



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

RENATA SANTANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS
CONSTITUINTES DE UM COMPLEXO DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO DO
TIPO eIF4F EM FORMAS SANGUÍNEAS DE *Trypanosoma brucei***

Recife

2019

RENATA SANTANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS
CONSTITUINTES DE UM COMPLEXO DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO DO
TIPO eIF4F EM FORMAS SANGUÍNEAS DE *Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadores: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

Dr. Eden Ribeiro Freire

Recife
2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Renata Santana da

Caracterização de interações entre proteínas constituintes de um complexo de iniciação da tradução do tipo eIF4F em formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei* / Renata Santana da Silva - 2019.

102 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadores: Danielle Maria Nascimento Moura

Eden Ribeiro Freire

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Tripanossomatídeos 2. Interação proteica 3. Formas sanguíneas
I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orient.) II. Moura, Danielle Maria
Nascimento (coorient.) III. Freire, Eden Ribeiro (coorient.) IV. Título

579.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-162

RENATA SANTANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS CONSTITUINTES DE
UM COMPLEXO DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO DO TIPO eIF4F EM FORMAS
SANGUÍNEAS DE *Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovado em 22/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Orientador)
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por guiar meus passos.

Agradeço imensamente ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pela oportunidade, orientação e todos os ensinamentos compartilhados.

Ao meu coorientador Dr. Eden Freire e em especial a minha coorientadora Dra. Danielle Moura pela paciência, ensinamentos e por me ajudar sempre que possível.

Aos meus queridos e amados pais, Angelita e João, que nunca mediram esforços para me educar, que sempre estão ao meu lado, apoiando em todas as decisões da minha vida e incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.

A todos os colegas do Departamento de Microbiologia pelo acolhimento, apoio, opiniões, ensinamentos e pelos momentos de descontração, meus sinceros obrigada.

Aos meus amigos de pós-graduação, especial a lanca Karine, Isaura, Hirisleide, Dalila, Elton, Jackeline, Rayssa, Bárbara e ao grupo BioMol, tudo ficou mais fácil ao lado de vocês.

A Erikles pela paciência, por sempre estar ao meu lado me dando forças.

As instituições que possibilitaram a execução deste trabalho, o PPGG pelo suporte acadêmico, o IAM/FIOCRUZ- PE pela infra-estrutura e o CNPq pelo suporte financeiro.

Por fim agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação profissional.

“Consagra-te ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.” (BIBLIA, A. T., Provérbios 16:3)

RESUMO

Os tripanossomatídeos são protozoários patogênicos que se caracterizam pelo controle da sua expressão gênica ser pós-transcricional, o qual inclui eventos regulatórios durante a tradução dos mRNAs. Em geral, a tradução em eucariotos se inicia através do reconhecimento dos mRNAs por meio do complexo heterotrimérico eIF4F (eIF4A, eIF4G e eIF4E). Múltiplos homólogos dessas subunidades foram identificados em tripanossomatídeos, formando diferentes complexos do tipo eIF4F. Um desses é formado pelas proteínas EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP, porém sua função ainda não foi definida nem o modo de interação entre suas subunidades. Este trabalho buscou contribuir na caracterização destas três proteínas em células sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, e mapear *in vitro* a interação entre as mesmas. Inicialmente verificou-se por *western blot* a expressão da EIF4G5 em ambas as fases do ciclo de vida do parasita. Linhagens de *T. brucei* expressando as proteínas EIF4G5 e EIF4G5-IP fusionadas ao *tag* PTP foram então obtidas e usadas em ensaios de coimunoprecipitação, técnica pela qual se pode confirmar a formação do complexo na fase sanguínea do parasita. Por fim, proteínas recombinantes foram avaliadas quanto a sua capacidade de interagir entre si em ensaios do tipo *pull-down*. Foram verificadas interações diretas do EIF4E6 tanto com EIF4G5 quanto EIF4G5-IP. Mutações nos aminoácidos EF91-92AA no EIF4G5 aboliu sua ligação ao EIF4E6, sugerindo ser este o sítio de interação entre essas proteínas. Esses resultados avançam no delineamento da estrutura e função do referido complexo nos tripanossomatídeos.

Palavras-chaves: Tripanossomatídeos. EIF4E. Interação proteica. Formas sanguíneas.

ABSTRACT

Trypanosomatids are pathogenic protozoa that are characterized by the control of their post-transcriptional gene expression, which includes regulatory events during the translation of the mRNAs. In general, translation in eukaryotes begins with the recognition of the mRNAs through the heterotrimeric complex eIF4F (eIF4A, eIF4G and eIF4E). Multiple homologs of the eIF4F subunits were identified in trypanosomatids, forming different eIF4F complexes. One of these is formed by EIF4E6 / EIF4G5 / EIF4G5-IP proteins, but its function has not still been defined nor the mode of interaction between its subunits. This work aimed to contribute to the characterization of these three proteins in *Trypanosoma brucei* bloodstream cells, and to map *in vitro* the interaction between them. The expression of EIF4G5 in both phases of the parasite life cycle was initially verified by *Western blot*. *T. brucei* lineages expressing the EIF4G5 and EIF4G5-IP proteins fused to the PTP tag were then obtained and used in coimmunoprecipitation assays where it was possible to confirm the formation of the complex in the bloodstream phase of the parasite life cycle. Finally, recombinant proteins were evaluated for their ability to interact with one another in *pull-down* assays. Direct interactions of EIF4E6 with both EIF4G5 and EIF4G5-IP were observed. Mutations in amino acids EF91-92AA in EIF4G5 abolished its binding to EIF4E6, suggesting that this is the site of interaction between these proteins. These results advance in defining the structure and function of the targeted complex in trypanosomatids.

Keywords: Trypanosomatids. EIF4E. Protein interaction. Bloodstream forms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	As seis principais classes de morfotipos de tripanossomatídeos a.tripomastigota. b.epimastigota, c. amastigota, d.opistomastigota, e.coanomastigota, f.promastigota.....	22
Figura 2 -	Parasita <i>Trypanosoma brucei</i> na forma sanguínea (A) e moscas tsé-tsé (<i>Glossina</i> sp.) (B).....	24
Figura 3 -	Mapa de distribuição da HAT (<i>Human African Trypanosomiasis</i> – Tripanossomíase Africana Humana) em 2016	25
Figura 4 -	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma brucei</i>	28
Figura 5 -	Modificações na posição flagelar durante o ciclo de vida de <i>Trypanosoma brucei</i>	30
Figura 6 -	Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos.....	34
Figura 7 -	Estrutura do <i>cap</i> 4 de tripanossomatídeos.....	36
Figura 8 -	Modelo proposto para <i>decapping</i> e <i>recapping</i> de mRNA em <i>T.brucei</i> ..	37
Figura 9 -	Representação esquemática do mecanismo de início da tradução em eucariotos.....	40
Figura 10 -	Complexo eIF4F, eIF4B e PABP (proteína de ligação a cauda poli-A).....	41
Figura 11 -	Esquema da estrutura do eIF4A.....	42
Figura 12 -	Esquema da estrutura do eIF4G.....	43
Figura 13 -	Estrutura tridimensional da proteína eIF4E de camundongo.....	45
Figura 14 -	Esquema dos dois diferentes complexos do EIF4F de tripanossomatídeos formados pelos homólogos EIF4G3 e EIF4G4....	49
Figura 15 -	Estrutura do PTP- <i>tag</i> na extremidade C-terminal da proteína.....	55

Figura 16 -	<i>Western blot</i> mostrando, nas diferentes concentrações dos extratos proteicos, a presença da proteína EIF4G5 na fase procíclica e sanguínea de <i>T. brucei</i>	62
Figura 17 -	Confirmação da construção plasmidial no vetor pC-PTP-Puro.....	63
Figura 18 -	<i>Western blot</i> para a confirmação da expressão das proteínas. EIF4G5-IP e EIF4G5 transfectadas com o PTP-tag em células da linhagem 427 de <i>T. brucei</i>	64
Figura 19 -	Lisados contendo EIF4G5-IP PTP/PTP (A) EIF4G5 PTP/PTP (B).....	66
Figura 20 -	Ensaio de <i>Western blot</i> de imunoprecipitações das proteínas EIF4G5- IP PTP/PTP e EIF4G5 PTP/PTP.....	67
Figura 21 -	<i>Western blot</i> a partir de cultura de <i>T. brucei</i> 90-13 de RNAi induzidas.....	71
Figura 22 -	Análise <i>in silico</i> dos prováveis motivos responsáveis pelas interações EIF4E6 e EIF4G5.....	72
Figura 23 -	Esquema simplificado das interações investigadas neste trabalho.....	73
Figura 24 -	Gel SDS PAGE 15% mostrando a integridade das proteínas expressas e dialisadas fusionadas a GST.....	74
Figura 25 -	Transcrição <i>in vitro</i>	75
Figura 26 -	Tradução <i>in vitro</i>	76
Figura 27 -	Análise de interação da proteína EIF4G5.....	77
Figura 28 -	Análise de interação da proteína EIF4E6.....	78
Figura 29 -	Análise de interação da proteína EIF4G5-IP.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Características dos homólogos do complexo eIF4F e PABP em <i>T. brucei</i>	47
Quadro 2 -	Lista com as construções plasmidiais disponíveis de trabalhos anteriores.....	52
Quadro 3 -	Lista de antibióticos e suas respectivas concentrações para linhagens em células sanguíneas (BSF).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais peptídeos identificados pela técnica de espectrometria de massas associados a proteína EIF4G5.....	69
Tabela 2 - Principais peptídeos identificados pela técnica de espectrometria de massas associados a proteína EIF4G5-IP.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP	<i>4E-binding protein</i> – Proteína de ligação ao 4E
A	Alanina
ATP	Adenosina trifosfato
BARP	<i>Brucei Alanine Rich Protein</i> – Proteína rica em alanina de <i>T. brucei</i>
BSF	<i>Bloodstream Form</i> – Forma sanguínea
Cap	Estrutura presente na extremidade 5' do mRNA
CMF	Complexo Multifatorial
DEAD	Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D)
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
E	Ácido Glutâmico
eIF	<i>eukaryotic Initiation Factor</i> – Fator de Iniciação Eucariótico
EP	(Glu-Pro)
F	Fenilalanina
G418	Análogo da neomicina
Glu	<i>Glutamic Acid</i> – Ácido Glutâmico
Gli	<i>Glycine</i> – Glicina
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GST	Glutathione S-transferase
H	Histidina
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i> – Tripanossomíase Africana Humana
IgG	Imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
IPTG	Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
m ⁷ GTP	<i>cap 7-metilguanosine-triphosphate</i> – <i>cap 7</i> -metilguanosina-trifosfato
Met	Metionina
mL	Mililitro

Mnk	<i>MAP-kinase signal integrating kinases</i> – Proteína quinase de integração de sinal das MAP quinases
ng	Nanograma
mM	milimolar
mRNA	<i>Messenger RNA</i> – RNA Mensageiro
PABP	<i>Poli (A) Binding Protein</i> – Proteína de ligação ao Poli A
PAD	<i>Protein Associated with Differentiation</i> – Proteína associada com a diferenciação
Paip	<i>PABP-interacting protein</i> – Proteína de interação com a PABP
Pb	Pares de base
PCF	<i>Procyclic Form</i> – Forma procíclica
PGCs	<i>Polycistronic Gene Clusters</i> – Grupamentos gênicos policistrônicos
PIC	<i>Preinitiation Complex</i> – Complexo de pré-iniciação
Pro	<i>Proline</i> – Prolina
PTP	ProtC-TEV-ProtA – Proteína C, sítio de clivagem TEV protease, Proteína A
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> – Fluoreto de polivinilideno
PDB	<i>Protein Data Bank</i> – Banco de dados de proteínas
RBP	<i>RNA Binding Protein</i> – Proteína ligadora de RNA
RNAi	RNA de interferência
RPM	Rotação por minuto
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i> – Motivo de reconhecimento do RNA
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio
SL-RNA	<i>Splicing Leader RNA</i> – Sequência Líder RNA
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i> – Tampão Salino de Tris
TbPTP1	<i>Protein Tyrosine Phosphatase 1</i> – Tirosina fosfatase 1
TET	<i>Tetracycline</i> – Tetraciclina
The	<i>Threonine</i> – Treonina
tRNA	<i>Transfer RNA</i> – RNA Transportador
tRNAi	<i>Transfer RNA initiator</i> – RNA Transportador iniciador
UTR	<i>Untranslated Region</i> – Região não traduzida

V	Valina
VSG	<i>Variant Surface Glycoprotein</i> – Glicoproteína variante de superfície
Y	Tirosina
W	Triptofano
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
WT	<i>Wild type</i> – Linhagem do tipo selvagem
μL	Microlitro
μg	Micrograma.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	REFERENCIA TEÓRICO.....	21
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	21
2.2	TRIPANOSSOMÍASE AFRICANA E <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i>	22
2.2.1	Distribuição geográfica e evolução de tratamento.....	24
2.2.2	Ciclo biológico.....	26
2.2.3	<i>Trypanossoma brucei</i> modelo de estudo.....	28
2.2.4	Diferenciação do <i>Trypanosoma brucei</i> em cultura.....	29
2.3	BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	31
2.3.1	Organização genômica e transcrição policistrônica.....	31
2.3.2	Processamento de mRNA.....	33
2.3.3	<i>cap4</i> e sua formação.....	34
2.3.3	Degradação do mRNA.....	36
2.4	SÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS.....	38
2.4.1	Iniciação da tradução em eucariotos.....	38
2.4.2	eIF4F e PABP em eucariotos.....	41
2.4.3	eIF4A: A RNA helicase.....	41
2.4.4	eIF4G: o estruturador do complexo eIF4F.....	42
2.4.5	eIF4E: proteína de ligação ao <i>cap</i>.....	43
2.4.6	PAPB – Proteína de ligação à cauda poli-A.....	45
2.5	FATORES DA INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	46
2.5.1	Complexo eIF4F e PAPB.....	46
2.5.2	Homólogos de eIF4A em tripanossomatídeos.....	47
2.5.3	Homólogos de eIF4G.....	48
2.5.4	Homólogos de eIF4E.....	49

3	MÉTODO.....	52
3.1	CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS.....	52
3.1.1	Reações de subclonagem.....	52
3.2	CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DE <i>T. BRUCEI</i>	53
3.3	OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE <i>T. BRUCEI</i>	55
3.4	OBTENÇÃO DE LISADO CELULAR DE <i>T. BRUCEI</i>	56
3.5	ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	56
3.6	IMUNOPRECIPITAÇÃO DO COMPLEXO POR PTP-TAG E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	57
3.7	RNA DE INTERFERÊNCIA E CURVAS DE CRESCIMENTO.....	58
3.8	ENSAIO DE INTERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	58
3.8.1	Expressão de proteínas recombinantes.....	58
3.8.2	Purificação e diálise de proteínas recombinantes.....	59
3.8.3	Transcrição e tradução <i>in vitro</i>.....	62
3.8.4	Ensaio de interação proteína-proteína (<i>pull-down</i>).....	61
4	RESULTADOS.....	62
4.1	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENDÓGENAS.....	62
4.2	IDENTIFICAÇÃO DE COMPLEXOS ENVOLVENDO OS HOMÓLOGOS EIF4G5 E EIF4G5-IP	63
4.2.1	Subclonagem do gene EIF4G5 no vetor pC-PTP-Puro.....	63
4.2.2	Análises da expressão de proteínas fusionadas ao PTP-tag.....	64
4.2.3	Imunoprecipitação de proteínas fusionadas ao PTP-tag.....	65
4.2.4	Identificação de parceiros através da espectrometria de massas.....	67
4.3	ANÁLISE DO EFEITO DA DEPLEÇÃO DO EIF4G5-IP E EIF4G5 POR RNA DE INTERFERÊNCIA.....	71
4.4	IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS EIF4E6 E EIF4G5.....	72
4.4.1	Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	73
4.4.2	Transcrição e tradução <i>in vitro</i> dos genes EIF4E6 e EIF4G5	75

4.4.3	Ensaio de interação proteína-proteína para investigar as interações entre o EIF4E6, EIF4G5 e EIF4G5-IP.....	76
5	DISCUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÕES.....	86
	REFERÊNCIAS.....	87
	APÊNDICE - CURRICULUM VITAE.....	101

1 INTRODUÇÃO

Os protozoários flagelados patogênicos da família Trypanosomatidae, gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, têm importância para a saúde pública por serem capazes de causar doenças infecto parasitárias englobadas nas chamadas “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTNs), sendo estas, a doença do sono, a doença de Chagas e as leishmanioses. Como consequência, tem-se a alta morbimortalidade que afeta milhões de pessoas mundialmente, em especial nos países em desenvolvimento, se tem associado a recursos escassos com prevenção ineficiente.

Os tripanossomatídeos apresentam um ciclo de vida muito complexo, apresentando formas morfológicas distintas, além de outras peculiaridades moleculares, como a transcrição policistrônica, o *trans-splicing* e a ausência de promotores clássicos para a RNA polimerase II. Essa ausência acarreta em uma complexa regulação da expressão gênica, que, diferentemente da maioria dos eucariotos, acontece principalmente por mecanismos pós-transcricionais, atuando no processamento, transporte e controle da estabilidade e tradução dos mRNAs em proteínas.

O processo de tradução em eucariotos acontece em quatro etapas, sendo a primeira delas, a iniciação, a mais sujeita a processos de regulação. A iniciação começa quando a subunidade menor ribossomal 40S, junto ao tRNA iniciador, formam o complexo de pré-iniciação, que interage com o mRNA através da estrutura chamada *cap*, presente na extremidade 5' do mesmo. Nesta etapa participam os chamados fatores de iniciação eucarióticos (*eIFs* - *Eukaryotic Initiation Factors*). Dentre esses, destaca-se o complexo heterotrimérico eIF4F, constituído por três subunidades: eIF4E, eIF4A e eIF4G. O papel principal do complexo eIF4F é reconhecer a extremidade 5' do mRNA e mediar a associação da mesma com a subunidade 40S ribossomal e a outros fatores.

O processo de tradução ainda não é completamente elucidado em tripanossomatídeos, sendo identificados em estudos prévios múltiplos homólogos para cada subunidade do complexo eIF4F. Foram descritos seis homólogos do eIF4E (EIF4E1 a 6), cinco do eIF4G (EIF4G1 a 5) e dois do eIF4A (EIF4AI e III), todos conservados em diferentes espécies dessa família. Destes, os homólogos EIF4E5 e EIF4E6 foram identificados mais recentemente e tem-se pouco conhecimento sobre

sua função. A influência da participação destas proteínas no processo de tradução dos tripanossomatídeos vem sendo avaliada nos últimos anos, mas ainda são necessários mais estudos para verificar a sua atuação durante a biossíntese proteica e em outros processos celulares importantes.

Na tentativa de gerar mais dados sobre sua caracterização funcional, o EIF4E6 foi escolhido como objeto de estudo deste trabalho. Dados da literatura mostram que em células procíclicas de *Trypanosoma brucei* essa proteína seria necessária para a viabilidade celular. Além disso, essa proteína é capaz de interagir com outras proteínas, formando um complexo que possui interações com proteínas com domínios relacionados à formação do *cap* na extremidade 5' dos mRNAs. Nesse contexto, este estudo buscou identificar e caracterizar o complexo formado pelo EIF4E6 e proteínas parceiras em células da fase sanguínea do parasita, bem como estudar o modo de interação entre subunidades específicas desse complexo. O entendimento dessas propriedades deve então contribuir nos avanços da elucidação da função desse complexo e do EIF4E6 em tripanossomatídeos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel sobre a tradução e a sobrevivência de células sanguíneas de *Trypanosoma brucei* do complexo formado pelas proteínas EIF4E6, EIF4G5 e EIF4G5-IP, caracterizando melhor as interações entre elas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar os níveis de expressão da proteína EIF4G5 em formas sanguíneas do parasita;
- b) Identificar a presença do complexo EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP na fase sanguínea do parasita;
- c) Verificar o efeito da depleção dos fatores EIF4G5 e EIF4G5-IP na viabilidade celular da fase sanguínea de *T. brucei*.

d) Mapear os domínios de ligação envolvidos na interação entre as proteínas EIF4E6, EIF4G5 e EIF4G5-IP.

2 REFERENCIAL TEORICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados unicelulares pertencentes à ordem Kinetoplastida, caracterizada por apresentar um DNA mitocondrial (kDNA) que forma estruturas coráveis visíveis por microscopia óptica, denominadas de cinetoplasto (Marande et al., 2005). A família Trypanosomatidae possui treze gêneros, classificados principalmente por suas características morfológicas, em conjunto com as relações do hospedeiro (Lopes, 2010; Lukes et al., 2014). Dois desses gêneros, *Trypanosoma* e *Leishmania*, destacam-se devido ao seu papel como agentes patogênicos humanos, sendo responsáveis por enfermidades de alta morbidade e mortalidade em diversos países em desenvolvimento, tais como: Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*), Doença do sono (*Trypanosoma brucei*) e as várias formas da leishmaniose (*Leishmania sp.*). Essas doenças estão associadas a um amplo espectro de sintomas, com diferentes severidades e mecanismos de patogênese (Jackson, 2015; Kaufer et al., 2017).

Os protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae apresentam uma ampla distribuição geográfica e parasitam vertebrados, invertebrados e plantas. Grande parte da sua biologia celular é semelhante entre as espécies e todas apresentam, como exemplo, um único flagelo originado perto de sua única mitocôndria através de uma bolsa flagelar que, dependendo da forma que o protozoário assume, pode ou não se exteriorizar. Possuem ainda peroxissomos modificados, denominados glicossomos, responsáveis pela realização da glicólise (Stuart et al., 2008). Em comum também é sua organização genômica e diferentes processos biológicos, bem como as alterações morfológicas sofridas durante seus ciclos de vida, que podem apresentar diferentes morfotipos celulares, sendo os mais comuns: tripomastigota, epimastigota, amastigota, opistomastigota, coanomastigota e promastigota (Figura 1) (Lopes, 2010; Kaufer et al., 2017). Esses morfotipos celulares decorrem de modificações das dimensões do flagelo livre, bem como a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (Kaufer et al., 2017). Além disso, em relação ao ciclo de vida, estes protozoários podem ser heteroxênicos quando o ciclo biológico apresenta dois hospedeiros, podendo um deles ser invertebrado e o outro vertebrado ou planta, ou monoxênicos, quando completam o ciclo de vida em apenas um único hospedeiro

(Simpson et al., 2006).

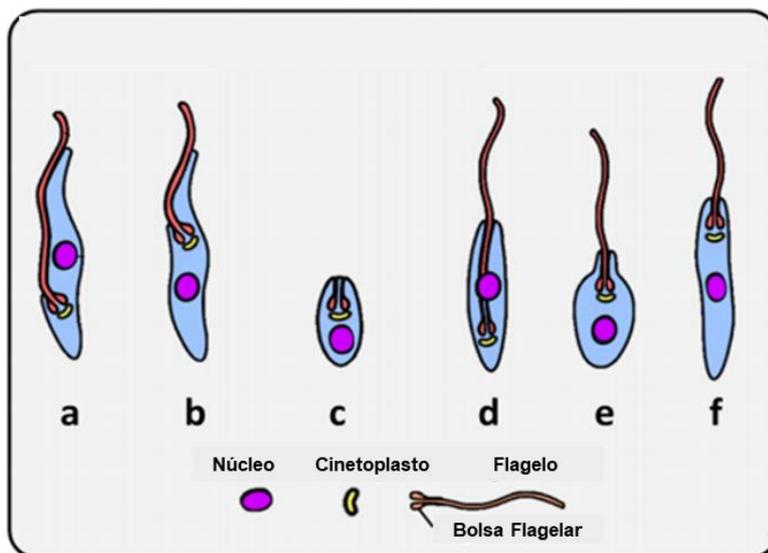


Figura 1. As seis principais classes de morfotipos de tripanossomatídeos. a. tripomastigota, b. epimastigota, c. amastigota, d. opistomastigota, e. coanomastigota, f. promastigota. Fonte: Adaptado de Kaufer (2017).

2.2 TRIPANOSSOMÍASE AFRICANA E *TRYPANOSOMA BRUCEI*

A Doença do sono, também conhecida como HAT (*Human African Trypanosomiasis*), é uma infecção parasitária, inclusa no grupo das “Doenças Tropicais Negligenciadas”, sendo esta causada por protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma*, espécie *T. brucei* (Figura 2A). A HAT, em suas duas formas, pode apresentar dois estágios. O primeiro é sistêmico (fase hemolinfática) e é caracterizado por não possuir sintomas clínicos específicos, variando entre indivíduos. Neste estágio é mais comum febre intermitente, dor de cabeça, prurido, problemas dermatológicos, com várias erupções cutâneas, conhecidas como “trypanides”, linfadenopatias, astenia, anemia, distúrbios cardíacos, distúrbios endócrinos, dores musculoesqueléticas e hepatoesplenomegalia. O segundo estágio se inicia quando os parasitas cruzam a barreira hematoencefálica e atingem o sistema nervoso central, causando distúrbios sensoriais, motores e psiquiátricos, incluindo distúrbios do sono, caracterizado nesses pacientes por apresentar um padrão de sonolência diurna e

insônia noturna. Na fase final da doença apresentam, como consequência da desmielinização e atrofia do sistema nervoso central, distúrbios de consciência, além de demência e convulsões (Cnops et al., 2015; Franco et al., 2014; Kennedy, 2013). A maioria dos sintomas de ambos os estágios se sobrepõem, dificultando a distinção entre eles. Em geral, os pacientes com HAT, quando não tratados, progridem gradualmente para o coma, insuficiência grave dos órgãos, colapso fisiológico e, eventualmente, morte (Cnops et al., 2015; Kennedy, 2013).

Apenas duas subespécies são capazes de transmitir a doença aos seres humanos: *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*), causando a forma crônica da doença em 24 países do oeste e parte central da África, e englobando cerca de 97% dos casos reportados; e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*), causando a forma mais aguda e severa, presente em 13 países do sul e no leste da África e abrangendo menos de 3% dos casos. Em ambos os casos, a transmissão ocorre através de moscas *tsé-tsé* (*Glossina* sp.) (Figura 2B) (Kennedy, 2013; WHO, 2018). A doença é distribuída em áreas restritas (focos), localizadas principalmente em zonas rurais e remotas de países da África Subsaariana, onde possuem condições ambientais adequadas para a presença do vetor. Apenas em Uganda ambas as formas da doença são encontradas (Wamwiri; Changasi, 2016; WHO, 2018).

Algumas outras subespécies de *T. brucei* e espécies relacionadas também são capazes de infectar animais selvagens e domésticos causando AAT (*African Animal Trypanosomiasis*). Entre elas encontram-se *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. evansi* e a subespécie *T. brucei brucei*. Esta última causa a doença “nagana” no gado, que tem como consequência a limitação da produção, causando assim grandes impactos econômicos nas regiões afetadas (Aksoy et al., 2017).

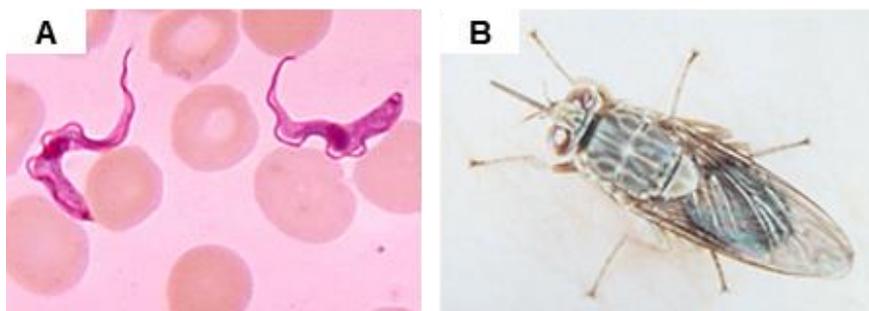


Figura 2. Parasita *Trypanosoma brucei* na forma sanguínea (A) e moscas tsé-tsé (*Glossina* sp.) (B). Fonte: Adaptado de Centers of Disease Control and Prevention (2018).

2.2.1 Distribuição geográfica e evolução de tratamento

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde, entre 1999 e 2017, o número relatado de novos casos da forma crônica da HAT (*T. b. gambiense*) caiu em 92%, de 27.862 para 2.131. Durante o mesmo período, o número de casos recém-relatados da forma aguda caiu 91%, de 619 para 53 (WHO, 2018). Apesar da acentuada queda, os registros sobre a HAT indicam que houve três grandes epidemias no século XX, sendo que a primeira (1896-1906) afetou principalmente Uganda e o Congo, matando cerca de 500 mil e 300 mil pessoas, respectivamente (Steverding, 2008; WHO, 2018). Na tentativa de controle, estudos para a fabricação de um medicamento curativo e profilático fizeram com que, ainda em 1916, o composto Suramin fosse lançado na terapia de fase inicial de infecções por *T. b. rhodesiense*. Este composto, contudo, tinha como efeitos adversos a alta toxicidade medular e complicações neurológicas como neuropatia periférica (Kennedy, 2013).

Para o controle da segunda epidemia de HAT o Suramin foi utilizado entre 1920-1940 em diversos países africanos, conjuntamente com a implantação de equipes móveis voltadas para a detecção, tratamento, e eliminação dos reservatórios parasitários. O surgimento de novas drogas como a Pentamida, para estágio inicial de *T. b. gambiense*, e posteriormente o Melarsoprol, para fase tardia de infecções por *T. b. rhodesiense*, bem como o controle de vetores, fez com que em 1960 a doença fosse controlada, com apenas 500 casos relatados em todo o continente (Franco et al., 2014; Welburn et al., 2016).

A subsequente diminuição do controle da HAT, entretanto, foi seguida da terceira epidemia, entre 1970-1990, afetando principalmente Angola, Congo, Sudão do Sul e

o distrito do oeste do Nilo de Uganda, com cerca de 300 mil novos casos por ano. O controle veio após a introdução da Eflornitina no tratamento do estágio final *T. b. gambiense*, que resultou em 2009 na maior diminuição do número de casos novos, menos de 10.000 por ano. Conjuntamente com esse progresso fora lançada mais uma droga, sendo esta utilizada em combinação com a Eflornitina, a NECT (nifurtimox e eflornitina) (Field et al., 2017; Matthews, 2015; WHO, 2018). A figura 3 mostra a distribuição da HAT com suas respectivas áreas envolvidas.

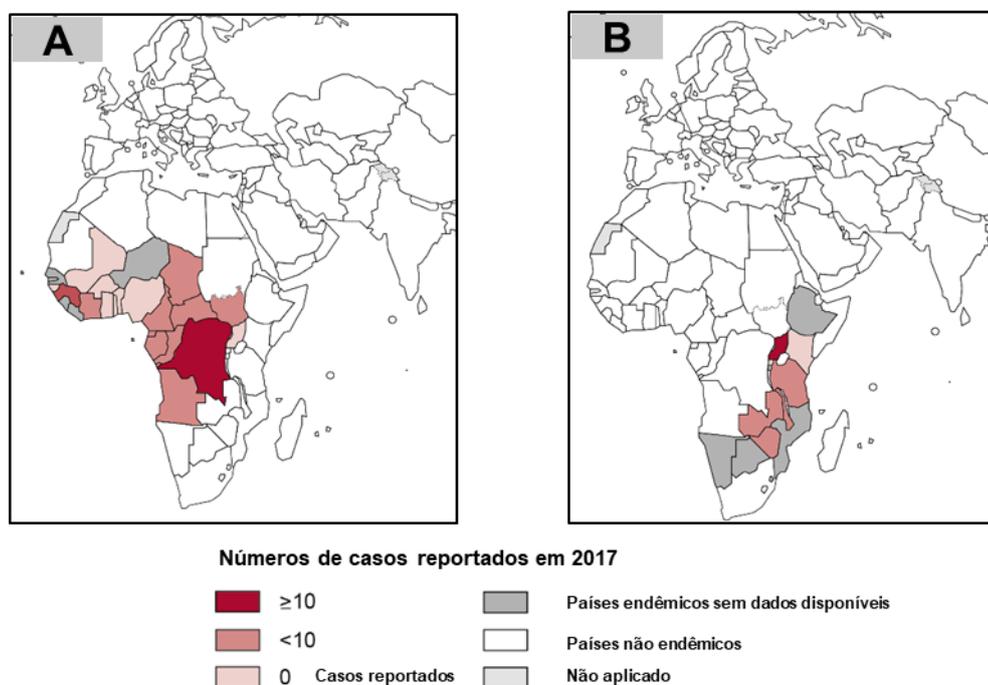


Figura 3. Mapa de distribuição da HAT (*Human African Trypanosomiasis – Tripanossomíase Africana Humana*) em 2017. (A) Distribuição da HAT causada pelo *T. b. gambiense*. (B) distribuição da HAT causada pelo *T. b. rhodesiense*. Fonte: Adaptado de WHO (2018).

A OMS declarou em 2012 uma meta para eliminação da HAT, na fase inicial, até 2020 e zero incidência da HAT na sua fase tardia até 2030. Uma vez que o controle desta é mais difícil devido à presença de muitos reservatórios de animais, ocorre um contínuo risco de reemergência (Bateta et al., 2017). Sendo assim, estudos de desenvolvimento farmacológico de novas drogas eficazes no tratamento são necessárias, principalmente na fase mais tardia da doença, visto que os

medicamentos utilizados são considerados de alto custo com um longo regime de tratamento e causando uma diversidade de efeitos colaterais. Esses são devidos à sua alta toxicidade levando ao quadro de encefalopatia reativa pós-tratamento, que ocorre em cerca de 5% a 18% dos pacientes, que pode levar a óbito. Além disso, a deficiência no diagnóstico correto impacta em uma maior dificuldade de combate à doença (Fairlamb et al., 2016; Field et al., 2017; Sutherland et al., 2015).

Diante do que foi exposto, são necessários ainda mais estudos para melhor compreensão sobre a biologia celular e molecular dos parasitas causadores desta doença, bem como o desenvolvimento destes nos seus hospedeiros. Essas informações são fundamentais para se apontar novos alvos biológicos para o desenvolvimento de novos quimioterápicos, a fim de se encontrar métodos preventivos e de tratamento mais eficazes.

2.2.2 Ciclo biológico

A infecção de *T. brucei* no hospedeiro vertebrado é iniciada quando formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas pela picada da mosca tsé-tsé (*Glossina* sp.) infectada. Ao entrar na corrente sanguínea do mamífero, esses parasitas se diferenciam nas formas tripomastigotas sanguíneas, formas longas e proliferativas (*slender forms*). Estas são responsáveis pelo aumento da parasitemia, além de possuírem uma capacidade de evasão do sistema imune, decorrente da expressão de VSGs (*Variant Surface Glycoprotein* – Glicoproteínas Variantes de Superfície), proteínas que estão ligadas na superfície de membrana por uma âncora de GPI (glicosil fosfatidil inositol) (Matthews, 1999, 2005; Roditi e Liniger, 2002). Devido ao aumento do número de parasitas no sangue, ocorre outro processo de diferenciação resultando na forma sanguínea não proliferativa, morfologicamente mais curta e larga (*stumpy forms*). Após um novo repasto sanguíneo essas células são ingeridas, pela mosca tsé-tsé, sendo capazes de se diferenciar nas formas tripomastigotas procíclicas (Fenn e Matthews, 2007; Franco et al., 2014).

Nas formas procíclicas ocorre uma substituição do revestimento de VSGs por proteínas de superfície do tipo prociclinas, termo associado a duas proteínas funcionalmente distintas, caracterizadas por diferentes motivos de repetição internos: prociclina EP (Gli-Pro), que possui três isoformas (EP1, EP2 e EP3) e prociclina

GPEET (Gli-Pro-Glu-Glu-The). As duas prociclinas são expressas no início da diferenciação para a forma procíclica de *T. brucei*, embora a expressão da prociclina GPEET diminua com a continuidade do desenvolvimento celular, sendo substituída pelas isoformas EP1 e EP3 em formas procíclicas tardias (Fenn e Matthews, 2005; Franco et al., 2014; Urwyler et al., 2005; Vassella et al., 2001).

Os tripomastigotas procíclicos migram para o proventrículo do inseto, espaço que ocorre uma divisão celular assimétrica, originando as formas epimastigotas longas e curtas, sendo essas capazes de migrar para as glândulas salivares, onde se ligam a células epiteliais e se transformam em epimastigotas proliferativas, as quais expressam na sua superfície o antígeno BARP (*brucei Alanine Rich Protein*) (Franco et al., 2014). Eventualmente essas células epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, readquirem o revestimento de VSG, e são liberadas para o lúmen da glândula salivar, em preparação para a inoculação em um novo hospedeiro mamífero (Figura 4) (Franco et al., 2014).

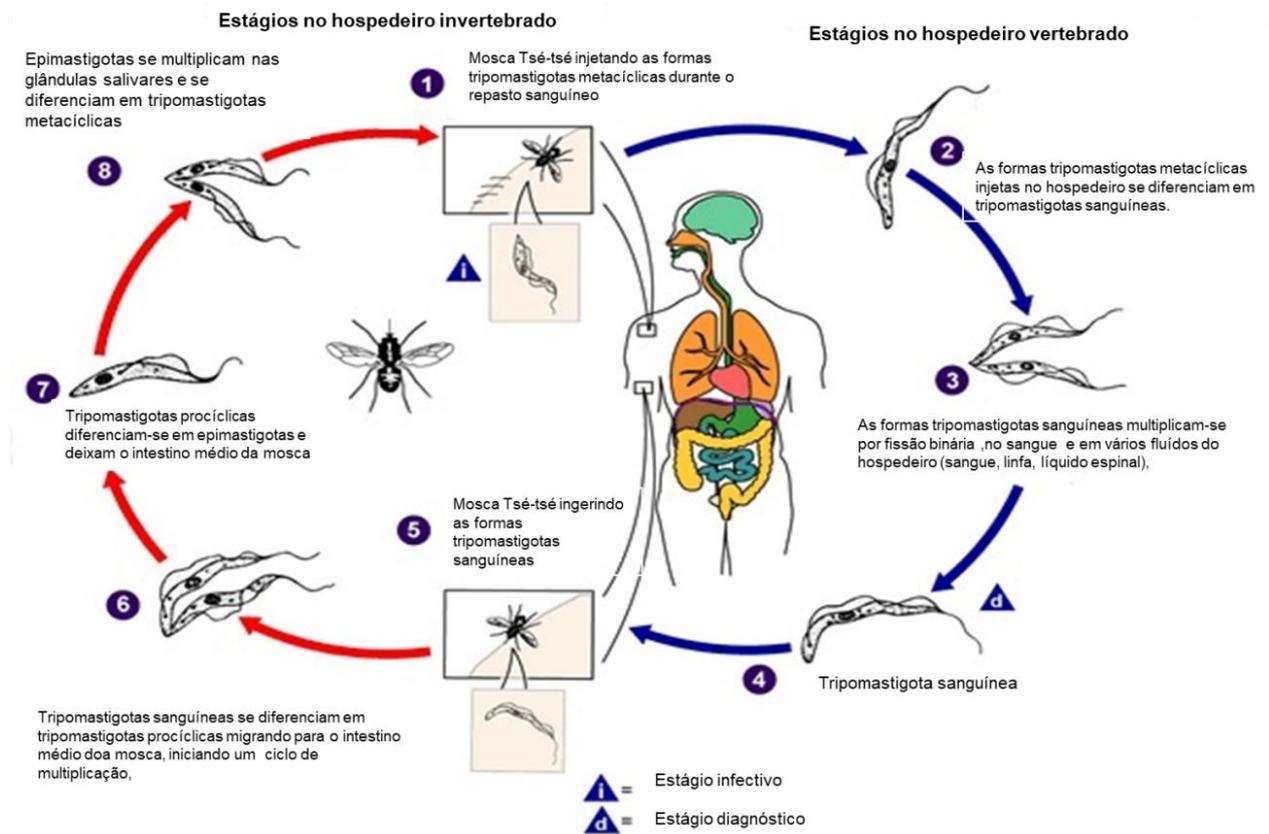


Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma brucei*. A mosca tsé-tsé, após o repasto sanguíneo, injeta as formas tripomastigotas metacíclicas no sangue do hospedeiro vertebrado (1). Dentro do hospedeiro, transformam-se em tripomastigotas sanguíneas e migram para outros fluidos corporais (2) e continuam se multiplicando por fissão binária (3). Ao realizar um novo repasto, as moscas se infectam com as formas tripomastigotas sanguíneas (4/5). No intestino médio estas transformam-se em tripomastigotas procíclicas (6). Quando deixam o intestino médio, transformam-se em epimastigotas (7) e estas migram para as glândulas salivares, que ficam até o novo repasto (8). Fonte: Adaptado de Centers of Disease Control and Prevention (2018).

2.2.3 *Trypanosoma brucei*: modelo de estudo

O *Trypanosoma brucei* é um protozoário modelo de variados processos biológicos, incluindo: variação antigênica, a reciclagem de seus antígenos de superfície (VSG) proporcionando um mecanismo de escape imunológico do hospedeiro; âncoras de glicosil fosfatidil inositol, para a imobilização de proteínas na membrana citoplasmática; e edição de RNAs mitocondriais, modificados pela inserção enzimática de nucleotídeos na sequência final. Esses processos foram primeiramente encontrados nesse protozoário e só posteriormente caracterizados em outros eucariotos (Poon et al., 2012). Além disso, a fácil manipulação de ferramentas de

análises de genética reversa possibilitou a expressão, induzida ou não, de genes que codificam proteínas modificadas contendo marcadores (*tags*) diversos, como os *tags* de afinidade, melhorando o processo de purificação de complexos proteicos. Além disso, a construção de linhagens celulares de *T. brucei* modificadas, que expressavam tanto o repressor da tetraciclina (TetR), quanto a T7 RNA polimerase viral (T7RNAP), através da utilização de vetores integrados ao genoma, foram úteis no desenvolvimento das análises fenotípicas por *knockdown* através da técnica de RNA interferência (RNAi) (Kelly et al, 2007; Wirtz et al., 1999). Estudos realizados por meio deste mecanismo em *T. brucei* permitem extrapolar os resultados obtidos para outras espécies de tripanossomatídeos, nas quais a maquinaria de RNAi não é competente. Esse parasita é então, utilizado como um excelente modelo de estudo de processos biológicos básicos encontrados apenas nos tripanossomatídeos.

2.2.4 Diferenciação do *Trypanosoma brucei* em cultura

Durante o seu ciclo de vida, processos de diferenciação entre as duas principais formas proliferativas do *T. brucei*, as formas sanguíneas dos mamíferos e as formas procíclicas e epimastigotas dos insetos, levam a um processo de remodelamento celular acompanhado por mudanças morfológicas, como o posicionamento de organelas que mudam durante a transição entre os estágios específicos (Figura 5) (Fenn e Matthews, 2007; Gadelha et al., 2011; Matthews, 2005). Este processo pode ser acompanhado em cultura e a disponibilidade de ferramentas para a manipulação genética do *T. brucei*, bem como o cultivo das suas duas principais formas de vida, permitiu uma melhor caracterização dos seus mecanismos de diferenciação celular e o estabelecimento de métodos para realizar essa diferenciação em cultura.

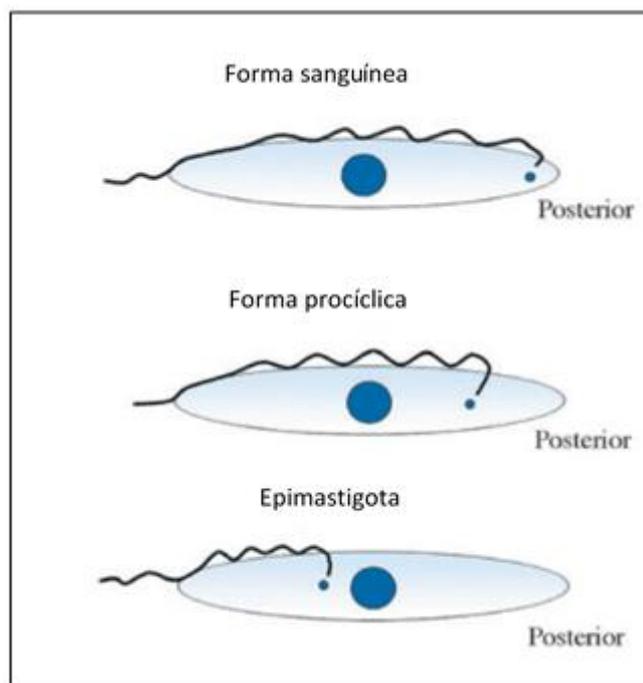


Figura 5. Modificações na posição flagelar durante o ciclo de vida de *Trypanosoma brucei*. Parasita na forma sanguínea, procíclica e epimastigota e suas diferenças com relação à posição do núcleo e à extremidade posterior da célula. Fonte: Adaptado de Matthews (2005).

Já há bastante tempo, estudos comprovaram que o processo de diferenciação em *T. brucei*, das formas sanguíneas em formas procíclicas, pode ser realizado *in vitro*. Esta diferenciação se dá após mudança de temperatura de 37°C para 26°C (choque frio) na presença de citrato/cis-aconilato (CCA) no meio de cultura (Czichos et al., 1986). A caracterização mais recente deste processo revelou que formas sanguíneas *stumpy* do *T. brucei*, formas não replicativas e passíveis de diferenciação nas formas procíclicas, são sensíveis ao CCA através da expressão das proteínas PAD (Proteínas Associadas à Diferenciação), sendo observados níveis elevados de PAD2 com redução de temperatura. Uma vez sensibilizadas, o CCA atua regulando negativamente um inibidor de diferenciação, uma tirosina fosfatase *TbPTP1* (*Protein Tyrosine Phosphatase 1*). Como consequência dessa inibição, um substrato da *TbPTP1*, a fosfatase *TbPIP39*, passa a ser fosforilada, estimulando a diferenciação (Szoor et al., 2010). Szoor e colaboradores (2013) mostraram ainda a atuação de ácidos leves sob a mesma via de regulação do CCA.

Até 2012 a diferenciação de formas procíclicas em sanguínea só era possível através de experimentos que envolviam infecção de moscas tsé-tsé. Entretanto estudos de Kolev e colaboradores (2012) mostraram que uma proteína com domínios

de ligação ao RNA, a RBP6 (*RNA Binding Protein*), como mediadora do controle pós-transcricional, desencadeia a via de diferenciação celular após dias. Mais recentemente a proteína RBP10, encontrada apenas nas formas sanguíneas, mostrou-se capaz de transformar diretamente as formas metacíclicas em epimastigotas, diminuindo o tempo para a transformação de dias para 48 horas (Mugo et al., 2017). A indução de todas as etapas conhecidas de diferenciação do *T. brucei* em cultura ressalta ainda sua utilização para se entender mecanismos controlando os processos de diferenciação em diferentes espécies de tripanossomatídeos, patogênicos ou não.

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

Já se tem conhecimento de que os tripanossomatídeos apresentam algumas peculiaridades nos seus aspectos moleculares que os diferenciam dos demais eucariotos. Isso é devido ao fato desses organismos terem divergido muito precocemente na linhagem evolutiva eucariótica, adquirindo assim, características moleculares únicas. Como exemplo se destacam sua organização genômica e mecanismos de expressão gênica, que incluem: carência de promotores clássicos para a RNA polimerase II; o agrupamento de genes codificantes de proteínas dispostos em série; a transcrição de vários genes sob o controle de uma mesma região promotora, gerando pré-mRNAs policistrônicos; e o processamento destes pré-mRNAs através de *trans-splicing* (processamento em *trans*). Essas diferenças implicam em uma complexa regulação da expressão gênica, que ocorre principalmente mediada por mecanismos pós-transcricionais, e um papel crucial parece ser o do controle da iniciação da tradução dos mRNAs em proteínas (Clayton e Shapira, 2007; Daniels et al., 2010; Gilinger e Bellofatto, 2011; Haile and Papadopoulou, 2007).

2.3.1 Organização genômica e transcrição policistrônica

O sequenciamento do genoma de *T. brucei* (Berriman et al., 2005), disponível no banco de dados denominado de TriTrypDb (Tritrypdb.org), mostrou que esta espécie possui um genoma com 26 Mb e 11 cromossomos, com cerca de 9.100 genes

identificados. Destes, 4.900 são codificadores de proteínas que ainda não foi encontrada homologia com outros organismos além dos tripanossomatídeos, acarretando na dificuldade de sua classificação funcional e levando à sua anotação como “hipotéticos”. Dos genes anotados para o *T. brucei* 810 são codificantes das VSGs, utilizados pelo parasita para evadir o sistema imunitário dos hospedeiros (Berriman et al., 2005; Crozier et al., 2017).

Na maioria dos eucariotos, os genes codificantes de proteínas são transcritos em unidades monocistrônicas, no qual um promotor é utilizado para a expressão de um único gene, resultando na regulação individual da expressão de cada gene ao nível da sua transcrição. Diferentemente, a organização gênica dos tripanossomatídeos se assemelha mais aos *operons* bacterianos, uma vez que seus genes estão dispostos em agrupamentos policistrônicos (*Polycistronic Gene Clusters* - PGCs), assim, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas são posicionados em sequência na mesma fita de DNA e separados por uma ou mais regiões intergênicas, ricas em pirimidinas, que em sua maioria não apresentam íntrons (Martínez-Calvillo et al., 2010; Romaniuk et al., 2016). Ao contrário do que se observa nos *operons* bacterianos, contudo, não há nenhuma relação funcional entre os genes que se encontram na mesma unidade policistrônica (Haile and Papadopoulou, 2007). Essa organização foi primeiramente encontrada no cromossomo 1 de *Leishmania major*, sendo esta espécie a primeira a ser totalmente sequenciada em tripanossomatídeos. As demais publicações sobre o genoma completo de *L. major* (Ivens et al., 2005) e *T. cruzi* (El-Sayed et al., 2005a) mostraram que a quase totalidade dos genes, em todos os cromossomos de tripanossomatídeos, está organizada da mesma forma (Martínez-Calvillo et al., 2010).

A maioria dos genes de RNAs ribossômicos está presente entre as PGCs e são transcritos pela RNA polimerase I, sendo esta enzima em *T. brucei* também a responsável por mediar a transcrição de duas classes de mRNA específicos, VSG e prociclinas, das formas sanguíneas e procíclicas, respectivamente. Já a maioria dos genes de RNAs transportadores está localizada nos limites das PGCs, sendo transcritos pela RNA Polimerase III. Como em outros eucariotos, os mRNAs codificantes de proteínas codificados nas PGCs são transcritos pela RNA polimerase II, contudo são transcritos de forma policistrônica por essa polimerase (Clayton, 2014; De Gaudenzi et al., 2011; Palenchar and Bellofatto, 2006).

2.3.2 Processamento de mRNAs

Após a transcrição, a maturação dos mRNAs eucarióticos em geral ocorre pelo processamento denominado *cis-splicing* necessária para a retirada dos *introns* e união dos *exons* no mRNA maduro. Nos tripanossomatídeos, não ocorrem *introns*, isso praticamente não acontece, mas os mRNAs precursores policistrônicos (pré-mRNAs) são processados em mRNAs monocistrônicos por duas reações de clivagem acopladas através do processo de *trans-splicing*. A primeira reação forma a extremidade 5' do mRNA final, e um *mini-exon* transcrito independentemente e contendo a sequência de 39 nucleotídeos, denominado sequência líder (*Spliced Leader* ou SL), é adicionado a todos os mRNAs. Isto ocorre através de uma reação com duas etapas de *trans-esterificação*, quando um sítio GU doador no RNA precursor com a SL, funde-se a uma região próxima ao sítio AG receptor do mRNA policistrônico, denominado ponto de ramificação. Além do mRNA com sua extremidade 5' formada, é gerado um pequeno RNA com uma estrutura em forma de "Y" que é subsequentemente degradado. Esta estrutura se compara ao laço intermediário formado pela retirada dos íntrons no processamento convencional observado em eucariotos (*cis-splicing*). A segunda clivagem ocorre na extremidade 3' do mRNA, que consiste na poliadenilação, pela adição de uma sequência de adeninas com cerca de 100 a 300 nucleotídeos a montante do sinal de *trans-splicing* subsequente (Figura 6) (Clayton e Shapira, 2007; De Gaudenzi et al., 2011; GünzL, 2010; Liang et al., 2003; Preuße et al., 2012).

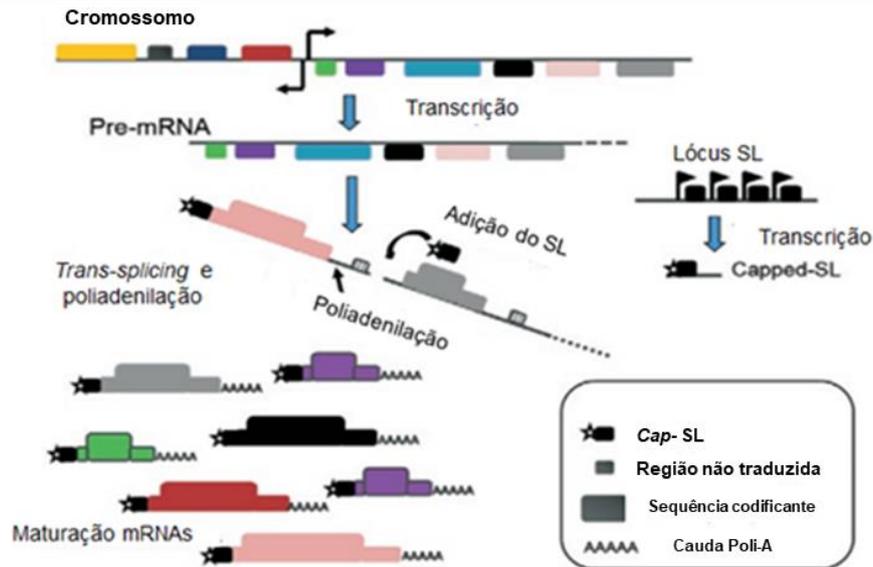


Figura 6. Transcrição e processamento de mRNA em tripanossomatídeos. Genes agrupados no genoma são transcritos como pré-mRNAs policistrônicos. Regiões intergênicas orientam a inserção de uma sequência líder (SL) na extremidade 5' e a cauda de poli-A na 3'. Gerando no final mRNAs monocistrônicos maduros. Adaptado de Araújo (2011).

2.3.3 *cap4* e sua formação

A adição do *cap* na extremidade 5' do mRNA é o primeiro evento de modificação dos transcritos da RNA polimerase II eucariótica. A adição do *cap* ocorre de maneira co-transcricional, quando o mRNA atinge um comprimento em cadeia com 30 nucleotídeos. Sua estrutura é posicionada de forma invertida em uma ligação 5'-5', que se liga ao primeiro nucleosídeo do mRNA por uma ponte trifosfato (Mair et al., 2000). Dentre as múltiplas funções celulares que envolvem o *cap*, inclui-se o controle da estabilidade do mRNA e seu transporte entre o núcleo e o citoplasma, além de seu envolvimento na formação do complexo de iniciação da tradução (Lewdorowicz et al., 2004).

Em eucariotos, de uma forma geral, a formação do *cap*₀ (m⁷GpppN) envolve três reações enzimáticas sequenciais: uma hidrólise do trifosfato do RNA nascente a um difosfato, pela RNA trifosfatase, dando origem a uma extremidade 5' difosfato; a adição de um resíduo de GMP, pela RNA guaniltransferase (GTase), via uma ligação inversa 5' a 5' trifosfato através de um intermediário covalente-(Lisil-N)-GMP; e uma metilação na porção guanosina do *cap* (GpppN), pela RNA (guanina-N7)

metiltransferase (Decroly et al., 2012). Estas três enzimas são codificadas por genes separados em *S. cerevisiae* e são todas essenciais para seu crescimento celular (Fabrega et al., 2004). Análises estruturais mostram que as RNA guanililtransferases se mantêm conservadas estruturalmente entre as espécies eucarióticas. Em eucariotos, é sabido que podem ocorrer metilações adicionais no *cap*, que diferem entre diversos organismos. Estas afetam as riboses do primeiro e segundo nucleotídeos transcritos formando o *cap1* (m⁷ GpppNm) e *cap2* (m⁷ GpppNmpNm) respectivamente (Zamudio et al., 2009).

Em tripanossomatídeos, o *cap* do RNA SL, é encontrado hipermetilado e denominado de *cap4*. Este consiste do *cap0* seguido de metilações 2'-O na ribose dos quatro primeiros nucleotídeos da sequência SL (A_mA_mC_mU_m), além de duas metilações de bases nitrogenadas, na primeira adenina (m^{6,6}A) e na quarta uridina (m³U) (Bangs et al., 1992; Mair et al. 2000). As proteínas responsáveis em adicionar o *cap0* co-transcritionalmente nos tripanossomatídeos foram identificadas como: TbCet1, uma RNA trifosfatase (Takagi et al., 2007) mecanicamente semelhante a RNAs trifosfatases encontradas em fungos, microsporídios e outros protozoários (Hall and Ho, 2006); e a enzima bifuncional TbCgm1, que possui atividade catalítica de guanililtransferase e de metiltransferase (Ho and Shuman, 2001). Além disso, já foram identificadas, em *T. brucei*, outras duas proteínas que atuam de maneira autônoma com atividades de guaniltransferase (TbCe1) (Silva et al., 1998) e metiltransferase (TbCmt1) (Hall and Ho, 2006). Estudos de silenciamento por RNA de interferência (RNAi) da TbCgm1, TbCe1 e TbCmt1 mostraram que apenas a primeira é necessária durante biossíntese do *cap4*, uma vez que sua depleção levou ao acúmulo de RNAs SL hipometilados. Em contraste, a depleção de TbCe1 ou TbCmt1 não afetou a formação do *cap4* do RNA SL (Takagi et al., 2007).

Com relação às enzimas que catalisam as metilações subsequentes que caracterizam o *cap4*, as 2'-O-metiltransferase, foram identificadas três RNA metiltransferases nos tripanossomatídeos. A TbMTr1 é responsável pela metilação da ribose do primeiro nucleotídeo transcrito, a TbMTr2 pela metilação do segundo nucleotídeo e a TbMTr3 é implicada nas metilações de ribose subsequentes (Figura 7) (Arhin et al., 2006; Zamudio et al., 2006; Ignatovich et al., 2015). Acredita-se que as metilações subsequentes nas riboses dos nucleotídeos adjacentes ao *cap0*, que formam os *cap1*, *cap2*, e *cap4*, podem aumentar os níveis de tradução. Já se sabe que metilações deficientes no *cap* dos tripanossomatídeos repercutem em uma

tradução mais lenta (Zamudio et al., 2009; Zinoviev and Shapira, 2012).

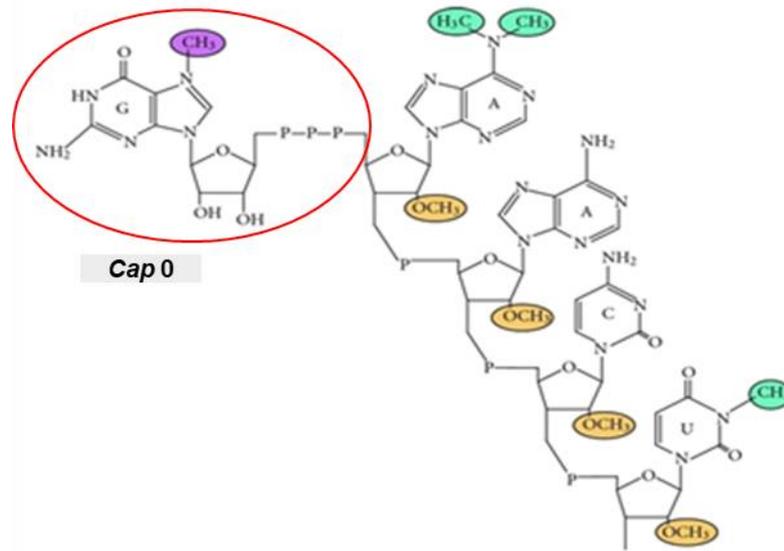


Figura 7. Estrutura do *cap4* de tripanossomatídeos. Pode-se observar todas as metilações que ocorrem na formação do *cap4*. As metilações em amarelo, são as quatro metilações do carbono 2' das riboses que ocorrem nos primeiros quatro nucleotídeos (AACU) do SL dos tripanossomatídeos. Além disso, os tripanossomatídeos possuem metilações adicionais que ocorrem diretamente na primeira e quarta base nitrogenada (verde). Em roxo representa a metilação do *cap* propriamente dito, m⁷ GTP. Fonte: Adaptado de Zinoviev and Shapira (2012).

2.3.4 Degradação do mRNA

Um dos principais modos de controle da abundância do mRNA é através da degradação do transcrito (Ghosh e Lima, 2010; Shatkin, 1976). O processo de degradação de mRNA em tripanosomatídeos, assim como em outros eucariotos, se inicia através da deadenilação, remoção da cauda poli A. Em tripanossomatídeos três complexos diferentes são responsáveis por essa remoção sendo o complexo CAF1 — NOT, responsável pela maior parte da sua deadenilação (Erben et al., 2014; Clayton, 2014). Posteriormente o mRNA pode ser degradado por duas vias, uma que vai estimular a retirada do “*cap*” (*decapping*) clivando o m⁷GDP do RNA recém-deadenilado, para gerar o pRNA (com um fosfato na sua extremidade 5'). Como consequência, o transcrito é exposto a ação de uma exoribonuclease citoplasmática, XRNA, com atividade 5' → 3' (Li et al., 2006). A via que é independente do *decapping*, e o transcrito pode ser degradado na direção 3' → 5' através de um complexo denominado exossomo (Estévez et al., 2003; Jião et al., 2013).

A associação do *decapping* com o decaimento do mRNA e *turnover* vinha da suposição de que mRNA 5' monofosfatado era rapidamente degradado por exoribonucleases (Clayton 2002). Vários estudos mais recentes, contudo, sugerem que mRNAs sem o *cap* podem potencialmente adquirir uma nova estrutura de 5' -*cap* para formação de mRNAs traduzíveis (Mukherjee et al., 2012). No entanto, para isso os mRNAs que sofreram o *decapping*, pRNAs, precisam ser convertidos em RNAs difosforilados (ppRNAs) para posteriormente serem protegidos por uma guanililtransferase (GpppRNA). Em tripanossomatídeos foi atribuído à enzima TbCe1 esse papel de re-*capping* citoplasmático, visto que a mesma apresenta atividades de RNA quinase 5' -monofosfato e guanililtransferase. Além disso, o RNA SL não metilado (GpppRNA) precisa sofrer a metilação na posição N7 (m⁷GpppRNA — *cap* 0). Acredita-se que a TbCmt1, uma metiltransferase específica para esta posição, seja responsável por tal metilação, sendo assim o mRNA regenerado torna-se passível de tradução (Figura 8) (Hall and Ho, 2006; Ignatovkina et al., 2015).

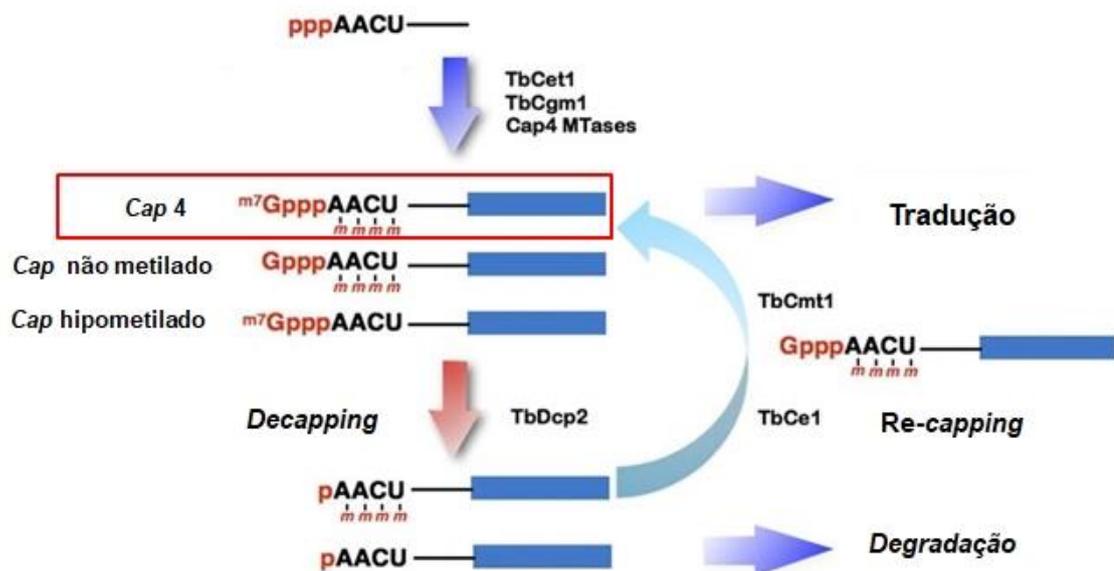


Figura 8. Modelo proposto para *decapping* e *recapping* de mRNA em *T. brucei*. O mRNA recém transcrito com a extremidade 5' trifosfato sofre a ação da TbCet1 sendo então convertido a difosfato. Posteriormente uma enzima nuclear TbCgm1, é responsável pelo *capping* e metilação. Além disso, de maneira geral, metiltransferases (MTases) são responsáveis pelas metilações adicionais no SL, caracterizando a formação do *cap* 4. O mRNA após o *trans-splicing* e poliadenilação se torna passível de tradução. Enquanto que o mRNA que apresenta um *cap* não metilado ou hipometilado está sujeito à via de degradação 3' →5' (não mostrado) ou convertido em pRNA por uma enzima de *decapping* (TbDcp2). Posteriormente à conversão, o pRNA pode ser degradado por uma exoribonuclease ou ter seu *cap* restaurado pela TbCe1 e TbCmt1 tornando assim passível novamente de tradução. Fonte: Adaptado de Ignatovkina et al (2015).

2.4 SÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS

A síntese proteica ou tradução é um processo complexo, cíclico e altamente conservado ao longo da evolução, tendo um importante papel no controle da expressão gênica (Zinoviev and Shapira, 2012). O processo de tradução pode ser dividido em quatro etapas, iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A iniciação é vista como a etapa limitante deste processo, servindo assim como um importante alvo regulatório, visto que é nesta fase que ocorrem eventos importantes como o recrutamento das subunidades ribossomais para o mRNA e a montagem do ribossomo, além da identificação do códon de iniciação da tradução AUG (Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Zinoviev and Shapira, 2012). Durante a fase de alongamento, os aminoácidos que são acrescentados na cadeia polipeptídica são trazidos para dentro do ribossomo pelo tRNA, que através do seu anticódon reconhece por pareamento de bases o códon do mRNA, à medida que o ribossomo vai se deslocando sob o mesmo. A terminação acontece quando o códon de parada é encontrado pelo ribossomo, liberando a proteína. Por último, na reciclagem, ocorre a liberação do tRNA e da molécula de mRNA do ribossomo e a dissociação de suas subunidades funcionais, que uma vez liberadas, estão prontas para começar um novo ciclo de tradução (Jackson et al., 2010).

2.4.1 Iniciação da tradução em eucariotos

A iniciação é vista como a fase limitante do processo de tradução, servindo assim como alvo para uma multiplicidade de mecanismos reguladores. Nos eucariotos, nesta etapa, é requerida a participação diversos fatores de iniciação (eIFs, *eukaryotic Initiation Factors*) os quais irão auxiliar no recrutamento das subunidades ribossomais e o posicionamento correto dos ribossomos no códon de iniciação AUG para dar início a síntese proteica (Ali et al., 2017; Jackson et al., 2010; Zinoviev and Shapira, 2012).

No início da tradução ocorre a formação do complexo ternário (TC) consistindo na seleção do met-tRNAⁱ (tRNA com a primeira metionina) pelo eIF2, na sua forma ligada ao GTP. Posteriormente o eIF3 juntamente com os fatores eIF1, eIF1A e eIF5, denominados de Complexo Multifatorial (*Multi Factor Complex* - CMF) recrutam a subunidade ribossomal menor (40S). Este irá se juntar ao complexo ternário para a formação do complexo de pré-iniciação 43S (PIC 43S), e o eIF3 medeia a ligação do

complexo 43S na extremidade 5' do mRNA.

Em paralelo, ocorre o recrutamento do complexo eIF4F por meio do *cap* presente na extremidade 5' do mRNA. Esse complexo é constituído por três subunidades: eIF4E, responsável pela ligação do complexo ao *cap*; eIF4A, uma ATPase e RNA helicase, que juntamente com o fator eIF4B desfaz as estruturas secundárias presentes na 5' UTR do mRNA e prepara essa região para a ligação do ribossomo; e eIF4G, uma proteína mantenedora do complexo, a qual interage com as outras duas subunidades e também participa na maioria das interações associadas à função do eIF4F. O eIF4G também atua na interação do mesmo com o eIF3, através de vários sítios de ligação que possuem ao longo de sua estrutura, recrutando assim o complexo 43S. A associação do PIC 43S ao mRNA é então resultado de uma cadeia de interações entre eIF4G-eIF3-43S e leva a formação do complexo 48S (Jackson et al., 2010).

Após a formação do complexo 48S, ocorre o deslocamento da subunidade ribossomal, com ajuda de fatores como o eIF4B e o eIF4A do complexo eIF4F, de forma dependente de ATP, ao longo da região 5' UTR do mRNA a procura do códon de iniciação AUG. Este, por sua vez, sinaliza o início da sequência codificadora. Posteriormente a identificação do códon AUG, ocorre o pareamento deste códon de iniciação com as do anticódon do tRNA_i (Met-tRNA_i). Uma proteína pertencente à PIC 43S com função GTPásica, eIF5, promove então a hidrólise do eIF2-GTP em eIF2-GDP e Pi. A hidrólise de GTP por sua vez acaba por reduzir a afinidade de eIF2 pelo Met-tRNA_i levando a dissociação parcial de eIF2-GDP da subunidade 40S. Em seguida, outra GTPase é requerida, eIF5B, que promove a liberação dos fatores de iniciação do complexo 48S (eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF2-GDP) com a ajuda do eIF6. Isto permite a união da subunidade ribossomal 60S com a subunidade 40S, levando a montagem do ribossomo 80S, junto ao mRNA. Posteriormente à hidrólise do GTP, o eIF5B acarreta sua própria libertação da partícula ribossomal 80S. Tem assim início o processo de alongamento da cadeia polipeptídica (Figura 9) (Aitken e Lorsch, 2012; Hinnebusch, 2014; Jackson et al., 2010; Lorsch and Dever, 2010; Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Zinoviev and Shapira, 2012).

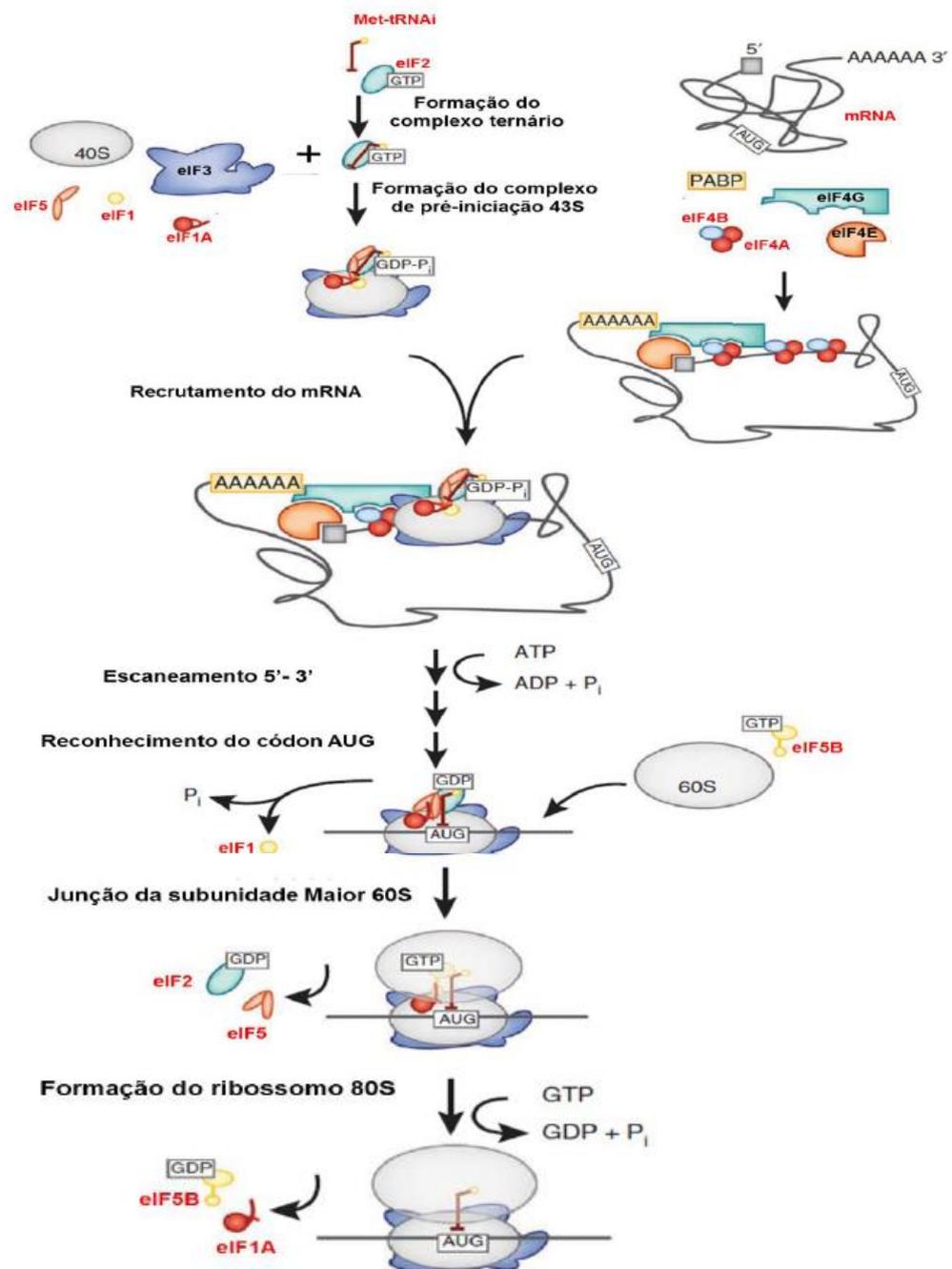


Figura 9. Representação esquemática do mecanismo de iniciação da tradução em eucariotos. Durante a fase de iniciação, o *cap* do mRNA é associado ao complexo eIF4F, mediado pelo eIF4E. O complexo de pré-iniciação 43S, composto pelo ribossomo 40S, complexo ternário (eIF2-GTP-tRNAi Met), eIF1, eIF1A, eIF5 e eIF3, é recrutado pelas interações entre eIF4G e eIF3, formando o complexo de pré-iniciação 48S. Inicia-se então o rastreamento do mRNA até a identificação do primeiro códon de iniciação AUG. A subunidade 60S é recrutada para este complexo e fatores de iniciação são liberados. Adaptado de Aitken e Lorsch (2010).

2.4.2 eIF4F e PABP em eucariotos

O eIF4F é um complexo heterotrimérico composto pelas três subunidades, eIF4G, eIF4A e eIF4E. Este complexo liga-se à estrutura de 5' do *cap* do mRNA, desempenhando um papel muito importante no início da tradução. A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP), que apesar de não fazer parte do complexo, também participa nesta etapa, liga-se à cauda poli-A na extremidade 3' do mRNA e interage com o eIF4G, resultando na formação do complexo 5' *cap*-eIF4E-eIF4G-PABP-poli-A, aproximando as extremidades 5' e 3' do mRNA para formar uma estrutura de laço. Esse processo chamado de circularização do mRNA é responsável por facilitar a reinicialização da tradução de um mesmo mRNA após a conclusão do primeiro ciclo de tradução. Além disso, é visto que a interação com o eIF4G é capaz de promover um aumento na interação do eIF4E com o *cap* do mRNA (Figura 10) (Ivanov et al., 2016; Jackson et al., 2010; Sonenberg e Dever, 2003)

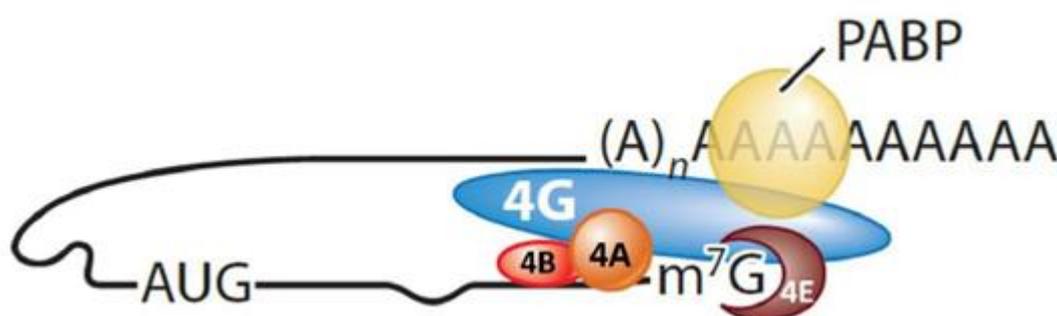


Figura 10. Complexo eIF4F, eIF4B e PABP (proteína de ligação a cauda poli-A). Representação mostrando a interação do complexo eIF4F, composto pelas três subunidades eIF4G, eIF4A, eIF4E, com a PABP e o eIF4B durante o início da tradução. O eIF4B interage com o complexo por meio da subunidade eIF4A, aumentando a atividade helicase do mesmo. Já a PABP interage com o eIF4G, promovendo a aproximação das extremidades do mRNA, facilitando sua circularização. Fonte: Adaptado de Hinnebusch (2014).

2.4.3 eIF4A: A RNA helicase

eIF4A, também conhecida como DDX2, é uma RNA helicase de aproximadamente 46 KDa, com atividade dependente de ATP, pertencente à família DEAD BOX, a qual possui o domínio de aminoácidos DEAD (Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D)) e também compartilha oito motivos de sequência de aminoácidos altamente conservados. Além disso, possui um núcleo de helicase,

constituído por dois domínios semelhantes à RecA, formando um centro conservado (Figura 11), que carrega um conjunto de motivos que contribuem para a hidrólise de ATP, ligação ao mRNA e desenrolamento do duplex de RNA. Esta proteína tem um papel importante no início da tradução desfazendo estruturas secundárias que venham a estar presente na região 5' UTR do mRNA a ser traduzido, facilitando assim o deslocamento do PIC 43S ao longo do mRNA até o códon de iniciação AUG. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que as atividades de RNA helicase e ATPase do eIF4A são estimuladas por outros fatores de iniciação da tradução, eIF4B ou eIF4H, dotando-a de mais capacidade de processamento, visto que apresenta uma baixa atividade quando está na sua forma livre (Andreou e Klostermeier, 2013; Merrick, 2015; Rogers et al., 2001).

Em mamíferos três homólogos de eIF4A foram identificados, denominados de eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII. Sabe-se que os dois primeiros são funcionalmente ativos durante o processo de tradução, enquanto que o eIF4AIII possui uma atividade diferenciada participando durante o *splicing* do mRNA no complexo de junção dos éxons (EJC), no núcleo (Merrick, 2015).

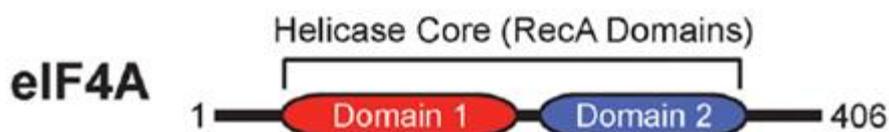


Figura 11. Esquema da estrutura do eIF4A. Fonte: adaptado de Merrick (2015).

2.4.4 eIF4G: o estruturador do complexo eIF4F

O fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) é uma proteína de alto peso molecular, com aproximadamente 175 kDa em mamíferos, desempenhando um papel central na iniciação da tradução através de suas interações com a proteína de ligação ao *cap*, eIF4E e com os eIF3, eIF4A, PABP, além da própria molécula de mRNA. Em mamíferos, leveduras e plantas o eIF4G apresenta duas isoformas (eIF4GI, eIF4GII), sendo que as duas primeiras apresentam discreta similaridade entre espécies diferentes, além de atividades bioquímicas semelhantes (Gallie e Browning, 2001).

Diferentes estudos precusores mostraram que a proteína eIF4G1, em humanos, pode ser dividida em três regiões: N-terminal (aminoácidos 1-571), central (aminoácidos 572-853) e C-terminal (aminoácidos 854-1599) (Figura 12) (Andreou and Lostermeier, 2014; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Na sua região N-terminal se encontra um motivo conservado de reconhecimento ao eIF4E, YXXXXLφ, onde X representa qualquer aminoácido e φ qualquer resíduo hidrofóbico (geralmente leucina, metionina ou fenilalanina), além de um motivo de ligação à PABP. A região central apresenta um domínio contendo repetições HEAT (HEAT-1/MIF4G), envolvido na ligação do mRNA e também com o eIF4A e com o complexo eIF3. Este domínio geralmente é bastante encontrado em proteínas envolvidas com grandes complexos multiprotéicos. Na região C-terminal possui um segundo sítio de ligação para a eIF4A (HEAT-2/MA3), que estimula sua atividade ATPase, e um sítio de ligação para proteínas quinases MNKs (HEAT-3/W2) (Merrick, 2015).

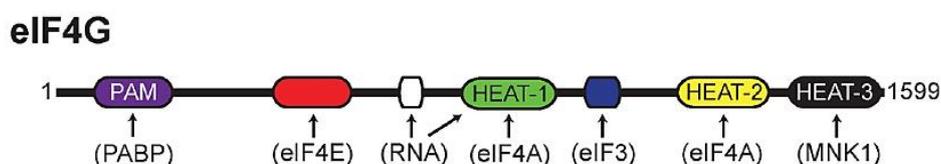


Figura 12. Esquema da estrutura do eIF4G. Fonte adaptado de Merrick (2015).

2.4.5 eIF4E: proteína de ligação ao *cap*

O fator de iniciação eucariótico eIF4E é uma pequena proteína (25,1 kDa), conservada em diversos organismos, cuja estrutura é formada por folhas β-antiparalelas, apoiadas por α-hélices. Estas conferem ao eIF4E uma estrutura côncavo-convexa em forma de mão, que possui interações com o *cap* presente na região 5' do mRNA e eIF4G do complexo eIF4F (Figura 13) (Papadopoulos et al., 2014). Além disso, o eIF4E apresenta diversos papéis no controle da expressão gênica, como estabilização do mRNA, protegendo-o da degradação no citoplasma, transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma e sequestro de mRNAs instáveis (Borden, 2016).

Já se sabe que na face côncava do eIF4E, dois resíduos altamente conservados de triptofano (W56 e W102) são responsáveis pela sua interação com o *cap*. Em sua face convexa o resíduo W73 (eIF4E-1 de mamíferos), medeia a interação do eIF4E com eIF4G. Estudos mostram que a substituição do triptofano W73 por outro aminoácido não aromático, tem como resultado a perda da interação do eIF4E com o eIF4G ou com as 4E-BPs (*4E-binding protein*). Estas últimas são proteínas de ligação ao eIF4E que competem por seu sítio de ligação ao eIF4G, possuindo assim um papel regulatório que impede a montagem do complexo eIF4F, promovendo uma repressão da tradução (Grüner et al., 2016; Sonenberg e Dever, 2003). Além das 4E-BPs, o eIF4E eucariótico pode ter sua função regulada por fosforilação. Em mamífero isso ocorre em um sítio único, S209, com auxílio das proteínas quinases Mnk1 e Mnk2. Estas interagem com o eIF4G pelo seu domínio C-terminal, fazendo com que se aproximem do eIF4E, resultando em sua fosforilação, tendo como consequência o aumento da afinidade do eIF4E pelo *cap* (Waskiewicz et al., 1997). Estudos mostram que o processo de desfosforilação de eIF4E resulta em taxas de tradução reduzidas (Grüner et al., 2016).

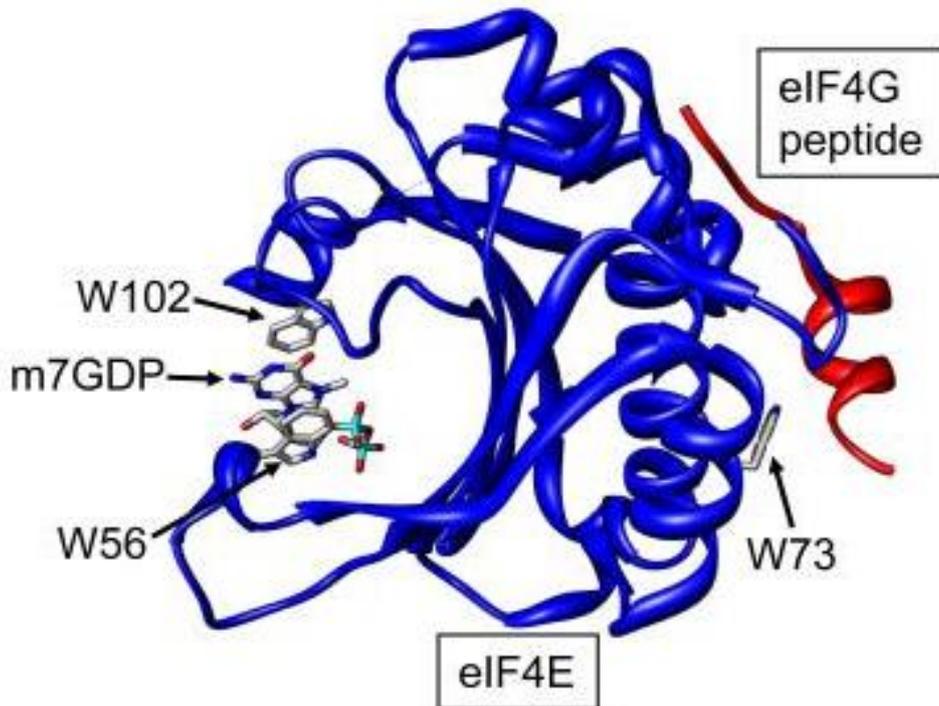


Figura 13. Estrutura tridimensional da proteína eIF4E de camundongo. A representação mostra a proteína (azul), em um complexo com o cap (m7GDP) e um peptídeo representando o motivo no eIF4G (*Protein Data Bank* - Banco de dados de proteínas - PDB:1EJ4) que se liga ao eIF4E (vermelho). Fonte: Adaptado de Goodfellow e Roberts (2008).

2.4.6 PABP – Proteína de ligação à cauda poli-A

As PABPs constituem um grupo de proteínas eucarióticas altamente conservadas que atuam durante a síntese proteica se ligando à cauda poli-A presente na extremidade 3' do mRNA eucariótico. Além disso, interagem com diversas outras proteínas, participando de vários processos celulares relacionados ao mRNA, tais como, biossíntese, processamento, transporte e degradação. Na iniciação da tradução, as PABPs participam através de sua interação com o complexo eIF4F (Gallie e Liu, 2014). Sua estrutura pode ser dividida em: uma região N-terminal, que contém quatro domínios de reconhecimento ao RNA – RRM (*RNA Recognition Motifs*); e uma região C-terminal, que contém um domínio de interação proteína-proteína denominado de PABC, onde ocorre a interação com outras proteínas regulatórias. Na região N-terminal os RRM1 e RRM2 são necessários na ligação específica ao poli-A e ao eIF4G, resultando na circularização do mRNA (Eliseeva et

al., 2013; Ivanov et al., 2016; Sonenberg and Dever, 2003).

2.5 FATORES DA INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

O processo de tradução, em geral, é menos conhecido no *T. brucei* e outros tripanossomatídeos embora tenha sido foco de vários estudos recentes (de Melo Neto et al., 2016), como descrito a seguir. Boa parte do que se sabe a respeito partiu do conhecimento gerado através do sequenciamento de genomas de diferentes espécies representativas. Ainda falta, contudo, uma melhor compreensão sobre o papel de eIFs selecionados no processo de síntese proteica, em especial aqueles ligados ao complexo eIF4F. Até o momento foram obtidos bastante dados relevantes a respeito dos múltiplos homólogos das subunidades 4A, 4E e 4G e de alguns complexos do tipo eIF4F por eles formados, ressaltando uma complexidade ainda não observada em outros organismos.

2.5.1 Complexo eIF4F e PABP

Múltiplos homólogos de subunidades do complexo eIF4F de iniciação da tradução foram identificados conservados nas mais diferentes espécies de tripanossomatídeos estudadas até o momento. Foram identificados cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 ao EIF4G5) (Dhalia et al., 2005) dois de eIF4A (EIF4AI e EIF4AII) (Dhalia et al., 2006; Yoffe et al., 2004, 2006) e seis de eIF4E (EIF4E1 ao EIF4E6). Dos homólogos de eIF4E, quatro foram descritos inicialmente, EIF4E1 ao EIF4E4 (Dhalia et al., 2005), e dois mais recentemente, os EIF4E5 e EIF4E6 (Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Além disso, foram identificados três homólogos de PABP (PABP1 a PABP3) em *Leishmania* sp., sendo os dois primeiros conservados em *T. cruzi* e *T. brucei* (Da Costa Lima et al., 2010). Em estudos filogenéticos foi constatado que a ausência do terceiro homólogo de PABP no gênero *Trypanosoma* ocorreu por perda gênica após sua divergência na linhagem dos tripanossomatídeos (Kramer et al., 2013) (Quadro 1).

Quadro 1. Características dos homólogos do complexo eIF4F e PABP em *T. brucei*. GeneDB ID# são de *T. brucei* 927 (www.tritrypdb.org).

Proteínas		Peso molecular (kDa)	GeneDB ID#:	Tamanho em aminoácido	Localização Cromossômica
PABP	PABP1	60	Tb927.9.9290	566	9
	PABP2	62.1	Tb927.9.10770	555	9
EIF4A	EIF4AI	45.4	Tb927.9.4680	404	9
	EIF4AIII	45,5	Tb927.11.8770	401	11
	EIF4G1	122.1	Tb927.5.1490	1118	5
	EIF4G2	97.30	Tb927.9.5460	998	9
EIF4G	EIF4G3	69.34	Tb927.8.4820	622	8
	EIF4G4	79,7	Tb927.11.10560	697	11
	EIF4G5	84.60	Tb927.8.4500	749	8
	EIF4E1	26.02	Tb927.11.2260	233	11
	EIF4E2	28.30	Tb927.10.16070	251	10
EIF4E	EIF4E3	47.96	Tb927.11.11770	442	11
	EIF4E4	46.54	Tb927.6.1870	427	6
	EIF4E5	21.98	Tb927.10.5020	195	10
	EIF4E6	20.86	Tb927.7.1670	186	7

2.5.2 Homólogos de eIF4A em tripanossomatídeos

Sendo um dos fatores mais bem caracterizado em tripanossomatídeos, o eIF4A possui dois homólogos, EIF4AI e EIF4AIII, descritos tanto em *T. brucei* quanto em *L. major*, sendo assim nomeados devido à sua similaridade de sequência, mais de 50% em ambos, com o fator de tradução eIF4AI e a helicase nuclear eIF4AIII de humanos, respectivamente. Estudos mostram que apenas o EIF4AI, abundante no citoplasma dos parasitas, possui envolvimento no processo de iniciação da síntese proteica. O

mesmo, tanto em *Leishmania* como em *T. brucei*, é capaz de interagir com o domínio HEAT-1/MIF4G de homólogos do fator eIF4G. Já o EIF4AIII, que possui localização estritamente nuclear, não é capaz de interagir com homólogos de outras subunidades do complexo eIF4F de tripanossomatídeos (Dhalia et al., 2005, 2006).

2.5.3 Homólogos de eIF4G

Os cinco homólogos (EIF4G1 a 5) identificados em *T. brucei* e *L. major* compartilham na sua estrutura o domínio HEAT1-MIF4G central conservado, com sequência semelhante à de mamíferos, plantas e leveduras (Dhalia et al., 2005). Ensaios de interação proteína-proteína, cujo objetivo era avaliar a capacidade dos homólogos do eIF4G se ligarem aos homólogos do eIF4A e eIF4E, mostraram inicialmente a formação de dois complexos do tipo eIF4F diferentes: EIF4G4 interagindo com EIF4E3 e EIF4G3 com EIF4E4, e ambos apresentando interação com EIF4AI (Yoffe et al., 2009). Foi demonstrado ainda que a proteína EIF4G3, em *Leishmania*, interage com a PABP1, formando o complexo EIF4G3/EIF4E4/EIF4AI/PABP1 (da Costa Lima 2010). Por sua vez estudos realizados em *Leishmania amazonensis* mostram a provável interação da PABP2 com o complexo EIF4G4/EIF4E3/EIF4AI (Figura 14) (Zinoviev et al., 2011).

Estudos utilizando a técnica de interferência de RNA (RNAi) em *T. brucei*, mostraram que o silenciamento do EIF4G3 tem como consequência a diminuição do crescimento celular, bem como uma forte diminuição na síntese proteica global do parasita, enquanto o do EIF4G4 não implicou em nenhuma mudança importante no processo de tradução (Moura et al., 2015). Sendo assim, pode sugerir que o EIF4G3 em complexo com o EIF4E4, teria um papel majoritário durante o processo de tradução. Os demais homólogos, EIF4G1, EIF4G2 e EIF4G5, não parecem estar envolvidos no processo de tradução, porém aparentam ter papel na regulação (Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b).

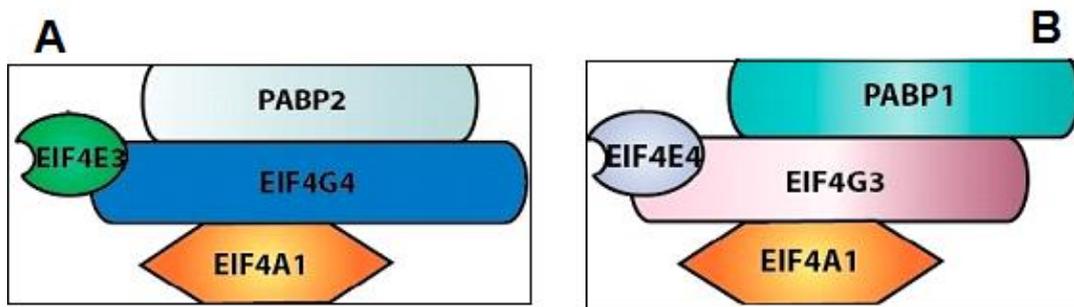


Figura 14. Esquema dos dois diferentes complexos do EIF4F de tripanossomatídeos formados pelos homólogos EIF4G3 e EIF4G4. Fonte: Adaptado de Freire et al (2017).

2.5.4 Homólogos de eIF4E

Os seis homólogos do eIF4E (EIF4E1 a 6) conservados nas espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* foram agrupados, com base nos aspectos estruturais e moleculares, em três grupos distintos (Freire et al., 2017; de Melo Neto et al., 2016):

Grupo 1: EIF4E1 e EIF4E2

Encontrado primeiramente em *Leishmania*, o EIF4E1, foi descrito como uma proteína de localização citoplasmática, que demonstrava uma capacidade de se ligar a analógos sintéticos da estrutura do *cap4* (Yoffe et al., 2004), contendo três (W56, W102e W166) dos oito resíduos de triptofano conservado na família eIF4E que possuem envolvimento nessa ligação ao *cap*. Cultura na fase promastigota mostrou que o EIF4E1 está associada a uma proteína, 4E-IP, de função desconhecida, que estaria envolvida no processo de regulação da tradução, visto que uma vez fosforilado o EIF4E1 é liberado promovendo sua ligação ao *cap4* (Zinoviev et al., 2011). Mais recentemente, em *T. brucei*, ambos os ortólogos EIF4E1 e 4E-IP mostraram se capazes de diminuir a tradução de um mRNA repórter quando ligado à sua 3' UTR (Lueong et al., 2016).

Em *Trypanosoma*, tanto o EIF4E1 como o EIF4E2 estão localizados tanto no núcleo quanto no citoplasma. Nenhum dos dois parece estar diretamente envolvido no processo de tradução, não possuem capacidade de se ligar a homólogos do eIF4G e nem são essenciais para a sobrevivência celular na fase procíclica, embora o EIF4E1 seja essencial para a forma sanguínea (Freire et al., 2011). Um estudo mais recente mostrou a associação do EIF4E2 a mRNAs maduros e a um homólogo de

proteína envolvida na ligação a mRNAs de histonas (proteína de ligação a *stem-loop* –SLBP) (Freire et al., 2017).

Grupo 2: EIF4E3 e EIF4E4

Esse grupo é composto por fatores que possuem cerca de 30% de identidade com o eIF4E-1 humano, sendo caracterizadas por apresentar extensões N-terminais não encontradas em outros eIF4Es, inclusive de tripanossomatídeos. Apresentam também substituições nos resíduos envolvidos na ligação ao *cap* (W56), por uma fenilalanina ou tirosina. Além disso esses homólogos fazem parte de complexos mais bem caracterizados em tripanossomatídeos que estão mais diretamente envolvidos no processo de síntese proteica (de Melo Neto et al., 2016). Ensaios de interação proteína-proteína mostraram que o EIF4E3 e EIF4E4 são capazes de interagir com os dois homólogos de eIF4G, EIF4G4 e EIF4G3, respectivamente (Freire et al., 2011). O complexo EIF4E4/EIF4G3 se associa ao EIF4A1 e PABP1 e parece atuar diretamente na síntese proteica. Já o papel do complexo EIF4E3/EIF4G4 na tradução ainda não está claro, embora ambas as subunidades sejam críticas para a sobrevivência de *T. brucei* (Freire et al., 2011; Moura et al., 2011). Resultados de *Leishmania* para o EIF4E3, contudo, indicariam uma função dissociada da tradução (Zinoviev and Shapira, 2012).

Grupo 3: EIF4E5 e EIF4E6

Este grupo compreende homólogos de eIF4E descritos mais recentemente, devido à sua maior divergência em sequência com o eIF4E-1 humano do que os outros grupos descritos anteriormente, possuindo cerca de 25% de identidade. Ambos os homólogos deste grupo, no entanto, contêm vários resíduos críticos conservados em eIF4Es necessários para sua função. Em *T. brucei*, observou-se que ambas as proteínas são citoplasmáticas, capazes de se ligar tanto ao *cap* tradicional de eucariotos (m⁷G) quanto ao *cap4*, mas não são essenciais para a viabilidade/divisão celular ou necessárias para a tradução geral, na forma procíclica do parasita (Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b).

Estudos constataram que o EIF4E5 possui dois resíduos conservados de ligação ao *cap* (W56 e o W166), além da substituição do terceiro triptofano conservado por uma tirosina (de Melo Neto et al., 2016). Em *T. brucei*, dados de espectrometria de massa confirmaram a presença de dois complexos independentes, envolvendo esta

proteína. O primeiro complexo, EIF4E5/EIF4G1, tem a capacidade de se ligar a uma proteína regulatória que possui domínios de guaniltransferase e metiltransferase, indicando um possível papel regulador na formação da estrutura *cap*. O segundo EIF4E5/EIF4G2 interage com uma proteína que tem dois domínios de ligação ao RNA. A depleção do fator EIF4E5 levou a um crescimento anormal das células, pela diminuição da motilidade, causando um efeito de sedimentação na cultura (Freire et al., 2014b).

O homólogo EIF4E6, possui apenas o resíduo W166 de ligação ao *cap* W166 conservado, mas com o W56 e W102 sendo substituídos por fenilalanina. Este homólogo forma um complexo com a proteína EIF4G5 e com uma terceira proteína de 70,3 kDa, denominada de EIF4G5-IP. Estudos de bioinformática mostraram que a mesma possui dois domínios, de nucleosídeo trifosfatase e de guaniltransferase, relacionados com proteínas de formação da estrutura *cap*. Experimentos de depleção do EIF4E6 demonstraram alterações na morfologia celular, afetando o crescimento, e também levando à perda da movimentação celular em cultura. Porém, não houve nenhuma influência nas taxas globais de tradução (Freire et al., 2014a, Freire et al., 2017). Vale ressaltar que estes estudos foram realizados em cultura de *T. brucei* na fase procíclica não tendo nenhum dado, até o momento, que relate a formação ou o papel do complexo EIF4E6/EIF4G5/G5-IP na viabilidade celular ou na tradução em culturas na fase sanguínea do parasita. Outra questão que ainda necessita ser investigada é como se dá a interação entre essas proteínas, bem como os motivos envolvidos em cada uma.

3 METODO

3.1 CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS

Para a inserção da extensão PTP (ProtC-TEV-ProtA) na extremidade C-terminal das proteínas alvo foram utilizadas construções plasmidiais provenientes de trabalhos anteriores. Estas construções contém os genes de interesse codificando as proteínas EIF4G5 e EIF4G5-IP clonados no vetor pC-PTP-Neo e o da EIF4G5-IP também clonado no pC-PTP-Puro, ambos vetores de recombinação homóloga tendo como marca de seleção os antibióticos neomicina e puromicina, respectivamente (Gunzi et al., 2005). Foram necessárias também nova construção foi gerada neste trabalho, contendo o gene EIF4G5 no plasmídeo pC-PTP-Puro que ainda não se encontrava disponível, conforme descrito a seguir. Para os experimentos de RNAi também serão utilizadas construções já disponíveis, derivadas do plasmídeo p2T7:177 (Wickstead et al., 2002) (Quadro 2).

Quadro 2. Lista com as construções plasmidiais provenientes de trabalhos anteriores.

Construções	Autor
pC-PTP-Neo-EIF4G5	(Freire <i>et al.</i> ,2014a)
pC-PTP-Neo-EIF4G5-IP	(Malvezzi, 2015)
pC-PTP-Puro-EIF4G5-IP	(Malvezzi, 2015)
p2T7:177-EIF4G5	(Moura,2011)
p2T7:177-EIF4G5-IP	(Malvezzi, 2015)

3.1.1 Reações de subclonagem

Para a obtenção da construção, pC-PTP-Puro/EIF4G5, os plasmídeos pC-PTP-Neo EIF4G5 e pC-PTP-Puro EIF4E2 foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *NotI*/ *KpnI* (BioLabs®) à 37°C por 8 horas. Os fragmentos foram liberados e tanto o inserto (EIF4G5) quanto o vetor (pC-PTP-Puro) digeridos foram purificados através do kit de purificação “GE Healthcare Life Sciences PCR DNA and Band Purification Kit” seguindo as recomendações do fabricante. O vetor foi submetido a

uma etapa de desfosforilação utilizando a enzima Antarctic Phosphatase (BioLabs®). A reação foi incubada a 37°C por 30 min e a 65°C por 20 min para inativação da enzima. Em seguida, os fragmentos purificados foram ligados em proporções de inserto e plasmídeos variadas, a depender dos valores de concentração de DNA (ng/µL) obtidos na quantificação (*Nanodrop 2000, UV- Vis Spectrophotometer* -Thermo Scientific), utilizando 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (400.000 U/mL, New England Biolabs®), 1 µL do tampão (10x) de ligação da enzima e água para completar o volume final de 10 µL por ligação. A reação foi mantida por 16 horas a 18°C.

Os cassetes obtidos foram transformados em células competentes de *Escherichia coli* TOP10. Para isso as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4°C seguido de choque térmico (37° C por 5 minutos) e subsequentemente semeadas, em placa de Petri contendo meio Agar LB (Luria Bertani), na presença de ampicilina (100 µg/mL), e colocado na estufa bacteriológica a 37°C. Após 16 horas foi verificado o crescimento e uma colônia formada foi colocada para crescimento por 16 horas em meio LB na presença de ampicilina (100 µg/mL), para a realização da extração do DNA por lise alcalina (Sambrook and Russel, 2011).

A confirmação das clonagens foi obtida através da digestão a 37°C com as enzimas *Bst*b I e *Nde* I (BioLabs®), por cerca de três horas e corrida eletroforética em gel de agarose a 1% corados com Syber® Safe. Além disso para a confirmação também foi realizado o sequenciamento das minipreparações, por método de Sanger automático, no equipamento ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do IAM-FIOCRUZ.

3.2 CULTIVO E TRANSFECCÃO DE CÉLULAS DE *T. BRUCEI*

As células de *T. brucei*, na fase sanguínea (*Bloodstream Form* – BSF – cepa selvagem 427 e cepa transgênica 90-13), foram cultivadas em meio HMI-9, pH 7,5, a 37°C, com 5% CO₂, contendo soro fetal bovino (10% v/v) e os antibióticos (ampicilina/estreptomicina 0,1%). Para a linhagem transgênica (BSF 90-13) foi necessária a adição dos antibióticos G418 (Sigma®, 5 µg/mL) e higromicina (InvivoGen®, 10 µg/mL), os quais são responsáveis pela manutenção da expressão da T7 RNA polimerase e do repressor da tetraciclina, respectivamente (Wirtz et al., 1999). As culturas foram monitoradas diariamente através de contagem em câmara

Neubauer e avaliação da morfologia por microscopia óptica e mantida em fase logarítmica por repiques sucessivos, com média de densidade de $10^6 - 10^7$ células/mL, ideal para a transfecção estável e obtenção de extratos proteicos para ensaios de *Western blot*.

Para cada transfecção, foram utilizadas alíquotas de 2×10^7 células de culturas sanguíneas e procíclicas, cultivadas em 20 mL de meio HMI-9 e centrifugadas a 3.000 rpm por 5 min. O sedimento foi ressuscitado em 5 mL de tampão Cytomix (2 mM de EGTA pH 7,6, 120 mM de KCl, 0,15 mM de CaCl_2 , 10 mM de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,6, 25 mM de HEPES pH 7,6, 5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5% de glicose, 100 µg/mL de BSA, 1 mM de hipoxantina), seguido de uma etapa de centrifugação, sob a mesma condição anterior. Após desprezar o sobrenadante, o sedimento foi então ressuscitado em 1 mL de seu respectivo tampão sendo transferido 450 µl para cuveta de 0,4 mm, a qual continha 10 µg de DNA plasmidial previamente linearizado por digestão, sendo utilizada a enzima *Not* I para todas as construções derivadas do plasmídeo p2T7:177; e as enzimas *Mef* I e *Xho* I para as construções no pC-PTP-Neo e pC-PTP-Puro dos genes EIF4G5 e EIF4G5-IP, respectivamente. Para os controles negativos foram adicionados apenas os parasitas em tampão, sem a presença do DNA.

As células foram submetidas à eletroporação em aparelho *BioRad Gene Pulser II*, com um pulso elétrico de 1,5 kV com 25 µF. Após o choque, foram transferidas para a garrafa de cultura contendo 10 mL meio de cultura e incubados a 37 °C, 5% CO_2 , por 24h para recuperação dos parasitas. Em seguida foi realizada a seleção dos transfectados, no qual o meio de cultura foi suplementado com os antibióticos apropriados (Quadro 3). As culturas foram incubadas na estufa de CO_2 , até morte da cultura controle e os transfectados alcançarem uma densidade celular suficiente para um novo repasse (cerca de 12 dias).

Quadro 3. Lista de antibióticos e suas respectivas concentrações utilizadas neste trabalho para seleção de células sanguíneas (BSF) de *T. brucei*.

	Construções	Antibióticos	Concentração final
BSF	pC-PTP-Neo	Neomicina (G418 da Sigma®)	5 µg/mL
	pC-PTP-Puro	Puromicina (InvivoGen®)	0,2 µg/mL
	p2T7:177	Fleomicina (InvivoGen®)	0,2 µg/ml

3.3 OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE *T. BRUCEI*

A fim de avaliar a expressão das proteínas fusionadas ao *tag* PTP (ProtC-TEV-ProtA) contém dois domínios: proteína A proveniente de *Staphylococcus aureus* e um domínio C derivada da vitamina K humana em substituição do peptídeo calmodulina (CBP), presentes nos vetores tradicionais de TAP-*tag*. Ambos os epítomos são separados por um sítio de clivagem para uma protease viral (Tobacco Etch Virus - TEV) (Figura15) (Schimanski et al., 2005), foram feitos extratos proteicos das linhagens transgênicas de *T. brucei*. Para isso, 30 mL de meio HMI-9 contendo cerca de 1×10^5 células/mL de cada linhagem foram cultivadas até atingir a densidade de 10^6 células/mL. Em seguida foram centrifugados a 3.000 rpm, 4 °C, por 5 minutos e o sedimento foi ressuspensionado em tampão de amostra para gel de SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 µl/mL de 2-mercaptoetanol), para concentração final de 5×10^5 células/µL. As amostras foram então fervidas por 5 minutos e guardadas a -80°C.

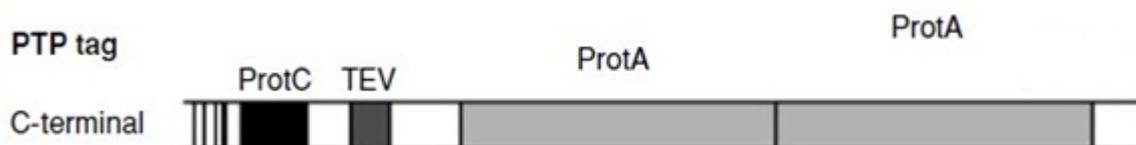


Figura 15. Estrutura do PTP-tag na extremidade C-terminal da proteína (19 kDa). Adaptado de Gunzl; Schimanski (2009).

3.4 OBTENÇÃO DE LISADO CELULAR DE *T. BRUCEI*

Para a obtenção da fração citoplasmática de células de *T. brucei* a ser usada na etapa de purificação pelo *tag* PTP (19 KDa), um inóculo de 300 mL de meio HMI-9 contendo cerca de 5×10^5 células/mL foi cultivado por cerca de 48 horas. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, e lavadas com 2 mL de PBS suplementado com 10% de inibidor de protease (Roche®), para obtenção de um sedimento com de cerca de 10^8 parasitas. Em seguida, estas células foram ressuspensas em 600 μ L de tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH 7,4/ 75 mM acetato de potássio/ 4mM de acetato de magnésio/ 2 mM de DTT), suplementado com inibidores de protease (Roche®). Para a lise, as células foram então submetidas à cavitação no *Cell disruption vessels* (câmara de ruptura celular) a uma pressão de 70 bar por 45 minutos, seguida de despressurização rápida. Após a retirada do material do aparelho, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos, a 4°C, para remoção dos restos celulares e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Alíquotas foram separadas para análise da qualidade dos lisados por *Western-blot* com anticorpo anti-proteína A (*PAP soluble complex*/ Sigma®).

3.5 ENSAIOS DE WESTERN BLOT

As amostras proteicas foram fracionadas em gel de SDS-PAGE 15% (5×10^6 células/poço) e transferidas para membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore®). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 (20 Mm Tris, 500 Mm NaCl, Tween-20 0,05%, pH 7,5) por uma hora, à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo comercial anti-proteína A (*PAP soluble complex*/ Sigma®), na diluição de 1:5.000, ou anti-TbEIF4G5 na diluição de 1:500, em solução de leite 5% TBS Tween-20, durante 2 e 16 horas, respectivamente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes (10 minutos cada) com TBS Tween-20 0,1% e incubada com o segundo anticorpo, anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Jackson Immunoresearch Laboratories), na mesma solução que a incubação anterior, durante uma hora, na concentração de 1:10.000. Após mais três lavagens com TBS Tween-20 por 10 minutos, foi adicionada à membrana uma solução para reação de quimioluminescência (luminol 1,2 mM diluído em Tris-HCl 0,1M, pH 8,5), adicionado de iodofenol (Sigma®), diluído em DMSO (Dimetilsufóxido

– Sigma®), em uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio 0,03% (Vetec®). Depois de incubada nessa mistura por 2 minutos, a membrana foi seca em papel filtro e exposta a filme fotográfico Kodak Biomax Light, revelado em uma solução de Dektol 1:2 (Kodak®), por 3 minutos, e fixado em solução de ácido acético, por cerca de 2 minutos.

3.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO (PTP-TAG) E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As linhagens transgênicas expressando EIF4G5-PTP e EIF4G5-IP-PTP foram submetidas à lise celular, em triplicata através de cavitação (descrito no item 4.4). Em seguida, 60 µL da resina IgG Sepharose® 6 Fast Flow (GE Healthcare) foi lavada três vezes com tampão de lise e uma vez com PBS. Em seguida a resina foi incubada com 200 µL do lisado celular por 2 horas, a 4°C, sob leve agitação. Em seguida, o sobrenadante foi separado e armazenado a -80°C (fração depletada do lisado). Após isso, a resina foi lavada mais uma vez com tampão de lise e duas vezes com 500 µL de PBS, sendo ressuspensa em 15 µL de PBS. Alíquotas com 10 µL dos produtos da imunoprecipitação (IP) e do lisado depletado foram ressuspensas em tampão de amostra, fervidos por 5 minutos e fracionadas em gel SDS-PAGE 15%, para realização de ensaios de *western blot*, utilizando anticorpo comercial anti-proteína A. Para o controle negativo da reação foi utilizado o mesmo procedimento a partir de um lisado celular da linhagem selvagem 427.

Para espectrometria de massas, 65 µL das imunoprecipitações foi “empacotado” (corrida do gel foi realizada em aproximadamente 15 minutos, apenas para as amostras migrarem para o início do gel SDS-PAGE 15%). O gel foi corado com azul de Coomassie Blue 250-R e depois descorado com etanol, e o *pool* de proteínas foi excisado do gel. Cada amostra foi mantida separadamente em água ultrapura e enviado para a Plataforma Tecnológica de Espectrometria de Massas (RPT02H) do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná e analisado através de uma nanocromatografia líquida acoplada à ionização *electrospray* e espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS), utilizando o espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD e o cromatógrafo nLC Easy 1000 (Thermo Scientific®).

A análise realizada pelo RPT02H consiste em quatro passos. O primeiro envolve a digestão das proteínas enviadas que estão “empacotadas” em gel de poliacrilamida

utilizando tripsina, clivando na sequência logo após os resíduos de arginina ou lisina. O segundo consiste na purificação/dessalinação dos peptídeos pré LC-MS/MS, para remoção de sais remanescentes durante o preparo da amostra e que possam vir interferir na cromatografia e na espectrometria de massas, prejudicando assim a análise. A terceira etapa consiste na análise de peptídeos por nano cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Por último, ocorre a identificação e quantificação automática dos peptídeos utilizando a plataforma MaxQuant.

3.7 RNA DE INTERFERÊNCIA E CURVAS DE CRESCIMENTO

Células da linhagem 90-13 foram transfectadas com o plasmídeo p2T7:177, que se integra na região do mini-cromossomo sob controle de dois promotores T7 em orientação reversa regulados pela tetraciclina, permitindo a transcrição de RNA dupla fita do gene alvo, desencadeando assim a maquinaria de RNAi celular. Para o RNAi, as células de *T. brucei* selecionadas com antibiótico apropriado, foram então induzidas com a adição de tetraciclina 1 µg/mL ao meio de cultura. O efeito do fenótipo e do crescimento celular foi analisado através de curvas de crescimento, por contagem diária do número de parasitas em câmara de Neubauer. A expressão da proteína de interesse foi analisada através de ensaios de *Western blot*, utilizando extratos proteicos (item 4.3), de amostras coletadas ao longo das curvas das culturas controles (- TET) e induzidas (+ TET).

3.8 ENSAIO *IN VITRO* DE INTERAÇÃO PROTEICA

3.8.1 Expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes fusionadas à proteína Glutathione S-transferase (GST), o vetor de expressão procariótico pGEX4T3, contendo os fragmentos gênicos das proteínas de interesse (EIF4E6, EIF4G5 e EIF4G5-IP) foram transformados em cepas de células BL21 star (Invitrogen®) de *E. coli* através de transformação por choque térmico. Para a transformação, as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4^o C, seguidas de choque térmico a 37^oC por 5 minutos, com subsequente semeio das células transformadas em placa de Petri contendo meio Agar LB (Luria-Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µg/µL) e incubadas a 37^oC por 18 horas. As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido

contendo antibiótico, como descrito anteriormente, e foram crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm por 18 horas. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 10 mL das culturas crescidas foram inoculadas em 500 mL de meio LB com antibiótico e crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela leitura em espectrofotômetro (a 600 nm) até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,5 ou 0,8, dependendo da proteína a ser expressa. Em seguida foi adicionado o indutor de síntese de proteínas, IPTG (isopropil-β-D-tio-galactosídeo - Sigma®), na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C (D.O. de 0,5) ou 1 hora (D.O. de 0,8). Alíquotas pré e pós IPTG foram retiradas para a visualização das expressões das proteínas através de eletroforese em gel de *SDS-PAGE*.

3.8.2 Purificação e diálise de proteínas recombinantes

Culturas bacterianas de 500 mL, após indução com IPTG, foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e o sedimento bacteriano obtido ressuspenso em 20mL de PBS, acrescido de inibidor de protease livre de EDTA, de acordo com as instruções do fabricante (Roche). Em seguida, a lise das bactérias foi realizada através de ultra-sonicação (6 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto), com posterior adição de 1% de Triton-X e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante após lise foi incubado com 300 µL de resina Glutathiona sefarose (Biosciences®) previamente equilibrada em PBS, após três lavagens de 10 mL cada. A incubação foi realizada por 1 hora, à 4°C, sob leve agitação. Após a incubação, foi realizada uma centrifugação de 5.000 rpm por 1 minuto, descartado o sobrenadante, e a resina lavada três vezes com 1 mL de PBS. Em seguida as proteínas recombinantes foram eluídas por 30 minutos com 500 µL de uma solução 50mM de glutathiona reduzida em Tris-HCl pH 8,0, seguida de uma segunda eluição com a mesma solução, porém em Tris-HCl pH 9,0, também por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 200 µL de PBS à resina e as amostras congeladas a –80°C. Para análise inicial, a cada 15 µL de cada eluato e da resina foi acrescido igual volume de tampão de gel de eletroforese de proteínas, e 15 µL de cada mistura foram fracionados em *SDS-PAGE* e visualizados após coloração com azul de Coomassie R-250 para verificar a eficiência da purificação.

As eluições que apresentaram maior rendimento e pureza foram selecionadas

para diálises. Esta etapa se iniciou com a transferência dos 500 µL dos eluatos para sacos de diálise de 6 mm de diâmetro (Sigma®) previamente hidratados em água MilliQ® por pelo menos 30 minutos. As membranas com eluatos foram colocadas em 700 mL de tampão de diálise (44 mM de Na₂HPO₄; 5,2 mM NaH₂PO₄, 50 mM de NaCl; 5 % de glicerol; 0,1 % TritonX-100), e mantidas sob leve agitação por 6 horas a 4°C, sendo o tampão trocado a cada intervalo de duas horas. As proteínas dialisadas foram analisadas em gel SDS-PAGE, sendo a quantificação das mesmas realizadas através da comparação da intensidade das bandas de uma diluição seriada das proteínas recombinantes com uma curva de concentrações definidas de BSA.

3.8.3 Transcrição e tradução *in vitro*

Para a transcrição *in vitro* foram utilizadas as construções contendo os genes EIF4G5 e EIF4E6 clonados no vetor pET21a. Para a reação de transcrição foram utilizados 3 µg de DNA plasmidial linearizado na região 3' do gene (com a enzima *Not I* para o EIF4G5 e *Xho I* para EIF4E6), na presença de tampão de transcrição (40 mM Tris pH 8,0, 15 mM MgCl₂), rNTPs (4 mM de ATP, CTP e UTP, cada; 0,4 mM de GTP; todos da GE Healthcare), 0,5 mM de m⁷-GTP (New England Biolabs®), 10 mM DTT, 30 U de inibidor de RNase (Promega®), 10 U de T7 RNA polimerase e água deionizada, tratada com DEPC, num volume final de 50 µL. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C, sendo que após os 30 minutos iniciais foi adicionado GTP para uma concentração final de 1 mM. Após mais 30 minutos de reação foi adicionado 2,5 U de T7 RNA polimerase. Ao término das reações de transcrição, 1 µL de cada transcrito foi analisado em gel de agarose 1%.

Os mRNAs sintéticos obtidos foram precipitados com NaCl 3 M e 2,5 volumes de etanol 100%, centrifugados, e o sedimento ressuspensão em água deionizada tratada com DEPC. Alíquotas correspondentes a 1 µL dos RNAs, diluídos de 1:5 e 1:10 foram traduzidos em sistema de lisado de reticulócito de coelho (RRL) suplementado com metionina marcada radioativamente com ³⁵S (10µCi/ µL), de acordo com as recomendações do fabricante (Promega®). As reações de tradução foram realizadas na temperatura de 30°C, durante 90 minutos. Após a tradução, alíquotas de 5 µL de cada amostra foram acrescidas de tampão de amostra para gel SDS-PAGE, e submetidas à migração por eletroforese. Após a migração, o gel foi corado com azul de Coomassie R-250 (Sigma®) e submetido à secagem em papel de filtro a 70°C, durante uma hora, sob vácuo. Para visualização das proteínas recombinantes

marcadas com ^{35}S , o gel foi exposto a um filme de autorradiografia *Hyperfilme MP Amersham (GE Healthcare®)* e revelada com Dektol 1:1 (Kodak®).

3.8.4 Ensaios de interação proteína-proteína (*pull-down*)

Para os ensaios de *pull-down*, a resina Glutathiona Sefarose 4B foi previamente equilibrada com tampão de ligação BB3 (100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 50 mM Hepes pH 7,2, 0,2% NP-40, 5% glicerol) e bloqueada com 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA para evitar ligações inespecíficas. Para cada ensaio, 10 μL da resina bloqueada foi incubada com 2 μg das proteínas recombinantes e com seus possíveis parceiros marcados com ^{35}S (obtidos por tradução *in vitro* utilizando construções plasmidiais do pET21a) em um volume final de 200 μL (em tampão), durante 1h sob agitação constante a 4°C. A resina foi lavada duas vezes com tampão BB3 e incubadas com 5 μL das proteínas radioativas num volume final de 200 μL (em tampão), durante duas horas, sob agitação constante a 4°C. Após três lavagens com 500 μL de tampão BB3, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 35 μL de tampão de amostra e analisadas em gel SDS-PAGE 15%. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250, para visualização das proteínas recombinantes, e submetidos à autorradiografia para visualização das proteínas radioativas marcadas com ^{35}S (Dhalia et al., 2005), verificando a associação ou não das proteínas avaliadas.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS ENDÓGENA

Em um primeiro momento buscou-se confirmar a presença do complexo EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP em diferentes fases do ciclo de vida de *T. brucei*. Para isso extratos de *T. brucei* de ambas as fases do parasita de culturas nas fases procíclica (forma presente no vetor inseto) e sanguínea (presente no hospedeiro vertebrado), foram testados em ensaio de *western blot* utilizando o soro policlonal anti-EIF4G5, purificado por imunoadsorção. Foram utilizados extratos celulares de *T. brucei* contendo 5×10^6 e 1×10^7 células/poço. O resultado obtido (Figura 16) mostra que a proteína EIF4G5 (85 kDa) é expressa em níveis semelhantes nas duas fases de vida do parasita. A presença do EIF4G5 nestas duas fases pode ser um indício inicial que o complexo também esteja presente durante todo o ciclo de vida de *T. brucei*. Vale salientar que a falta de anticorpos eficientes contra as proteínas EIF4E6 e EIF4G5-IP impossibilitaram a realização da avaliação dos mesmos.

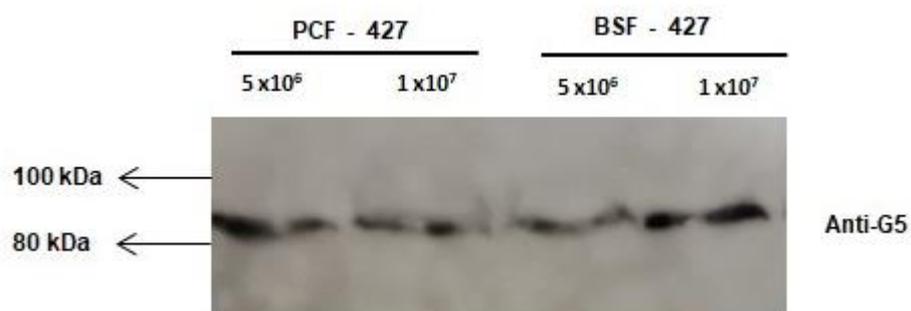


Figura 16. *Western blot* mostrando, nas diferentes concentrações dos extratos proteicos, a presença da proteína EIF4G5 na fase procíclica e sanguínea de *T. brucei*.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE COMPLEXOS ENVOLVENDO OS HOMÓLOGOS EIF4G5 E EIF4G5-IP

4.2.1 Subclonagem do gene EIF4G5 no vetor pC-PTP-Puro

Para possibilitar a execução de ensaios *in vivo* de imunoprecipitação e confirmar a composição do complexo alvo desse estudo em células sanguíneas de *T. brucei*, foi necessário antes a subclonagem do gene EIF4G5 no vetor pC-PTP-Puro (Schimanski et al., 2005) utilizando as enzimas de restrição *Not* I e *Kpn* I. Esse vetor permite a expressão das proteínas de interesse fusionadas ao peptídeo de purificação PTP. A figura 17 A mostra o inserto com tamanho preditos de 1980 pb após a digestão com as enzimas de restrição cujos sítios flanqueiam os genes de interesse. As subclonagens foram confirmadas utilizando as enzimas *Bst*B I / *Nde* I (Figura 17 B), liberando os fragmentos com tamanhos preditos. Para o controle da reação foi utilizado a construção do vetor pC-PTP-Puro contendo o gene EIF4E2, da qual o vetor pC-PTP-Puro digerido foi obtido. Após a confirmação de que os insertos foram adequadamente subclonados no vetor de expressão, foi dada a continuidade do trabalho realizando transfecções para obtenção de linhagens transgênicas de *T. brucei*.

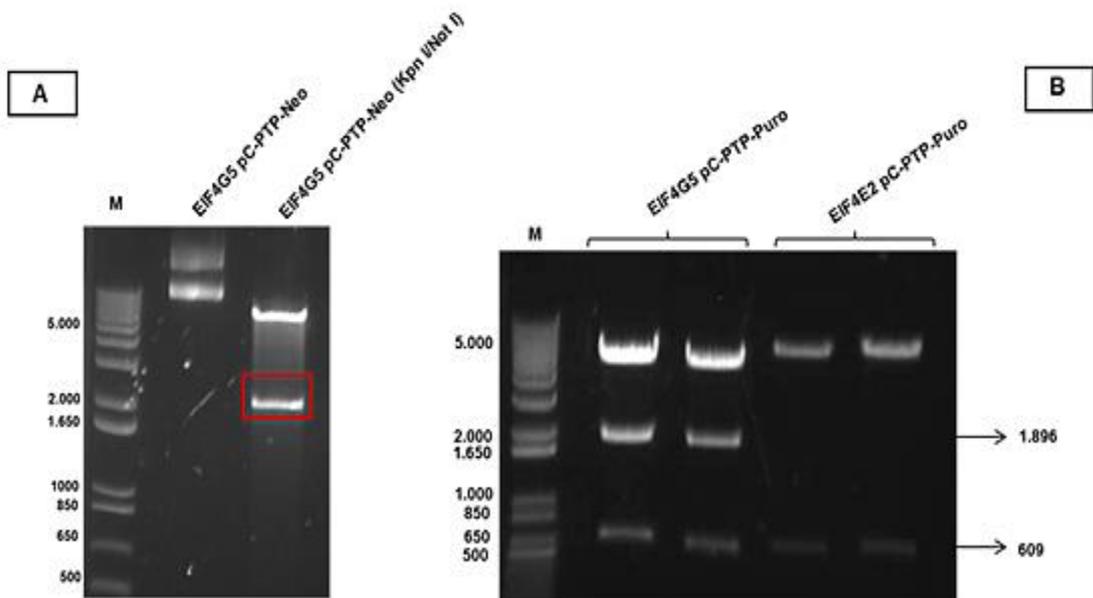


Figura 17. Confirmação da construção plasmidial no vetor pC-PTP-Puro. Gel de agarose 1% após eletroforese. (A) mostra o produto da digestão de minipreparação de DNA plasmidial EIF4G5 pC-PTP-Neo com enzimas específicas *Not* I / *Kpn* I para obtenção do inserto EIF4G5 (1980 pb). (B) mostra as digestões enzimáticas das minipreparações com as enzimas *Bst*B I / *Nde* I, que possui sítio interno de clivagem para a enzima *Nde* I (M) marcador de peso molecular utilizado 1 Kb Plus Ladder (Invitrogen®).

4.2.2 Análises da expressão de proteínas fusionadas ao PTP-tag

Inicialmente a linhagem selvagem 427 de *T. brucei* foi modificada a fim de obter a expressão das proteínas de interesse, EIF4G5 e EIF4G5-IP, fusionadas ao tag do PTP (19 kDa). Para a modificação desejada, as células de *T. brucei* na fase exponencial foram transfectadas com construções plasmidiais, derivadas do pC-PTP-Neo para substituição da primeira cópia do gene e selecionadas com neomicina. Posteriormente extratos celulares, foram preparados, fracionados em gel SDS-PAGE e avaliados por *Western blot* utilizando um anticorpo contra a proteína A do tag PTP, anti-Prot A (Sigma®), com o intuito de verificar a expressão das proteínas nos tamanhos preditos, sendo de aproximadamente 89 kDa para a linhagem EIF4G5-IP +/-PTP e com ~104 kDa para EIF4G5 +/-PTP (Figura 18). Em seguida essas células foram submetidas a uma nova transfecção com o vetor pC-PTP-Puro para substituição da outra cópia selvagem do gene. Vale salientar que foram realizadas várias tentativas de transfecções, embora mal sucedidas, para obtenção da linhagem EIF4E6 +/-PTP.

Para as células transgênicas 90-13 de *T. brucei* utilizada em ensaios de RNAi, foi utilizada uma outra estratégia de transfecção. Neste caso apenas para a proteína EIF4G5-IP, para qual não dispúnhamos de soro policlonal específico, as células de *T. brucei* foram submetidas a transfecção com o plasmídeo pC-PTP-Puro, substituindo uma das cópias do gene. Este plasmídeo foi escolhido devido à resistência da linhagem a neomicina e higromicina, devido a expressão constitutiva do gene da T7 RNA polimerase e o repressor da tetraciclina respectivamente. Após a confirmação da expressão foram então, submetidas a uma nova transfecção com o plasmídeo de RNAi (p2T7:177).

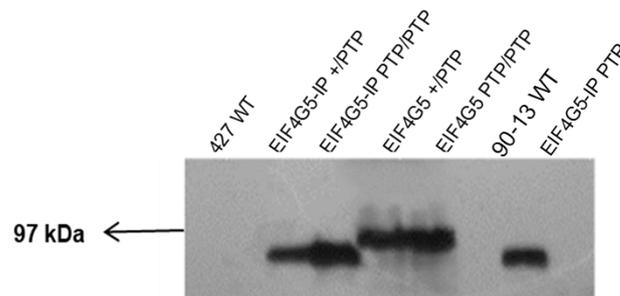


Figura 18. *Western blot* para a confirmação da expressão das proteínas EIF4G5-IP e EIF4G5 nas células transfectadas com o PTP-tag derivadas da linhagem 427. Como controles foram utilizadas linhagens selvagens 427 e 90-13 de células sanguíneas. O anticorpo monoclonal comercial anti-proteína A da marca Sigma® diluído 1:10.000 reconheceu cada proteína nos seus tamanhos esperados.

4.2.3 Imunoprecipitação de proteínas fusionadas ao PTP-tag

Posteriormente à confirmação da expressão das proteínas de interesse fusionada ao tag PTP, prosseguiu-se com o objetivo de identificar se o complexo formado pelas proteínas EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP identificado na linhagem procíclica de *T. brucei* também estaria presente na fase sanguínea. Para isso, primeiramente foram produzidos lisados celulares, em triplicata, para a obtenção da fração citoplasmática, a partir de culturas derivadas da linhagem 427, expressando as proteínas de interesse fusionadas ao tag, EIF4G5-IP PTP/PTP e EIF4G5-IP PTP/PTP. Estes lisados por sua vez foram fracionados em SDS-PAGE para avaliar a susceptibilidade destas proteínas a eventos de degradação durante o processo de lise (Figura 19). Uma vez confirmado a integridade das proteínas prosseguiu-se com a etapa de imunoprecipitação. Essa técnica já é bem utilizada para o isolamento de complexos proteicos para posterior identificação de suas proteínas co-purificadas, através do uso da espectrometria de massas.

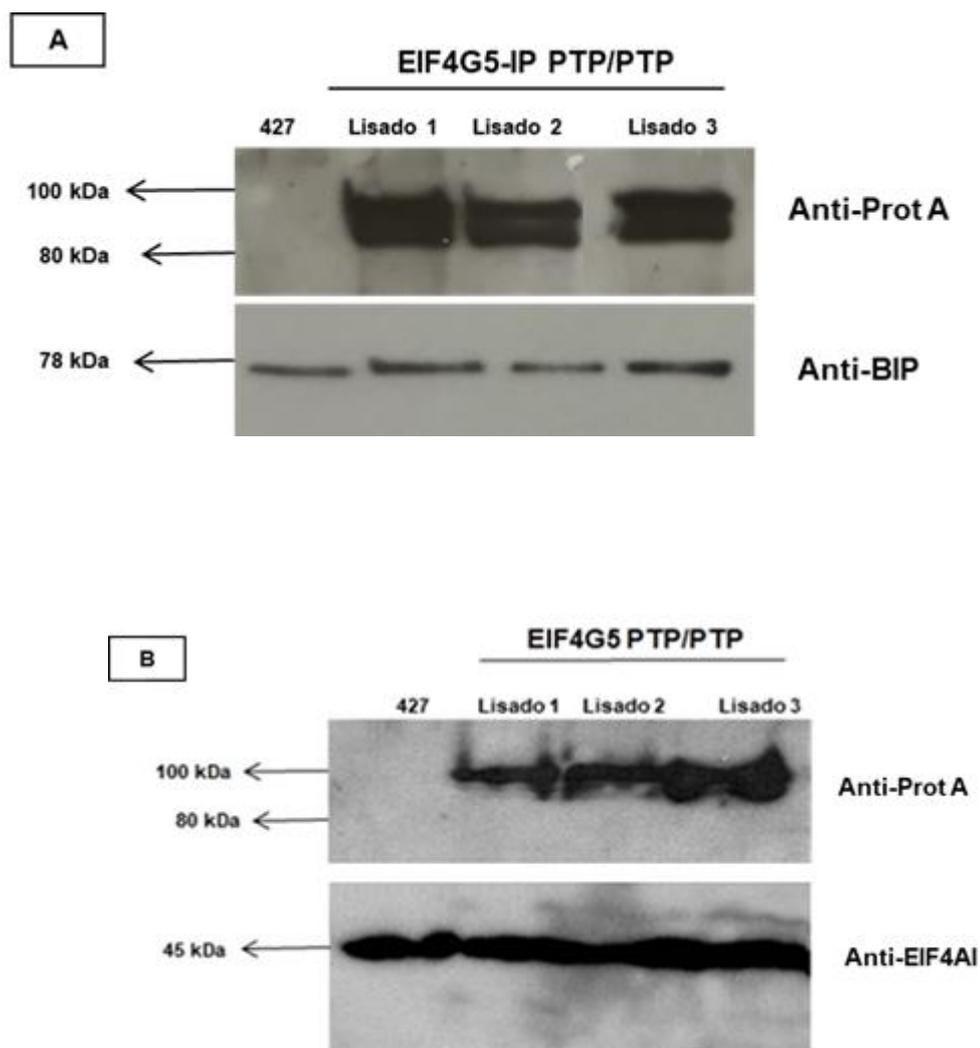


Figura 19. Lisados contendo EIF4G5-IP PTP/PTP e EIF4G5 PTP/PTP. *Western blot* para a confirmação da integridade da proteína EIF4G5-IP PTP/PTP **(A)** e EIF4G5 PTP/PTP **(B)** na fração citoplasmática dos lisados celulares. A detecção da chaperona BiP e da proteína EIF4AI, ambas de expressão constitutiva e citoplasmática, foi utilizada como controle de carga respectivamente.

Durante o ensaio, alíquotas da resina (Imunoprecipitado – IP) juntamente com o lisado total e os lisados obtidos após o ensaio (lisados depletados) foram utilizadas para a realização de *Western-blot* para detecção das proteínas marcadas com o epítipo PTP. O lisado da linhagem selvagem 427 de *T. brucei* (WT) foi utilizado como controle negativo. A figura 20 mostra o produto deste ensaio pelo qual podemos verificar a presença das proteínas expressas, na amostra dos lisados celulares, a quase ausência total dessas mesmas proteínas nas frações depletadas e presença das mesmas nos imunoprecipitados (IP), mostrando a capacidade que essas

proteínas, através do *tag* adicionado, tem de se ligar a resina.

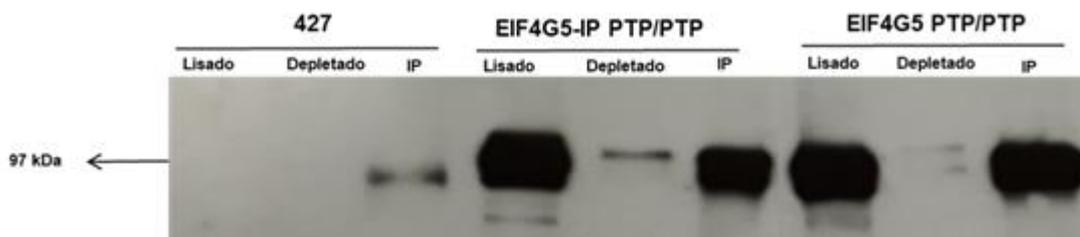


Figura 20. Ensaio de *Western blot* de imunoprecipitações das proteínas EIF4G5- IP PTP/PTP e EIF4G5 PTP/PTP. Como controle negativo foi utilizada a linhagem selvagem 427.

4.2.4 Identificação de parceiros através da espectrometria de massas

Em posse dos dados brutos enviados pelo Plataforma Tecnológica de Espectrometria de Massas, foi realizada a identificação dos peptídeos que copurificaram com as amostras de interesse enviadas. Para identificação foi baseada na sequência proteica de *T. brucei* depositada em um banco de dados online (*T. brucei brucei* TREU927, 2018, disponível no TriTrypDB).

A análise dos valores fornecidos consistiu em utilizar o valor da média da intensidade (*Intensity*) das triplicatas técnicas das amostras de interesse EIF4G5 e EIF4G5-IP, em comparação com as do controle (linhagem selvagem 427), gerando assim uma razão que reflete de forma quantitativa a abundância das proteínas que copurificaram com cada amostra analisada. Entretanto, para uma análise mais refinada foi realizado uma nova filtragem dos dados primários de intensidade obtidos através da transformação logarítmica na base 2.

As tabelas 1 e 2 mostram as proteínas que apresentaram maior abundância ao copurificar com as proteínas EIF4G5 e EIF4G5-IP respectivamente, utilizando como parâmetro o valor do *log* da intensidade maior ou igual a 3. Pode-se observar através desses dados a presença das proteínas associadas à proteína alvo, formando *in vivo* o complexo do tipo eIF4F já conhecido (EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP). Vale ressaltar que nenhum outro homólogo dos fatores de iniciação da tradução foi identificado na análise, confirmando a especificidade do ensaio e a integridade do complexo. Além

disso foram identificadas proteínas envolvidas com a formação flagelar, no metabolismo celular e no metabolismo de mRNA de tripanossomatídeos (MKT1). Chama a atenção a copurificação exclusivamente com o EIF4G5-IP de uma proteína com domínio CYTH, domínio este encontrado também em uma proteína relacionada com a maturação do *cap* em tripanossomatídeos, e duas proteínas anotadas como “hipotéticas”. Sendo a Tb927.6.2210, uma proteína de ligação ao mRNA.

Tabela 1. Principais peptídeos identificados pela técnica de espectrometria de massas associados a proteína EIF4G5. Os resultados foram divididos em número de acesso (*T. brucei* 927 (www.tritrypdb.org)), identidade, função molecular e média dos valores de intensidade usando o Log2 e a média de peptídeos encontrados em cada uma das proteínas envolvidas.

EIF4G5-PTP (Tb927.8.4500)				
Nº de acesso do gene	Identidade	Função	Média intensity (Log 2) >3,0	Média do nº de peptídeos
Fatores de Iniciação da tradução				
Tb927.11.14590	EIF4G5-IP	Proteína de interação com o EIF4G5	26,56	63,33
Tb927.7.1670	EIF4E6	Fator de iniciação da tradução	23,32	50
Tb927.8.4500	EIF4G5	Fator de iniciação da tradução	7,63	15,83
Relacionadas ao mRNA				
Tb927.6.4770	Proteína MKT1	Proteína de ligação ao mRNA	20,84	23,33
Proteínas de metabolismo				
Tb927.1.3830	Glicose-6-fosfato isomerase	Proteína envolvida na via glicolítica	26,33	50,67
Tb927.4.2450	Proteína Dissulfato isomerase1	Proteína envolvida nos processos de oxirredução	24,54	60
Tb927.11.900	Isocitrato desidrogenase	Proteína envolvida nos processos de oxirredução	24,39	34
Tb927.9.8720	Frutose-1,6-bifosfatase	Atividade de fosfatase	21,75	14
Tb927.11.7380	Glicose-3-fosfato desidrogenase	Proteína envolvida nos processos de oxirredução	7,89	12,38
Relacionadas a função flagelar				
Tb927.10.11300	Proteína da haste paraflagelar	Proteína constituinte da haste paraflagelar	22,93	13,67
Tb927.4.3740	Proteína da zona de fixação do flagelo 1	Proteína constituinte da zona de fixação do flagelo	23,71	10
Tb927.1.4310	Proteína da zona de fixação do flagelo 2	Proteína constituinte da zona de fixação do flagelo	21,79	13,33

Tabela 2. Principais peptídeos identificados pela técnica de espectrometria de massas associados a proteína EIF4G5-IP. Os resultados foram divididos em número de acesso (*T. brucei* 927 (www.tritrypdb.org)), identidade, função molecular e média dos valores de intensidade usando o Log₂ e a média de peptídeos encontrados em cada uma das proteínas envolvidas.

EIF4G5- IP-PTP (Tb927.11.14590)				
N° de acesso do gene	Identidade	Função	Média Intensity (Log 2) >3,0	Média N° de peptídeos
Fatores de Iniciação da tradução				
Tb927.7.1670	EIF4E6	Fator de iniciação da tradução	23,30	30,33
Tb927.11.14590	EIF4G5-IP	Proteína de interação com o EIF4G5	22,06	23,67
Tb927.8.4500	EIF4G5	Fator de iniciação da tradução	7,85	5,83
Relacionadas ao mRNA				
Tb927.6.4770	Proteína MKT1	Proteína de ligação ao mRNA	23,78	17,33
Tb927.10.15330	Proteína domínio CYTH	-	3,60	4,25
Proteínas de metabolismo				
Tb927.4.2450	Proteína dissulfato isomerase 1	Proteína envolvida nos processos de oxirredução	24,54	30,33
Tb927.1.3830	Glicose-6-fosfato isomerase	Proteína envolvida na via glicolítica	24,48	20,67
Tb927.11.900	Isocitrato desidrogenase	Proteína envolvida nos processos de oxirredução	19,67	4
Tb927.9.8720	Frutose-1,6-bifosfatase	Atividade de fosfatase	16,37	4
Relacionadas a função flagelar				
Tb927.10.11300	Proteína da haste paraflagelar	Proteína constituinte da haste paraflagelar	22,93	7,33
Tb927.1.4310	Proteína da zona de fixação do flagelo 2	Proteína constituinte da zona de fixação do flagelo	19,17	4
Tb927.6.2210	Proteína hipotética	Proteína de ligação ao mRNA	18,01	4
Tb927.11.2540	Proteína hipotética	Proteína do axonema	17,95	4

4.3 ANÁLISE DO EFEITO DA DEPLEÇÃO DO EIF4G5-IP E EIF4G5 POR RNA DE INTERFERÊNCIA

Para análise da viabilidade celular, na ausência das proteínas de uma das cópias endógenas do EIF4G5-IP +/-PTP e do EIF4G5 foi utilizada a técnica de RNAi. As células 90-13 transfectadas foram induzidas por tetraciclina. O crescimento celular tanto das culturas induzidas (+TET), quanto das culturas não induzidas (-TET), foram monitoradas por cinco dias. As culturas EIF4G5-IP e EIF4G5 apresentaram uma pequena diminuição do crescimento celular muito embora a análise do nível de expressão dessas proteínas se manteve inalteradas ao comparar com as culturas não induzidas indicando que as depleções induzidas pelo RNAi não foram satisfatórias (Figura 21). Vale salientar que com a falta de anticorpos eficientes contra a proteína endógena, o EIF4G5-IP, as análises de expressão foram detectadas utilizando um anticorpo contra o *tag* PTP.

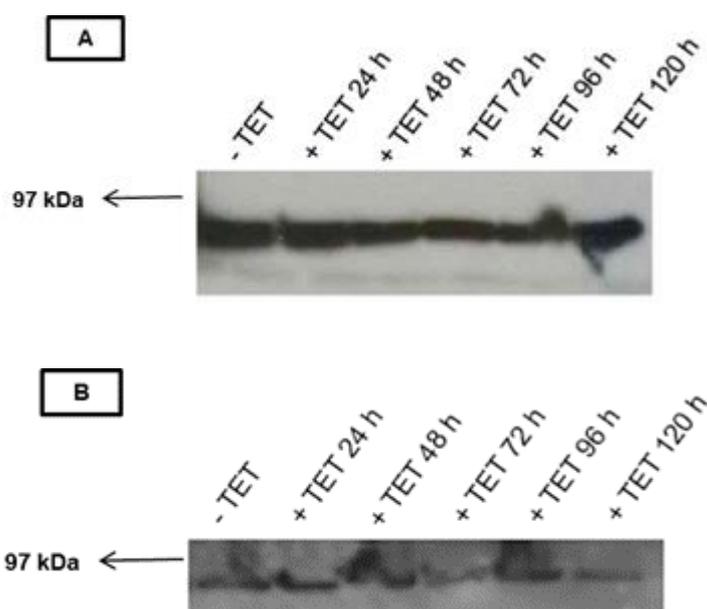


Figura 21. Western blot a partir de cultura de *T. brucei* 90-13 de RNAi induzidas. Mostrando o nível de expressão a proteína EIF4G5-IP (A) e EIF4G5 (B).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS SÍTIOS DE INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS DO COMPLEXO EIF4E6/ EIF4G5 E EIF4G5-IP

Uma outra etapa deste trabalho consistiu em analisar *in vitro* a interação entre as principais proteínas formadoras do complexo e para isso, foram usados dois conjuntos distintos de interações, o primeiro envolvendo as proteínas selvagens e o segundo envolvendo proteínas contendo resíduos selecionados de aminoácidos mutados. Estes aminoácidos foram identificados previamente através do alinhamento no Clustal W das sequências das proteínas EIF4E6 e EIF4G5 de diferentes espécies de tripanossomatídeos, levando a identificação de motivos que poderiam estar envolvidos na interação com parceiros funcionais (Figura 22).

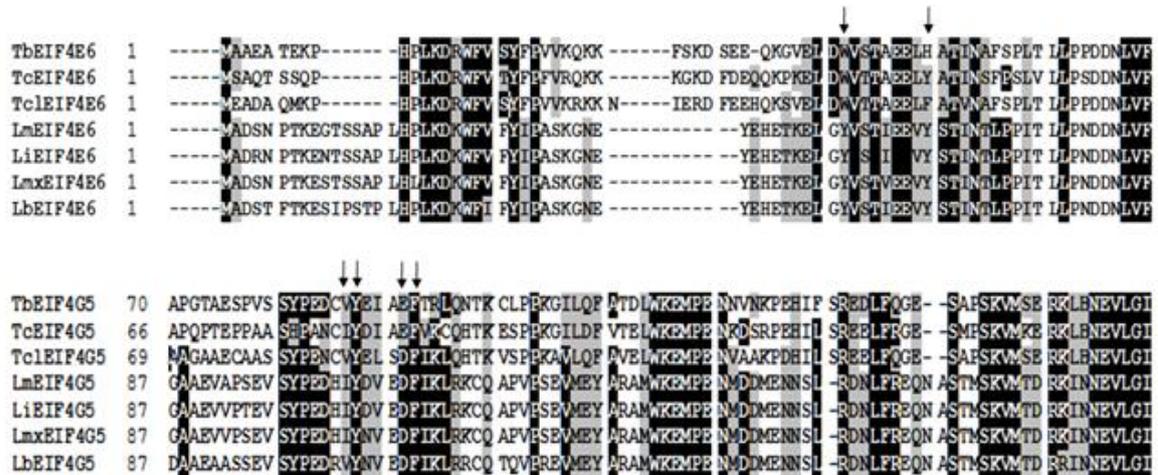


Figura 22. Análise *in silico* dos prováveis motivos responsáveis pelas interações EIF4E6 e EIF4G5. Mostrando o alinhamento realizado nas diferentes espécies de tripanossomatídeos. As setas juntas indicam os resíduos os que foram mutados.

Para os ensaios de interação previstos, as proteínas do estudo, EIF4E6, EIF4G5 e EIF4G5-IP, fusionadas com Glutathione S-transferase (GST) foram expressas, dialisadas e testadas em relação a sua capacidade de interagir com seus parceiros selvagens (EIF4E6_{WT} e EIF4G5_{WT}) e mutantes (EIF4E6_{W43A}, EIF4E6_{H51A}, EIF4G5_{VY86-87AA} e EIF4G5_{EF91-92AA}), marcados radioativamente (^{35}S). A Figura 23 ilustra os pares de proteínas que foram avaliados neste trabalho.

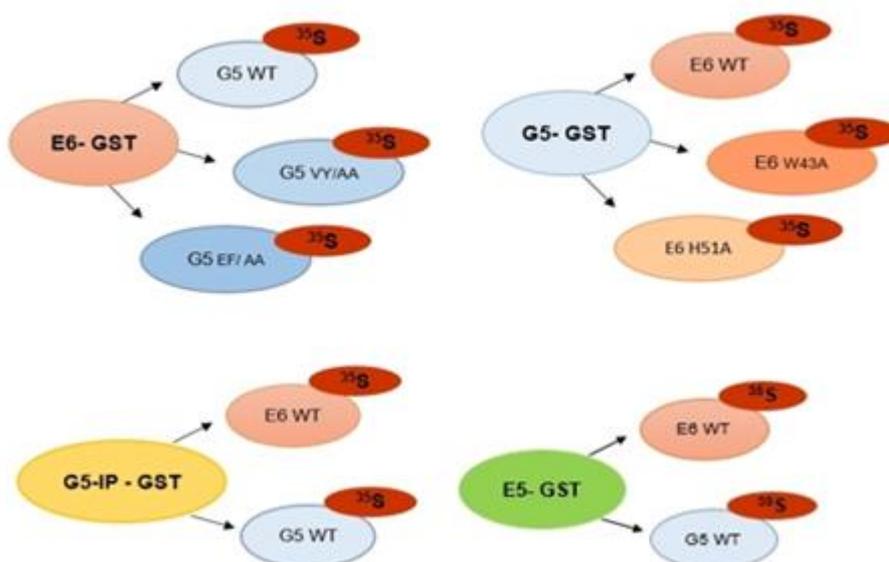


Figura 23. Esquema simplificado das interações investigadas neste trabalho. O esquema mostra as proteínas recombinantes fusionadas à GST e seus possíveis parceiros marcados com ³⁵S. Para controle negativo da reação foi utilizado a proteína recombinante EIF4E5.

4.4.1 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

Nesta etapa foram utilizadas as diferentes construções contendo os genes EIF4G5, EIF4G5-IP, EIF4E6 e EIF4E5 clonados no plasmídeo pGEX4T3 e expressas em *Escherichia coli* como proteínas recombinantes fusionadas a GST. A Figura 24A mostra a expressão das proteínas que foram utilizadas como controle no ensaio de interação, GST (26 KDa) e EIF4E5 (~ 48 KDa), além das proteínas alvos EIF4EG5 (110 KDa), EIF4G5-IP (96 KDa) e EIF4E6 (~47 KDa), todas estando com seu respectivo peso molecular predito. Uma vez expressas, essas proteínas foram purificadas, utilizando uma resina de Glutathione Sefarose 4B, dialisadas e submetidas à migração em gel SDS-PAGE para a realização de sua quantificação, através de uma curva de BSA de concentrações conhecidas, além verificar a integridade das mesmas (Figura 24 B).

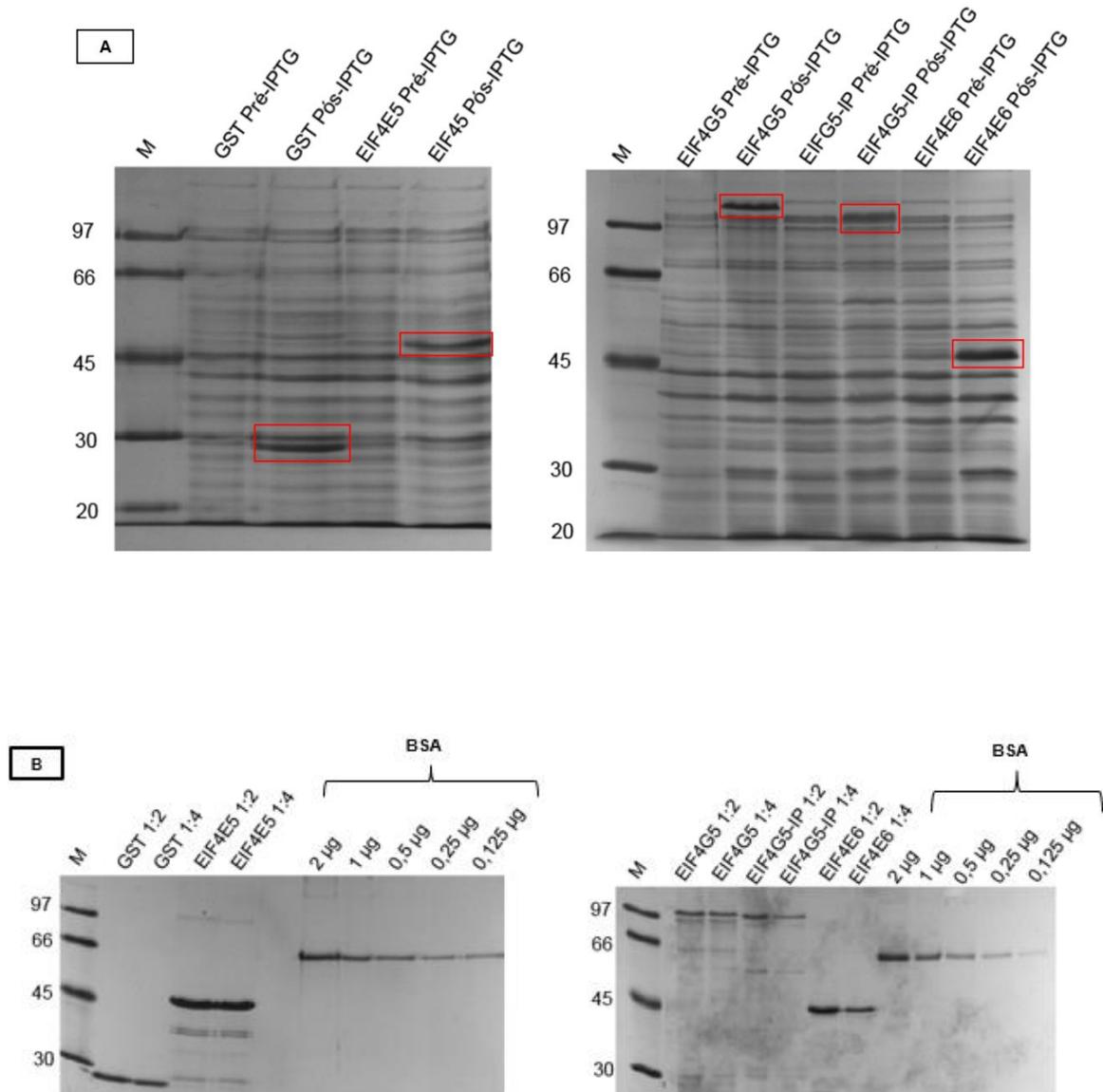


Figura 24. Gel SDS PAGE 15% mostrando a integridade das proteínas expressas e dialisadas fusionadas a GST. (A) Para a indução das proteínas recombinantes foi adicionada a cultura bacteriana o IPTG (Pós). Como controle, foram crescidas as culturas sob a mesma condição sem a presença do indutor (Pré). (B) As proteínas recombinantes foram dialisadas e alíquotas nas concentrações de 1:2 e 1:4 foram quantificadas a partir de uma curva de BSA de concentrações conhecidas.

4.4.2 Transcrição e tradução *in vitro* dos genes EIF4E6 e EIF4G5

Para obtenção das proteínas radioativas, foi necessário primeiramente a obtenção de mRNAs por transcrição *in vitro* a partir dos genes EIF4E6 (EIF4E6 selvagem e mutantes, W43A e H51A) e EIF4G5 (EIF4G5 selvagem e mutantes VY86-87AA e EF91-92AA). Estes mRNAs sintéticos obtidos foram analisados em gel de agarose para verificação de sua integridade (Figura 25).

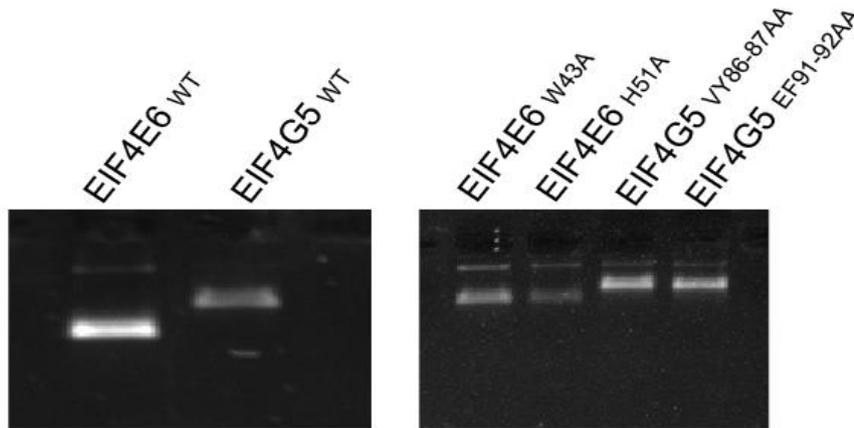


Figura 25. Transcrição *in vitro*. Gel de agarose a 1% mostrando os mRNAs sintéticos selvagens (WT) e mutantes provenientes da transcrição *in vitro* dos genes EIF4E6 e EIF4G5 no plasmídeo pET21a.

Subsequentemente esse mRNAs foram traduzidos *in vitro*, em pequena escala, no sistema de tradução de lisado de reticulócito de coelho permitindo a obtenção das proteínas radioativas visualizadas em autorradiografia (Figura 26). Uma vez confirmado a eficiência de tradução de todas as proteínas de interesse, selvagem e mutantes, seguiu-se com a tradução em larga escala, para posteriormente serem utilizadas no ensaio de interação com as proteínas recombinantes.

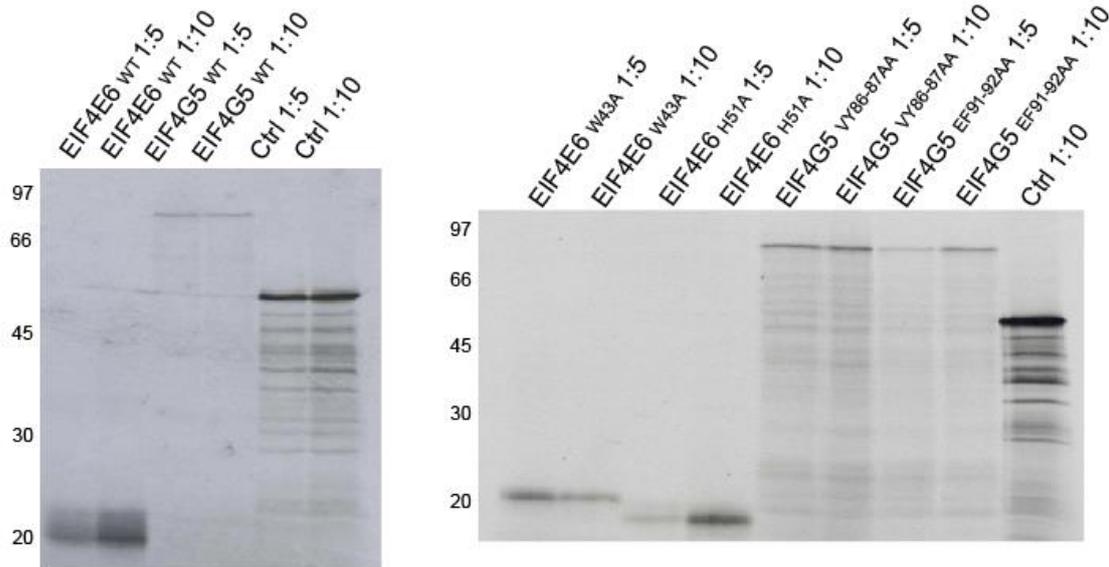


Figura 26. Tradução *in vitro*. Expressão das proteínas marcadas radioativamente (^{35}S) em diferentes concentrações (1:5 e 1:10) submetidas a exposição em filme autorradiográfico. Foi utilizado como controle o RNA de Luciferase.

4.4.3 Ensaios de interação proteína-proteína para investigar as interações entre o EIF4E6, EIF4G5 e EIF4G5-IP.

O primeiro ensaio de interação proteína-proteína (*pull down*) buscou investigar as proteínas EIF4E6 e EIF4G5-IP fusionadas a GST, que foram imobilizadas na resina Glutathione Sefarose 4B e em seguida incubadas com a proteína EIF4G5 marcadas com ^{35}S . Após a incubação a resina obtida foi lavada para remoção de interações inespecíficas e as proteínas retidas foram analisadas em SDS-PAGE. Apenas no caso de interações específicas, entre as proteínas com GST e àquela marcada com ^{35}S , as proteínas radioativas seriam detectadas nos poços contendo a resina. As proteínas GST e a EIF4E5 foram incubadas com as radioativas para serem utilizadas como controles negativos, a fim de descartar qualquer interação inespecífica.

A figura 27 mostra dois conjuntos de interações envolvendo a proteína EIF4G5. O primeiro conjunto retrata as interações envolvendo as proteínas selvagens e é possível observar a interação entre EIF4G5/EIF4E6_{WT} e a ausência de interação entre as proteínas EIF4G5/EIF4G5-IP_{WT}. Pode observar também a especificidade das interações obtidas uma vez que a proteína, EIF4G5, não consegue interagir nem com a GST, nem com o outro homólogo do EIF4E testado, o EIF4E5. O segundo conjunto de resultados procurou investigar os motivos que estariam envolvidos nessa

interação, utilizando as proteínas EIF4G5 mutadas (VY86-87AA e EF91-92AA). Foi possível observar que apenas a mutação dupla EF91-92AA é capaz de desligar a ligação do EIF4G5 ao EIF4E6 indicando que estes resíduos possam fazer parte do sítio de interação entre as mesmas.

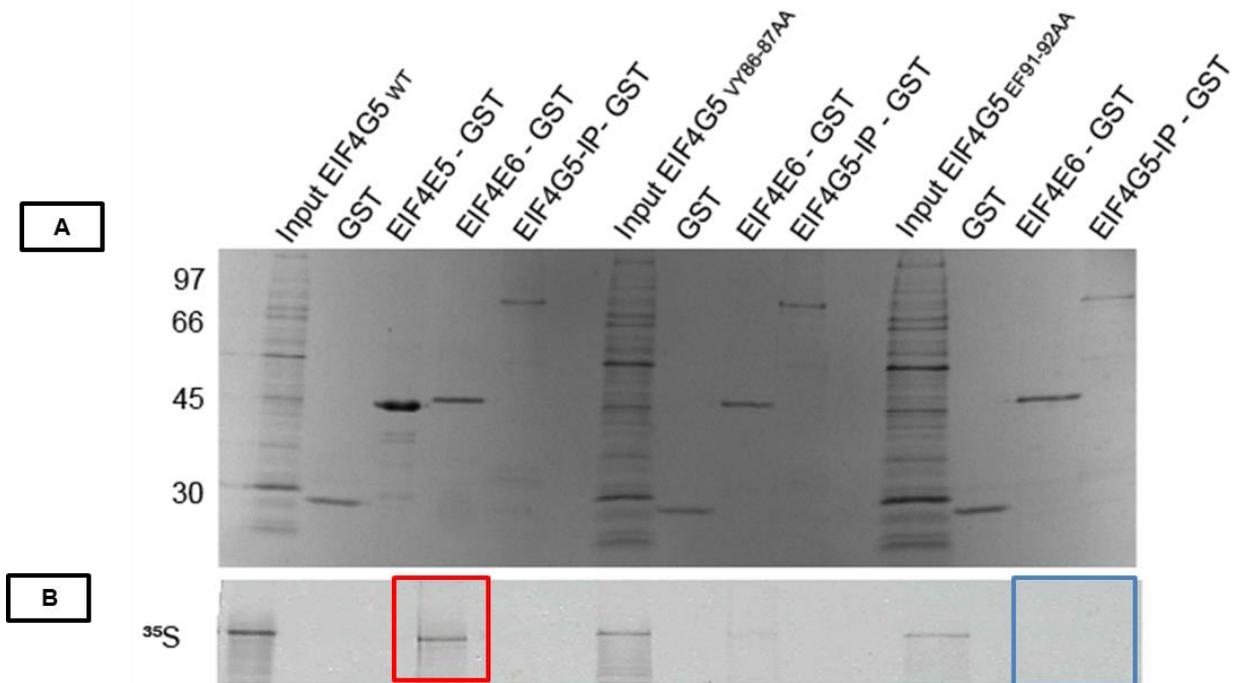


Figura 27. Análise de interação da proteína EIF4G5. As diferentes proteínas recombinantes foram incubadas com as proteínas selvagens (WT) e mutantes marcadas radioativamente. (A) O *input* proveniente da tradução *in vitro* e as proteínas recombinantes utilizadas foram submetidas a migração em gel de SDS-PAGE 20% e corado com azul de Coomassie. (B) Filme autorradiográfico após 48 horas de exposição mostrando a capacidade que as proteínas têm de interagir *in vitro*. Em destaque (vermelho) mostra a interação entre as proteínas EIF4G5/EIF4E6, e em azul o mostrando que a mutação EIF4G5_{EF91-92AA} foi capaz de remover a interação com seu parceiro EIF4E6.

No segundo ensaio, procurou-se investigar a proteína EIF4E6 e para isso as proteínas EIF4G5 e EIF4G5-IP fusionadas a GST foram imobilizadas na resina Glutathiona Sefarose 4B e em seguida incubadas com a proteína EIF4E6, marcada com ³⁵S. O experimento seguiu com as mesmas condições anteriormente relatadas. As proteínas GST e a EIF4E5 também foram incubadas com as radioativas para serem utilizadas como controles negativos. A figura 28 mostra, primeiro o conjunto das interações envolvendo a proteína EIF4E6_{WT} e é possível observar a interação da mesma com as duas proteínas, EIF4G5_{WT} e EIF4G5-IP_{WT}, além de reportar a ausência

de interações com as proteínas GST e EIF4E5. O segundo conjunto de resultados, seguiu procurando investigar os motivos que estariam envolvidos nessas interações, utilizando as proteínas EIF4E6 mutadas (W42A e H51A), e foi demonstrado que nenhuma dessas mutações testadas foram capazes de interferir com a interação das proteínas testadas (EIF4G5 e EIF4G5-IP), mostrando não ser o sítio de interação entre as mesmas.

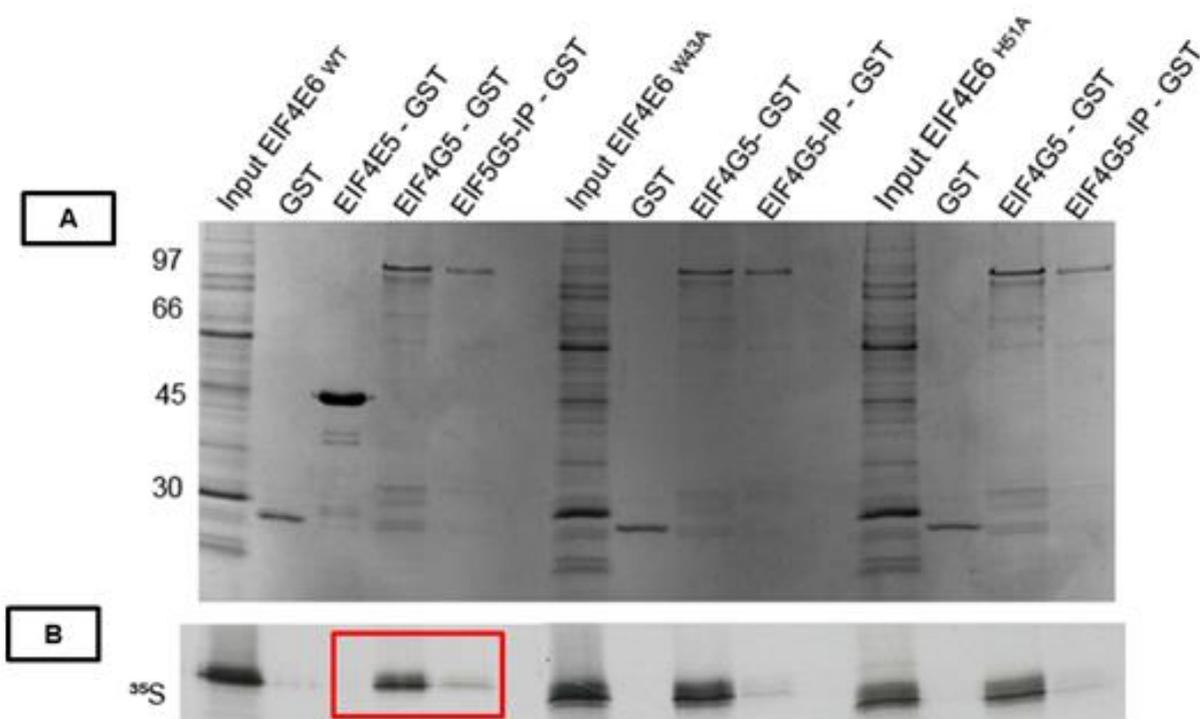


Figura 28. Análise de interação da proteína EIF4E6. As diferentes proteínas recombinantes foram incubadas com as proteínas selvagens (WT) e as proteínas marcadas radioativamente. (A) O *input* proveniente da tradução *in vitro* e as proteínas recombinantes utilizadas foram submetidas a migração em gel de SDS-PAGE 20% e corado com azul de Coomassie. (B) Filme autorradiográfico após 48 horas de exposição mostrando a capacidade que as proteínas têm de interagir *in vitro*. Em destaque (vermelho) mostra a interação entre as proteínas EIF4E6/EIF4G5 e EIF4E6/EIF4G5-IP. Nenhuma das mutações testadas foi capaz de interromper a ligação dessas proteínas.

Por fim, buscando-se investigar um pouco mais sobre as interações envolvendo a proteína EIF4G5-IP_{WT}, foi utilizada a estratégia de *pull down* triplo. O primeiro bloco de interações triplas consistiu em verificar a capacidade que a proteína radiativa EIF4G5 tem em interagir com a proteína EIF4G5-IP, na presença de outra proteína radiativa parceira, EIF4E6. Para isso a proteína EIF4G5-IP fusionadas a GST foi

imobilizada na resina Glutathione Sefarose 4B e em seguida incubadas ao mesmo tempo com as proteínas EIF4G5 e EIF4E6 marcadas radiativamente. O segundo bloco de interações triplas consistiu em modificar apenas as proteínas alvos radioativas, sendo utilizado as proteínas EIF4E6_{WT} e o EIF4G5 mutado (EF91-92AA), que como demonstrado no ensaio anterior não possui a capacidade de interagir com a outra proteína radioativa do teste, no intuito de verificar o seu perfil interação com a EIF4G5-IP. Foi possível observar (Figura 29) que o EIF4G5_{WT} mesmo na presença de seu parceiro, EIF4E6, não foi capaz de interagir com a proteína EIF4G5-IP. E que no ensaio envolvendo a mutação, apenas a proteína EIF4E6 possui a capacidade de ligação com a EIF4G5-IP. Como controle foi utilizado apenas a proteína radiativa mutada, que como mostrado anteriormente não se liga ao EIF4G5-IP.

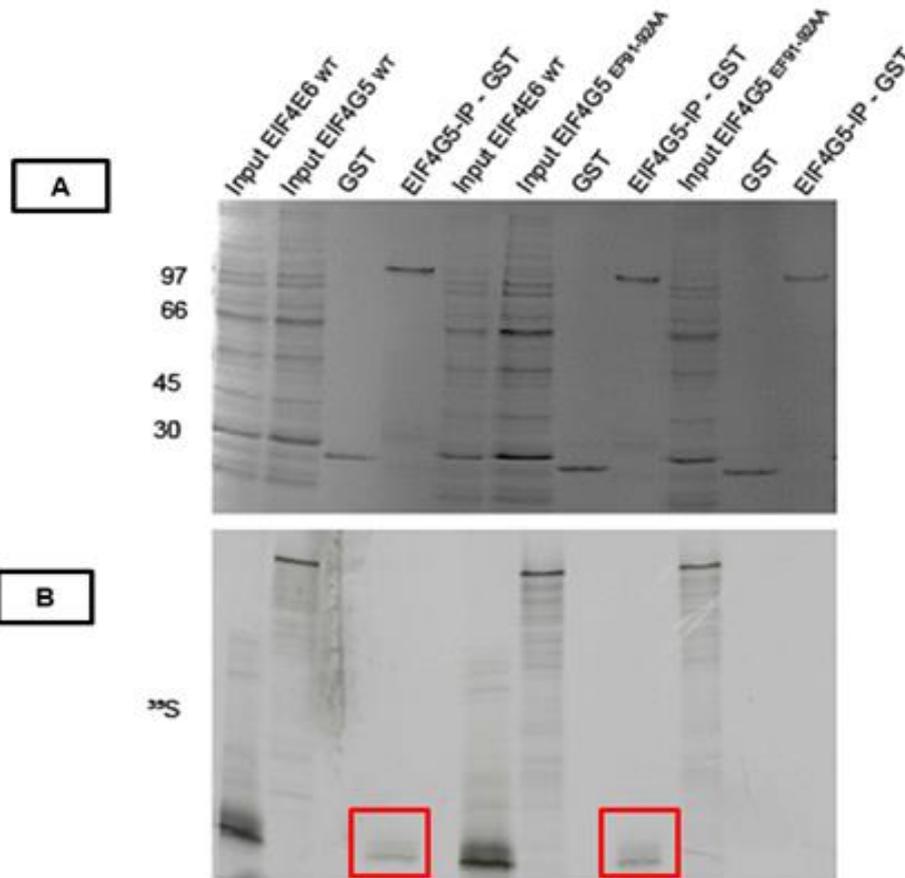


Figura 29. Análise de interação envolvendo a proteína EIF4G5-IP. A proteína recombinante EIF4G5-IP foi incubada com as proteínas selvagens EIF4E6 WT/EIF4G5 WT e EIF4E6 WT/EIF4G5^{EF 91-92AA}. No ensaio de *pull down* triplo. Como controle foi utilizado o ensaio do EIF4G5^{EF 91-92AA} contra a recombinante EIF4G5-IP. (A) O input proveniente da tradução *in vitro* e as proteínas recombinantes utilizadas foram submetidas a migração em gel de SDS-PAGE 20% e corado com azul de Coomassie. (B) Filme autorradiográfico após 48 horas de exposição mostrando (vermelho) que apenas a proteína EIF4E6 WT é capaz de interagir com a proteína EIF4G5-IP.

5 DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos apresentam características peculiares referentes à sua biologia molecular e regulação de seus genes. Diferente do que ocorre nos demais eucariotos, os mecanismos moleculares associados à regulação da expressão gênica são influenciados pós-transcricionalmente, pelos níveis dos mRNAs (processamento, estabilidade e degradação) e pela interação entre os elementos que participam do processo de tradução (Clayton; Shapira, 2007; Inoue et al., 2014; Singh et al., 2018).

Em eucariotos, a etapa de iniciação da tradução é crítica e vários fatores estão envolvidos, dentre eles o complexo heterotrimérico eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G). Em tripanossomatídeos foram identificados múltiplos homólogos das diferentes subunidades deste complexo que interagem entre si, totalizando cinco complexos do tipo eIF4F conhecidos (Papadopoulos, 2014; Zinoviev et al., 2012; de Melo Neto et al., 2016). Este trabalho teve por objetivo avançar na caracterização do complexo envolvendo as proteínas EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP em linhagens de células sanguíneas de *T. brucei*, bem como identificar quais motivos estariam envolvidos nessas interações.

Através de ensaio de análise de expressão por *Western blot* foi possível observar que não há diferenças perceptíveis de expressão desse EIF4G5 nas duas fases do ciclo biológico do parasita. Este foi o indício inicial que o complexo deva estar presente durante todo o ciclo de vida do parasita. A mesma análise não foi possível realizar para as demais proteínas do complexo, EIF4E6 e EIF4G5-IP, devido à indisponibilidade de anticorpo eficiente. Nenhum dado quantitativo preciso para determinar a abundância dessas proteínas foi até o momento realizado. Entretanto já se sabe que o EIF4E6 é um dos homólogos menos expressos tanto em *Leishmania major* na forma promastigota (dados não publicados) quanto na forma procíclica de *T. brucei* (Freire et. al., 2017). Isso é um indicativo que para realizar sua função biológica não necessitam estar presentes em grandes quantidades.

Os resultados obtidos na análise de espectrometria de massas mostraram que as proteínas do estudo coprecipitam entre si formando *in vivo* o complexo EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP. Esses achados corroboram com os dados encontrados em linhagens de células da linhagem procíclica deste parasita, utilizando a mesma metodologia de estudo (Freire et al. 2014b). Além disso, neste trabalho, também foram

detectadas associadas ao complexo, proteínas envolvidas no metabolismo celular, na formação flagelar, no metabolismo de mRNA e proteína de domínio CYTH.

Em tripanossomatídeos a proteína MKT-1 foi caracterizada por interagir com outras proteínas que possuem a capacidade de ligar a mRNAs específicos, sugerindo ter um papel sobre o metabolismo do mRNA (Singh et al., 2014). Por outro lado, a superfamília CYTH de proteínas foi caracterizada, em eucariotos, agindo sobre substratos trifosforilados (Bettendorff e Wins, 2013). Esse mesmo domínio foi encontrado no sítio ativo da proteína Cet1, uma RNA trifosfatase que catalisa o primeiro passo na formação de *cap* do mRNA (Gong et al., 2006). Curiosamente, a proteína EIF4G5-IP possui em sua estrutura domínios de guanililtransferase e trifosfatase (NTPase), enzimas possivelmente envolvidas na formação do *cap*, além de ter domínios conservados da TbCe1 (Freire et al., 2014b). Estudos mais recentes mostram a função da TbCe1 em restaurar mRNAs que sofreram *decapping* citoplasmático, sendo passíveis de tradução (Ignatichkina et al., 2015). É possível dessa forma, atribuir que este complexo possa fazer parte de vias que regulam a tradução de mRNA específicos (Freire et al., 2017).

Além disso, foram encontradas também duas proteínas (Tb927.4.3740 e Tb927.1.4310) que coprecipitaram com o EIF4G5 e EIF4G5-IP que estão envolvidas na zona de fixação flagelar (FAZ). Estudos mostram que durante o ciclo celular de *T. brucei* as mudanças morfológicas necessárias para a adaptação e patogenicidade do parasita nos hospedeiros tem sido associada as mudanças na composição da proteica do FAZ (Sunter and Gull, 2016). Além disso, já se sabe que a ruptura do conjunto FAZ tem associação com alterações morfológicas como deslocamento flagelar além de alterações no tamanho e forma das células (Sunter et al., 2015). Curiosamente o RNAi, fase procíclica, de uma das proteínas envolvidas no complexo, EIF4E6, afetou na motilidade celular e na estabilidade flagelar do parasita, causando um descolamento do flagelo em células submetidas a centrifugação leve. Indicando que este fator é necessário para o crescimento celular eficiente e que pode atuar sobre a regulação do metabolismo de mRNAs específicos provavelmente associado de alguma forma com mobilidade celular e/ou ligação flagelar (Freire et al., 2017).

Um passo para a caracterização das proteínas EIF4G5-IP e EIF4G5 foi a análise das consequências da depleção ou redução delas pela técnica de RNAi. Para isso foi

utilizado a mesma estratégia de Freire e colaboradores (2014b), utilizando o sistema PTP-*tag* para a proteína EIF4G5-IP, uma vez que anticorpos contra a proteína endógena estão ausentes, possibilitando assim, a análise da expressão das proteínas por *Western blot*. Para ambas não foi possível visualizar alguma diminuição da expressão, uma explicação é que as células transfectadas não estão sendo responsivas a indução por tetraciclina. Em um estudo realizado por Alford e colaboradores (2011) envolvendo o RNAi em escala mostrou que cada um dos membros do complexo EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP é essencial para o crescimento celular normal.

A segunda etapa desse trabalho iniciou a avaliação das interações deste complexo através de ensaios *in vitro* de interação proteína-proteína. Foi possível observar a interação entre as proteínas EIF4E6 e EIF4G5, corroborando os dados obtidos pela técnica de duplo híbrido (Freire et al., 2014b). Além disso, o fato dessa ligação ocorrer com o EIF4E6 e não o EIF4E5 é uma forte indicação das funções específicas exercidas pelos diferentes complexos eIF4Fs. Já para a proteína EIF4G5-IP, foram observados dados contrastantes entre o *pull down* realizado neste trabalho e o ensaio de duplo híbrido demonstrado no trabalho de Freire e colaboradores (2014b), visto que a primeira técnica caracterizou sua interação com o EIF4E6 e o segunda com o EIF4G5 (Freire et al., 2014b). Um primeiro motivo que pode justificar a ausência de interação na técnica de duplo híbrido, é a possibilidade da proteína EIF4G5-IP não se apresentar com seu dobramento correto, podendo causar interações inespecíficas. Alternativamente é possível que ocorra ativação do gene repórter utilizado na técnica sem que haja de fato interações entre as proteínas testes (Bruckner et al., 2009; Mehla et al., 2017), caracterizando um falso positivo.

Embora possa ocorrer de os ensaios de *pull down* não identificarem interações entre as proteínas testes devido à baixa afinidade ou nível de expressão dos ligantes, essa técnica minimiza a ocorrência de interações inespecíficas devido ao fato de apenas uma proteína ser expressa como proteína de fusão (GST), diferente do duplo híbrido. Além de ser uma interação direta, não facilitada pela presença de outras macromoléculas adicionais (Lapetina and Gil-Henn, 2017). Por outro lado, é bastante possível também que a interação, EIF4G5/EIF4G5-IP possa apenas se observada dentro do *T. brucei* por uma questão de posicionamento desses fatores.

Outra abordagem do trabalho teve como foco mapear as interações anteriormente observadas entre as subunidades do complexo. Dados da literatura mostram que em vários organismos, a ligação eIF4G-eIF4E acontece através dos resíduos VEDFW (triptofano W73, mamífero) presentes no eIF4E e o motivo canônico YXXXXLΦ (onde X representa qualquer aminoácido e Φ representa um resíduo hidrofóbico) localizado no terço N-terminal do eIF4G (Rhoads, 2009; Gruner et al., 2016). Em tripanossomatídeos, dados de análises *in silico* mostraram que, dentre todos os homólogos de eIF4E, apenas o EIF4E6 de *T. brucei* apresenta o triptofano conservado (W43) do núcleo do eIF4E, entretanto o aminoácido aromático conservado (referente ao W73) no domínio de interação eIF4G, encontra-se substituído por uma histidina (H51) (de Melo Neto et al., 2016; Freire et al., 2017).

Sendo assim, foram realizados ensaios de interações com proteínas EIF4E6 mutadas nos resíduos W43A e H51A, para avaliar a capacidade de interagir com as proteínas EIF4G5 e EIF4G5-IP, a fim de verificar se estes resíduos estariam envolvidos nestas interações. Curiosamente o resultado mostrou que não houve interrupção das ligações EIF4E6/EIF4G5 e EIF4E6/EIF4G5-IP, mostrando que nenhum dos resíduos testados são responsáveis por tais interações. No caso do EIF4G5 avaliado aqui, foi realizado um alinhamento de sequências em busca de possíveis motivos nas regiões mais conservadas. Assim foi encontrado dois conjuntos de resíduos de aminoácidos candidatos (EF91-92AA e VY86-87AA). Esses sítios foram mutados e o resultado mostrou que o primeiro mutante não foi capaz de interagir com o EIF4E6, indicando que os aminoácidos EF91-92 estão envolvidos na interação entre essas proteínas. Contudo estudos adicionais serão necessários para verificar o efeito desta mutação na linhagem sanguínea do parasita.

Por fim, procurou-se investigar melhor a interação das proteínas do trabalho com o EIF4G5-IP, utilizando a técnica de *pull down* triplo, onde duas proteínas radiativas, EIF4G5 e EIF4E6_{WT} foram testadas contra o EIF4G5-IP. Os resultados deste teste indicaram que apenas o EIF4E6_{WT}, possui a capacidade de interação com a proteína alvo. Estes resultados reforçam a ideia de que a interação EIF4G5/EIF4G5-IP possa ocorrer *in vivo* no *T. brucei* e depender de algum outro fator, além do próprio EIF4E6.

As informações contidas neste trabalho auxiliaram na caracterização dos fatores presentes em um complexo do tipo eIF4F formados pelas proteínas

EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP em tripanossomatídeos, e foi demonstrada sua presença do mesmo na fase sanguínea do parasita, de forma similar à presente na fase procíclica. Além disso, contribuiu no avanço do mapeamento entre essas proteínas, confirmando interações já estabelecidas (EIF4E6/EIF4G5) e identificando um possível sítio de interação entre elas. Novas investigações devem ser necessárias a fim de melhor elucidar a função do complexo formado pelas proteínas EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP.

6 CONCLUSÕES

- a) O anticorpo contra a proteína EIF4G5 reconhece a mesma em extrato de células de *T. brucei* em ambas as fases do parasita, sendo indício inicial que o complexo no qual essa proteína participa também está presente durante todo o ciclo de vida do parasita.
- b) Ensaio *in vivo* mostram a formação do complexo EIF4E6/EIF4G5/EIF4G5-IP na fase sanguínea do parasita e indica a presença de novos parceiros não descritos previamente.
- c) Ensaio *in vitro* mostram a que o EIF4E6 é capaz de interagir com as proteínas EIF4G5 e EIF4G5-IP, enquanto o EIF4G5 interage apenas com a EIF4E6.
- d) Foi visto que para o EIF4G5 que apenas a mutação EF91-92AA aboliu a ligação ao EIF4E6.

REFERÊNCIAS

ACKER, Michael G.; LORSCH, Jon R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochemical Society transactions**, v. 36, p. 653–657, 2008.

AITKEN, Colin Echeverría; LORSCH, Jon R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, n. 6, p. 568, 2012.

AKSOY, Serap et al. Human African trypanosomiasis control: achievements and challenges. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 4, p. e0005454, 2017.

ALI, Muhammad Umar et al. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. **Tumor Biology**, v. 39, n. 6, p. 1010428317709805, 2017.

ANDREOU, Alexandra Z.; KLOSTERMEIER, Dagmar. The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out?. **RNA biology**, v. 10, n. 1, p. 19-32, 2013.

ANDREOU, Alexandra Zoi; KLOSTERMEIER, Dagmar. eIF4B and eIF4G jointly stimulate eIF4A ATPase and unwinding activities by modulation of the eIF4A conformational cycle. **Journal of molecular biology**, v. 426, n. 1, p. 51-61, 2014.

ARAÚJO, P. R.; Teixeira, S. M. (2011). Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi* - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**.

ARHIN, George K.; ULLU, Elisabetta; TSCHUDI, Christian. 2'-O-methylation of position 2 of the trypanosome spliced leader cap 4 is mediated by a 48 kDa protein related to vaccinia virus VP39. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 147, n. 1, p. 137, 2006.

ALSFORD, Sam et al. High-throughput phenotyping using parallel

sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. **Genome research**, v. 21, n. 6, p. 915-924, 2011.

BANGS, James D. et al. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 14, p. 9805-9815, 1992.

BATETA, Rosemary et al. Tsetse fly (*Glossina pallidipes*) midgut responses to *Trypanosoma brucei* challenge. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 614, 2017.

BERRIMAN, Matthew et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-422, 2005..

BETTENDORFF, Lucien; WINS, Pierre. Thiamine triphosphatase and the CYTH superfamily of proteins. **The FEBS journal**, v. 280, n. 24, p. 6443-6455, 2013.

BIMBOIM, H. C.; DOLY, Jo. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic acids research**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.

BORDEN, Katherine LB. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a "cap" for many occasions. **Translation**, v. 4, n. 2, p. e1220899, 2016.

BRÜCKNER, Anna et al. Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 6, p. 2763-2788, 2009.

CLAYTON, Christine E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO journal**, v. 21, n. 8, p. 1881-1888, 2002.

CLAYTON, C. E. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 2, p. 96-106, 2014..

CLAYTON, Christine; SHAPIRA, Michal. Post-transcriptional regulation of

gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93-101, 2007.

Centers of Disease Control and Prevention. Parasites. Sleepingsickness. Atlanta, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/biology.html>> Acesso em: 19/08/2018.

CNOPS, Jennifer; MAGEZ, Stefan; DE TREZ, Carl. Escape mechanisms of African trypanosomes: why trypanosomosis is keeping us awake. **Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 417-427, 2015.

CROZIER, Thomas WM et al. Prediction of protein complexes in *Trypanosoma brucei* by protein correlation profiling mass spectrometry and machine learning. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 16, n. 12, p. 2254-2267, 2017.

CZICHOS, Joachim; NONNENGAESSER, Christina; OVERATH, Peter. *Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro. **Experimental parasitology**, v. 62, n. 2, p. 283-291, 1986.

DA COSTA LIMA, Tamara D. et al. Functional characterization of three *Leishmania* poly (a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 10, p. 1484-1494, 2010.

DANIELS, Jan-Peter; GULL, Keith; WICKSTEAD, Bill. Cell biology of the trypanosome genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 4, p. 552-569, 2010.

DE GAUDENZI, Javier G. et al. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays in biochemistry**, v. 51, p. 31-46, 2011.

DE MELO NETO, Osvaldo P. et al. Unique and conserved features of the protein synthesis apparatus in parasitic trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) species. In: **Evolution of the Protein Synthesis Machinery**

and Its Regulation. Springer, Cham, 2016. p. 435-475.

DECROLY, Etienne et al. Conventional and unconventional mechanisms for *capping* viral mRNA. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 51, 2012.

DHALIA, Rafael et al. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 140, n. 1, p. 23-41, 2005.

DHALIA, Rafael et al. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 9, p. 2495-2507, 2006.

EL-SAYED, Najib M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005^a.

ELISEEVA, I. A.; LYABIN, D. N.; OVCHINNIKOV, L. P. Poly (A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1377-1391, 2013.

ERBEN, Esteban; CHAKRABORTY, Chaitali; CLAYTON, Christine. The CAF1-NOT complex of trypanosomes. **Frontiers in genetics**, v. 4, p. 299, 2014.

ESTÉVEZ, Antonio M. et al. The roles of intersubunit interactions in exosome stability. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 278, n. 37, p. 34943-34951, 2003.

FABREGA, Carme et al. Structure and mechanism of mRNA *cap* (guanine-N7) methyltransferase. **Molecular cell**, v. 13, n. 1, p. 77-89, 2004.

FAIRLAMB, Alan H. et al. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. **Nature microbiology**, v. 1, n. 7, p. 16092, 2016.

FENN, Katelyn; MATTHEWS, Keith R. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 539-546, 2007.

FIELD, Mark C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217, 2017.

FRANCO, Jose R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 257, 2014.

FREIRE, Eden R. et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 176, n. 1, p. 25-36, 2011.

FREIRE, Eden R. et al. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, v. 20, n. 8, p. 1272-1286, 2014a.

FREIRE, Eden R. et al. *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. **Eukaryotic cell**, v. 13, n. 7, p. 896-908, 2014b.

FREIRE, Eden et al. The role of cytoplasmic mRNA cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. **Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 55, 2017.

FREIRE, Eden R. et al. *Trypanosoma brucei* EIF4E2 cap-binding protein binds a homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein. **Current genetics**, v. 64, n. 4, p. 821-839, 2018.

GADELHA, Catarina et al. Specializations in a successful parasite: what makes the bloodstream-form African trypanosome so deadly?. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 179, n. 2, p. 51-58, 2011..

GALLIE, Daniel R.; BROWNING, Karen S. eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 40, p. 36951-36960, 2001.

GALLIE, Daniel R.; LIU, Renyi. Phylogenetic analysis reveals dynamic evolution of the poly (A)-binding protein gene family in plants. **BMC evolutionary biology**, v. 14, n. 1, p. 238, 2014.

GILINGER, Gwen; BELLOFATTO, Vivian. Trypanosome spliced leader RNA genes contain the first identified RNA polymerase II gene promoter in these organisms. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 7, p. 1556-1564, 2001.

GHOSH, A., & LIMA, C. D. Enzymology of RNA cap synthesis. Wiley Interdisciplinary Reviews: **RNA**, 1(1), 152-172, 2010.

GONG, Chunling; SMITH, Paul; SHUMAN, Stewart. Structure–function analysis of Plasmodium RNA triphosphatase and description of a triphosphate tunnel metalloenzyme superfamily that includes Cet1-like RNA triphosphatases and CYTH proteins. **Rna**, v. 12, n. 8, p. 1468-1474, 2006.

GOODFELLOW, Ian G.; ROBERTS, Lisa O. Eukaryotic initiation factor 4E. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 12, p. 2675-2680, 2008.

GRÜNER, Stefan et al. The structures of eIF4E-eIF4G complexes reveal an extended interface to regulate translation initiation. **Molecular cell**, v. 64, n. 3, p. 467-479, 2016.

Günzl, A. (2010). The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified?. **Eukaryotic cell**, 9 (8), 1159-1170.

GÜNZL, A., & SCHIMANSKI, B. Tandem affinity purification of proteins. **Current protocols in protein science**, 19-19, 2009.

HALL, MEGAN P.; HO, C. Kiong. Characterization of a *Trypanosoma brucei* RNA cap (guanine N-7) methyltransferase. **Rna**, v. 12, n. 3, p. 488-497, 2006.

HAILE, Simon; PAPADOPOULOU, Barbara. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569-577, 2007.

HINNEBUSCH, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annual review of biochemistry**, 83, 779-812, 2010.

HO, C. K., & SHUMAN, S. Trypanosoma brucei RNA Triphosphatase antiprotozoal drug target and guide to eukaryotic phylogeny. **Journal of Biological Chemistry**, 276 (49), 46182-46186, 2001.

INOUE, A. H., SERPELONI, M., HIRAIWA, P. M., YAMADA-OGATTA, S. F., MUNIZ, J. R. C., MOTTA, et al. Identification of a novel nucleocytoplasmic shuttling RNA helicase of trypanosomes. **PloS one**, 9 (10), 2014.

IGNATOCHKINA, Anna V. et al. The messenger RNA *decapping* and recapping pathway in *Trypanosoma*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 22, p. 6967-6972, 2015.

IVANOV, Alexandr et al. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 16, p. 7766-7776, 2016.

IVENS, Alasdair C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

JACKSON, Andrew P. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**, v. 142, n. S1, p. S40-S56, 2015.

JACKSON, Richard J.; HELLEN, Christopher UT; PESTOVA, Tatyana V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 113, 2010.

JIAO, Xinfu et al. A mammalian pre-mRNA 5' end *capping* quality control mechanism and an unexpected link of *capping* to pre-mRNA processing. **Molecular cell**, v. 50, n. 1, p. 104-115, 2013.

KAMENSKA, Anastasiia; SIMPSON, Clare; STANDART, Nancy. eIF4E-binding proteins: new factors, new locations, new roles. 2014.

KAUFER, A., ELLIS, J., STARK, D., & BARRATT, J. The evolution of

trypanosomatid taxonomy. **Parasites & vectors**, 10 (1), 287, 2017.

KELLY, Steven et al. 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**, v. 154, n. 1-4, p. 103, 2007.

KENNEDY, Peter GE. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 2, p. 186-194, 2013.

Kolev, N. G., Ramey-Butler, K., Cross, G. A., Ullu, E., Tschudi, C. (2012). Developmental progression to infectivity in *Trypanosoma brucei* triggered by an RNA-binding protein. **Science**, 338 (6112), 1352-1353.

KRAMER, Susanne et al. Differential localization of the two *T. brucei* poly (A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54004, 2013.

LAPETINA, Stefanie; GIL-HENN, Hava. A guide to simple, direct, and quantitative *in vitro* binding assays. **Journal of Biological Methods**, v. 4, n. 1, p. e62, 2017.

LEWDOROWICZ, MAGDALENA et al. Chemical synthesis and binding activity of the trypanosomatid *cap-4* structure. **Rna**, v. 10, n. 9, p. 1469-1478, 2004.

LIANG, Xue-hai et al. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LI, Chi-Ho et al. Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→ 3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. **Rna**, v. 12, n. 12, p. 2171-2186, 2006.

LOPES, Angela H. et al. Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. **Open Parasitol J**, v. 4, p. 30-59, 2010.

LORSCH, Jon R.; DEVER, Thomas E. Molecular view of 43 S complex

formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21203-21207, 2010.

LUEONG, Smiths et al. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Molecular microbiology**, v. 100, n. 3, p. 457-471, 2016.

LUKEŠ, Julius et al. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

Malvezzi, A. M. Estudo de novas propriedades associadas à regulação e função de complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma brucei*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

MAIR, Gunnar; ULLU, Elisabetta; TSCHUDI, Christian. Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 37, p. 28994-28999, 2000.

MARANDE, William; LUKEŠ, Julius; BURGER, Gertraud. Unique mitochondrial genome structure in diplonemids, the sister group of kinetoplastids. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 6, p. 1137-1146, 2005.

MARTÍNEZ-CALVILLO, Santiago et al. Gene expression in trypanosomatid parasites. **BioMed Research International**, v. 2010, 2010.

MATTHEWS, Keith R. 25 years of African trypanosome research: From description to molecular dissection and new drug discovery. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 200, n. 1-2, p. 30-40, 2015.

MATTHEWS, K. R. Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 2, p. 76-80, 1999.

MATTHEWS, Keith R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of cell science**, v. 118, n. 2, p. 283-290, 2005.

MEHLA, J., CAUFIELD, J. H., SAKHAWALKAR, N., & UETZ, P. A

Comparison of Two-Hybrid Approaches for Detecting Protein–Protein Interactions. In **Methods in enzymology**, 586, 333-358, 2017.

MERRICK, W. C. eIF4F: a retrospective. *Journal of Biological Chemistry*, 290(40), 24091-24099, 2015.

Moura, D. M. Análise da participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese proteica de *Trypanosoma brucei*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2011.

MOURA, Danielle MN et al. Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA biology**, v. 12, n. 3, p. 305-319, 2015.

MUGO, Elisha; EGLER, Franziska; CLAYTON, Christine. Conversion of procyclic-form *Trypanosoma brucei* to the bloodstream form by transient expression of RBP10. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 216, p. 49-51, 2017.

MUKHERJEE, Chandrama et al. Identification of cytoplasmic capping targets reveals a role for *cap* homeostasis in translation and mRNA stability. **Cell reports**, v. 2, n. 3, p. 674-684, 2012.

PALENCHAR, J. B., & BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and biochemical parasitology**, 146 (2), 135-141, 2006.

PAPADOPOULOS, Evangelos et al. Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 31, p. E3187-E3195, 2014.

POON, S. K. et al. A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. **Open biology**, v. 2, n. 2, p. 110037, 2012.

PREUßER, Christian; JAÉ, Nicolas; BINDEREIF, Albrecht. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4-

5, p. 221-224, 2012.

RHOADS, Robert E. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 25, p. 16711-16715, 2009.

RODITI, Isabel; LINIGER, Matthias. Dressed for success: the surface coats of insect-borne protozoan parasites. **Trends in microbiology**, v. 10, n. 3, p. 128-134, 2002.

ROGERS, George W. et al. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30914-30922, 2001.

ROMANIUK, María Albertina; CERVINI, Gabriela; CASSOLA, Alejandro. Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. **World journal of biological chemistry**, v. 7, n. 1, p. 146, 2016.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W., & RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). *Immunol*, 49, 895-909, 2001.

SCHIMANSKI, Bernd; NGUYEN, Tu N.; GÜNZL, Arthur. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 11, p. 1942-1950, 2005.

SILVA, Erika et al. *Trypanosome capping* enzymes display a novel two-domain structure. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 8, p. 4612-4619, 1998.

SIMPSON, Alastair GB; STEVENS, Jamie R.; LUKEŠ, Julius. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

SINGH, Aditi et al. *Trypanosome* MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 7, p. 4652-4668, 2014.

SONENBERG, Nahum; DEVER, Thomas E. Eukaryotic translation initiation

factors and regulators. **Current opinion in structural biology**, v. 13, n. 1, p. 56-63, 2003.

SONENBERG, Nahum; HINNEBUSCH, Alan G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 731-745, 2009.

SHATKIN, A. J. *Capping* of eucaryotic mRNAs. **Cell**, v. 9, n. 4, p. 645-653, 1976..

STEVERDING, Dietmar. The history of African trypanosomiasis. **Parasites & vectors**, v. 1, n. 1, p. 3, 2008.

STUART, Ken et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

SUTHERLAND, C. Simone et al. A literature review of economic evaluations for a neglected tropical disease: human African trypanosomiasis ("sleeping sickness"). **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003397, 2015.

SUNTER, Jack D. et al. Modulation of flagellum attachment zone protein FLAM3 and regulation of the cell shape in *Trypanosoma brucei* life cycle transitions. **J Cell Sci**, v. 128, n. 16, p. 3117-3130, 2015.

SUNTER, Jack D.; GULL, Keith. The flagellum attachment zone: 'the cellular ruler' of trypanosome morphology. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 4, p. 309-324, 2016.

SZÖÖR, Balázs. Trypanosomatid protein phosphatases. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 173, n. 2, p. 53-63, 2010.

SZÖÖR, Balázs et al. Independent pathways can transduce the life-cycle differentiation signal in *Trypanosoma brucei*. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003689, 2013.

TAKAGI, Yuko et al. *Trypanosoma brucei* encodes a bifunctional capping

enzyme essential for cap 4 formation on the spliced leader RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 15995-16005, 2007.

URWYLER, Simon et al. Expression of procyclin mRNAs during cyclical transmission of *Trypanosoma brucei*. **PLoS pathogens**, v. 1, n. 3, p. e22, 2005.

VASSELLA, Erik et al. Multiple procyclin isoforms are expressed differentially during the development of insect forms of *Trypanosoma brucei*. **Journal of molecular biology**, v. 312, n. 4, p. 597-607, 2001.

WAMWIRI, Florence Njeri; CHANGASI, Robert Emojong. Tsetse flies (Glossina) as vectors of human African trypanosomiasis: a review. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

WASKIEWICZ, Andrew Jan et al. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. **The EMBO journal**, v. 16, n. 8, p. 1909-1920, 1997.

WELBURN, Susan C.; MOLYNEUX, David H.; MAUDLIN, Ian. Beyond tsetse—implications for research and control of human African trypanosomiasis epidemics. **Trends in parasitology**, v. 32, n. 3, p. 230-241, 2016..

WIRTZ, Elizabeth et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89-101, 1999.

WHO – World Health Organization (2018). Human African trypanosomiasis Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/human_african_trypanosomiasis/en/Acesso: 19/08/2018.

YOFFE, YAEL et al. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **Rna**, v. 10, n. 11, p. 1764-1775, 2004.

YOFFE, Yael et al. Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 12, p. 1969-1979, 2006.

YOFFE, Yael et al. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E–eIF4G interactions. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 10, p. 3243-3253, 2009.

ZAMUDIO, Jesse R. et al. Complete cap 4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 6, p. 905-915, 2006.

ZAMUDIO, Jesse R. et al. *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA maturation by the cap 1 2'-O-ribose methyltransferase and SLA1 H/ACA snoRNA pseudouridine synthase complex. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 5, p. 1202-1211, 2009.

ZINOVIEV, Alexandra et al. A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 19, p. 8404-8415, 2011.

ZINOVIEV, Alexandra; SHAPIRA, Michal. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comparative and functional genomics**, v. 2012, 2012.

APÊNDICE - CURRICULUM VITAE (restrito ao período de vínculo ao PPGG)

Renata Santana da Silva

Formação acadêmica/titulação

2017 – 2019 Mestrado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.

Título: Caracterização de interações entre proteínas constituintes de um complexo de iniciação da tradução do tipo eIF4F em formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, Ano de obtenção: 2019.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientador: Danielle Maria Nascimento Moura

Eden Ribeiro Freire

Bolsista do (a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Formação complementar

2018 - 2018 Curso de curta duração em Delineando um projeto de pesquisa. (Carga horária: 60h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.

2018 - 2018 QBA/On-line - Sensibilização em Gestão da Qualidade, Biossegurança e Ambiente.

Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brasil.

2017 - 2017 Introdução à língua e à cultura italiana para fins acadêmicos. (Carga horária: 32h).

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. CARVALHO, K. S.; CRESPO, Mônica Maria; ARAUJO, A. P.; **SILVA, R. S.**; OLIVEIRA, C. M. F.; MELO-SANTOS, M. A. V.; Silva-Filha, M.H.N.L.

Long-term exposure of *Aedes aegypti* to *Bacillus thuringiensis* svar. *israelensis* did not

involve altered susceptibility to this microbial larvicide or to other control agents. *Parasites & Vectors*, v.11, p.673, 2018.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SILVA, R. S.**; FREIRE, E. R.; MOURA, D. M. N.; de MELO NETO, O. P.

Caracterização de interações entre proteínas constituintes de um complexo de iniciação da tradução do tipo eIF4F em formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, 2018. (Outra Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais: Brasil/Português; Evento: VIII Jornada de Pós Graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Participação em eventos

1. **VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2018. (Outra)
2. **VII Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2017. (Outra)

Organização de evento

1. **SILVA, R. S.**; ZIMMERMANN, R. D. **I Simpósio de Humanização da UFPE: A Humanização nos Diferentes Cenários da Assistência à Saúde**, 2017. (Outra Organização de evento)

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **Avaliadora no VI Encontro de Desenvolvimento e Meio Ambiente (VI EDMA)**, 2018. Universidade Federal de Pernambuco.
2. **Avaliadora na XVIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (JEPEX)**, 2018. Universidade Federal Rural de Pernambuco.
3. **Avaliadora no I Simpósio de Humanização da UFPE: A Humanização nos Diferentes Cenários da Assistência à Saúde**, 2017. Universidade Federal de Pernambuco.
4. **Parecerista *Ad Hoc* do III Encontro de Extensão e Cultura da UFPE (ENEXC)**, 2017. Universidade Federal de Pernambuco.