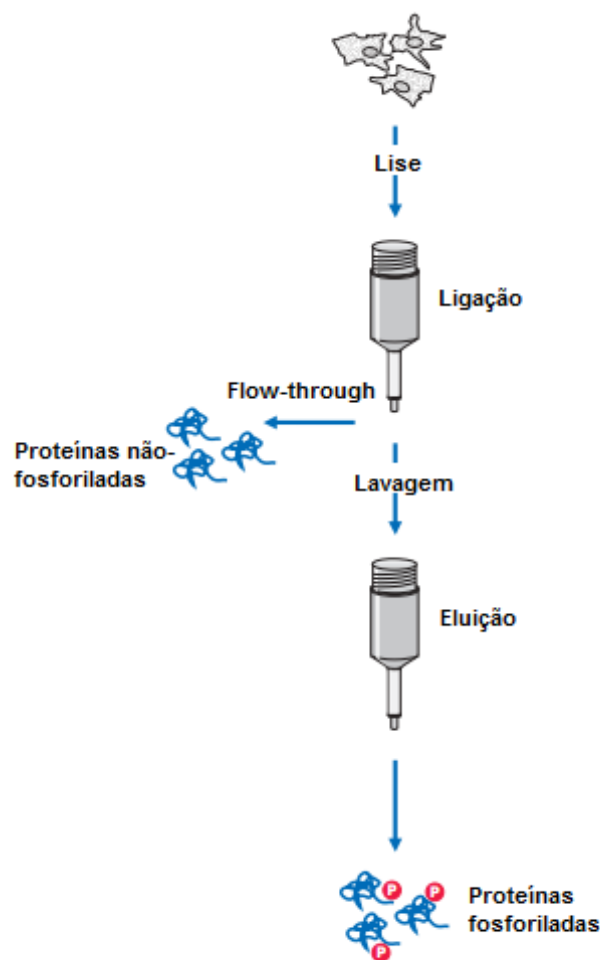


Figura 15. Esquema do protocolo de purificação de fosfoproteínas. As células são submetidas à lise, ligação na coluna que é posteriormente lavada e as fosfoproteínas são eluídas.

4.11. Fracionamento Celular

Alíquotas de culturas de células procíclicas e sanguíneas de *T. brucei* em fase exponencial contendo 2×10^8 células foram centrifugadas a 2650 g a 4°C por 10 minutos. O sedimento foi lavado com PBS e novamente centrifugado nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensão em 1 ml de tampão de lise (100 mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM HEPES, 10% Igepal, Inibidor de protease) e a suspensão celular incubada no gelo por 15 minutos. Em seguida as células foram submetidas a dois ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido e banho-maria a 37°C, seguido de centrifugação a 10.600 g, a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante, que contém a fração citoplasmática, foi separado do sedimento e ambos conservados a -80°C. Para verificação por *western blot*, alíquotas correspondentes a concentração de 5×10^6 células foram precipitadas com TCA, ressuspensas em tampão L2X, fracionadas em gel SDS-PAGE 20% e transferidas para membrana PVDF.

4.12. Imunização em coelho

Antes da imunização, foram coletados 5 ml de sangue da orelha de coelho New Zealand, após vasodilatação com álcool, que foi utilizado controle pré-imune dos experimentos. Este sangue foi acondicionado a 4°C durante toda noite e posteriormente foi centrifugado a 660 g por 10 minutos a temperatura ambiente, para obtenção do soro, que foi armazenado a -80°C. Cerca de 150µg das proteínas recombinantes (no caso as *LmEIF4E5* e 6) fusionadas a sequência de poli-histidinas foram purificadas por fracionamento por eletroforese em gel SDS-PAGE 20% e, após visualização por coloração com Comassie Blue R-250, excisão dos fragmentos correspondentes às bandas de interesse do gel. Estes fragmentos foram então macerados em sistema duplo de seringas e misturados com 200 µL de adjuvante completo de Freund e 600 µL de PBS. Esta mistura foi inoculada por via subcutânea no dorso de coelhos em múltiplos pontos de aplicação. Nas imunizações seguintes, foi utilizado adjuvante incompleto de Freund. O processo foi composto de cinco imunizações, com intervalo de quinze dias entre cada uma delas. O soro obtido foi testado em ensaios de *western blot* quanto à capacidade de

reconhecer as proteínas recombinantes, e em seguida a proteína nativa em extrato proteico total do parasita.

4.13. Purificação de anticorpos por imunoadsorção

Para a purificação dos anticorpos policlonais específicos a partir dos soros obtidos por imunização em coelhos cerca de 100 µg de proteínas recombinantes foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e transferidos para membrana de transferência de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno, Immobilon-P, Millipore Corporation) e a membrana, após transferência, corada com Ponceau S 0,2% (Sigma-Aldrich) em solução de ácido tricloroacético (1%). As bandas correspondentes às proteínas de interesse foram excisadas da membrana, cortadas em pequenos pedaços e transferidas para tubos eppendorf. Os fragmentos de membrana foram então lavados três vezes com 1 mL de PBS, por 10 minutos cada, e bloqueados com solução de leite 5% em PBS-Tween 20 (PBS adicionado de 0,01% Tween 20) durante 30 minutos a 4°C. A solução bloqueadora foi removida e a membrana lavada rapidamente uma vez com PBS. Foram então adicionados 750 µL do soro obtido da imunização e 500 µL de PBS e os fragmentos de membrana permaneceram incubando por 24 horas, sob agitação constante, a 4°C. Ao término da incubação, os fragmentos de membrana foram então lavados três vezes com 1 mL de PBS-Tween 20 por 10 minutos cada e os anticorpos adsorvidos às membranas foram eluídos com 200 µL de solução de glicina ácida (glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5) por agitação vigorosa durante cinco minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a solução de glicina com os anticorpos eluídos foi recuperada para novo tubo eppendorf e o pH da solução equilibrado pela adição de 20 µL de Tris-HCl (1M, pH 8,0). Os anticorpos purificados obtidos foram estocados a -80°C.

4.14. Ensaio de *western blot*

Para os ensaios de *western blot*, extratos protéicos foram fracionados em gel SDS PAGE 20% e transferidos para membranas de PVDF, as quais, na primeira etapa do *western blot*, sofreram bloqueio em solução de leite 5% em TBS/Tween (20mM Tris, 500mM NaCl, Tween 20 1% pH 7,5) por 1 hora. Posteriormente foram incubadas com os soros/anticorpos purificados contra as diferentes proteínas em estudo, a diluições

variadas, por 1 hora. As membranas, após a incubação, foram lavadas três vezes com TBS/Tween 20 1% por 10 minutos cada. Em seguida, uma nova incubação de 1 hora foi realizada com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho, Jackson Immunoresearch Laboratories), marcado com peroxidase, numa diluição de 1:10.000. Decorrido esse tempo, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBS/Tween 20 1% por 10 minutos. Após as lavagens, as membranas foram banhadas em luminol 1,2 nM (Sigma-Aldrich), iodofenol 0,4 mM (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio 0,03% (Vetec) por 1 minuto para realização da reação de quimioluminescência. Em seguida, foram expostas a um filme de quimioluminescência durante 10 minutos e 1 minuto, respectivamente. O filme foi revelado com solução Dektol (Kodak) por 3 minutos e fixado em solução de ácido acético por 1 minuto.

4.15. Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada utilizando aproximadamente 2×10^6 células das formas procíclicas e sanguíneas em cada reação. As células foram centrifugadas (600g / 25°C / 10 min), lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 3% em PBS 100mM por 10 minutos à temperatura ambiente. A cultura fixada foi novamente centrifugada e alíquotas foram distribuídas em placa já contendo lamínulas revestidas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich). Após 15 minutos, foram feitas as lavagens com PBS-glicina 20mM e a permeabilização com Triton 100x 0,1% (Sigma-Aldrich) por 10 minutos, seguida das lavagens e do bloqueio com PBS-Glicina + BSA 1% por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas com os anticorpos anti-*Tb*EIF4E5 e 6 purificados na diluição de 1:30 por 1h a 37°C. Após lavagens, foram incubadas com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor® 488 (Life Technologies™) diluído 1:500. As lamínulas foram deixadas no escuro por 1h a 37°C e lavadas três vezes com a solução de bloqueio. Para marcação do DNA as células foram incubadas por 10 minutos na presença do DAPI (Sigma-Aldrich). Ainda no escuro, as lamínulas foram lavadas, secas, fixadas em lâminas com 10 µl de Prolong-gold e guardadas protegidas da luz a -20°C. As células foram visualizadas em microscópio confocal TCPS SP2 AOBS – Leica Microsystems® utilizando o programa de microscopia Leica SPII-AOBS.

5. RESULTADOS

5.1. Análise das sequências dos fatores *TbEIF4E5* e 6 e *LmEIF4E5* e 6

Como ponto de partida para este trabalho, as sequências dos seis homólogos de eIF4E de *T. brucei* (Tabela 4) e *L. major* (Tabela 5) foram utilizadas, junto com as sequências dos eIF4E humano e da levedura *S. cerevisiae*, para se fazer uma análise por bioinformática das regiões conservadas destas proteínas, identificando nos EIF4E5 e 6 possíveis sítios de interação com parceiros funcionais como o eIF4G bem como com o *cap* dos mRNAs. Nestas análises sempre se levou em consideração o conhecimento já disponível a respeito das proteínas de mamíferos e de levedura.

Num primeiro momento, todas as sequências foram submetidas ao BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Acesso em 20/03/2012), para identificação da presença do domínio da super-família 4E nos homólogos. Com exceção do fator *TbEIF4E6*, todas as sequências apresentaram o domínio citado claramente identificado. Para dar continuidade, foi feito o alinhamento global das sequências utilizando a ferramenta de alinhamento ClustalW do programa BioEdit versão 7.3.1.0 (Figura 16). Comparando-se com a sequência do eIF4E humano, foram identificadas conservações nos sítios de interação com os parceiros funcionais.

Com relação aos homólogos EIF4E5 e 6 de *T. brucei*, foram localizados dois dos três resíduos envolvidos na primeira etapa da ligação ao *cap* em ambos os fatores: R-112 e K-162 (substituída pelo aminoácido de mesma função química R). Já a R-157 não se apresenta conservada. Os aminoácidos responsáveis pelo empilhamento do *cap*, W-56 e W-102, não apresentam conservação. O primeiro triptofano é encontrado somente no *TbEIF4E5* e está substituído por uma fenilalanina no *TbEIF4E6*, enquanto que o segundo se encontra substituído por tirosina no *TbEIF4E5* e fenilalanina no *TbEIF4E6* (ambos aminoácidos aromáticos, como o triptofano). Com relação aos aminoácidos envolvidos na interação com o eIF4G e 4E-BP, W-43 e W-73 (este dentro do consenso (S/T)V(e/d)(e/d)FW), o primeiro pode ser visualizado em ambos os homólogos, enquanto que o segundo está ausente no *TbEIF4E6*.

Tabela 4. Homólogos ao EIF4E em *Trypanosoma brucei*

Gene	N.º de Acesso	Tamanho do gene (pb)	Peso molecular predito (kDa)	Similaridade com eIF4E Humano
<i>TbEIF4E1</i>	Tb11.18.0004	702	26,0	23%
<i>TbEIF4E2</i>	Tb10.61.0210	756	28,2	32%
<i>TbEIF4E3</i>	Tb11.01.3630	1329	47,9	25%
<i>TbEIF4E4</i>	Tb92.76.1870	1284	46,5	40%
<i>TbEIF4E5</i>	Tb10.70.2180	588	21,9	25%
<i>TbEIF4E6</i>	Tb92.77.1670	561	20,8	22%

Tabela 5. Homólogos ao EIF4E em *Leishmania major*

Gene	N.º de Acesso GenDB	Tamanho do gene (pb)	Peso molecular predito (kDa)	Similaridade com homólogo em <i>T. brucei</i>
<i>LmEIF4E1</i>	LmjF27.1620	645	24	48%
<i>LmEIF4E2</i>	LmjF19.1500	846	31,5	45%
<i>LmEIF4E3</i>	LmjF28.2500	1050	38	49%
<i>LmEIF4E4</i>	LmjF30.0450	927	33,8	37%
<i>LmEIF4E5</i>	LmjF36.0590	660	24	43%
<i>LmEIF4E6</i>	LmjF26.0240	549	20,3	47%

Adaptado de (Dhalia et al., 2004)

[illegible]

Já nos fatores eIF4E5 e 6 de *L. major*, o resíduo R-112 se apresenta conservado, enquanto a R-157 está ausente em ambos os fatores e K-162 está substituída por arginina em *LmEIF4E5* e 6. O W-56 também é visualizado exclusivamente no *LmEIF4E5* e está substituído por uma tirosina no *LmEIF4E6*, ao passo que o W-102 se encontra substituído pelos aminoácidos aromáticos tirosina e fenilalanina no *LmEIF4E5* e 6, respectivamente. Relacionados à interação com o eIF4G, o W-43 é encontrado em ambos os fatores, enquanto que, o W-73 no consenso é conservado no *LmEIF4E5* e substituído por uma tirosina no *LmEIF4E6*.

Através da análise do alinhamento global das sequências dos homólogos ao eIF4E observou-se que o sítio de ligação ao *cap* descrito para a proteína humana não apresenta alto grau de conservação nos fatores em estudo, ao passo que os resíduos responsáveis pela interação com eIF4G são encontrados bem conservados, em especial nos homólogos de EIF4E5.

5.2. Subclonagens dos genes *TbEIF4E5* e 6 em vetores de transfecção em *T. brucei*

Para possibilitar a execução dos ensaios *in vivo* de localização subcelular, imunoprecipitação e RNAi, foi necessária a subclonagem dos genes *TbEIF4E5* e 6 nos vetores p2216, p2477 e p2t7:177 (Kelly *et al.*, 2007; Wickstead *et al.*, 2002) utilizando as enzimas de restrição *Hind* III e *Bam*H I. O vetor p2216 possibilitou a expressão *in vivo* da proteína alvo em fusão traducional com a proteína fluorescente EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein), sob o controle do promotor T7 RNA polimerase, controlado através do operador indutível pela presença de tetraciclina (Figura 17A). De forma semelhante, o vetor p2477 possibilitou a superexpressão da proteína alvo fusionada com o *tag* HA (hemoaglutinina), sob o controle do mesmo promotor T7 RNA Pol e também indutível pela presença de tetraciclina (Figura 17B). Para a indução de interferência de RNA, foi utilizado o vetor p2t7:177 que se integra na região do mini-cromossomo de *T. brucei*, e, sob controle de dois promotores T7 em orientação reversa regulados pela tetraciclina, permite a transcrição em RNA dupla fita do gene alvo, desencadeando a maquinaria de RNAi celular (Figura 17C).

No que concerne o gene *TbEIF4E5*, não foi possível a sua subclonagem imediata utilizando a estratégia proposta uma vez que este contém sítios de restrição internos para ambas as enzimas necessárias para a subclonagem. Optou-se então pela realização prévia de mutagêneses sítio-dirigidas introduzindo mutações pontuais silenciosas na

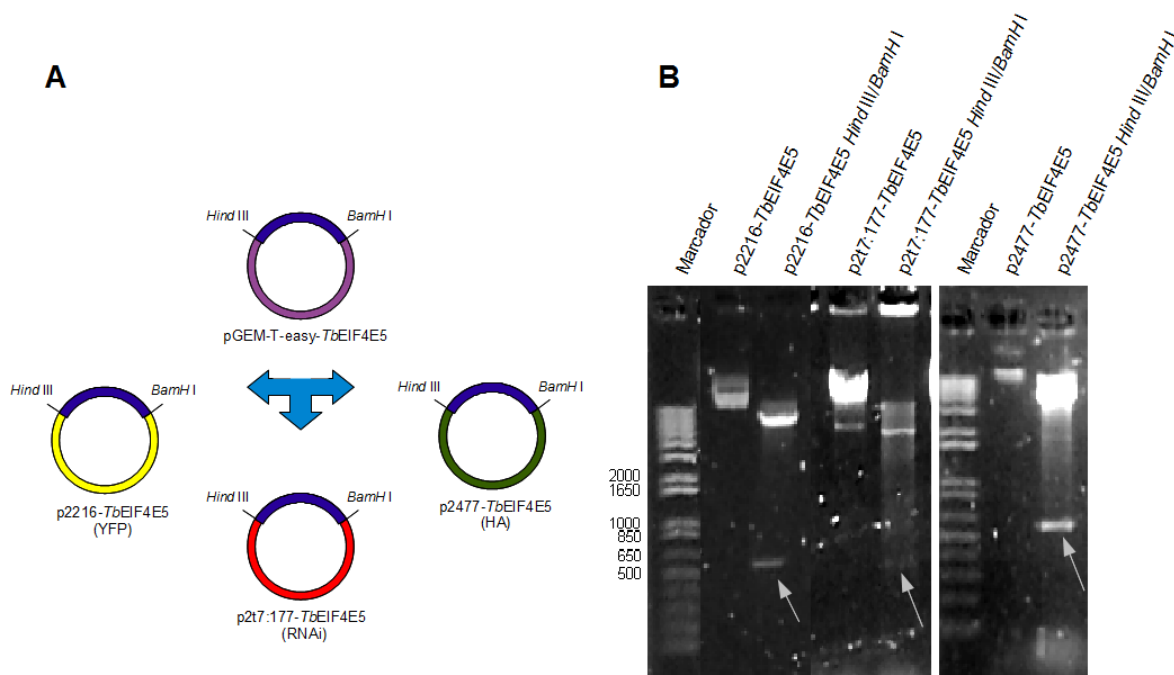


Figura 19. Subclonagens do gene *TbEIF4E5* nos vetores de interesse. A. Esquema representativo das subclonagens do *TbEIF4E5*. **B.** Digestão das construções p2216- *TbEIF4E5*, p2t7:177- *TbEIF4E5* e p2477- *TbEIF4E5* com as enzimas de restrição *BamH* I e *Hind* III. As setas indicam o inserto *TbEIF4E5*.

Como o gene do homólogo *TbEIF4E6* não possui os sítios de restrição internos para as enzimas utilizadas, a construção pet2171-*TbEIF4E6* pôde ser digerida com as enzimas de restrição *Hind* III e *BamH* I, assim como os vetores de interesse, e foram posteriormente ligados. As construções foram confirmadas por digestão (Figura 20) e sequenciamento.

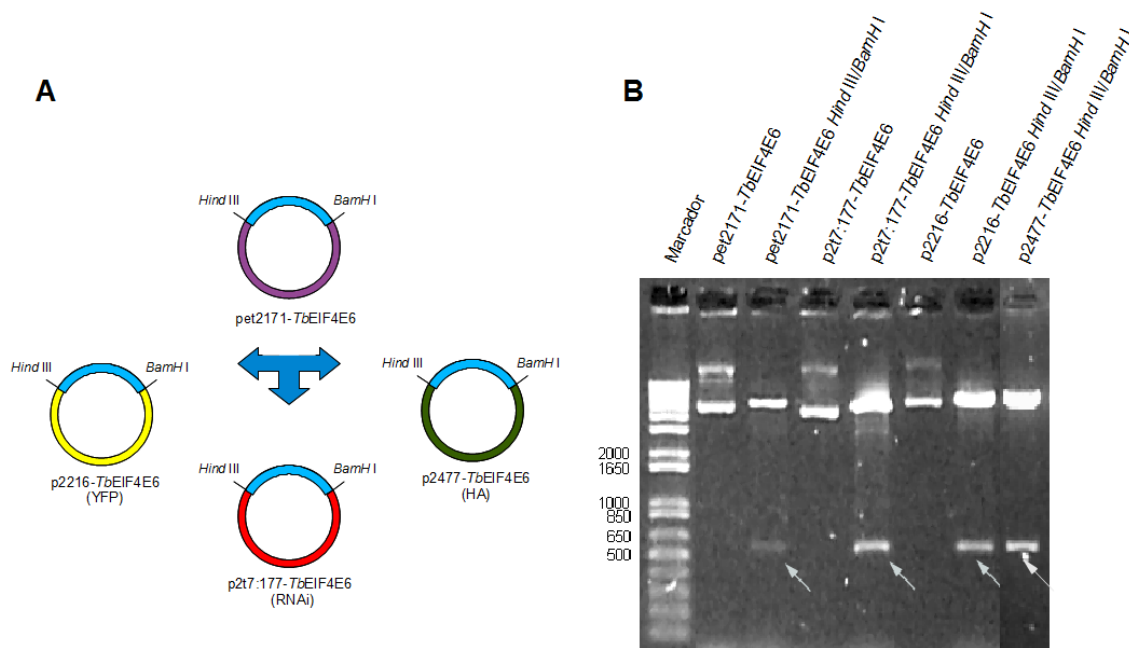


Figura 20. Subclonagens do gene *TbEIF4E6* nos vetores de interesse. A. Esquema representativo das subclonagens do *TbEIF4E6*. **B.** Digestão das construções pet2171-*TbEIF4E6*, p2t7:177-*TbEIF4E6*, p2216-*TbEIF4E6* e p2477- *TbEIF4E6* com as enzimas de restrição *BamH* I e *Hind* III. As setas indicam o inserto *TbEIF4E6*.

5.3 Análise do padrão de migração das proteínas *TbEIF4E5* e 6

Quando do início desse trabalho soros policlonais específicos contra as proteínas *TbEIF4E5* e 6 já haviam sido produzidos e avaliados quanto a sua capacidade de reconhecimento das respectivas proteínas recombinantes produzidas por expressão em *E. coli* e das proteínas nativas em extratos de células na fase procíclica de *T. brucei* (Andrade, 2008; Nascimento, 2010). Apesar das proteínas em estudo possuírem o peso molecular predito de 22 kDa e 21 kDa respectivamente, para os *TbEIF4E5* e 6, no extrato protéico de *T. brucei* as bandas reconhecidas pelos soros apresentaram-se com tamanho menor que o esperado, abaixo de 14 kDa (Figura 21).

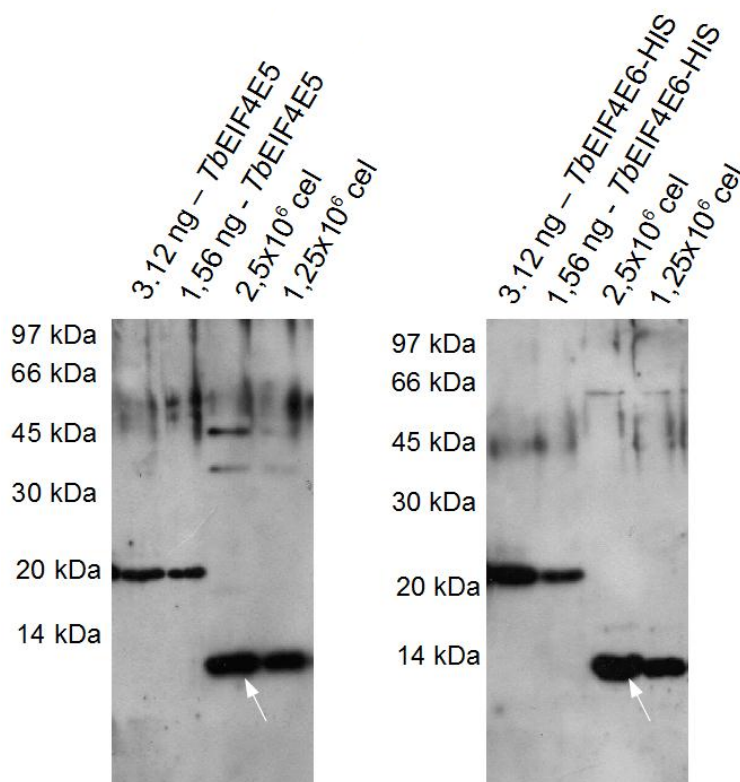


Figura 21. Western blot para reconhecimento do padrão de expressão das proteínas *TbEIF4E5* e 6 em extratos de *T. brucei*. Foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20% as proteínas recombinantes *TbEIF4E5* e 6 fusionadas com histidina e extratos protéicos de células de *T. brucei*, nas concentrações indicadas. Foram utilizados anticorpos purificados específicos diluídos 1:500.

Para investigar o tamanho correto das proteínas, foi utilizada a superexpressão *in vivo* dos homólogos *TbEIF4E5* e 6 fusionados ao tag HA, através da indução de células procíclicas transfectadas com as construções p2477-*TbEIF4E5* e 6. O vetor p2447 permite a superexpressão da proteína de interesse fusionada ao tag HA, que consiste no peptídeo YPYDVDPDYA repetido seis vezes, proporcionando um aumento de aproximadamente 30 kDa no tamanho da proteína em migração no gel. Extratos protéicos

de culturas onde a expressão das proteínas de fusão foi induzida pela adição de tetraciclina foram empregados em ensaios de *western blot* utilizando o anticorpo monoclonal específico anti-HA. Pode ser verificada a expressão das proteínas *TbEIF4E5*-HA e *TbEIF4E6*-HA, com os respectivos tamanhos aproximados: 80 kDa e 47 kDa (Figura 22). O padrão observado para o fator *TbEIF4E5* é muito superior ao esperado, mesmo considerando o tamanho predito da proteína recombinante.

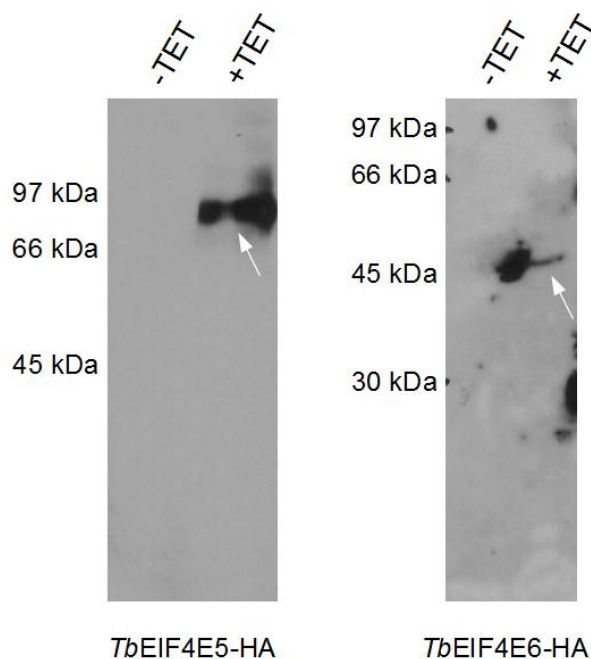


Figura 22. Western blot para reconhecimento da superexpressão das proteínas *TbEIF4E5* e 6 fusionadas ao tag HA. Células de *T. brucei* transfectadas submetidas à indução por adição de tetraciclina (+TET) e células controle (-TET) foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15%. Cada amostra possui o equivalente a 2×10^6 células. Foi utilizado anticorpo monoclonal específico anti-HA (1:5000). As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas em análise fusionadas ao tag HA

Outra abordagem que permitiu a verificação do tamanho da proteína *TbEIF4E6* foi a indução da superexpressão da proteína fusionada a EYFP. Extratos da cultura induzida foram fracionados em gel e submetidos a *western blot* utilizando o anticorpo policlonal purificado anti-*TbEIF4E6*. Enquanto a proteína EYFP possui peso molecular de 26 kDa, o produto da fusão *TbEIF4E6*-EYFP reconhecido pelo anticorpo apresentou um peso molecular de aproximadamente 40 kDa (Figura 23). Não foi possível, entretanto, a visualização da proteína endógena devido à porcentagem do SDS-PAGE utilizada. Para o fator *TbEIF4E5* não foi viável a realização da mesma análise pois não foi observado reconhecimento da proteína induzida pelo anticorpo utilizado.

A partir da análise do padrão de migração das proteínas endógenas nas células procíclicas, tanto selvagens quanto transfectadas com vetores que possibilitaram a expressão das proteínas fusionadas ao *tag* HA e a EYFP, constatou-se que o fator *TbEIF4E6*, de fato, migra em gel com peso molecular aparente situado entre 12 e 15 kDa. Porém, os resultados obtidos até o momento para o *TbEIF4E5* não permitem uma definição quanto ao padrão de migração da proteína nativa em gel.

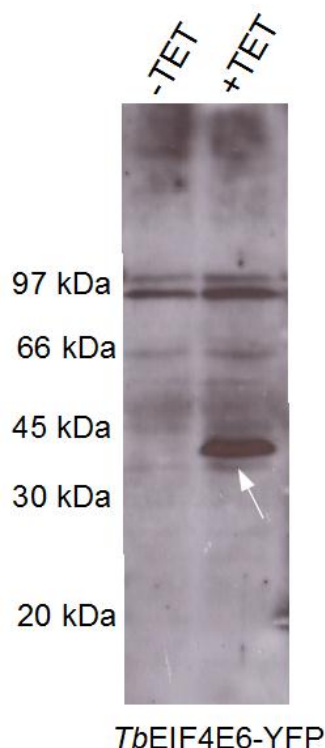


Figura 23. Western blot para reconhecimento da superexpressão da proteína *TbEIF4E6* fusionada a EYFP. Células de *T. brucei* transfectadas submetidas à indução por adição de tetraciclina (+TET) e células controle (-TET) foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15%. Cada amostra possui o equivalente a 5×10^6 células. Foi utilizado anticorpo policlonal purificado anti-*TbEIF4E6* (1:500). A seta indica a banda correspondente à proteína em análise fusionada a EYFP.

5.4. Localização subcelular dos fatores *TbEIF4E5* e 6

Como próximo passo na investigação da função desempenhada pelos *TbEIF4E5* e 6 objetivou-se determinar a localização subcelular destas proteínas nas células nas fases procíclicas e sanguíneas de *T. brucei*. Foram utilizadas duas metodologias diferentes, porém complementares: superexpressão da proteína endógena fusionada ao *tag* fluorescente EYFP e imunofluorescência aliada ao fracionamento celular.

5.4.1. Localização por superexpressão de proteínas fusionadas a EYFP

Culturas de células procíclicas transfectadas com as construções p2216-*TbEIF4E5* e 6 tiveram a superexpressão induzida pela adição de tetraciclina e foram visualizadas em microscópio confocal, permitindo a localização subcelular dos fatores em análise. O fator *TbEIF4E5*-EYFP apresentou-se predominantemente no citoplasma celular, com uma pequena fração nuclear (Figura 24). Já o *TbEIF4E6* foi observado distribuído pelo núcleo e citoplasma (Figura 25).

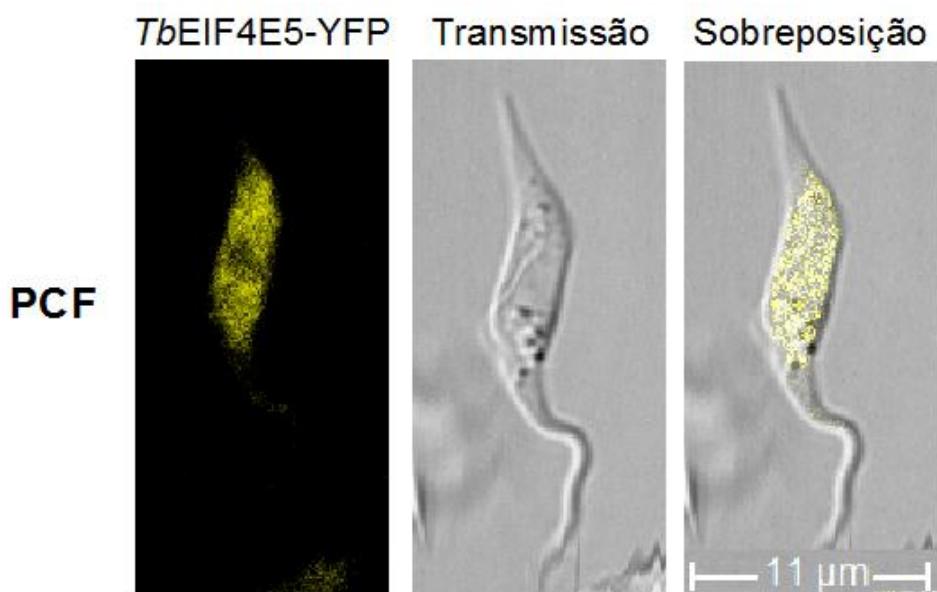


Figura 24. Localização da proteína *TbEIF4E5*-EYFP. Superexpressão da proteína em estudo fusionada ao tag EYFP, onde a indução foi feita por adição de tetraciclina e as células observadas em microscópio confocal. PCF: forma procíclica.

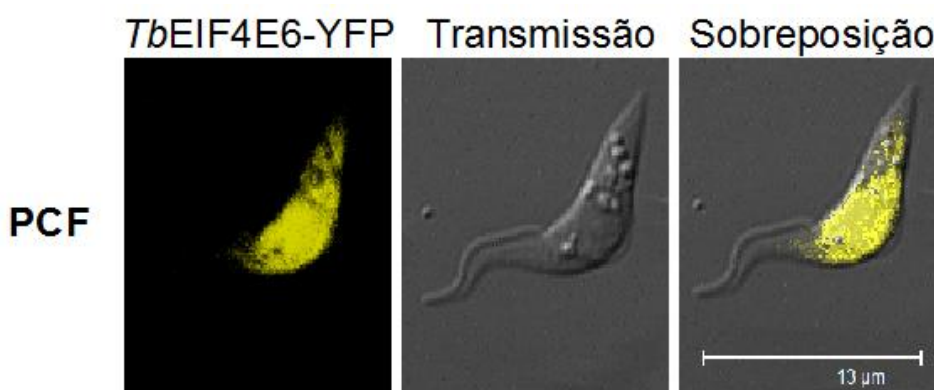


Figura 25. Localização da proteína *TbEIF4E6*-EYFP. Superexpressão da proteína em estudo fusionada ao tag EYFP, onde a indução foi feita por adição de tetraciclina e as células observadas em microscópio confocal. PCF: forma procíclica.

5.4.2. Localização por imunofluorescência

Para corroborar os resultados obtidos pela superexpressão das proteínas fusionadas a EYFP, foi realizado o ensaio de imunofluorescência. O referido ensaio utiliza os respectivos anticorpos policlonais purificados por imunoadsorção, os mesmos utilizados nos *western-blots* das Figuras 21 a 23, em células procíclicas e sanguíneas fixadas em lâmina, utilizando um segundo anticorpo conjugado ao fluoróforo Alexa Flúor 488.

Para o fator *TbEIF4E5*, obteve-se a localização na fase procíclica de forma que este apresenta-se distribuído predominantemente no citoplasma, com uma particular concentração na região perinuclear. Na fase sanguínea, o fator em questão parece estar associado à região nuclear de forma mais pronunciada, mantendo, contudo, a distribuição citoplasmática (Figura 26). Já o fator *TbEIF4E6* apresentou-se distribuído igualmente por toda a célula, tanto na fase procíclica quanto na fase sanguínea (Figura 27).

A marcação flagelar observada nas imunofluorescências das células de *T. brucei* na fase sanguínea parece ser inespecífica, visto que foram feitos diversos ajustes ao protocolo e testes adicionais com diferentes anticorpos contra as proteínas *TbEIF4A1*, *TbEIF4E3*, *TbNOM1* e *TbEIF4G1* e 2 e todos apresentaram, além do padrão de localização específico para cada proteína, a mesma marcação flagelar.

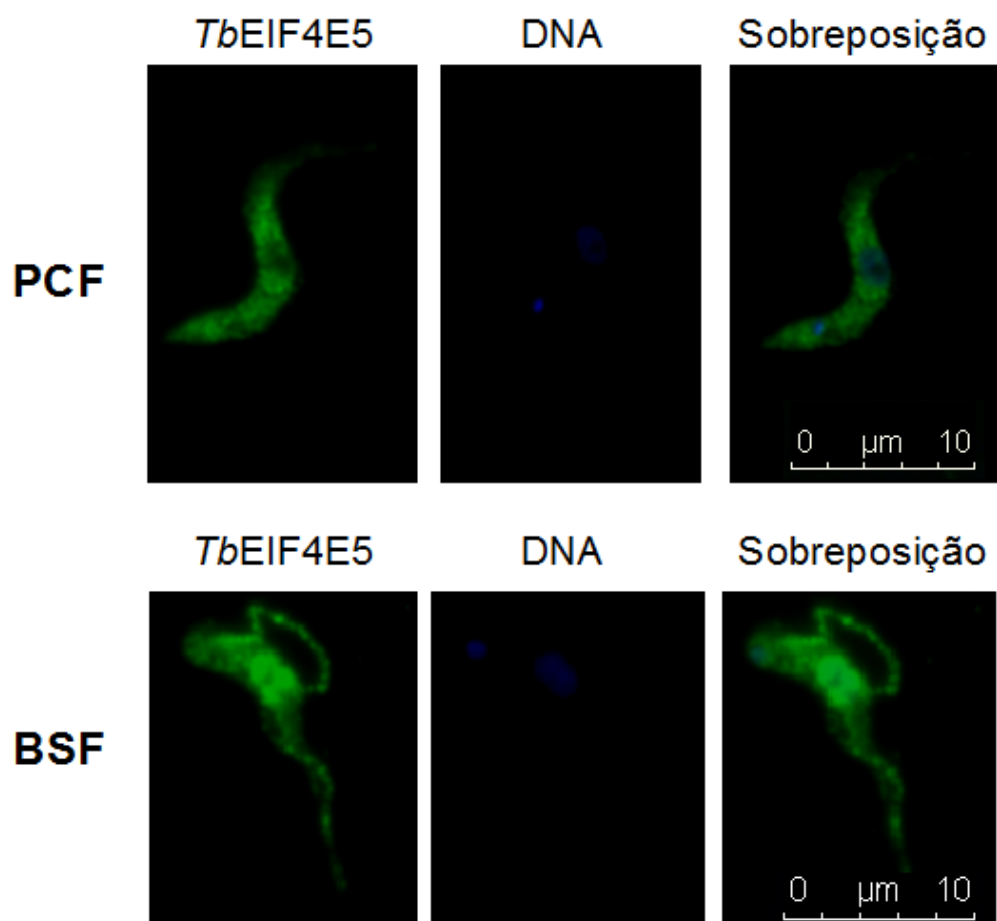


Figura 26. Localização celular da proteína *Tb*EIF4E5. Fotografias demonstrando a localização da proteína em células de *T. brucei* nas fases procíclica (PCF) e sanguínea (BSF) por imunofluorescência. Para o reconhecimento proteico foi utilizado o respectivo anticorpo purificado específico, utilizando o segundo anticorpo conjugado ao Alexa Flúor 488 e DAPI (em azul) para marcação de ácidos nucleicos.

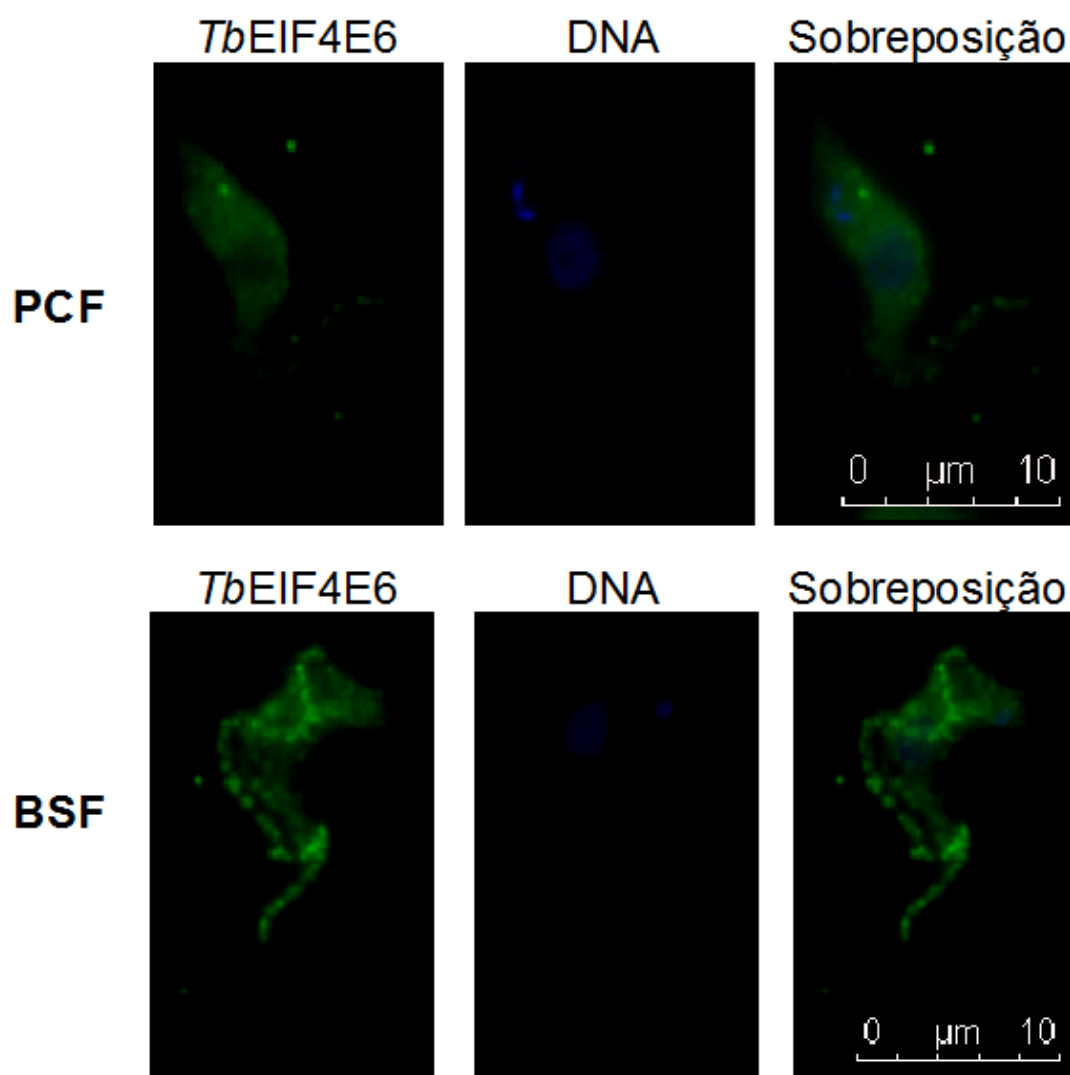


Figura 26. Localização celular da proteína *TbEIF4E6*. Fotografias demonstrando a localização da proteína em células de *T. brucei* nas fases procíclica (PCF) e sanguínea (BSF) por imunofluorescência. Para o reconhecimento proteico foi utilizado o respectivo anticorpo purificado específico, utilizando o segundo anticorpo conjugado ao Alexa Flúor 488 e DAPI (em azul) para marcação de ácidos nucleicos.

5.4.3. Localização por fracionamento celular

Para confirmar os resultados obtidos na localização subcelular, foi utilizado o ensaio de fracionamento celular, utilizando-se a histona como controle nuclear. Os resultados confirmam a presença dos fatores *TbEIF4E5* e 6 tanto no núcleo quanto no citoplasma (Figura 28), corroborando os resultados obtidos.

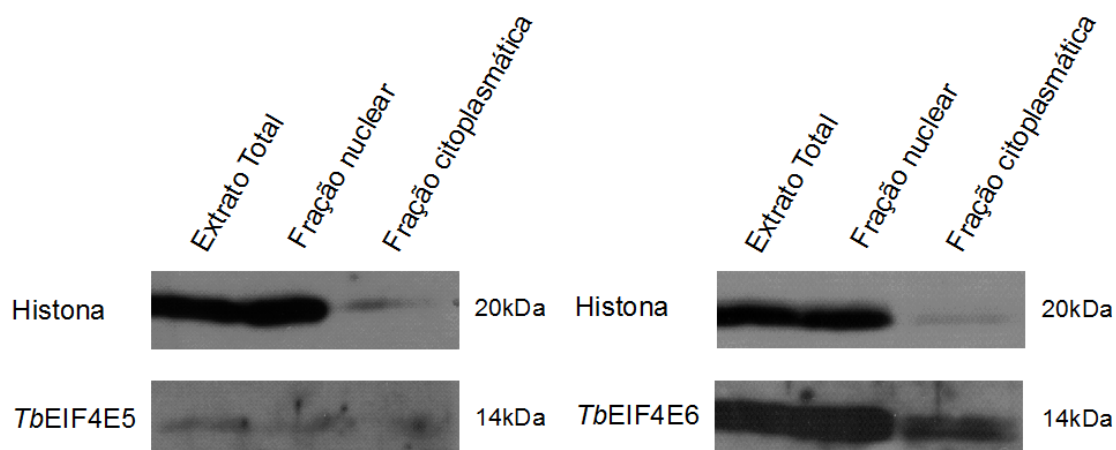


Figura 28. Western blot para reconhecimento das proteínas *TbEIF4E5* e 6 no ensaio de fracionamento celular. O extrato protéico total, o sedimento, correspondente à fração de membrana de núcleo celular, e o sobrenadante, correspondente a fração citoplasmática, foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e analisados por *western blot* contra os anticorpos específicos (diluição 1:250). A histona foi utilizada como controle nuclear. Cada amostra possui o equivalente a 5×10^6 células.

5.5. Análise do efeito da depleção dos *TbEIF4E5* e 6 por interferência de RNA (RNAi) na viabilidade celular

Para verificar a viabilidade celular de formas procíclicas de *T. brucei* na ausência *TbEIF4E5* e 6 optou-se por realizar o silenciamento gênico destes fatores empregando-se a técnica de interferência de RNA (RNAi). Para isso utilizou-se o vetor p2t7:177 (Wickstead *et al.*, 2002), no qual foram clonados os genes *TbEIF4E5* e 6. Assim, culturas de células procíclicas transfectadas foram utilizadas para a realização do ensaio de RNAi em dois meios de cultura diferentes: SDM-79 (Brun e Schonenberger, 1979) em que as células tem crescimento médio de duas a três vezes por dia e SM (Cunningham, 1977) em que as células crescem de quatro a cinco vezes em um mesmo período de 24 horas.

As células submetidas ao RNAi do fator *TbEIF4E5* no meio SM apresentaram a diminuição da taxa de crescimento celular a partir do terceiro dia após a indução por adição de tetraciclina e no sexto dia, morte celular (Figura 29). Já a cultura induzida mantida em SDM-79 também apresentou diminuição no crescimento celular, porém, o fenótipo de morte celular não foi observado até o décimo dia da curva (Figura 30). O cálculo do tempo de geração nas diferentes condições demonstra que o fenótipo observado em ambas as curvas é idêntico, visto que o número de gerações necessárias para o desenvolvimento do fenótipo é o mesmo no SM e SDM. Portanto, foi possível constatar que o fator *TbEIF4E5* é essencial para a viabilidade celular.

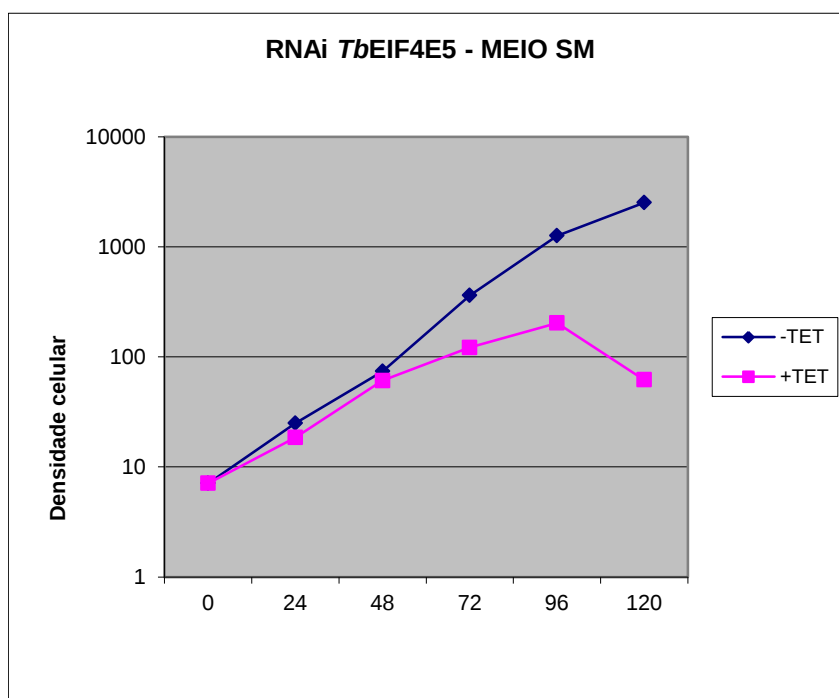


Figura 29. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do mRNA *TbEIF4E5* em meio SM. A cultura não induzida está representada pela curva –TET e a induzida pela +TET.

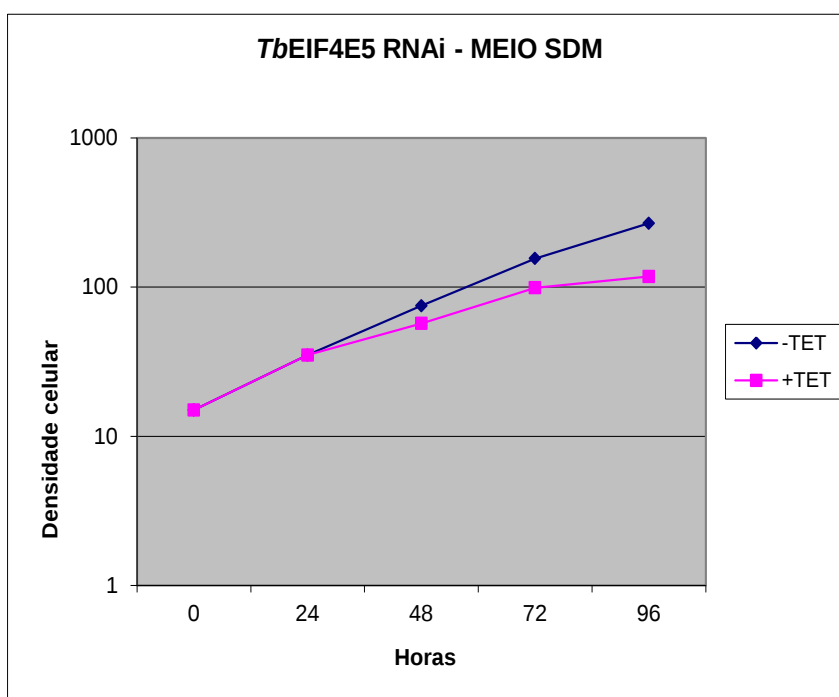


Figura 30. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do mRNA *TbEIF4E5* em meio SDM-79. A cultura não induzida está representada pela curva –TET e a induzida pela +TET.

A análise das culturas submetidas ao RNAi do fator *TbEIF4E6* permitiu a observação de que essa proteína parece não ser essencial a viabilidade celular na fase procíclica nas diferentes condições de cultura testadas (Figuras 31 e 32), embora a sua depleção tenha causado alterações morfológicas na cultura induzida no meio SM. Neste

meio, quando do RNAi, células tornaram-se pequenas e levemente arredondadas em comparação com a cultura controle.

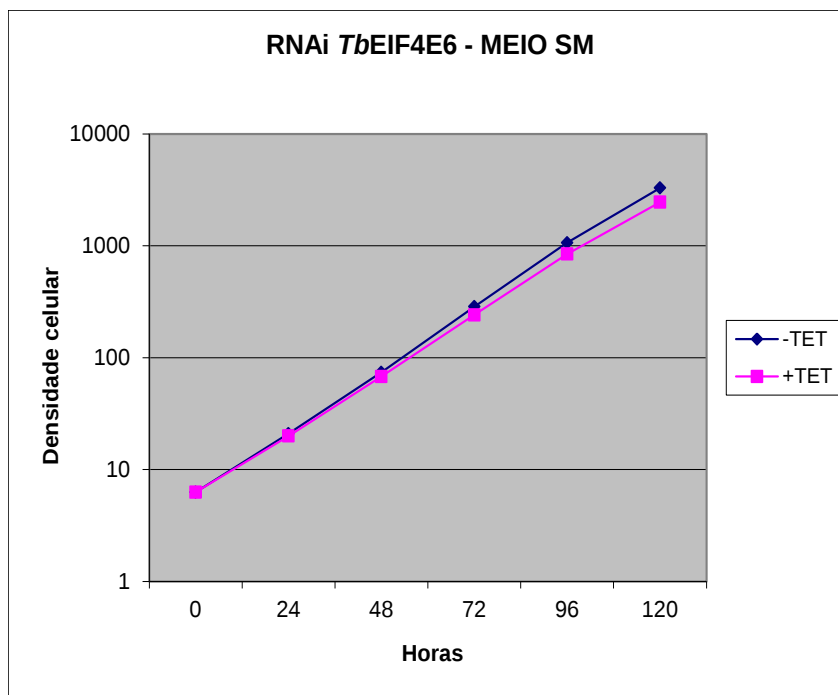


Figura 31. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do mRNA *TbEIF4E6* em meio SM. A cultura não induzida está representada pela curva –TET e a induzida pela +TET

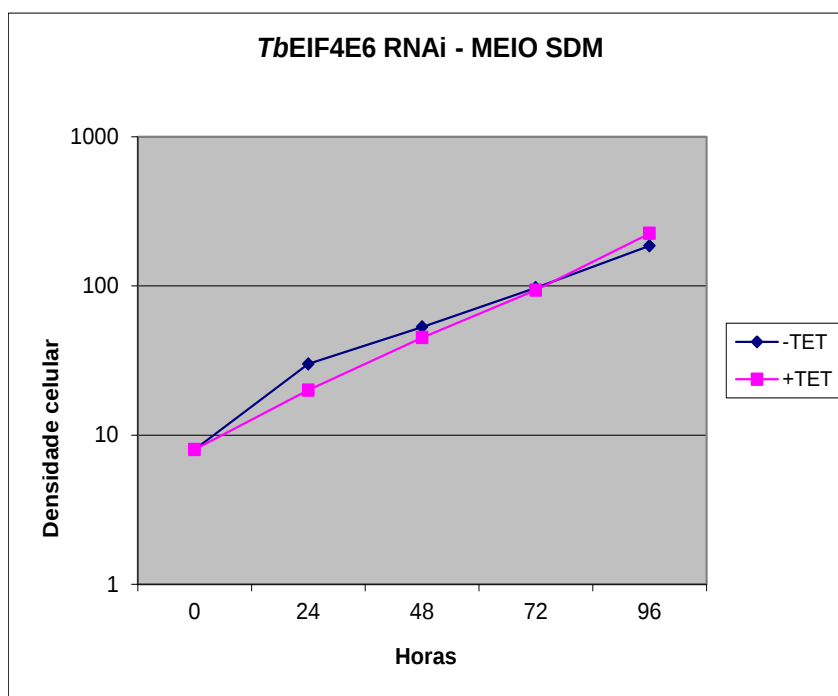


Figura 32. Curva de crescimento de cultura PCF submetida ao RNAi do mRNA *TbEIF4E6* no meio SDM-79. A cultura não induzida está representada pela curva –TET e a induzida pela +TET.

5.6. Análise da presença de modificações pós-traducionais por fosforilação

Homólogos de eIF4E de diversos organismos, inclusive outros homólogos de eIF4E de tripanosomatídeos, já foram observados como sujeitos a modificação pós-traducional por fosforilação (Joshi *et al.*, 1995; Nett *et al.*, 2009; Malvezzi, 2010). Visando confirmar se os EIF4E5 e 6 também estão sujeitos a fosforilação decidiu-se investigar a presença dos TbEIF4E5 e 6 dentro do conjunto de proteínas fosforiladas de *T. brucei*, assim como investigar a presença de sítios de fosforilação em potencial nos ortólogos de EIF4E5 e 6 de *T. brucei* e *L. major*.

5.6.1. Ensaio de purificação de fosfoproteínas

Para investigar a presença de isoformas fosforiladas dos TbEIF4E5 e 6, foi utilizado o sistema de purificação de fosfoproteínas *PhosphoProtein Purification Kit* (Qiagen) que permite a purificação do conjunto completo de fosfoproteínas de amostras biológicas. Amostras obtidas com este sistema de lisados da forma procíclica de *T. brucei* puderam então ser avaliadas quanto à presença das proteínas de estudo por *western blot*. Utilizando os anticorpos purificados, pode-se verificar a presença dos fatores TbEIF4E5 (como produtos de degradação, provavelmente como consequência da ação de proteases durante o processo de purificação) e TbEIF4E6 nas frações correspondentes ao fosfoproteoma de *T. brucei* (Eluições 3 e 4) (Figura 33). Vale ressaltar que o fator TbEIF4E6 apresenta-se no *western blot* com o reconhecimento de duas bandas bastante próximas, padrão esperado para proteínas fosforiladas.

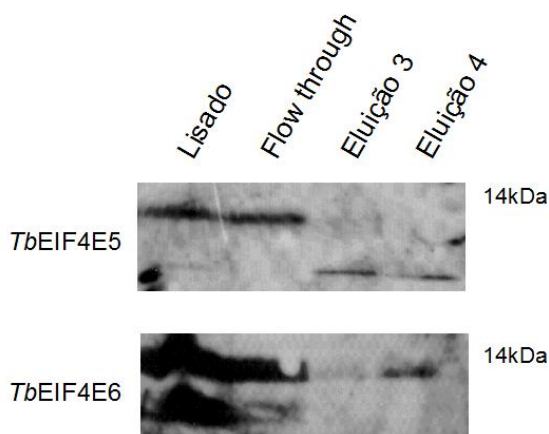


Figura 33. Western blot para reconhecimento das proteínas TbEIF4E5 e 6 no ensaio de purificação de fosfoproteínas. O lisado total, o *flow through* e as eluições 3 e 4 foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e analisados por *western blot* contra os anticorpos específicos (diluição 1:250). Cada amostra possui o equivalente a 5×10^6 células.

5.6.2. Identificação dos possíveis sítios de fosforilação nos homólogos de EIF4E5 e 6 de *T. brucei* e *L. major*

Uma vez indicada a ocorrência de formas fosforiladas dos *TbEIF4E5* e 6, foi possível realizar a predição de prováveis sítios-alvo de fosforilação nas sequências destas proteínas utilizando a ferramenta Phostryp (Palmeri *et al.*, 2011). Para tal, foi utilizada como parâmetro a representação com base nos valores de substituição da matriz PAM30 (mais restritiva) e foram consideradas tanto a composição do resíduo aminoacídico como a estrutura secundária da proteína.

Para o fator *TbEIF4E5* foram encontrados cinco possíveis sítios de fosforilação (Tabela 6), sendo em sua maior parte nos resíduos de serina (S). Três dos sítios preditos estão localizados dentro do domínio conservado da super-família 4E (Figura 34). Já para a proteína *TbEIF4E6*, foi possível a identificação de sete sítios possíveis de fosforilação, a maior parte nos resíduos de treonina (T) (Tabela 7).

Tabela 6. Sítios de fosforilação preditos para *TbEIF4E5*

<i>Peptídeo</i>	<i>Posição</i>	<i>Score</i>
SVIGESVSQEV	117	0,701
RPNKESPELVR	142	0,619
NDVGMSQPHVI	175	0,606
LESSSTFVFAR	71	0,589
-MEEESHALKD	5	0,550

Tabela 7. Sítios de fosforilação preditos para *TbEIF4E6*

<i>Peptídeo</i>	<i>Posição</i>	<i>Score</i>
AHKPGTVYPES	136	0,678
MAAEATEKPHP	6	0,673
GEHLRTVTDGP	117	0,577
LDWVSTAELH	46	0,571
HLRTVTDGPSH	119	0,549
KQKKFSKDSEE	30	0,537
EELHATINAFS	53	0,497

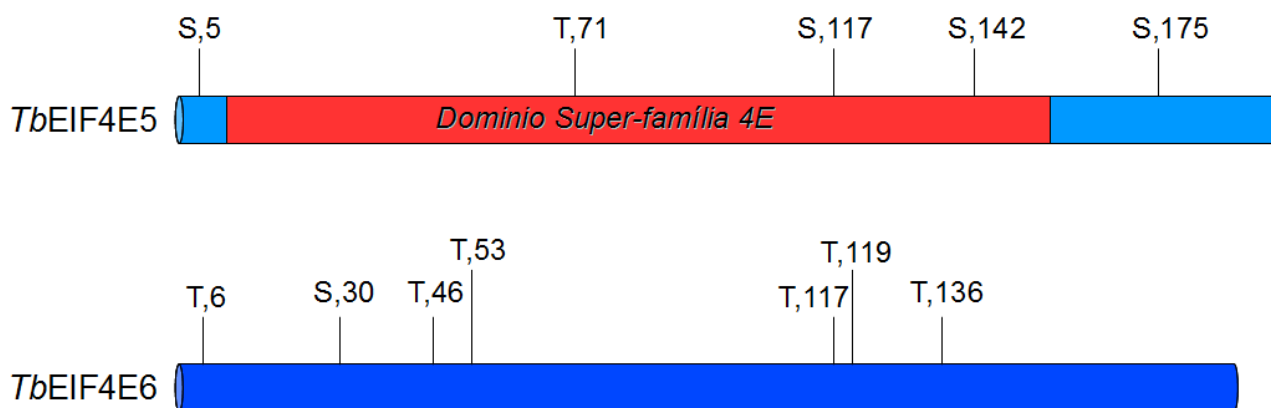


Figura 34. Representação gráfica da localização dos sítios de fosforilação preditos para os fatores TbEIF4E5 e 6. Sendo X, Y. X representa o aminoácido passível de fosforilação S (serina) ou T (treonina). Y identifica a posição do resíduo na sequência.

Ao mesmo tempo, a predição *in silico* dos sítios de fosforilação das sequências das proteínas EIF4E5 e 6 de *L. major* resultou em um maior número de aminoácidos passíveis de fosforilação: dezesseis para o *LmEIF4E5* (Tabela 8) e oito para o *LmEIF4E6* (Tabela 9). É interessante notar que, nas proteínas em questão, os sítios de fosforilação preditos concentram-se principalmente nas extremidades N- e C-terminais (Figura 35). Não foi observada, ao contrário das sequências de *T. brucei*, uma predominância de um determinado aminoácido para fosforilação.

Tabela 8. Sítios de fosforilação preditos para *LmEIF4E5*

<i>Peptídeo</i>	<i>Posição</i>	<i>Score</i>
ASTMPSPSSPP	210	1.063
MPSPSPPMVK	213	0.806
KSATMSATHAL	7	0.773
VLAASTMPSPS	207	0.717
TMPSPSSPPMV	212	0.717
---MKSATMSA	3	0.710
VVMGETAAEKA	122	0.705
-MKSATMSATH	5	0.702
AAEKASDGKPV	128	0.671
NIAEASFDAAA	190	0.645
ATMSATHALRD	9	0.613
LKPPTTDAGLE	107	0.597
LGMGSTLIFAR	75	0.567

LLKPPTTDAGL	106	0.550
EELWSTMNLP	60	0.509
KVLAASTMPSP	206	0.507

Tabela 9. Sítios de fosforilação preditos para *LmEIF4E6*

Peptídeo	Posição	Score
KEGTSSAPLHP	13	0.737
PTKEGTSSAPL	11	0.717
TKEGTSSAPLH	12	0.714
ADSNPTKEGTS	7	0.656
AIPGITVSARP	175	0.596
--MADSNPTKE	4	0.590
PGITVSARPFK	177	0.578
KYLVSTLSAIP	167	0.510
VWAHQSPYNTA	154	0.507

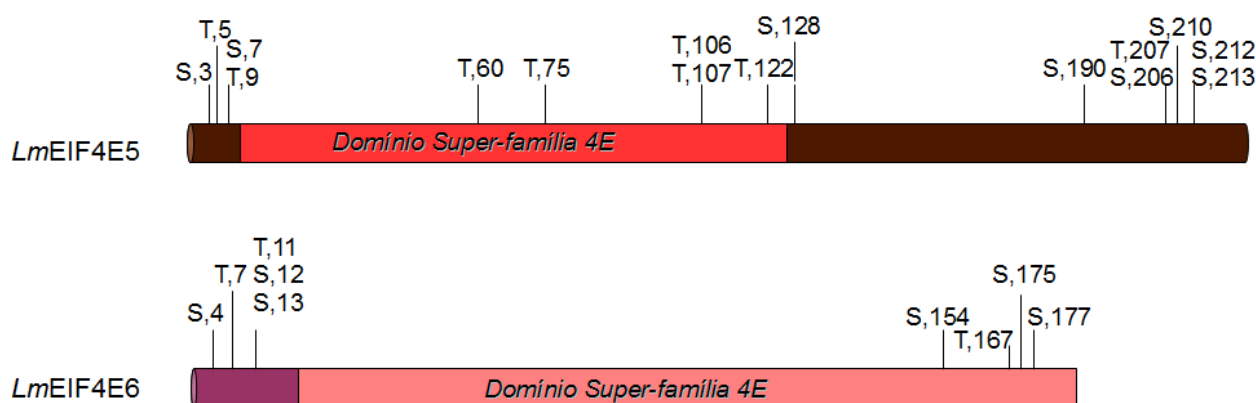


Figura 35. Representação gráfica da localização dos sítios de fosforilação preditos para os fatores *LmEIF4E5* e *6*. Sendo X, Y. X representa o aminoácido passível de fosforilação S (serina) ou T (treonina). Y identifica a posição do resíduo na sequência.

5.7. Análise da expressão dos *LmEIF4E5* e *6* em células procíclicas de *L. major*

Paralelamente ao trabalho desenvolvido com os genes *TbEIF4E5* e *6* e partiu-se também para avaliar a expressão de seus ortólogos em *L. major* de forma a se verificar a conservação neste organismo das propriedades observadas nas proteínas estudadas em *T. brucei*, como a sua expressão como peso molecular abaixo do esperado. Neste sentido partiu-se para a clonagem dos seus genes, expressão das respectivas proteínas e

produção de soro policlonal específico. Além dos conhecimentos preliminares já obtidos nesse trabalho os genes, proteínas e anticorpos gerados serão úteis como ferramentas para trabalhos posteriores de caracterização destas proteínas que darão continuidade a esta dissertação.

5.7.1 Clonagem dos genes *LmEIF4E5* e 6

Reações de PCR possibilitaram a amplificação dos fragmentos correspondentes aos genes *LmEIF4E5* e 6 a partir do DNA total de *Leishmania major* (Figura 36). Os fragmentos foram purificados e clonados no vetor pGEM-T-easy. As construções obtidas pGEM-T-easy-*LmEIF4E5* e 6 foram confirmadas por sequenciamento e digeridas com as enzimas *BamH*I e *Not*I e os insertos liberados foram purificados e subclonados no vetor pGEX4T3. As construções pGEX-*LmEIF4E5* e 6 resultantes foram confirmadas por digestão com as mesmas enzimas utilizadas previamente. As construções pet21d-*LmEIF4E5*-6 já se encontravam disponíveis de trabalho anterior (Andrade, 2008) e foram utilizadas como controle (Figura 36).

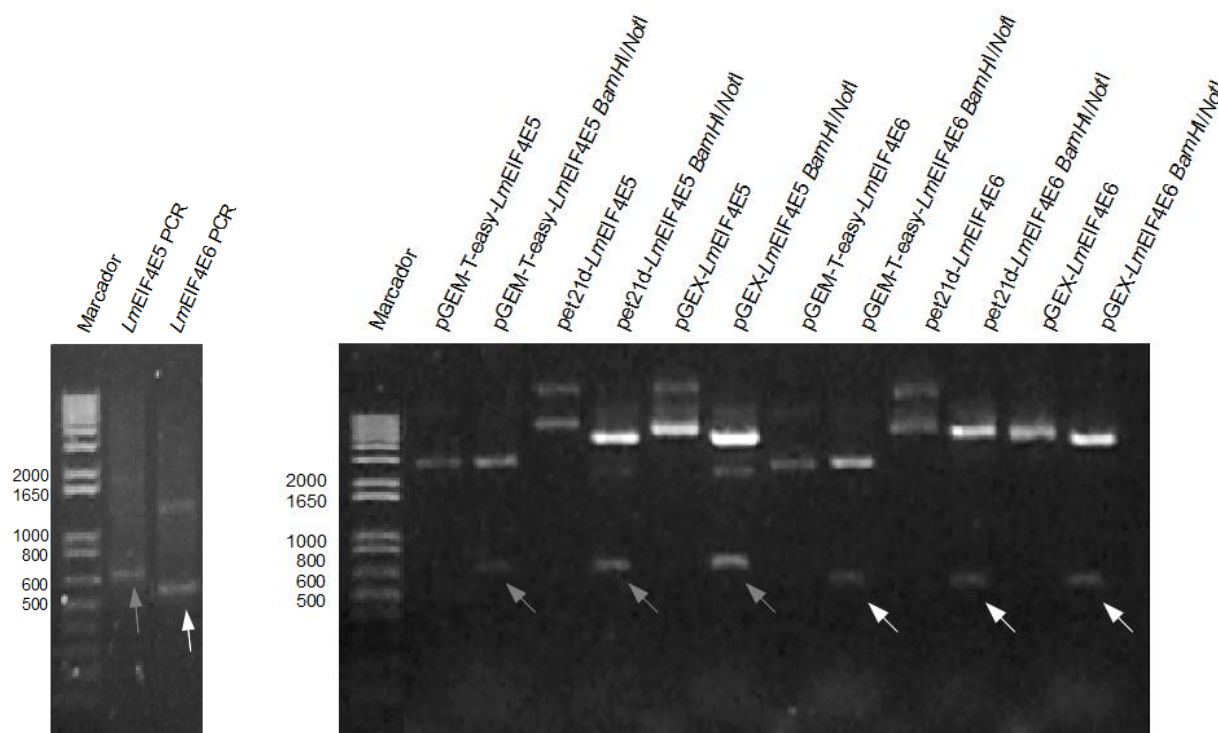


Figura 36. Clonagem dos genes *LmEIF4E5* e 6 nos vetores de interesse. Fragmentos correspondentes aos genes *LmEIF4E5* (seta cinza) e *LmEIF4E6* (seta branca) obtidos por PCR (esquerda). Digestão das construções pGEM-T-easy-*LmEIF4E5*, pet21d-*LmEIF4E5*, pGEX4T3-*LmEIF4E5*, pGEM-T-easy-*LmEIF4E6*, pet21d-*LmEIF4E6* e pGEX4T3-*LmEIF4E6* com as enzimas de restrição *BamH*I e *Not*I. As setas cinzas indicam o inserto *LmEIF4E5* e as brancas o *LmEIF4E6* (direita).

5.7.2 Expressão das proteínas recombinantes *LmEIF4E5* e 6

As construções *pet21d-LmEIF4E5* e 6 e *pGEX4T3-LmEIF4E5* e 6 foram utilizadas para a produção de proteínas recombinantes fusionadas respectivamente a oligo-histidina (6x-His) e GST por expressão heteróloga em *E. coli*. As proteínas recombinantes obtidas apresentaram tamanho esperado, sendo estas: *LmEIF4E5*-HIS - 27 kDa; *LmEIF4E6*-HIS - 22 kDa (Figura 37); *LmEIF4E5*-GST e *LmEIF4E6*-GST – ambas de aproximadamente 48 kDa (Figura 38). As proteínas também foram quantificadas baseando-se na comparação com a curva de diluição de BSA de concentrações conhecidas.

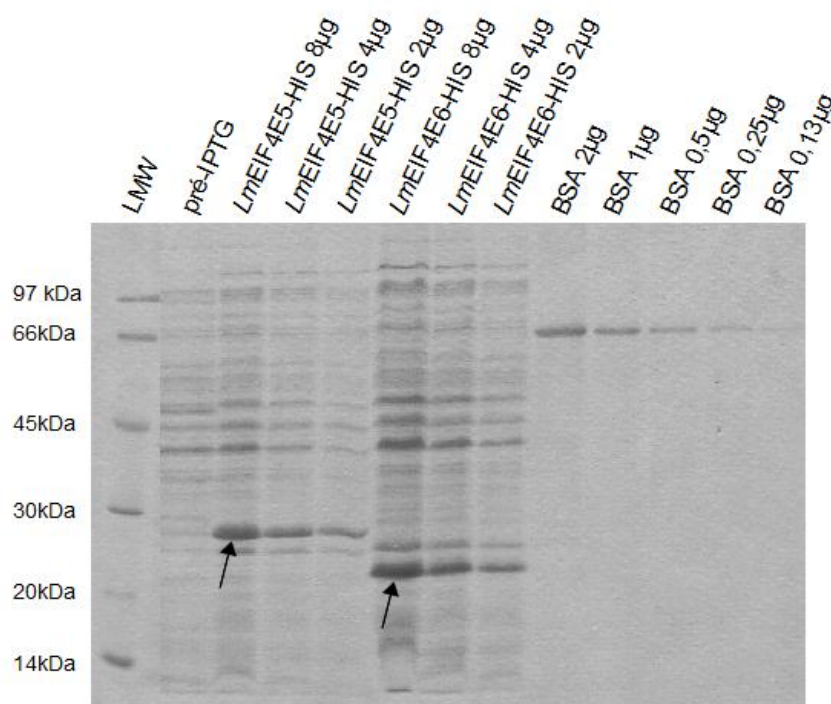


Figura 37. Expressão das proteínas recombinantes *LmEIF4E5*-HIS e *LmEIF4E6*-HIS. Gel de SDS-PAGE 20% corado com Comassie Blue. As proteínas obtidas (setas) foram quantificadas a partir de uma curva de BSA de concentrações conhecidas.

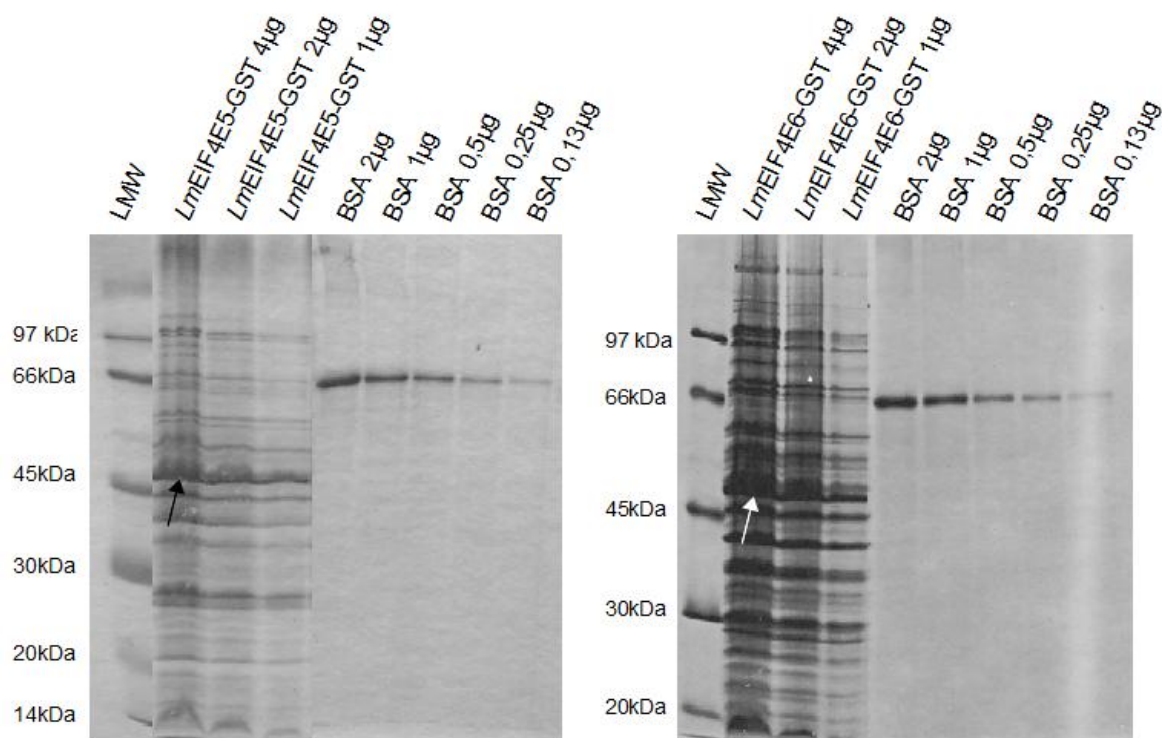


Figura 38. Expressão das proteínas recombinantes *LmEIF4E5*-GST e *LmEIF4E6*-GST. Gel de SDS-PAGE 15% corado com Comassie Blue. As proteínas obtidas (setas) foram quantificadas a partir de uma curva de BSA de concentrações conhecidas.

5.7.3 Teste de reconhecimento dos antissoros anti-*LmEIF4E5* e 6

Anticorpos policlonais contra as proteínas *LmEIF4E5* e 6 foram produzidos por imunização das proteínas recombinantes fusionadas a cauda de oligo-histidina em coelhos. Os soros obtidos foram purificados e os anticorpos resultantes foram testados quanto à especificidade por *western blot* usando tanto as proteínas fusionadas a sequência de histidinas como aquelas fusionadas a GST. Ambos os anticorpos mostraram reconhecimento específico de 10 ng das respectivas proteínas recombinantes. Não houve reconhecimento de bandas inespecíficas nos extratos das proteínas utilizadas (Figura 39).

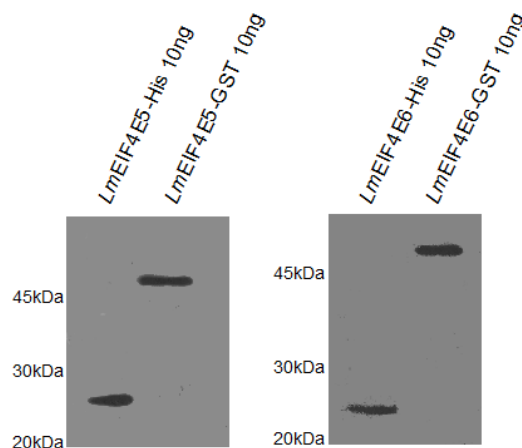


Figura 39. Western blot para teste de sensibilidade e especificidade dos anticorpos contra as proteínas *LmEIF4E5* e *6*. 10 ng das respectivas proteínas recombinantes fusionadas a poli-histidina e GST foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e analisados por western blot contra os anticorpos específicos purificados (diluição 1:500).

Os antissoros policlonais foram então testados para verificação do reconhecimento das proteínas em extratos proteicos de células de diferentes espécies (*L. major*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*) e formas (promastigota e amastigota de *L. amazonensis*) do parasita, bem como de *T. brucei* nas formas procíclica e sanguínea. Os extratos foram fracionados em gel e submetidos a western blot utilizando os soros não purificados anti-*LmEIF4E5* e *6*. Esse ensaio preliminar permitiu a observação do reconhecimento de bandas próximas ao tamanho esperado para o *LmEIF4E5* em *L. major*, na forma promastigota de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Entretanto, o padrão observado para o *LmEIF4E6* não é compatível com o peso molecular predito para essa proteína (Figura 40). Ensaio adicionais são necessários para a confirmação do tamanho correto dos fatores em estudo, embora já sejam aparentes diferenças significativas em relação às proteínas de *T. brucei*.

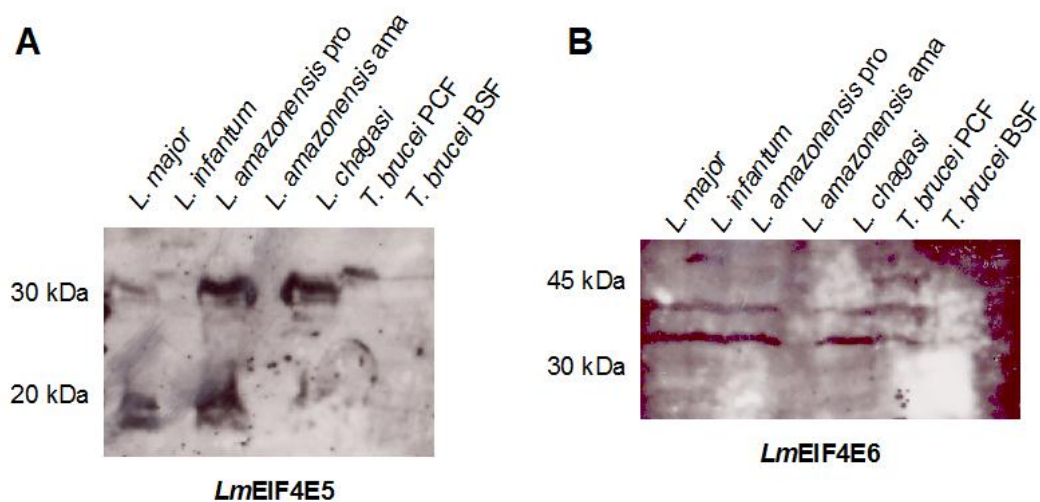


Figura 40. Western blot para teste de reconhecimento dos anticorpos contra as proteínas *LmEIF4E5* e 6 nos extratos proteicos em diferentes espécies de tripanossomatídeos. Células de *L. major*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *T. brucei* foram fracionadas em gel SDS-PAGE 20%. Cada amostra possui o equivalente a 1×10^7 células. Foram utilizados soros não purificados anti-*LmEIF4E5* e 6 diluídos 1:3000.

6. DISCUSSÃO

Sendo responsáveis por importantes doenças negligenciadas que atingem milhares de pessoas ao redor do mundo e por apresentarem uma biologia molecular bastante divergente da dos eucariotos superiores, os tripanossomatídeos despertam a curiosidade científica na busca de um melhor entendimento dos seus mecanismos celulares. Um destes é a iniciação da síntese proteica que consiste em um processo altamente regulado e que não está elucidado nesses organismos. A presença de múltiplos homólogos das subunidades do fator de iniciação eucariótico eIF4F demonstra a complexidade que esse processo pode assumir nos tripanossomatídeos.

O presente trabalho objetivou contribuir para a caracterização funcional de dois homólogos divergentes do fator iniciação eIF4E, a proteína responsável pela ligação ao *cap*, denominados EIF4E5 e 6, tanto de *Trypanosoma brucei* como *Leishmania major*. Em uma análise inicial, a investigação das sequências dos genes pode auxiliar na identificação de regiões conservadas entre os fatores em estudo, seus homólogos nos tripanossomatídeos e o eIF4E de *Homo sapiens* e *S. cerevisiae*. Através do reconhecimento dos possíveis sítios de interação, é possível prever a capacidade dos fatores de atuarem conforme a proteína canônica.

O reconhecimento dos grupos fosfatos da porção m⁷Gppp do *cap* compreende a primeira etapa da ligação *cap*-eIF4E. O reconhecimento dos primeiros dois grupos fosfatos se dá pela ligação aos aminoácidos básicos localizados no sítio de ligação ao *cap* do eIF4E em humanos (R-112, R-157 e K-162) através de pontes de hidrogênio diretas ou mediadas por uma molécula de água. Já o terceiro grupo fosfato forma uma ponte de hidrogênio com a R-112 via uma molécula de água (Tomoo *et al.*, 2002). Através de cristalografia e ressonância magnética nuclear, Brown *et al.* (2007) desvendaram a estrutura completa da ligação m⁷G com o eIF4E, mostrando que, após a formação inicial das pontes de hidrogênio entre os grupos fosfato do *cap* e os aminoácidos básicos do eIF4E, a porção m⁷G é empilhada entre os aminoácidos W-56 e W-102 através de interações da ribose com os triptofanos.

Com relação à capacidade de interação com o *cap* monometilado e o *cap* 4 dos homólogos aos eIF4E de *Trypanosoma brucei*, Freire *et al.* (2011) demonstraram que os fatores TbEIF4E1, E2 e E4 possuem a capacidade de ligar o *cap* monometilado. De acordo com o alinhamento, TbEIF4E1 e 2 apresentam todos os resíduos conservados que são necessários para a ligação ao *cap* quando comparados ao eIF4E humano. No

TbEIF4E4 o W-56 está substituído por outro aminoácido aromático (tirosina), assim como *TbEIF4E6*, mas isso não parece comprometer a capacidade de interação do *TbEIF4E4* com o *cap*. Assim, pode-se especular que, de forma semelhante, *TbEIF4E5* e 6 tenham a capacidade de se ligar ao *cap* monometilado. Quanto aos homólogos de eIF4E de *Leishmania*, observou-se que os fatores *LeishEIF4E1* a 4 (*LmEIF4E1* a 4) são capazes ligar tanto o m⁷GTP quanto o *cap* 4, o *cap* característico dos tripanossomatídeos, e que seus domínios de ligação ao *cap* são bastante conservados quando comparados ao eIF4E de murinos. Já o *LeishEIF4E2* (*LmEIF4E2*) liga preferencialmente o *cap* 4 (Yoffe *et al.*, 2006). *LmEIF4E2* possui quase todos os resíduos aminoacídicos responsáveis por essa interação, assim como o *LmEIF4E5*. Já a sequência do *LmEIF4E6* carece da K-162 e do W-56, semelhante aos *LmEIF4E1*, 3 e 4. Então, pode-se especular que o *LmEIF4E5* tenha a capacidade de ligar o *cap* 4 mais especificamente do que o *LmEIF4E6*.

Todas as proteínas conhecidas que interagem com eIF4E, o fazem por possuírem motivo Y-X₄-L-Φ, onde Φ é um aminoácido hidrofóbico (Mader *et al.*, 1995). Com relação ao sítio de interação na sequência do eIF4E, foi demonstrado que os resíduos W-43 e W-73 são de fundamental importância para a ligação eIF4E-eIF4G e eIF4E-4E-BP, sendo o W-73 encontrado na sequência filogeneticamente conservada (S/T)V(e/d)(e/d)FW, onde os resíduos ácidos são menos conservados (Ptushkina *et al.*, 1999). Nos homólogos em estudo em *T. brucei*, eIF4E5 apresenta W-43 e W-73 dentro do consenso conservado, enquanto que o eIF4E6 carece do W-73. Já existem dados de interação proteína-proteína (duplo híprido e co-precipitação seguido de espectrometria de massa) que indicam que o *TbEIF4E5* interage com dois dos cinco homólogos de eIF4G de *T. brucei*, os *TbEIF4G1* e *G2*, enquanto que o *TbEIF4E6* interage com o *TbEIF4G5* (Freire, comunicação pessoal). Assim, a identificação dos possíveis sítios de ligação conservados na sequência do homólogo eIF4E5, possibilita o direcionamento das investigações futuras para a confirmação dessas interações e de como elas ocorrem. Entretanto, a ausência do W-73 no *TbEIF4E6*, relatada como essencial para a ligação do eIF4G em humanos, sugere que a interação com o *TbEIF4G5* ocorre via motivos de ligação ainda não descritos.

Em *L. major*, todos os homólogos ao eIF4E possuem o W-43, enquanto que o W-73 está presente dentro do consenso no *LmEIF4E5* (semelhante a *LmEIF4E2*, 3 e 4) e se encontra substituído por uma tirosina no *LmEIF4E6* (como em *LmEIF4E1*, no qual a substituição é por uma fenilalanina). Reis (2009) demonstrou que *LmEIF4G3* é capaz de interagir com *LmEIF4E4*, enquanto *LmEIF4G4* liga *LmEIF4E3* como observado em *T. brucei*. Tal fato demonstra a possível conservação das interações entre os homólogos do

eIF4G e eIF4E que ocorrem nesses dois organismos. Portanto, baseando-se na semelhança estrutural dos sítios de ligação, é provável que o homólogo *LmEIF4E5* possa interagir com os homólogos *LmEIF4G1* e 2. Entretanto, a substituição do W-73 por um aminoácido aromático no *LmEIF4E6* e por um não aromático no homólogo em *T. brucei* sugere que, se o fator de *L. major* interagir com algum dos cinco homólogos ao eIF4G já descritos, deve fazê-lo de forma diferente do *TbEIF4E6*.

Apesar do tamanho predito para as proteínas *TbEIF4E5* e 6 ser de aproximadamente 20 kDa, os anticorpos demonstraram o reconhecimento abaixo do esperado em extratos proteicos de *T. brucei*. Testes de reconhecimento adicionais foram realizados e foi observado que o peso do *TbEIF4E6* é compatível ao previamente visualizado no reconhecimento do anticorpo policlonal produzido (~14 kDa). O fator pode ser alvo de alguma modificação pós-traducional para tornar-se ativo (ex: clivagem) ou ser sensível à proteólise nas condições em que os extratos proteicos são realizados. Todavia, para o *TbEIF4E5* os resultados não são conclusivos. O padrão de migração da proteína *TbEIF4E5*-HA é anômalo, visto que, considerando o tamanho predito para o fator em estudo adicionado do peso molecular do *tag* utilizado, o resultado esperado seria de aproximadamente 50 kDa. Análises adicionais são necessárias para a confirmação do tamanho correto desta proteína. Para os homólogos de *L. major*, foram obtidas proteínas recombinantes e antissoros policlonais com boa sensibilidade que, uma vez confirmada sua especificidade em extratos proteicos do parasita, serão utilizados em ensaios funcionais futuros. Testes preliminares de reconhecimento em extratos de várias espécies de *Leishmania*, bem como extratos de *T. brucei* nas formas sanguínea e procíclica, mostraram que o anti-*LmEIF4E5* é capaz de reconhecer uma proteína bastante próxima do tamanho predito nos extratos de *L. major*, *L. amazonensis* na forma promastigota e *L. chagasi*. Já o reconhecimento observado quando utilizado o anti-*LmEIF4E6* não condiz com o tamanho predito para a proteína e precisa ser melhor investigado.

Investigando a localização subcelular dos fatores em *T. brucei*, pode ser observado que o *TbEIF4E5* apresenta padrões diferentes de distribuição celular nas formas procíclica e sanguínea do parasita, enquanto *TbEIF4E6* está distribuído por todo núcleo e citoplasma, em ambas as fases do parasita. Freire (2010) localizou os fatores *TbEIF4E1* e 2 como citoplasmáticos e nucleares, enquanto *TbEIF4E3* e 4 são exclusivamente citoplasmáticos. Já Yoffe *et al.* (2006) constataram que todos os homólogos identificados até então (*LmEIF4E1* a 4) eram citoplasmáticos. Assim, a

concentração perinuclear do *TbEIF4E5* consiste em um novo padrão de localização para um homólogo ao eIF4E em tripanossomatídeos.

Sabe-se que o eIF4E é predominantemente citoplasmático em mamíferos e leveduras, mas uma fração significativa (12%-33% em mamíferos) é localizada no núcleo (Lejbkowitz *et al.*, 1992). A importação do eIF4E para o núcleo é mediada pela proteína transportadora de 4E, 4E-T, que se liga através do mesmo domínio conservado compartilhado pelo eIF4G e 4E-BP, e que interage com receptores de importação nuclear, as importinas α/β (Dostie *et al.*, 2000). Rong *et al.*, 2008 provaram que a localização nuclear do eIF4E também depende das proteínas 4E-BP1 e 2, uma vez que estas retêm o fator de ligação ao *cap* no compartimento nuclear. Entretanto, não foram identificadas proteínas 4E-T nem 4E-BPs clássicas em tripanossomatídeos, apesar de uma nova proteína de interação ao eIF4E em *L. major*, chamada de Leish4E-IP, cuja função ainda não foi desvendada, ter sido descrita recentemente como parceira do EIF4E1 (Zinoviev *et al.*, 2011). Assim, não se sabe o mecanismo pelo qual seria explicada a presença dos homólogos ao eIF4E dos tripanossomatídeos no núcleo celular.

Avaliando a viabilidade celular mediante o silenciamento gênico dos fatores em estudo em *T. brucei*, apenas o *TbEIF4E5* mostrou-se essencial para o parasita na fase procíclica. Alsford *et al.* (2011) realizaram o *knock down* de todo o genoma de *T. brucei* em culturas de células nas fases procíclica e sanguínea, bem como durante a diferenciação, através da técnica de larga escala RIT-seq (*RNAi target sequencing*). Na análise do referido trabalho, o *TbEIF4E5* é essencial somente na fase procíclica, o que concorda com o resultado obtido. Entretanto, o *TbEIF4E6* foi avaliado como essencial para a viabilidade do parasita nas fases procíclica, sanguínea e durante a diferenciação, o que não foi observado nos resultados obtidos por RNAi. Uma leve mudança de morfologia foi observada no experimento realizado em meio de cultura SM, onde as células estavam arredondadas e menores, mas a curva de crescimento se mostrou igual ao controle não induzido nas duas condições testadas. Outros resultados discordantes foram observados quando comparados aos resultados obtidos pelo trabalho referenciado e através da interferência de RNA de um único gene. O RNAi do homólogo *TbEIF4G3* tem um dos fenótipos mais pronunciados de morte celular dentre os fatores já testados (Moura, 2011), mas no trabalho citado está classificado no grupo dos genes que não causa perda de viabilidade em nenhuma das formas do parasita. De forma semelhante, o RNAi do homólogo *TbEIF4E4* na forma sanguínea leva a morte celular (Freire, 2010), mas através da técnica empregada no trabalho de Alsford *et al.*, 2011, este foi classificado como

essencial somente no processo de diferenciação celular. Tais discrepâncias podem ser devidas as diferenças nas metodologias empregadas: o RNAi de um único gene utiliza a transfecção de um cassete de integração contendo o gene-alvo, enquanto que o RIT-seq emprega a transfecção de uma biblioteca de plasmídeos RNAi contendo fragmentos genômicos aleatórios. Assim, a técnica de interferência de RNA de um gene-alvo é mais específica e produz resultados mais reprodutíveis.

A purificação de fosfoproteínas permitiu a análise da presença da modificação pós-traducional do tipo fosforilação nas proteínas em estudo. Foi constatado que os fatores *TbEIF4E5* e 6 são fosforilados. Trabalhos recentes utilizando espectrometria de massa têm identificado muitos sítios de fosforilação em vários organismos, inclusive tripanossomatídeos (Nett *et al.*, 2009; Marchini *et al.*, 2011; Hem *et al.*, 2010). A partir desses dados, a ferramenta Phostryp foi desenvolvida para possibilitar a predição de sítios de fosforilação característicos desses organismos com mais especificidade do que outras ferramentas disponíveis. Entretanto, apesar da capacidade de predizer sítios específicos, um grande número de resíduos é resultado na análise das sequências e tem de ser posteriormente validados por técnicas *in vitro* e *in vivo*. Através da utilização da ferramenta Phostryp foi possível a predição dos possíveis sítios de fosforilação nas sequências das proteínas *TbEIF4E5* e 6. Foram identificados cinco sítios na sequência da proteína *TbEIF4E5* principalmente compostos por serina, e sete no *TbEIF4E6*, em sua maioria treoninas. Embora não tenha sido realizada a análise das proteínas *LmEIF4E5* e 6 no ensaio de purificação de fosfoproteínas, utilizou-se as sequências para a predição dos possíveis sítios de fosforilação. Para o *LmEIF4E5* foram observados quatorze sítios enquanto que para o *LmEIF4E6*, apenas oito. É interessante notar que, há uma maior concentração dos sítios preditos nas regiões extremas N- e C-terminal e que, diferentemente do achado para as sequências de *T. brucei*, não há predominância de um determinado resíduo passível de fosforilação. A predição dos sítios direciona a investigação para quais dos possíveis aminoácidos identificados são realmente fosforilados, uma vez que pode ser empregada a técnica de mutagênese sítio-dirigida para abolir o possível sítio, e posteriormente verificar *in vivo* se a proteína modificada ainda pode ser fosforilada.

Nos eucariotos superiores, o eIF4E é uma proteína fosforilada pelas MAP-quinases de integração de sinal Mnk1 e Mnk2 (serina-treonina quinases) em um único sítio, a Ser-209 (em mamíferos), que se encontra na região C-terminal (Joshi *et al.*, 1995). Na predição dos sítios de fosforilação de *T. brucei* e *L. major* não foram encontradas

sequências semelhantes ao motivo fosforilado de humano, podendo demonstrar que o mecanismo ou as quinases envolvidas na fosforilação desses homólogos são diferentes. Em humanos, as quinases Mnks são recrutadas pelo eIF4G e a regulação da fosforilação do eIF4E se dá pela modulação dessa interação (Shveygert *et al.*, 2010). Como há indícios da interação dos homólogos ao eIF4E em estudo de *T. brucei* com TbEIF4G1, 2 e 5, se as Mnks forem responsáveis pela fosforilação dos homólogos em estudo, este pode ser o mecanismo pelo qual estes são regulados por fosforilação. O efeito da fosforilação na atividade do eIF4E e seu impacto na tradução ainda são controversos (McKendrick *et al.*, 2001)..

Como foi anteriormente citado, as investigações em curso do grupo de pesquisa permitem concluir que existem pelo menos quatro complexos semelhantes ao eIF4F em tripanossomatídeos. Além dos já descritos TbEIF4E3 - TbEIF4G4 - TbEIF4A1 e TbEIF4E4 - TbEIF4G3 - TbEIF4A1, outros dois envolveriam a interação TbEIF4E5 com TbEIF4G1 e/ou 2, e TbEIF4E6 com TbEIF4G5. Todos os complexos são expressos simultaneamente na célula e cada um pode estar envolvido em diferentes processos celulares. Situação semelhante é verificada em plantas, onde são encontrados dois complexos distintos e que traduzem mRNAs diferentes (Mayberry *et al.*, 2009). Os dados de interação das proteínas TbEIF4E5 e 6 obtidos serão validados utilizando a imunoprecipitação fusionadas ao tag HA produzidas neste trabalho. Além disso, o padrão de concentração perinuclear encontrado para a localização do TbEIF4E5 também foi observado no homólogo TbEIF4G2 (Lima, comunicação pessoal) e, uma vez que este parece ser parceiro funcional do TbEIF4E5, podem estar co-localizados.

7. CONCLUSÕES

- Através da análise dos alinhamentos entre as sequências dos homólogos ao eIF4E foi possível identificar os motivos de interação ao *cap* e ao eIF4G conservados nos fatores *TbEIF4E5* e 6 e *LmEIF4E5* e 6;
- O padrão de localização do fator *TbEIF4E5* é diferente ao identificado para outros homólogos ao eIF4E nos tripanossomatídeos, enquanto o *TbEIF4E6* mostra-se de forma semelhante ao *TbEIF4E1* e 2;
- Apenas o fator *TbEIF4E5* mostrou-se essencial para a viabilidade do parasita, embora a depleção da proteína *TbEIF4E6* leve a alterações morfológicas;
- Ambos os fatores em estudo em *T. brucei* são fosforilados, o que é característica comum nas proteínas da família eIF4E, e múltiplos possíveis sítios de fosforilação foram identificados *in silico*;
- Foram produzidas as proteínas recombinantes e anticorpos policlonais capazes de reconhecer proteínas nos extratos proteicos de *L. major* e que serão utilizados para dar continuidade a caracterização funcional dos homólogos *LmEIF4E5* e 6.

8. REFERÊNCIAS

- Aboagye-Kwarteng T, ole-MoiYoi OK and Lonsdale-Eccles JD (1991) Phosphorylation differences among proteins of bloodstream developmental stages of *Trypanosoma brucei brucei*. The Biochemical Journal 275: 7–14.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P (2008) Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science, 1725pp
- Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, Hertz-Fowler C and Horn D (2011) High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. Genome research 21: 915–924.
- Andrade RP (2008) Caracterização preliminar de dois homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de Leishmania e Trypanosoma. 58pp.
- Archer SK (2009) Standard culture medium allows clonal dilution of *Trypanosoma brucei* procyclic cells after auto-conditioning. Molecular and biochemical parasitology 164: 100–103.
- Bastin P, Pullen TJ, Moreira-Leite FF, and Gull K (2000) Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. Microbes and infection / Institut Pasteur 2: 1865–1874.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science (New York, N.Y.) 309, 416–422.
- Brenchley R, Tariq H, McElhinney H, Szöör B, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews K, and Tabernero L (2007) The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. BMC Genomics 8: 434.
- Brown CJ, McNae I, Fischer PM and Walkinshaw MD (2007) Crystallographic and mass spectrometric characterisation of eIF4E with N7-alkylated cap derivatives. Journal of molecular biology 372: 7–15.

- Browning KS (1996) The plant translational apparatus. *Plant molecular biology* 32: 107–144.
- Brun R and Schonenberger M (1979) Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. *Acta tropica* 36: 289–292.
- Campbell DA, Thomas S and Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes and Infection* 5: 1231–1240.
- Clayton C and Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and biochemical parasitology* 156: 93–101.
- Cunningham I (1977) New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 24 324–329.
- Daniels J-P, Gull K and Wickstead B (2010) Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiology and molecular biology reviews* 74: 552–569.
- Dell KR and Engel JN (1994) Stage-specific regulation of proteinphosphorylation in *Leishmania major*. *Molecular and biochemical parasitology* 64: 283–292.
- Dhalia R, Marinsek N, Reis CRS, Katz R, Muniz JRC, Standart N, Carrington M and de Melo Neto OP (2006) The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic acids research* 34: 2495–2507.
- Dhalia R, Reis CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, Standart N, and de Melo Neto OP (2004) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and biochemical parasitology* 140: 23–41.
- Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA and Sonenberg N (2000) A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E. *The EMBO journal* 19: 3142–3156.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A-N, Ghedin E, Wortley EA, Delcher AL, Blandin G, *et al.* (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409–415.

- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey E, Hertz-Fowler C, *et al.* (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 21: 1027–1028.
- Freire ER (2010) Avaliação funcional de membros da família protéica eIF4E de *Trypanosoma brucei*. 163.
- Freire ER, Dhalia R, Moura DMN, da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CRS, Hughes K, Figueiredo RCBQ, Standart N, Carrington M, *et al.* (2011) The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and biochemical parasitology* 176: 25–36.
- Gao M, Rychlik W and Rhoads RE (1998) Cloning and characterization of human eIF4E genes. *The Journal of biological chemistry* 273: 4622–4628.
- Gilinger G and Bellofatto V (2001) Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. *Nucleic acids research* 29: 1556–1564.
- Gingras C, Raught B and Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* 68: 913–963.
- Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O and Rodríguez M (2010) Regulation of gene expression in protozoa parasites. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010: 726045.
- Goyer C, Altmann M, Lee H, Blanc A, Woolford Jr JL, Trachsel H and Sonenberg N (1993) TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition. *Molecular and cellular biology* 13: 48–60.
- Grondal EJ, Evers R, Kosubek K and Cornelissen W (1989) Characterization of the RNA polymerases of *Trypanosoma brucei*: trypanosomal mRNAs are composed of transcripts derived from both RNA polymerase II and III. *The EMBO journal* 8: 3383–3389.

- Gunn A and Pitt SJ (2012) *Parasitology: An Integrated Approach* 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons
- Günzl A, Bruderer T, Laufer G, Tu L.-chun, Chung H-min, Lee P-tseng, Lee MG-shu, Gu A and Schimanski B (2003) RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei* RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic cell* 2: 542–551.
- Haile S and Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology* 10: 569–577.
- Hammarton TC (2007) Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 153: 1–8.
- Hem S, Gherardini PF, Osorio y Fortéa J, Hourdel V, Morales M, Watanabe R, Pescher P, Kuzy M, Smith D, Borchers CH, *et al.* (2010) Identification of Leishmania-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* 10: 3868–3883.
- Hernández G, del Mar Castellano M, Agudo M, and Sierra JM (1998) Isolation and characterization of the cDNA and the gene for eukaryotic translation initiation factor 4G from *Drosophila melanogaster*. *European journal of biochemistry / FEBS* 253: 27–35.
- Holzmann K, Gerner C, Pörtl A, Schäfer R, Obrist P, Ensinger C, Grimm R and Sauermann G (2000) A human common nuclear matrix protein homologous to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Biochemical and biophysical research communications* 267: 339–344.
- Imataka H, Gradi A and Sonenberg N (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *The EMBO journal* 17: 7480–7489.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey E, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M-A, Adlem E, Aert R *et al.* (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436–442.

- Jennings FW, Rodgers J, Bradley B, Gettinby G, Kennedy PGE and Murray M (2002) Human African trypanosomiasis: potential therapeutic benefits of an alternative suramin and melarsoprol regimen. *Parasitology international* 51: 381–388.
- Joshi B, Cai A, Keiper B and Minich W (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *Journal of Biological Chemistry* 270: 14597–14603.
- Joshi B, Cameron A and Jagus R (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European journal of biochemistry / FEBS* 271: 2189–2203.
- Jäger AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D’Orso I and Frasch AC (2007) mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2035–2042.
- Kahvejian A, Svitkin Y, Sukarieh R, M’Boutchou M and Sonenberg N (2005) Mammalian poly (A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & Development*, 19: 104–113.
- Kapp LD and Lorsch JR (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annual review of biochemistry* 73: 657–704.
- Keiper BD, Gan W and Rhoads RE (1999) Protein synthesis initiation factor 4G. *The international journal of biochemistry & cell biology* 31: 37–41.
- Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande M, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T and Rhoads RE (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* 275: 10590–10596.
- Kelly S, Reed J, Kramer S, Ellis L, Webb H, Sunter J, Salje J, Marinsek N, Gull K, Wickstead B *et al.* (2007) Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Molecular and biochemical parasitology* 154: 103–109.
- Kennedy PGE (2004) Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *Journal of Clinical Investigation* 113: 496-504.

- Kruel D (2007) Deadly diseases and epidemics: Trypanosomiasis First ed. Infobase.
- Legros D, Gastellu-Etcheberry M, Paquet C, Burri C, Jannin JG and Buscher P (2002) Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. *The Lancet infectious*, 437–440.
- Lejbkiewicz F, Goyer C, Darveau A, Neron S, Lemieux R and Sonenberg N (1992) A fraction of the mRNA 5' cap-binding protein, eukaryotic initiation factor 4E, localizes to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9612–9616.
- Lewdorowicz M, Yoffe Y, Zuberek J, Jemielity J, Stepinski J, Kierzek R, Stolarski R, Shapira M and Darzynkiewicz E (2004) Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid cap-4 structure. *RNA* 10: 1469–1478.
- Li W, Belsham GJ and Proud CG (2001) Eukaryotic initiation factors 4A (eIF4A) and 4G (eIF4G) mutually interact in a 1:1 ratio *in vivo*. *The Journal of biological chemistry* 276, 29111–29115.
- Lima RP (2009) Análise da expressão e localização subcelular dos homólogos *TbEIF4G1* e *TbEIF4G2* do fator de iniciação da tradução eIF4G de *Trypanosoma brucei*. 102.
- Livingstone M, Atas E, Meller A and Sonenberg N (2010) Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Physical biology* 7: 021001.
- Lorsch JR and Dever TE (2010) Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *The Journal of biological chemistry* 285: 21203–21207.
- Lundkvist GB, Kristensson K and Bentivoglio M (2004) Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology* 19: 198–206.
- Mader S, Lee H, Pause A and Sonenberg N (1995) The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and cellular biology* 15: 4990–4997.

- Malvezzi AM (2010) Identificação de modificações pós- traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei*. 72pp.
- Malys N and McCarthy JEG (2011) Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cellular and molecular life sciences* 68: 991–1003.
- Marchini FK, de Godoy LMF, Rampazzo RCP, Pavoni DP, Probst CM, Gnad F, Mann M and Krieger M (2011) Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PloS One* 6: e25381.
- Marcotrigiano, J, Gingras, AC, Sonenberg, N and Burley SK (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular cell* 3: 707–716.
- Marcotrigiano J, Gingras C, Sonenberg N and Burley SK (1997) Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* 89: 951–961.
- Marcotrigiano J, Lomakin IB, Sonenberg N, Pestova TV, Hellen CU and Burley SK (2001) A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. *Molecular cell* 7: 193–203.
- Martínez-Calvillo S, Saxena A, Green A, Leland A and Myler PJ (2007) Characterization of the RNA polymerase II and III complexes in *Leishmania major*. *International journal for parasitology* 37: 491–502.
- Matthews KR, Ellis JR and Paterou A (2004) Molecular regulation of the life cycle of African trypanosomes. *Trends in Parasitology* 20: 40–47.
- Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD and Browning KS (2009) Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. *Plant physiology* 150: 1844–1854.
- McKendrick L, Morley SJ, Pain VM, Jagus R and Joshi B (2001) Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) at Ser209 is not required for protein synthesis in vitro and in vivo. *European journal of biochemistry* 268: 5375–5385.

- Michels PA, Bringaud F, Herman M and Hannaert V (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica and biophysica acta* 1673: 1463–1477.
- Miranda-Saavedra D and Barton GJ (2007) Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins* 68: 893–914.
- Mitropoulos P, Konidas P and Durkin-Konidas M (2010) New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology* 63: 309–322.
- Molyneux DH, Hotez PJ and Fenwick A (2005) “Rapid-impact interventions”: how a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. *PLoS medicine* 2: e336.
- Moura DMN (2011) Análise da participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese proteica de *Trypanosoma brucei*. 128pp.
- Nascimento JF (2010) Análise da expressão e localização subcelular de dois homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei*. 52pp.
- Nett IRE, Martin DM, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber JD, Mehlert A and Ferguson MJ (2009) The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Molecular & cellular proteomics* 8: 1527–1538.
- Niedzwiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieszyńska A, Dadlez M, Gingras A-C, Mak P, Darzynkiewicz E, Sonenberg N *et al.* (2002). Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5’ cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *Journal of molecular biology* 319: 615–635.
- Olsen OW (1986) *Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology*, Third Ed. Baltimore: Dover Publication, 564pp.
- Palmeri A, Gherardini PF, Tsigankov P, Ausiello G, Späth GF, Zilberstein D and Helmer-Citterich M (2011) PhosTryp: a phosphorylation site predictor specific for parasitic protozoa of the family trypanosomatidae. *BMC Genomics* 12: 614.

- Parsons M, Worthey E, Ward PN and Mottram JC (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics 6: 127.
- Pestova TV and Hellen CUT (2006) Translation, interrupted. Nature structural & molecular biology 13: 98–99.
- Pisarev AV, Kolupaeva VG, Yusupov MM, Hellen CUT and Pestova TV (2008) Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. The EMBO Journal 27: 1609–1621.
- Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S and Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. The Journal of biological chemistry 273: 14002–14007.
- Prévôt D, Darlix J-L and Ohlmann T (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. Biology of the Cell 95: 141–156.
- Ptushkina M, Berthelot K, von der Haar T, Geffers L, Warwicker J and McCarthy JE (2001) A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. Nucleic acids research 29: 4561–4569.
- Ptushkina M, von der Haar T, Karim MM, Hughes JM and McCarthy JE (1999) Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state. The EMBO journal 18: 4068–4075.
- Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T and Sonenberg N (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. The EMBO journal 18: 270–279.
- Radwanska M, Chamekh M, Vanhamme L, Claes F, Magez S, Magnus E, de Baetselier P, Büscher P and Pays E (2002) The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. The American journal of tropical medicine and hygiene 67: 684–690.
- Ramirez CV, Vilela C, Berthelot K and McCarthy JEG (2002) Modulation of eukaryotic mRNA stability via the cap-binding translation complex eIF4F. Journal of molecular biology 318: 951–962.

- Reis CRS (2009) Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator eIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major*. 151pp.
- Rhoads RE (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *The Journal of biological chemistry* 284: 16711–16715.
- Rhoads RE, Dinkova TD and Jagus R (2007). Approaches for analyzing the differential activities and functions of eIF4E members. *Methods in Enzymology* 429, 261–297.
- Roberts LJ, Handman E and Foote SJ (2000) Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ* 321: 801–804.
- Roberts L and Janovy Jr J (2009) *Foundations of parasitology*. 8th ed. P. E. Reidy. New York: Roering-Blong, Janice. 720pp.
- Rodgers J (2010) Trypanosomiasis and the brain. *Parasitology* 137: 1995–2006.
- Rogers GW, Richter NJ, Lima WF and Merrick WC (2001) Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *The Journal of biological chemistry* 276: 30914–30922.
- Rogers GW, Richter NJ and Merrick WC (1999) Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *The Journal of biological chemistry* 274: 12236–12244.
- Rom E, Kim HC, Gingras AC, Marcotrigiano J, Favre D, Olsen H, Burley SK and Sonenberg N (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 273: 13104–13109.
- Rong L, Livingstone M, Sukarieh R, Petroulakis E, Gingras AC, Crosby K, Smith B, Polakiewicz RD, Pelletier J, Ferraiuolo M *et al.* (2008) Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA* 14: 1318–1327.

- Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L and Sonenberg N (1996) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1065–1070.
- Ruud K, Kuhlown C, Goss DJ and Browning KS (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of biological chemistry* 273: 10325–10330.
- Sambrook J and Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third Ed.
- Santos DO, Coutinho CER, Madeira MF, BottinoCG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A., Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT *et al.* (2008) Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitology Research* 103: 1–10.
- Sharma U and Singh S (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of vector borne diseases* 45: 255–272.
- Shveygert M, Kaiser C, Bradrick SS and Gromeier M (2010) Regulation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation by mitogen-activated protein kinase occurs through modulation of Mnk1-eIF4G interaction. *Molecular and Cellular Biology* 30: 5160–5167.
- Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, Fenyo D, Wang X, Dewell S and Cross GM (2009) Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes & Development* 23: 1063–1076.
- Simarro PP, Cecchi G, Paone M, Franco JR, Diarra A, Ruiz J, Fèvre EM, Courtin F, Mattioli RC and Jannin JG (2010) The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *International Journal of Health Geographics* 9: 57.
- Simpson AGB, Stevens JR and Lukes J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* 22: 168–174.
- Singh S (2006) New developments in diagnosis of leishmaniasis. *The Indian Journal of Medical Research* 123: 311–330.

- Singh S and Sivakumar R (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy* 10: 307–315.
- Sonenberg N and Dever TE (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 56–63.
- Sonenberg N and Gingras AC (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current opinion in cell biology* 10: 268–275.
- Stevens JR, Noyes HA, Schofield C J and Gibson W (2001) The molecular evolution of trypanosomatidae. *Advances in Parasitology* 48: 1–53.
- Strudwick S and Borden KLB (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation; research in biological diversity* 70: 10–22.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S and Tarleton R (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation* 118: 1301.
- Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, Ishida T, Taniguchi T, Hasegawa H, Terashima A *et al.* (2002) Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m⁷GTP)-and P (1)-7-methylguanosine-P (3)-adenosine-5', 5'-triphosphate (m⁷GpppA)-bound human full-length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C-terminal flexible reg. *Biochemical Journal* 362: 539-550
- Tyler KM and Engman DM (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology* 31: 472–481.
- Varani G (1997) A cap for all occasions. *Structure* 5: 855–858.
- Vincendeau P and Bouteille B (2006) Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78: 645–665.
- Whalen SG, Gingras AC, Amankwa L, Mader S, Branton PE, Aebersold R and Sonenberg N (1996) Phosphorylation of eIF-4E on serine 209 by protein kinase C is inhibited by the translational repressors, 4E-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* 271: 11831–11837.

- Wickstead B, Ersfeld K and Gull K (2002) Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology* 125: 211–216.
- Wolstencroft K, Lord P, Taberner L, Brass A and Stevens R (2006) Protein classification using ontology classification. *Bioinformatics* 22: e530–8.
- Yoffe Y, Zuberek J and Lewdorowicz M (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *RNA*, 1764–1775.
- Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Stepinski J, Altmann M, Darzynkiewicz E and Shapira M (2006) Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryotic cell* 5: 1969–1979.
- Zinoviev A, Léger M, Wagner G and Shapira M (2011) A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic acids research* 39: 8404–8415.

9. CURRICULUM LATTES

2010-2012

Dados Pessoais

Nome Janaína de Freitas Nascimento
Filiação Wilson dos Santos Nascimento e Cícera de Freitas Alves
Nascimento 21/08/1987 - Vitória/ES - Brasil

Endereço profissional Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Av. Moraes Rego s/n Campus da Universidade Federal do Pernambuco
Cidade Universitária - Recife
50670-420, PE - Brasil
Telefone: 81 21012636

Endereço eletrônico e-mail para contato : janaina_biomed@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

- 2010 - 2012** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Localização subcelular e identificação de parceiros funcionais de dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei*
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: EIF4E, Iniciação da tradução, Tripanossomatídeos
Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos
Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico
- 2006 - 2010** Graduação em Biomedicina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Análise da expressão e localização subcelular de homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E em *Trypanosoma brucei*.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Projetos

- 2010 - 2012** Localização subcelular e identificação de parceiros funcionais de dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei*
Descrição: Os tripanossomatídeos são agentes de doenças negligenciadas que atingem milhões de pessoas, como tripanossomíase humana africana (*Trypanosoma brucei*), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e as várias formas de leishmaniose (*Leishmania* sp.). A urgência para a produção de drogas específicas para o tratamento, bem como o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, remete à necessidade do conhecimento dos processos biológicos destes organismos. Um desses processos é o controle da expressão gênica mediada por mecanismos pós-transcricionais, como o controle da síntese de proteínas. Os fatores de iniciação da tradução em eucariotos – os eIFs – catalisam a biossíntese proteica e um dos fatores é o eIF4E, responsável pelo reconhecimento da estrutura *cap* presente na região 5' dos mRNAs. Em *L. major* foram identificados seis homólogos desse fator (LmEIF4E1-6), todos conservados em *T. brucei* (TbEIF4E1-6). A iniciação da tradução em tripanossomatídeos é o alvo de estudo do grupo no CPqAM e tem dentre os resultados a identificação, em *Leishmania major*, de cinco homólogos para o eIF4G (LmEIF4G1 a 5), dois para o eIF4A (LmEIF4A1 e 2) e seis para o eIF4E (LmEIF4E1 a 6), todos conservados em *Trypanosoma brucei*. (DHALLIA *et al.*, 2005). Dos seis homólogos ao eIF4E, os dois últimos (LmEIF4E5 e 6) e seus ortólogos em *T. brucei* (TbEIF4E5 e 6) foram identificados recentemente com a conclusão do sequenciamento do genoma desses organismos e ainda permanecem pouco estudados. A caracterização dos fatores TbEIF4E5-6 foi iniciada com a clonagem dos genes em vetores plasmidiais, expressão das proteínas recombinantes, obtenção dos anticorpos policlonais e posterior quantificação dos níveis intracelulares das proteínas em extratos procíclicos do parasita. Assim, o presente projeto objetiva a

utilização das ferramentas moleculares já produzidas em ensaios que permitam a caracterização funcional dos fatores e a identificação dos possíveis parceiros funcionais.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Janaína de Freitas Nascimento; Éden Ribeiro Freire; Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Responsável); Fabíola Holetz Barbieri

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2008 - 2010 Análise da expressão e localização subcelular de dois homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei*.

Descrição: Os tripanosomatídeos são agentes de importantes doenças negligenciadas que atingem milhões de pessoas, como tripanossomíase humana africana (*Trypanosoma brucei*), doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e as várias formas de leishmaniose (*Leishmania* sp.). A urgência para a produção de drogas específicas para o tratamento, bem como o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico, remete à necessidade do conhecimento dos processos biológicos destes organismos. Um exemplo desses processos é o controle da expressão gênica mediada por mecanismos pós-transcricionais nestes organismos. Os fatores de iniciação da tradução em eucariotos – os eIFs – catalisam a biossíntese protéica e um desses fatores é o eIF4E responsável pelo reconhecimento da estrutura *cap* presente na região 5' dos mRNAs, dentre outras funções. Em *L. major* já foram identificados seis homólogos desse fator (LmEIF4E1-6), todos conservados em *T. brucei* (TbEIF4E1-6). O presente trabalho tem como objetivos quantificar os níveis intracelulares dos homólogos eIF4E5-6 de *T. brucei* bem como realizar a sua localização subcelular, visando concluir os dados sobre análise da expressão desses fatores em *T. brucei*.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);

Integrantes: Janaína de Freitas Nascimento; Éden Ribeiro Freire; Mariana Marques Coutelo Pereira; Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Responsável)

Financiador(es):

Áreas de atuação

1. Genética
2. Biologia Molecular de Tripanosomatídeos

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Apresentação de Trabalho

1. NASCIMENTO, J. F., REIS, C. R. S., MELO NETO, O. P.

LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS DE DOIS HOMÓLOGOS DO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4E DE *Trypanosoma brucei*, 2011.
(Comunicação, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: EIF4E, Iniciação da tradução, Tripanossomatídeos

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: CCSA - UFPE; Cidade: RECIFE; Evento: I JORNADA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA DA UFPE; Inst.promotora/financiadora: PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - UFPE