



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

MOEZIO DE VASCONCELLOS COSTA SANTOS FILHO

**IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTEICOS E mRNAs ALVOS ASSOCIADOS  
AO PAPEL DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO POLI-A NO PROCESSO DE  
TRADUÇÃO EM *Leishmania infantum***

Recife  
2020

MOEZIO DE VASCONCELLOS COSTA SANTOS FILHO

**IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTEICOS E mRNAs ALVOS ASSOCIADOS  
AO PAPEL DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO POLI-A NO PROCESSO DE  
TRADUÇÃO EM *Leishmania infantum***

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

**Área de concentração:** Biologia Molecular

**Orientador:** Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**Coorientador:** Dr. Eden Ribeiro Freire

Recife  
2020

Catalogação na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Santos Filho, Moezio de Vasconcellos Costa

Identificação de parceiros proteicos e mRNAs alvos associados ao papel das proteínas de ligação ao poli-A no processo de tradução em *Leishmania infantum* / Moezio de Vasconcellos Costa Santos Filho - 2020.

138 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Eden Ribeiro Freire

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, 2020.

Inclui referências.

1. Expressão gênica 2. Tripanossomatídeos 3. Leishmania  
I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (Orientador) II. Freire, Eden Ribeiro (Coorientador) III. Título

572.865 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-180

MOEZIO DE VASCONCELLOS COSTA SANTOS FILHO

**IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTEICOS E mRNAs ALVOS ASSOCIADOS  
AO PAPEL DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO POLI-A NO PROCESSO DE  
TRADUÇÃO EM *Leishmania infantum***

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

Aprovado em: 17/07/2020

**Banca Examinadora:**

---

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Orientador)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Tercilio Calsa Junior (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dra. Janaína de Freitas Nascimento (Examinadora Externa)  
Universidade de São Paulo

---

Dr. Gabriel da Luz Wallau (Examinador Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Eu dedico este trabalho aos meus pais, Moezio e Willma, por acreditarem em minhas escolhas e por serem o meu alicerce. Dedico também à minha amada filha Julia, por me tornar verdadeiramente forte todos os dias, através de sua existência e de seu encanto.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto por ter acolhido um forasteiro em seu grupo de pesquisas. Obrigado pela orientação, confiança, paciência e, principalmente, por me mostrar através de uma forma tão disciplinada o verdadeiro valor da dedicação ao método científico.

Ao meu amigo e co-orientador Dr. Eden Ribeiro Freire pelos conselhos e pelas longas conversas noturnas no laboratório. Obrigado por ensinar com humildade e serenidade e por compartilhar comigo os amplos aspectos das linhas do pensamento científico.

Aos irmãos que eu encontrei em Recife, Wlisses Veloso e Werbson Guaraná, pelas madrugadas de estudos, maratonas cinematográficas e momentos de felicidade. Obrigado por terem auxiliado o meu equilíbrio emocional durante essa trajetória.

À família que eu construí no IAM: Camila, Wagner, Adriana Roberto, Lílian, Adriana Neuman, Allana, Irassandra, Thaíse, Mayara e Tallyta. Obrigado pelos incríveis momentos regados por drinks e café. Vocês serão para sempre a minha notificação preferida.

Aos incríveis amigos e cientistas Gustavo Lima, Ludmila Arruda, Maria Ribeiro e a todos que compõem o grupo BiomolTrip. Eu não teria conseguido sem o apoio e ajuda de vocês. Eu aprendi todos os dias seguindo os seus passos e continuarei aprendendo com os exemplos de cada um.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG) da UFPE, pela oportunidade em realizar um grande objetivo, conhecendo e aprendendo sobre a vasta área da genética com incríveis Professores e Geneticistas. Obrigado por me proporcionar uma qualificação profissional e acadêmica de excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio no financiamento e papel fundamental na expansão e consolidação da pós-graduação *stricto sensu*.

Aos pesquisadores Dr. Christian Reis, Dra. Danielle Moura e Dr. Antônio Rezende que contribuíram com a minha aprendizagem e conhecimento adquiridos ao longo desses 4 anos.

Aos incríveis profissionais e pessoas que considero o alicerce do Departamento de Microbiologia do IAM: Carol, Bruna, Fabiana, Silvana, Cláudio e Matheus. São vocês que fazem o departamento funcionar.

A minha querida irmã Anne Carolinne, a toda a minha família e aos meus verdadeiros amigos de Maceió que acreditaram e torceram pelas boas consequências de minhas escolhas.

Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM) / FIOCRUZ-PE por fornecer e disponibilizar toda a infraestrutura para a realização do meu projeto de doutorado.

Aos professores e pesquisadores que foram convidados a compor a minha banca de avaliação da tese de doutorado. Obrigado por contribuírem de forma tão significativa na lapidação deste trabalho.

À Camila Fernandes, que através de sua timidez e sua forma de pensar despertou em mim a vontade de me conhecer e querer ser alguém melhor.

À minha amada filha Julia. Obrigado por me tornar verdadeiramente forte todos os dias, através de sua existência, de seu encanto e de sua longa espera pelo meu retorno.

Por fim, agradeço especialmente aos meus pais, Moezio de Vasconcellos e Willma Albuquerque, por acreditarem em minhas escolhas e por serem o meu alicerce durante toda a minha jornada.

Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade (CURIE, 1911).

## RESUMO

Os tripanosomatídeos são protozoários responsáveis por doenças negligenciadas e que se caracterizam pela sua expressão gênica regulada por eventos pós-transcpcionais. Boa parte destes eventos contam com a atuação das PABPs, proteínas que se ligam a cauda poli-A dos mRNAs e participam no processo de tradução. Em *Leishmania*, três homólogos de PABP foram identificados, com a PABP1 já implicada na tradução e as PABPs 2 e 3 com função menos definida. Este trabalho buscou identificar mRNAs associados às três proteínas bem como avaliar propriedades específicas das PABPs 2 e 3 visando melhor definir sua função. Para isso todas foram expressas em *Leishmania infantum* fusionadas ao epítopo HA e usadas em ensaios de imunoprecipitação. Os mRNAs co-precipitados foram identificados por sequenciamento, onde se observou a PABP1 se associando majoritariamente a mRNAs codificantes de proteínas ribossomais. Já as PABPs 2 e 3 co-precipitaram mais com transcritos codificantes de enzimas e de proteínas com atividade de transporte e ligação, incluindo as histonas. A análise de proteínas co-precipitadas com as PABPs 2 e 3 identificou as ZC3H41 e DRBD2, ligantes de RNAs, e as XPO1 e NTF2, atuantes no transporte de mRNAs, além de fatores de tradução. Mutantes da PABP2 foram testados quanto à sua atuação, destacando a importância do motivo TGM para sua função. As informações geradas irão contribuir na elucidação do modo de ação das PABPs de *Leishmania*, identificando alvos para estratégias terapêuticas.

**Palavras-chave:** PABP. mRNA. *Leishmania*.

## ABSTRACT

Trypanosomatids are protozoans responsible for neglected diseases that are characterized by their gene expression being regulated through post-transcriptional events. Most of these rely on the performance of PABPs, proteins that bind to the mRNAs' poly-A tails and function during translation. In *Leishmania*, three PABP homologues were previously identified, with PABP1 directly implicated in the mRNA translation while the functions of PABP2 and PABP3 are not yet clearly defined. This study sought to identify mRNAs associated with all three proteins as well as to evaluate specific properties of PABPs 2 and 3, aiming to better define their functions. All three proteins were expressed in *Leishmania infantum* fused to an HA epitope and used in immunoprecipitation assays. Co-precipitated mRNAs were identified by sequencing, where PABP1 was observed to be mainly associated with mRNAs encoding ribosomal proteins. PABPs 2 and 3 co-precipitated mostly with transcripts encoding enzymes and proteins with transport and binding activities, including histones. The analysis of proteins that co-precipitated with PABPs 2 and 3 identified ZC3H41 and DRBD2, which bind RNAs, and XPO1 and NTF2, which act in the transport of mRNAs, in addition to translation factors. PABP2 knockouts were tested for their functional performance, highlighting the importance of the TGM motif for its function. These findings will contribute to the elucidation of mechanisms of action of the *Leishmania* PABPs and identification of targets for therapeutic strategies.

**Key words:** PABP. mRNA. *Leishmania*.

## LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura	
Figura 1 - Vetores das principais doenças causadas por tripanosomatídeos....	19
Figura 2 - Morfologia celular presente no ciclo de vida de <i>L. infantum</i> .....	20
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	22
Figura 4 - Formas promastigotas encontradas dentro dos flebotomíneos vetores.....	23
Figura 5 - Distribuição espacial da Leishmaniose Visceral no brasil no ano de 2015.....	24
Figura 6 - Esquema de maturação do mRNA por <i>trans-splicing</i> e poliadenilação.....	26
Figura 7 - Esquema geral da PABP1 de <i>Homo sapiens</i> .....	28
Figura 8 - Esquema geral das PABPs de <i>Leishmania infantum</i> .....	32
Figura 9 - Esquema geral do complexo formado pela PABP1, EIF4E4 e EIF4G3.....	33
Artigo 1	
Figura 1 - Análise das populações de mRNAs associadas às PABPs de <i>Leishmania</i> spp.....	75
Figura 2 - Comparação dos dados de RNASeq das três PABPs de <i>Leishmania infantum</i> .....	76
Figura 3 - Esquema representando a RBP23 e a DRBD2 de <i>L. infantum</i> marcadas com HA e seus parceiros proteicos.....	77
Figura 4 - Localização das proteínas co-precipitadas com RBP23 e DRBD2 marcadas com HA.....	78
Figura 5 - Análise das populações de mRNAs e comprimento dos transcritos associados à RBP23 e à DRBD2 em <i>L. infantum</i> .....	79
Figura 6 - Elementos das sequências 3' UTRs das populações de mRNAs de tripanosomatídeos associadas à RBP23 e à DRBD2.....	80
Figura 7 - Modelo proposto da participação da RBP23 na interação de mRNAs para a tradução.....	81
Figura S1 - Expressão de proteínas fusionadas ao HA.....	82
Figura S2 - Volcano Plot comparando os mRNAs co-precipitado com as PABPs.....	83

Figura S3 - Análises das sequencias de RBP23 de sete kinetoplastidas.....	84
Figura S4 - Análises das sequencias de DRBD2 de sete kinetoplastidas.....	85
Figura S5 - Análises das regiões dos mRNAs co-precipitados com a RBP23.....	86

## Artigo 2

Figura 1 - Filme do western blot confirmando a presença das PABPs fusionadas ao epítopo HA nos lisados citoplasmáticos e nas imunoprecipitações.....	119
Figura 2 - Proteínas associadas às PABPs 2 e 3 organizadas de acordo com as taxas médias de intensidade.....	120
Figura 3 - Diagrama de Venn comparando as proteínas co-precipitadas com a PABP2 de <i>Trypanosoma brucei</i> e com a PABP2 de <i>Leishmania infantum</i> .....	121
Figura 4 - Diagrama de Venn das proteínas co-precipitadas com os três homólogos de PABP.....	122
Figura 5 - Esquema da localização dos motivos da PABP2 de <i>L. infantum</i> que sofreram mutação.....	123

## **LISTA DE TABELAS**

### **Artigo 1**

Tabela 1 - Relação das proteínas relevantes co-precipitadas com as PABPs-HA.....	72
--	----

Tabela 2 - Proteínas co-precipitadas com a RBP23-HA.....	73
--	----

Tabela 3 - Proteínas co-precipitadas com a DRBD2-HA.....	74
--	----

### **Artigo 2**

Tabela 1 - Proteínas co-precipitadas com PABP2-HA.....	115
--	-----

Tabela 2 - Proteínas co-precipitadas com PABP3-HA.....	117
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUG	Códon de iniciação da tradução
ALBA	Proteína/Domínio de acetilação de baixa afinidade de ligação ( <i>Acetylation lowers binding affinity</i> )
Cap	7-metil guanosina invertido
DKO	Duplo nocaute ( <i>double knockout</i> )
DNA	Ácido desoxiribonucléico ( <i>Desoxiribonucleic acid</i> )
DRBD	Domínio duplo de ligação ao RNA ( <i>Doubled RNA-Binding Domain</i> )
eIF	Fator de iniciação de eucariotos ( <i>Eukariotic initiation factor</i> )
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GO	<i>Gene Ontology</i>
HA	Hemaglutinina ( <i>Hemagglutinin</i> )
HEPES	Ácido hidroxietil piperazinaetanossulfónico ( <i>hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid</i> )
LV	Leishmaniose Visceral
MLLE	PABC ou domínio da região C-terminal das PABPs
mRNA	RNA mensageiro
NES	Sinal de Exportação Nuclear ( <i>Nuclear Export Signal</i> )
NTF	Fator de Transporte Nuclear ( <i>Nuclear Transport Factor</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Região codificante do gene ( <i>Open Reading Frame</i> )
PABC	Domínio C-terminal da PABP
PABP	Proteína de ligação a cauda poli-A ( <i>Poly-A Binding Protein</i> )
Paip2	<i>Poly-A Binding Protein Interacting Protein 2</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )

PVDF	Fluoreto de polivinilideno ( <i>Polyvinylidene difluoride</i> )
RBP	Proteínas de ligação ao RNA ( <i>RNA binding protein</i> )
RNA	Ácido Ribonucléico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
RNASeq	Sequenciamento de RNA ( <i>RNA sequencing</i> )
RPM	Rotação por minuto
RRM	Motivos de reconhecimento de RNA ( <i>RNA recognition motif</i> )
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida em condições desnaturantes. ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SKO	<i>Single Knockout</i>
SL	<i>Spliced-Leader</i>
TRRM	Três motivos do tipo RRM ( <i>Three RNA Recognition Motif</i> )
UTR	Região não traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )
WT	Linhagem selvagem ( <i>Wild type</i> )
XPO1	Exportina1
ZC3H	Domínio dedo de zinco ( <i>Zinc finger CCCH-type</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVOS.....	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
2.1	A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE.....	18
2.2	O GÊNERO <i>Leishmania</i> .....	19
2.2.1	O ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	21
2.2.2	Os aspectos epidemiológicos de <i>Leishmania</i> spp.....	23
2.3	A BIOLOGIA MOLECULAR DE <i>Leishmania</i> spp. E DE OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS.....	25
2.3.1	A regulação da expressão gênica em <i>Leishmania</i> spp. e em outros tripanosomatídeos.....	26
2.4	AS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À CAUDA POLI-A (PABPs).....	27
2.4.1	As PABPs, o complexo eIF4F e o papel na iniciação da tradução.....	29
2.4.2	O papel das PABPs no controle da estabilidade dos mRNAs.....	30
2.5	AS PABPs DE <i>Leishmania</i> spp. E AS EVIDÊNCIAS SOBRE AS SUAS FUNÇÕES.....	31
2.5.1	As interações das PABPs nos demais tripanosomatídeos.....	32
<b>3</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E DE mRNAs DIFERENCIALMENTE ASSOCIADOS ÀS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO POLI-A DE <i>Leishmania</i> E ASSOCIAÇÃO ESPECÍFICA ENTRE PABP1, RBP23 E mRNAs DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTEICOS DIFERENCIALMENTE ASSOCIADOS ÀS PABPS 2 E 3 DE <i>Leishmania infantum</i> COM A CARACTERIZAÇÃO DE MOTIVOS DE INTERAÇÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>124</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>130</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>131</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae engloba organismos eucariotos unicelulares e uniflagelados que são parasitas compulsórios (não possuem enzimas de produção de componentes celulares). As diferentes espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* possuem importância médica e veterinária, ocasionando enfermidades como doença de Chagas, doença do sono e diversas formas de leishmaniose, todas de ampla distribuição geográfica. Nos tripanosomatídeos, os mecanismos moleculares associados à regulação da expressão gênica não dependem tanto do controle da transcrição, sendo mais influenciados pelos níveis de seus mRNAs (processamento e estabilidade) e pela interação entre os elementos que participam do processo de tradução. Entretanto, apesar de inúmeros estudos, estes mecanismos de regulação ainda não foram completamente elucidados.

O início da tradução é uma etapa importante para o controle desse processo, sendo caracterizado pela interação entre os ribossomos e o mRNA, bem como pelo posicionamento correto dos ribossomos junto ao códon AUG de início da tradução. Entre os principais fatores que auxiliam na atividade ribossomal destacam-se as proteínas de ligação à cauda poli-A (PABPs) e os fatores de iniciação da tradução (eIFs). As PABPs auxiliam o complexo eIF4F (constituído pelas subunidades eIF4E, eIF4A e eIF4G) em funções importantes na iniciação da tradução, como no recrutamento das subunidades ribossomais para o mRNA e na identificação do códon AUG.

As PABPs interagem com a cauda poli-A na extremidade 3' dos mRNAs e são importantes no seu processamento, no transporte dos transcritos para o citoplasma e no controle de sua degradação e tradução. Essas proteínas fazem parte de um grupo de proteínas de ligação ao RNA e apresentam-se bem conservadas ao longo da evolução dos eucariotos, sendo caracterizadas por estruturas N- e C-terminais típicas, constituídas por quatro domínios de ligação ao RNA e um domínio de interação proteína-proteína, respectivamente.

Foram identificados três homólogos de PABP (PABPs 1, 2 e 3) em diferentes espécies de tripanosomatídeos, onde o terceiro está ausente em algumas espécies do gênero *Trypanosoma*. Estudos anteriores relataram a localização citoplasmática das três PABPs de *Leishmania* spp., embora em condições de inibição transcricional as PABPs 2 e 3 migrem para o núcleo celular, podendo também estar associadas ao

processamento de mRNAs ou à exportação para o citoplasma. A PABP1 permanece no citosol, o que sugere que está apenas relacionada com as funções citoplasmáticas da classe PABP. Foi relatado ainda uma associação mais específica da PABP1 com a cauda poli-A quando comparada aos outros dois homólogos. Em estudos prévios, houve uma indicação de que as PABPs 2 e 3 se ligam a mRNAs distintos da PABP1, sendo esta última preferencialmente associada a mRNAs dotados de extremidades curtas não traduzidas 5' e 3'.

Neste trabalho, a identificação de mRNAs alvos dos três homólogos de PABP e de parceiros proteicos das PABPs 2 e 3 contribuiu para a elucidação de aspectos moleculares importantes das funções dessas proteínas no gênero *Leishmania*, com impacto na definição de funções para homólogos de PABP em outros organismos. As possíveis interações identificadas, bem como as regiões envolvidas nessas ligações, levaram à identificação de alvos para moléculas inibidoras e com possível ação antiparasitária.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Identificar os mRNAs alvos dos três homólogos de PABP de *Leishmania infantum* e os parceiros proteicos das PABPs 2 e 3 para a determinação de propriedades específicas envolvidas na potencialização do processo de tradução.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- 1- Avaliar as associações entre os três homólogos de PABPs e as populações de mRNAs, identificando os transcritos que podem interagir exclusivamente com cada homólogo;
- 2- Comparar as populações de mRNAs co-precipitados com as PABPs 2 e 3 e confrontar essas mesmas populações com aquelas relacionadas à PABP1;
- 3- Identificar as possíveis proteínas associadas às PABPs 2 e 3 e que podem ser relevantes ao papel desses parálogos na síntese proteica;
- 4- Verificar a essencialidade da PABP2 e identificar domínios funcionalmente relevantes neste homólogo.

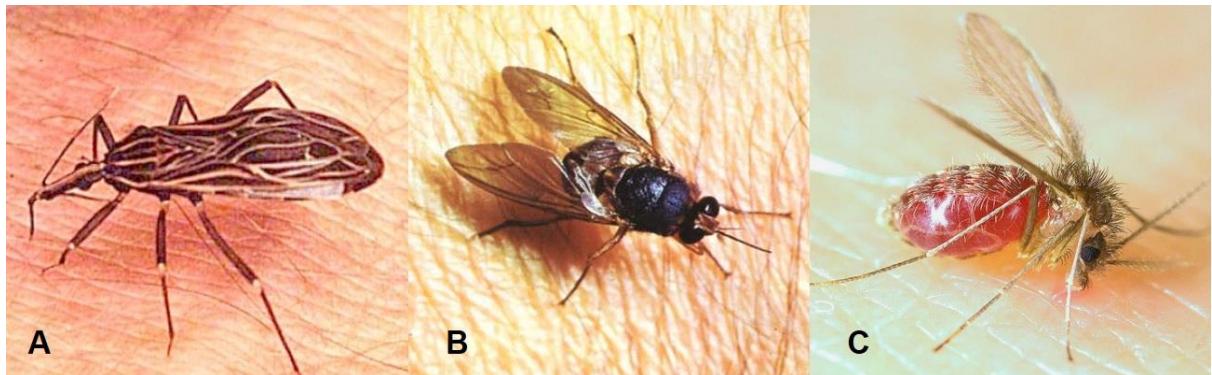
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

Os tripanosomatídeos são protozoários pertencentes a ordem Kinetoplastida e que são conhecidos principalmente pelos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. As espécies dessa ordem são caracterizadas pela presença do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria que possui moléculas circulares e concatenadas de DNA. Essas diferentes espécies são capazes de parasitar vertebrados, invertebrados e plantas (STUART et al., 2008).

Em comparação com outros eucariotos complexos como os mamíferos, os tripanosomatídeos divergiram precocemente na escala evolutiva em cerca de um bilhão de anos. Apesar das semelhanças em relação à organização genômica e aos processos biológicos, as espécies apresentam aspectos distintos importantes. Espécies patogênicas ao homem tendem a ter um ciclo de vida mais complexo, diferenciando-se em formas de desenvolvimento que ocorrem sucessivamente durante as fases relacionadas ao inseto vetor e ao hospedeiro mamífero (SIMPSON et al., 2006; LUKES et al., 2014).

São observados diferentes nichos e, consequentemente, diferentes vetores presentes no ciclo de vida dos tripanosomatídeos patogênicos. Entre os principais insetos responsáveis pela disseminação das doenças causadas pelos mesmos estão: o triatomíneo/barbeiro (*Rhodnius* spp.) na doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*; a mosca tsé-tsé (*Glossina morsitans*) na doença do sono, causada pelo *Trypanosoma brucei*; e o mosquito-palha (*Lutzomyia longipalpis*), responsável pelas leishmanioses, causadas por parasitos do gênero *Leishmania* (Figura 1) (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009).



**Figura 1: Vetores das principais doenças causadas por tripanosomatídeos.** A) *Rhodnius* spp. (doença de Chagas por *T. cruzi*); B) *Glossina morsitans* (doença do sono por *T. brucei*); C) *Lutzomyia longipalpis* (leishmanioses por espécies do gênero *Leishmania*). **Fonte:** Google Imagens.

Diante das mudanças de ambiente e da complexidade dos seus respectivos ciclos de vida, a resposta adaptativa dos tripanosomatídeos inclui mudanças na morfologia celular, no metabolismo catabólico e em outras alterações comandadas pela regulação da sua expressão gênica (MANNAERT et al., 2012).

## 2.2 O GÊNERO *Leishmania*

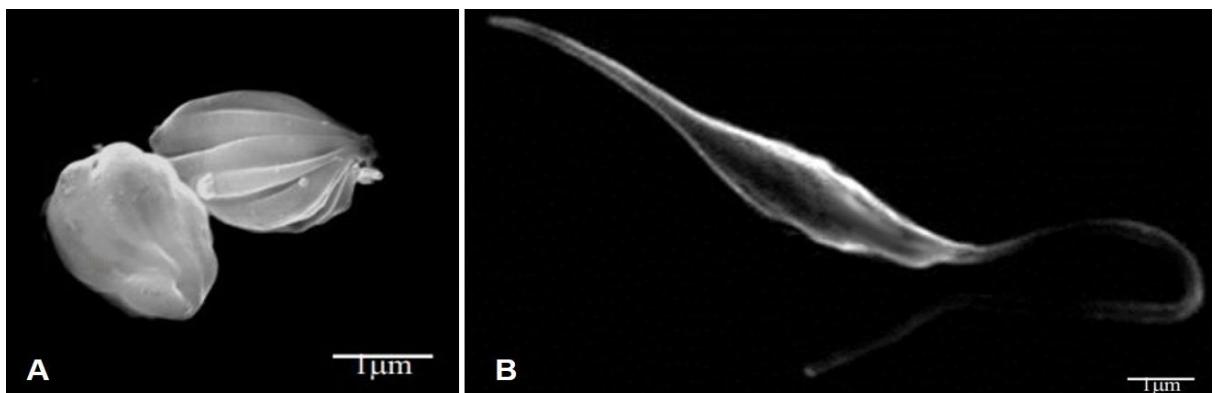
Entre os gêneros de protozoários parasitos de seres humanos, *Leishmania* é considerado o que abrange o maior número de espécies patogênicas. A classificação de *Leishmania* spp. foi inicialmente relacionada a critérios clínicos e bioecoepidemiológicos, como distribuição geográfica, relação com os vetores, tropismo tissular, propriedades antigênicas e aspectos clínicos (cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral). Estudos filogenéticos têm sugerido uma grande variabilidade para este gênero, no entanto, a classificação taxonômica continua gerando discussões sobre a validação das espécies (KUHLS et al., 2011).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são divididos em três subgêneros. O subgênero *Sauroleishmania* inclui somente as espécies parasitas de répteis e que para alguns autores é considerado outro gênero, embora análises moleculares apontem esta classificação como subgênero. Já as espécies de *Leishmania* que parasitam mamíferos são divididas em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. De uma forma geral, os parasitos englobados no subgênero *Viannia* possuem um desenvolvimento limitado em meios de cultura e caracterizam-se por abranger a maioria das espécies do Novo Mundo (Américas). Já aqueles do subgênero

*Leishmania* possuem um rápido crescimento em cultura e circulam no Novo e no Velho Mundo (Américas, África, Europa e Ásia) (AKHOUNDI et al., 2016).

A transmissão de *Leishmania* spp. está associada a muitos ecótopos. Espécies como *L. infantum*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis* são encontradas em diversos ambientes, podendo ser transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos. A dispersão das espécies de *Leishmania* possibilitou adaptações em diferentes hospedeiros mamíferos, levando o mesmo parasito a se comportar de forma distinta em sua relação parasito-hospedeiro (DE SOUZA ROCHA et al., 2010).

Em seu ciclo biológico, *Leishmania* spp. possui duas formas adaptativas principais, correspondentes aos ambientes em que estão no momento. As formas amastigotas, intracelulares e que ocorrem nos hospedeiros mamíferos, são arredondadas e sem um flagelo aparente, por apresentar-se curto e interiorizado na bolsa flagelar. Quando as amastigotas são adquiridas pelos flebotomíneos vetores, diferenciam-se em formas extracelulares, as promastigotas, de aparência alongada e com um longo flagelo livre emergindo da região anterior do parasito (Figura 2) (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).



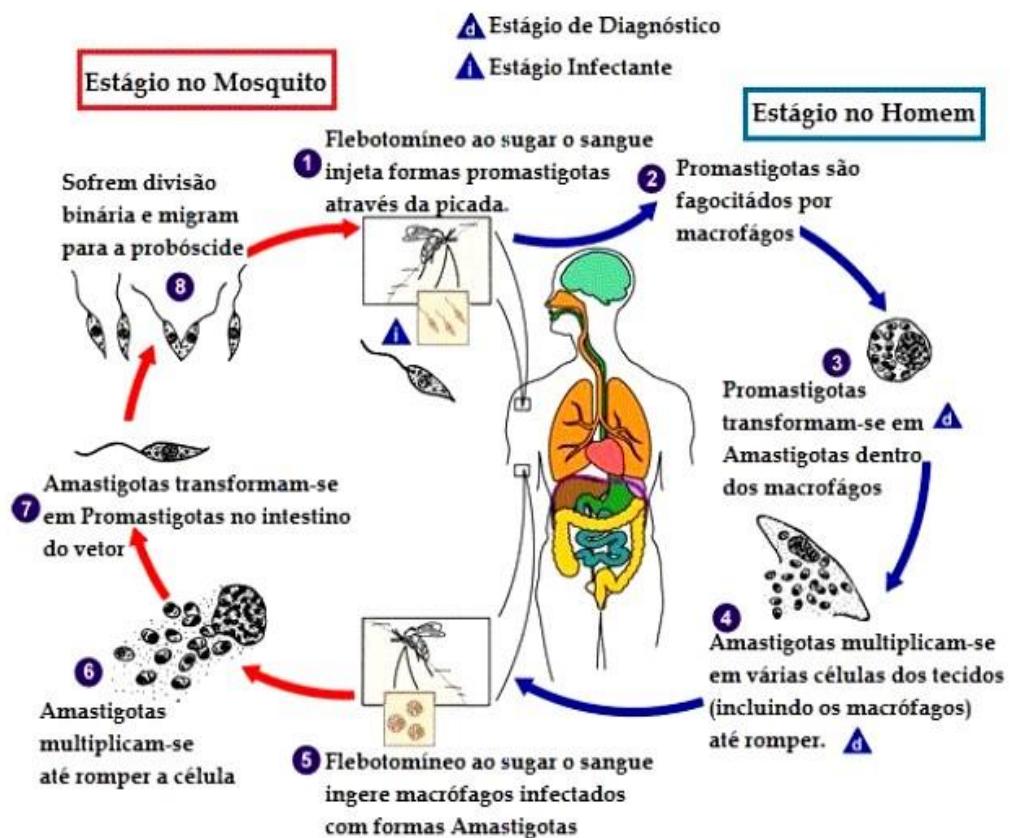
**Figura 2: Morfologia celular presente no ciclo de vida de *L. infantum*. A)** Amastigotas e **B)** Promastigotas de *L. infantum* observadas em microscópio eletrônico de varredura. **Fonte:** Modificado de Pimenta et al. (2012).

Durante a mudança dos microambientes (macrófagos nos hospedeiros vertebrados e tubo digestivo dos insetos vetores) as espécies de *Leishmania* são submetidas às diferenças de temperatura, pH e nutrientes. A manutenção e sobrevivência tornam-se possíveis devido às alterações no perfil de expressão gênica e, consequentemente, ocasionando as mudanças que foram descritas acima relacionadas com a forma e a motilidade, além de alterações no metabolismo desses organismos (MANNAERT et al., 2012).

### 2.2.1 O ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida que abrange dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. O grupo de hospedeiros vertebrados engloba roedores, répteis, edentados, marsupiais, canídeos e primatas, incluindo os seres humanos. O grupo dos hospedeiros invertebrados, ou vetores, são formados por insetos da ordem Díptera, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (LAURENTI, 2010).

O ciclo de vida digenético das espécies de *Leishmania* abrange diferentes formas celulares, devido ao mecanismo de adaptação ao ambiente. As formas promastigotas metacíclicas infectivas, presentes nas glândulas salivares dos flebótomos fêmeas, são inoculadas na junção derme-epiderme dos hospedeiros vertebrados. Quando atinge a corrente sanguínea, os parasitos diferenciam-se em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo de células do sistema fagocítico monocuclear (SFM), como exemplo, os macrófagos. Após a multiplicação das amastigotas por divisão binária, a infecção pode persistir por todo o tempo de vida do hospedeiro, com o risco de aparecimento de lesões cutâneas e viscerais (Figura 3) (STUART et al., 2008).

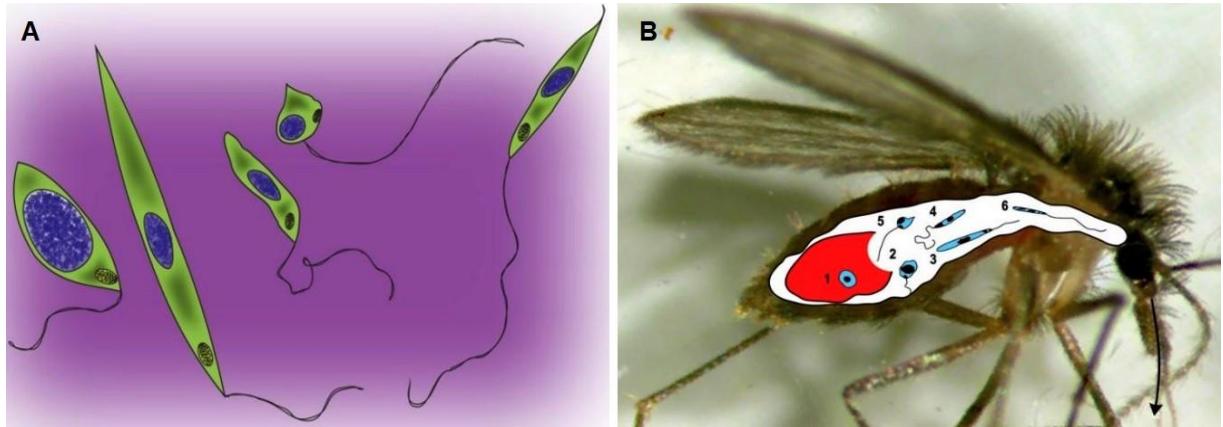


**Figura 3: Ciclo biológico de *Leishmania* spp.** As formas infectivas (promastigotas metacíclicas) são inoculadas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do inseto vetor. O parasito se diferencia para as formas amastigotas após ser fagocitado pelos macrófagos do hospedeiro. As amastigotas se multiplicam no interior dos macrófagos e são liberadas na corrente sanguínea onde infectam novos macrófagos. As fêmeas dos flebotomíneos acabam ingerindo as formas amastigotas ao realizar o repasto sanguíneo nos hospedeiros infectados e, posteriormente, no intestino do inseto, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, anteriores às formas metacíclicas (formas infectivas), repetindo então o ciclo biológico de *Leishmania* spp. **Fonte:** Modificado de CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2015.

As fêmeas dos flebotomíneos ingerem durante o repasto sanguíneo as formas amastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado. Essas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas no intestino do inseto e então se multiplicam. Após alguns dias, os parasitos replicam-se mais lentamente, ocorrendo a metacilogênese, ou diferenciação em promastigotas metacíclicas, reiniciando o ciclo biológico (DANTAS-TORRES, 2007; STUART et al., 2008).

Durante o ciclo dentro do vetor, a forma promastigota é classificada ainda de acordo com os estágios de desenvolvimento como: promastigota procíclica, promastigota nectomonada, promastigota haptomonada, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica (Figura 4). Nesse último estágio o parasito se apresenta pequeno, com o flagelo relativamente grande e com uma forma mais

alongada. É comum estar presente em cultura celular na fase estacionária e apesar de ser a forma infectante de *Leishmania* spp, o estágio procíclico e a forma amastigota também são capazes de infectar o hospedeiro (TEIXEIRA et al., 2002).



**Figura 4: Formas promastigotas encontradas dentro dos flebotomíneos vetores.** A) Da esquerda para direita: promastigota procíclica, promastigota nectomonada, promastigota haptomonada, promastigota paramastigota e promastigota metacíclica. B) 1) Amastigotas ingeridas no repasto sanguíneo; 2) Promastigotas procíclicas em contato com o tubo digestivo; 3) Surgimento das formas nectomonadas; 4) Surgimento das formas haptomonadas; 5) Surgimento das formas paramastigotas; 6) Formas metacíclicas nas glândulas salivares do flebotomíneo. **Fonte:** Modificado de Pimenta et al. (2012); Conceição-Silva; Alves (2014).

## 2.2.2 Os aspectos epidemiológicos de *Leishmania* spp.

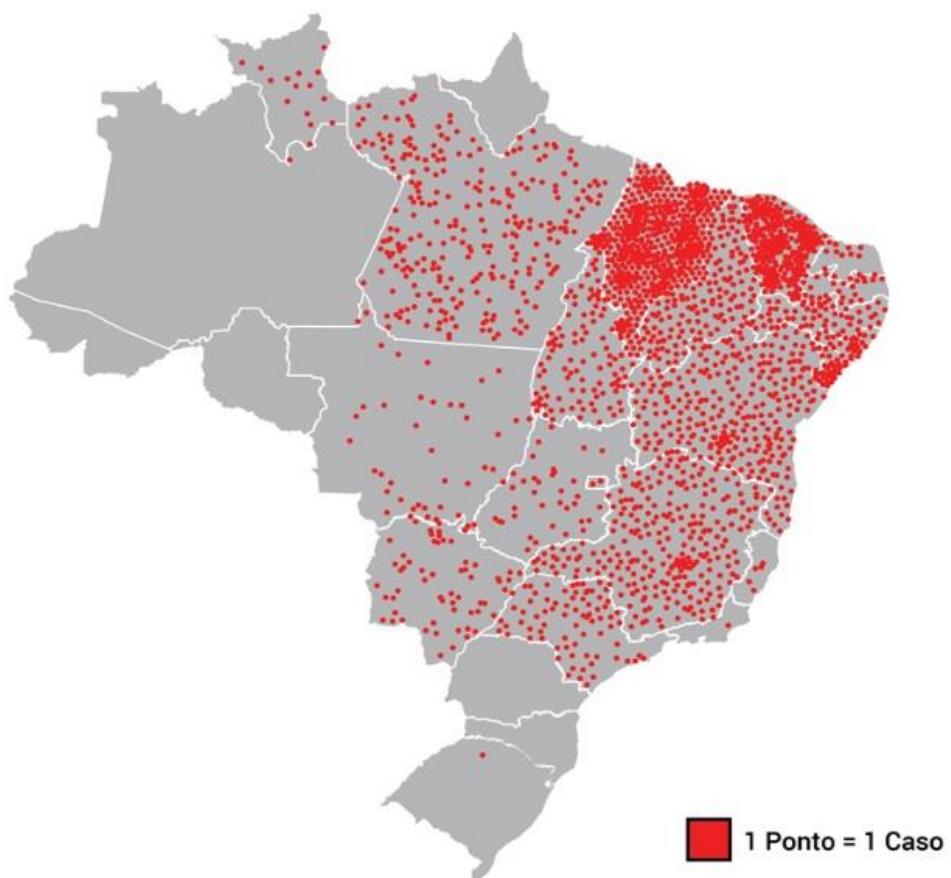
Enquanto a doença de Chagas possui ocorrência na América Latina e a doença do sono é prevalente na África Subsaariana, as leishmanioses possuem uma ampla distribuição geográfica e são registradas ao longo de todos os continentes, tornando-se endêmica em mais de 60 países. Estima-se que cerca de 1,7 bilhões de pessoas vivem em áreas consideradas de risco para a infecção, com 12 milhões de indivíduos infectados com as diversas formas de manifestação das leishmanioses (TEIXEIRA et al., 2012; PIGOTT et al., 2014).

Apesar de *Leishmania* spp. ter uma ampla distribuição mundial, nos últimos anos, mais de 90% dos casos de Leishmaniose Visceral (LV) notificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) concentraram-se em 7 países: Etiópia, Somália, Nepal, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil. Em países como o Nepal e a Índia, ainda considerados endêmicos para esse agravo, a quantidade de casos registrados diminuiu nos últimos anos, possivelmente devido ao planejamento e à prática de programas de eliminação nesses locais (WHO, 2015).

Até a década de 1990, a Região Nordeste do Brasil registrava cerca de 90% dos casos de LV de todo o país. No entanto, essa doença começou a expandir-se

para as regiões Norte, Centro-Oeste e Sudeste, com a alteração do padrão de transmissão rural e tendência à urbanização do ciclo da doença. Este fato aconteceu devido ao movimento de expansão das cidades que avançam para o interior e desde então, o Brasil possui dados oficiais que confirmam o aparecimento de novos casos, bem como o aumento gradativo dos mesmos em todas as regiões do país (Figura 5) (MARCONDES; ROSSI, 2013).

Apesar de toda essa expansão e do entendimento do ciclo de vida dos parasitos, o tratamento contra as leishmanioses ainda possui desvantagens. Os antimoniais pentavalentes, que são as drogas mais utilizadas, possuem elevada toxicidade no fígado, nos rins e no coração dos pacientes. Este cenário é um dos fatores que tem despertado cada vez mais o interesse médico e veterinário na comunidade científica (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

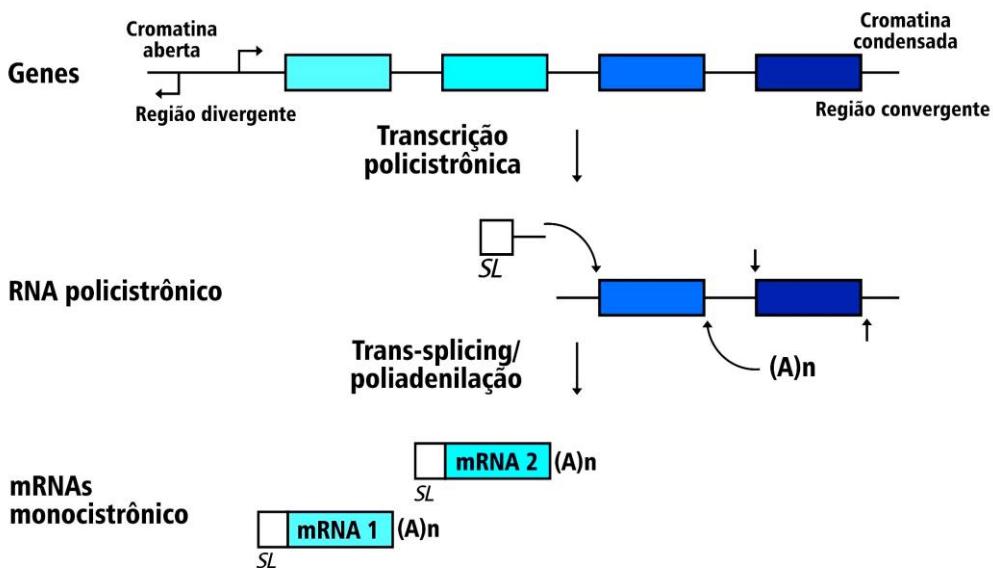


**Figura 5: Distribuição espacial da Leishmaniose Visceral no brasil no ano de 2015.** Em 2015 foram notificados 3.289 casos novos de L.V., com uma incidência de 1,6 casos/100.000 habitantes, distribuídos em 22 unidades federadas e cinco regiões brasileiras, mostrando a expansão do problema. **Fonte:** Adaptado do Ministério da Saúde (2017).

## 2.3 A BIOLOGIA MOLECULAR DE *Leishmania* spp. E DE OUTROS TRIPANOSOMATÍDEOS

Um dos pontos mais importantes no entendimento de *Leishmania* spp. é a compreensão de aspectos biológicos básicos que são obtidos através dos dados moleculares. O DNA deste gênero é distribuído ao longo de 36 cromossomos nas espécies do Velho Mundo e entre 34 ou 35 cromossomos nas espécies do Novo Mundo. O genoma possui regiões pobres em introns e espaços intergênicos curtos. A organização dos genes em *Leishmania*, como nos outros tripanosomatídeos assemelha-se, em parte, aos operons bacterianos, que da mesma forma possuem genes transcritos em unidades policistrônicas. Entretanto, diferente do exemplo dos procariotos, as unidades policistrônicas dos tripanosomatídeos não codificam genes relacionados em nível de função. Essa estruturação gênica incomum foi inicialmente identificada no cromossomo 1 de *L. major*, sendo este o primeiro cromossomo sequenciado do grupo dos tripanosomatídeos (MYLER et al., 1999; MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010; ALSFORD et al., 2012).

Nos tripanosomatídeos é possível verificar uma diferenciação nos seus mecanismos de expressão gênica, levando a uma formação distinta de transcritos quando comparada aos mRNAs da maioria dos outros eucariotos. Um exemplo marcante é a codificação de proteínas por genes organizados em grupos transpcionais contendo um único elemento promotor, transcrevendo pré-mRNAs policistrônicos. Estes geram mRNAs monocistrônicos através de eventos de *trans-splicing* e poliadenilação (Figura 6) (LIANG et al., 2003; GUNZL, 2010).



**Figura 6: Esquema de maturação do mRNA por *trans-splicing* e poliadensilação.** A transcrição se inicia em regiões de cromatina aberta e termina em regiões de cromatina condensada. Os aglomerados de genes codificantes de proteínas são transcritos e então processados por mecanismos acoplados de *trans-splicing* e poliadensilação, dando origem a mRNAs monocistrônicos maduros. SL: RNA Spliced-Leader; (A)n: Cauda poli-A. **Fonte:** Adaptado de Gaudenzi et al. (2011).

### 2.3.1 A regulação da expressão gênica em *Leishmania* spp. e em outros tripanosomatídeos

Foram necessárias diferentes modificações adquiridas ao longo do ciclo de vida dos tripanosomatídeos como estratégias de adaptação aos diversos vetores e hospedeiros, consequentemente originando diferentes patologias. O que torna este fato possível são as variadas sequências proteicas codificadas pelos respectivos genomas e a complexa regulação durante as alterações do padrão de controle gênico (HAILE; PAPADOPOLOU, 2007). Atualmente é aceita a possibilidade dos tripanosomatídeos terem perdido a capacidade da regulação de expressão de genes codificadores de proteínas no nível da transcrição (CAMPBELL et al., 2003). Devido a esses organismos realizarem transcrição policistrônica e pela ausência de promotores clássicos para a formação de mRNAs, a influência da RNA Polimerase II neste processo não é observada. Diante deste cenário molecular, foi proposto que a RNA Polimerase transcreve os genes de forma constitutiva, dando origem aos extensos pré-mRNAs policistrônicos, para então ocorrer o controle da expressão gênica (HAILE; PAPADOPOLOU, 2007).

A ausência dos mecanismos de controle durante a transcrição mostra a importância dos eventos pós-transcricionais na regulação de genes, sendo a tradução um passo fundamental nos processos regulatórios da expressão gênica em tripanosomatídeos. Logo, supõe-se que funções importantes de controle sejam desempenhadas durante o seu estágio de iniciação da tradução. Os fatores de início de tradução (eIFs), as subunidades ribossomais e as proteínas de ligação à cauda poli-A de mRNAs (PABPs) são considerados elementos relevantes na maquinaria da síntese proteica e na regulação de sua atividade. Para uma melhor avaliação do seu papel nos tripanosomatídeos, tornou-se importante comparar sua distribuição e função nas espécies englobadas pelos principais gêneros estudados, *Leishmania* e *Trypanosoma*, e com o que já é entendido a respeito de eucariotos complexos. Diversas características importantes no início da tradução foram assim elucidadas nos tripanosomatídeos (DE MELO NETO et al., 2016). Da mesma forma, o controle da estabilidade e a degradação dos mRNAs são dois dos alvos mais importantes para eventos específicos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

#### 2.4 AS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À CAUDA POLI-A (PABPs)

As PABPs constituem um grupo de proteínas que interagem com a cauda poli-A dos mRNAs e que estão ligadas ao metabolismo desses transcritos, participando de funções na biogênese, no transporte para o citoplasma, no controle da degradação e na tradução de mRNAs (CASTELLO et al., 2013). Diante do cenário de regulação da tradução, novas funções estão sendo descritas para as PABPs. Em eucariotos os mRNAs citoplasmáticos podem formar estruturas circulares fechadas e que auxiliam no recrutamento de subunidades ribossomais. As PABPs são necessárias para a formação dessas estruturas, tornando-se importantes por regular interações que envolvem mRNAs e ribossomos, desencadeando assim processos eficientes de tradução (WIGINGTON et al., 2015).

As PABPs possuem uma região N-terminal e outra C-terminal, constituídas respectivamente por quatro domínios conservados de ligação ao RNA (RRMs - *RNA Recognition Motifs*) e um domínio helicoidal de interação com outras proteínas localizado na região PABC (MLLE) (Figura 7). Os RRMs são amplamente conservados entre as PABPs, sendo constituídos por 90 a 100 aminoácidos, onde

parte dessas regiões realiza o reconhecimento de sequências distintas de mRNAs com funções ainda pouco elucidadas (KUHN; WAHLE, 2004; GOSS; KLEIMAN, 2014).



**Figura 7: Esquema geral da PABP1 de *Homo sapiens*.** Ao longo do comprimento da *Hs*PABP1 (~70 kDa) estão sendo evidenciadas as regiões N-terminal e C-terminal, que possuem respectivamente quatro domínios de ligação a RNAs (RRMs) (verde escuro) e a região PABC (verde claro), onde localiza-se o domínio de ligação às proteínas (MLLE). A determinação das posições foi consultada no site *InterPro*, utilizando o banco de domínios *Prosite*. **Fonte:** Elaborada pelo próprio autor.

Os estudos iniciais que utilizaram cristalografia de RRMs mostraram que esses domínios são globulares e compostos por 4 folhas-β paralelas e apoiadas por duas α-helices, onde as duas folhas-β mais centrais de cada RRM incluem motivos conservados que formam a região de ligação ao RNA. A especificidade das interações com RNAs é mediada principalmente por forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e pelo empilhamento de resíduos aromáticos nas superfícies das folhas-β. É interessante destacar que os quatro RRMs das PABPs são mais semelhantes aos seus equivalentes em diferentes espécies do que entre os RRMs de PABPs de uma mesma espécie, confirmando uma origem precoce das PABPs com suas estruturas iniciais já definidas nos moldes das proteínas atuais (DEO et al., 1999; GOSS; KLEIMAN, 2014).

As PABPs variam na quantidade de homólogos entre os organismos e a maioria dos eucariotos possuem parálogos dessas proteínas que interagem com diversos parceiros e formam complexos distintos como forma de resposta aos diferentes ambientes e níveis de adaptação (SMITH et al. 2014). Entre essas interações, algumas proteínas se associam às PABPs regulando a afinidade pela cauda poli-A, como o eIF4G (um fator de início da tradução) e a Paip2 (*Poly-A Binding Protein Interacting Protein 2*), os quais respectivamente controlam de forma positiva e negativa esta afinidade. A interação entre a PABP e o eIF4G estimula o início da tradução e regula a estabilidade do mRNA mantendo a sua integridade antes deste processo (ELISEEVA et al., 2013).

O papel das PABPs na maturação e transporte de mRNAs foi descrito a partir de experimentos que interromperam a exportação de transcritos para o citoplasma

em células de mamíferos e leveduras. Os RNAs ficam retidos no núcleo quando não possuem a poladenilação ocorrendo de forma eficiente ou quando este processo é inibido devido à ausência e inatividade de fatores catalíticos específicos (DOWER; ROSBASH, 2002; HAMMELL et al., 2002). A falha na adição da cauda poli-A de mRNAs acaba privando os transcritos da ligação à PABP, a qual possui um papel essencial para a exportação nuclear desses transcritos. A função da PABP no transporte de mRNAs é mediada pela sua interação com nucleoporinas específicas que respondem aos sinais de exportação nuclear e estão localizadas próximas ao canal do poro (UETZ et al., 2000; MANGUS et al., 2003). A associação dos mRNAs com as PABPs, pode estimular de forma análoga os fatores de transporte de RNAs para a competência da exportação desses transcritos.

#### **2.4.1 As PABPs, o complexo eIF4F e o papel na iniciação da tradução**

As PABPs de eucariotos interagem com diversas proteínas formando complexos em resposta aos diferentes estímulos ambientais e níveis de adaptação. Como o controle da tradução é um dos principais responsáveis na regulação da expressão gênica, é seletivamente vantajoso que alguns organismos possuam diversos fatores compondo esses complexos. É o caso do complexo heterotrimérico eIF4F (formado pelas subunidades eIF4E, eIF4A e eIF4G), que é auxiliado pelas PABPs no desempenho de funções na iniciação da tradução em tripanosomatídeos (ZOLTNER et al. 2018). De uma forma geral, o complexo eIF4F reconhece a extremidade 5' dos mRNAs, controlando a associação destes com a subunidade 40S dos ribossomos, dando origem ao complexo 48S e iniciando a tradução. Neste cenário, o eIF4F atua diante de interações com o complexo eIF3, mediadas pelo eIF4G que conecta a subunidade menor do ribossomo com o mRNA. Como descrito anteriormente, o eIF4F, através de suas subunidades, também interage com a PABP, o que leva à circularização do mRNA e à eficiência da tradução (HINNEBUSCH, 2014; BROWNING; BAILEY-SERRES, 2015; ALI et al., 2017).

O fator eIF4E é o responsável pelo reconhecimento do *cap* presente na grande maioria dos mRNAs de eucariotos. A regulação desse fator de iniciação é mediada por parte de suas interações, incluindo aquelas que envolvem o eIF4G, sendo esta ligação necessária para a tradução de mRNAs contendo *cap* (RICHTER; SONENBERG, 2005). Já o eIF4G tem como função coordenar a estruturação do

complexo eIF4F durante o início da tradução, tendo um papel central por intermediar a ligação das interações que envolvem o eIF4F, o mRNA e a PABP. Essas interações são cruciais para a ancoragem de complexos ribossomais de pré-iniciação na extremidade 5' dos mRNAs (YOFFE et al., 2009).

O eIF4G se liga a outros fatores de tradução e também às PABPs de forma simultânea, o que resulta na circularização do mRNA pela aproximação das extremidades 5' e 3'. Essa conformação é estabelecida como um modelo eficiente de iniciação da tradução (PESTOVA; HELLEN, 2006; ZHAO et al., 2017). A Paip2 também regula a tradução e a estabilidade de mRNAs no citoplasma e foi inicialmente descrita como um repressor da tradução que interage com a região C-terminal da PABP. A associação da Paip2 com a PABP inibe a ligação da PABP com a cauda poli-A do mRNA, levando a uma regulação negativa na tradução desses transcritos (KHALEGHPOUR et al., 2001; KACHAEV et al., 2019). Apesar da PABP não ser um fator de início da tradução clássico, possui também um papel importante para a iniciação da síntese proteica, por sua ligação à extremidade 3' dos mRNAs e pela sua interação com o eIF4G (JACKSON et al., 2010).

#### **2.4.2 O papel das PABPs no controle da estabilidade dos mRNAs**

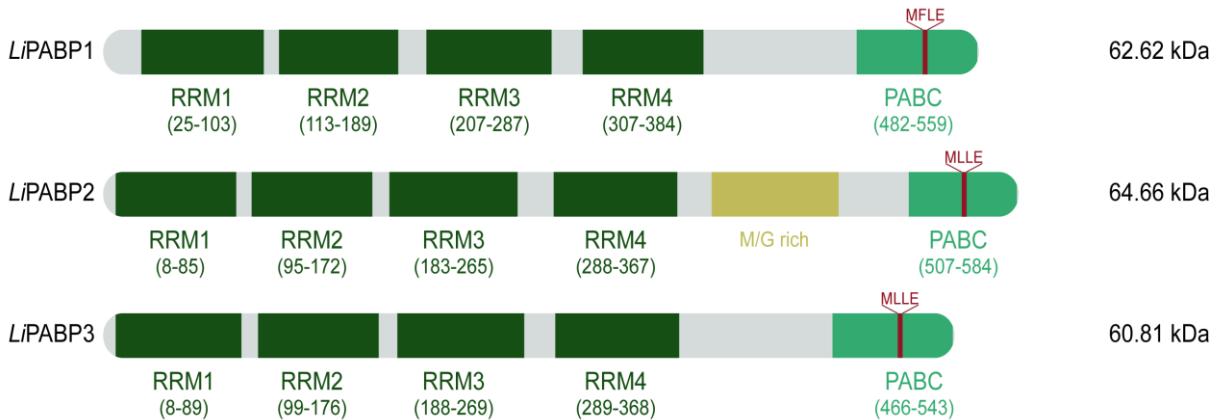
Tanto o controle da estabilidade como a degradação dos mRNAs também são eventos que estão ligados à sequência de poli-adenosinas (cauda poli-A) presente na extremidade 3' da maior parte dos mRNAs transcritos no núcleo celular. A cauda poli-A não é codificada por genes específicos, sendo adicionada aos pré-mRNAs pela ação de agentes enzimáticos através de processos que envolvem a clivagem sítio-dirigida e posterior poliadenilação do seguimento situado na extremidade 3' do candidato à mRNA maduro (ECKMANN et al., 2011). A sequência da cauda poli-A pode variar de tamanho entre as diferentes espécies, possuindo entre 200 e 250 nucleotídeos em mamíferos e de 70 a 90 resíduos em leveduras; e como dito anteriormente, esta região é importante para a maturação do mRNA bem como para a sua exportação do núcleo. Algumas vias de degradação de transcritos incluem processos de deadenilação e decapeamento (retirada do cap da extremidade 5' dos mRNAs) que podem levar à degradação pela ação de exonucleases. Na deadenilação as PABPs têm um efeito inibitório ou um efeito estimulador. Podem inibir o principal complexo poliproteico envolvido na deadenilação (CCR4-NOT) e

ainda impedir a ação da poli-A ribonuclease. Já o estímulo da deadenilação fica por conta da associação com o complexo PAN2/PAN3 que é responsável pela delimitação das caudas poli-A recém-sintetizadas (WANG; KILEDJIAN, 2000).

Através da interação entre as PABPs e os fatores de início da tradução, ocorre a estabilização do complexo de ligação ao *cap* que leva a um controle do decapeamento. Processos de deadenilação podem fazer com que a PABP não consiga mais realizar a interação com outras proteínas importantes, deixando o *cap* exposto e fazendo com que seja removido por enzimas como dcp1 e dcp2 (LODISH et al., 2014).

## 2.5 AS PABPs DE *Leishmania* spp. E AS EVIDÊNCIAS SOBRE AS SUAS FUNÇÕES

Em tripanosomatídeos foram identificados três homólogos de PABP (Figura 8). A PABP1 foi o primeiro homólogo de PABP descrito em *Leishmania* (BATES et al., 2000), enquanto que a PABP2 é um ortólogo da primeira PABP de tripanosomatídeos, originalmente descrita em *T. cruzi* e *T. brucei* (BATISTA et al., 1994). Já a PABP3 foi descrita mais recentemente, a partir de dados genômicos de *Leishmania*, e se mostrou ausente em algumas espécies de *Trypanosoma*. Em *Leishmania* spp. os genes que codificam as PABPs 1 e 2 estão localizados no cromossomo 35, enquanto o gene codificante da PABP3 tem *locus* no cromossomo 25 (DA COSTA LIMA et al., 2010). Análises filogenéticas das sequências de PABPs de diferentes tripanosomatídeos e kinetoplastidas mostraram que provavelmente a ausência da PABP3 em parte do gênero *Trypanosoma* foi uma perda da respectiva sequência gênica que ocorreu após a sua divergência evolutiva (KRAMER; CARRINGTON, 2011).



**Figura 8: Esquema geral das PABPs de *Leishmania infantum*.** Em evidência, os três homólogos de PABP de *L. infantum* destacando os respectivos pesos moleculares: PABP1 (62,62 kDa), PABP2 (64,66 kDa) e PABP3 (60,81 kDa). A determinação das posições foi consultada no site *InterPro*, utilizando o banco de domínios *Prosite*. **Fonte:** Elaborada pelo próprio autor.

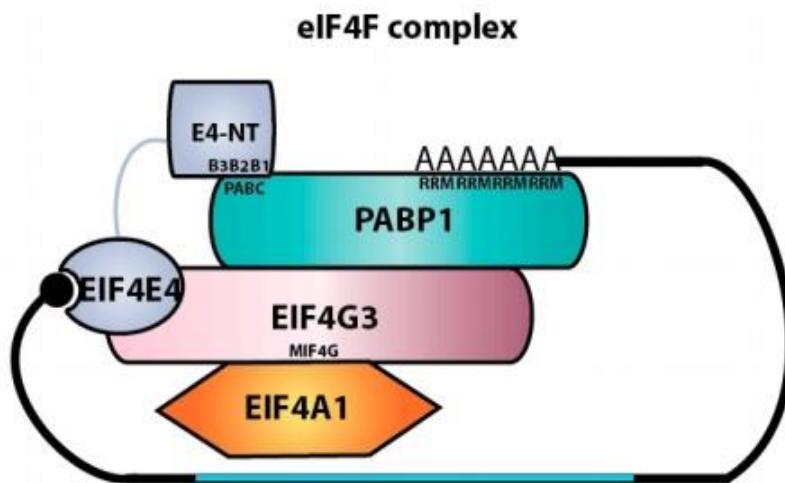
Em estudos anteriores, observou-se que a ligação da PABP2 com a cauda poli-A pode não ser específica ao mesmo tempo que esta aparece co-precipitada com a PABP3, sugerindo que esses dois homólogos podem interagir entre si e/ou possuir funções redundantes associadas às mesmas populações de mRNAs (DE MELO NETO et al., 2016). Quando submetidas à inibição transcrional, as PABPs 2 e 3, que possuem localização citoplasmática, migram para o núcleo celular, sugerindo que estejam relacionadas com o processamento de mRNAs ou exportação dos mesmos para a matriz citoplasmática. Já a PABP1, nas mesmas condições de inibição da transcrição, continua no citosol, sugerindo estar relacionada somente com funções citoplasmáticas das PABPs (DA COSTA LIMA et al., 2010). Os diferentes homólogos de PABP também podem desempenhar um papel importante na degradação de mRNAs, onde a PABP2 foi observada em grânulos de estresse nutricional em *Leishmania* spp, entretanto ainda não está claro qual o papel que a PABP2 e a PABP3 podem desempenhar na diferenciação desses organismos (SHRIVASTAVA et al., 2019).

### 2.5.1 As interações das PABPs nos demais tripanosomatídeos

Estudos envolvendo a caracterização de *Trypanosoma brucei* e espécies de *Leishmania* permitiram a identificação de homólogos das subunidades do complexo eIF4F, iniciando o estudo da sua iniciação da tradução. Já é sabido sobre a existência de seis homólogos eIF4E (eIF4E1 ao eIF4E6), cinco eIF4G (eIF4G1 ao

EIF4G5) e dois eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII) que são conservados nas espécies de tripanosomatídeos. Esses homólogos tornaram-se o foco de pesquisas destinadas a desvendar as funções no início da tradução ou em outros processos moleculares que ocorrem nesses parasitos (FREIRE et al., 2017).

Um primeiro complexo do tipo eIF4F de tripanosomatídeos relevante à iniciação da tradução tem como base as proteínas EIF4E4, EIF4G3 e EIF4AI (Figura 9), visto que já foi descrito que o silenciamento de sua subunidade EIF4G3 de *T. brucei* leva à inibição específica da tradução (MOURA et al., 2015). O primeiro homólogo de PABP relacionado então ao processo de tradução foi a PABP1, que interage *in vivo* e *in vitro* com o EIF4G3 e o EIF4E4. A PABP1 está localizada no citoplasma e liga-se especificamente à cauda poli-A (DA COSTA LIMA et al., 2010; DE MELO NETO et al., 2018). Já a associação dos demais homólogos de PABPs com diferentes complexos formados pelo eIF4F em *Leishmania* spp. ainda não foi completamente elucidada, embora algumas hipóteses sobre as interações dessas proteínas tenham surgido pelos dados encontrados em *T. brucei* a partir do estudo no das PABPs 1 e 2. Assim, a respeito da PABP2, ensaios de co-precipitação relataram a diversidade de parceiros proteicos relacionados, tornando-a menos específica do que a PABP1 (ZOLTNER et al., 2018).



**Figura 9: Esquema geral do complexo formado pela PABP1, EIF4E4 e EIF4G3.** O modelo representa um dos principais complexos do início da tradução cap-dependente. A PABP1 está ligada a cauda poli-A na extremidade 3' e o EIF4E4 ligado à extremidade 5' do mRNA. O EIF4G3 funciona como um mediador para as interações. **Fonte:** Adaptado de Freire et al. (2017).

Outra informação relevante sobre a PABP1 diz respeito a sua fosforilação, descrita como uma possível via de controle da função desta proteína influenciando possivelmente a tradução. A PABP1 é fosforilada simultaneamente com o seu parceiro funcional EIF4E4 (DE MELO NETO et al., 2015; DE MELO NETO et al., 2018). As duas proteínas parceiras possuem resíduos semelhantes que são alvos de proteínas quinases como a CRK1 diante do complexo formado entre esta quinase e a proteína ciclina CYC2. A CRK1 é conservada no gênero *Leishmania* e está envolvida na transição da fase G1 para a fase S, portanto, a fosforilação da PABP1 e do EIF4E4 pode ser importante para a viabilidade do ciclo celular nesses parasitos (NAULA et al., 2005; HU et al., 2016). Em ensaios *in vitro*, a forte interação da PABP1 com o EIF4E4, não observada em outros organismos, não requer fosforilação para ocorrer e em células promastigotas de *Leishmania* spp. o processo de fosforilação dessas proteínas também foi descrito como sendo possivelmente mediado por MAP quinases ainda não identificadas (DE MELO NETO et al., 2018).

Neste cenário complexo das interações dos tripanosomatídeos, a busca por uma melhor elucidação vem fornecendo contribuições para o entendimento das associações que envolvem RNAs e proteínas. O alcance de respostas diante de metodologias atuais pode levar ao encontro de novos alvos para o controle desses parasitos.

### 3 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E DE mRNAs DIFERENCIALMENTE ASSOCIADOS ÀS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO POLI-A DE *Leishmania* E ASSOCIAÇÃO ESPECÍFICA ENTRE PABP1, RBP23 E mRNAs DE PROTEÍNAS RIBOSOMAIS

**Autores:** Ludmila A. Assis, Tamara D. C. da Costa Lima, João R. da Cruz Silva, Maria J. R. Bezerra, Irassandra R. P. U. C. de Aquino, **Moezio V. C. Santos Filho**, Camila C. Xavier, Kleison C. Merlo, Fabiola B. Holetz, Christian Probst, Antônio M. Rezende, Barbara Papadopoulou e Osvaldo P. de Melo Neto

**Periódico:** *Nucleic Acids Research*

Neste capítulo está o manuscrito do artigo que será submetido para a publicação no periódico *Nucleic Acids Research*. A responsabilidade da co-autoria foram os dados obtidos no sequenciamento em larga escala (RNASeq) de mRNAs co-precipitados com os homólogos de PABP (PABP1, PABP2 e PABP3) fusionadas ao epítopo HA em *L. infantum*. Células transfetadas expressando individualmente as proteínas de fusão foram utilizadas para obtenção de extratos citoplasmáticos seguindo de imunoprecipitações com anticorpo anti-HA, além das extrações dos mRNAs co-precipitados e o sequenciamento dos mesmos. Os resultados possibilitaram identificar as populações de mRNAs associados respectivamente à cada homólogo de PABP. A identificação dessas populações utilizou como base a classificação do *Gene Ontology*.

**THE IDENTIFICATION OF PROTEINS AND mRNAs DIFFERENTIALLY BOUND TO THE *Leishmania* POLY(A) BINDING PROTEINS (PABPs) REVEALS NOVEL AND SPECIFIC ASSOCIATIONS BETWEEN PABP1, THE RNA BINDING PROTEIN RBP23 AND RIBOSOMAL PROTEIN mRNAs**

Ludmila A. Assis<sup>1,2</sup>, Tamara D. C. da Costa Lima<sup>3</sup>, João R. da Cruz Silva<sup>1</sup>, Maria J. R. Bezerra<sup>1</sup>, Irassandra R. P. U. C. de Aquino<sup>1</sup>, **Moezio V. C. Santos Filho**<sup>1,2</sup>, Kleison C. Merlo<sup>1</sup>, Fabiola B. Holetz<sup>4</sup>, Christian Probst<sup>4</sup>, Antônio M. Rezende<sup>1</sup>, Barbara Papadopoulou<sup>5</sup> and Osvaldo P. de Melo Neto\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Institute – Oswaldo Cruz Foundation, Recife, PE, Brazil.

<sup>2</sup> Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

<sup>3</sup> University Center Tabosa de Almeida, Caruaru, PE, Brazil.

<sup>4</sup> Carlos Chagas Institute, Curitiba, PR, Brazil.

<sup>5</sup> CHU de Quebec Research Center and Department of Microbiology-Infectious Disease and Immunology, Laval University, Quebec, QC, Canada.

\*Corresponding author e-mail: opmn@cpqam.fiocruz.br

**Keywords:** Trypanosomatidae. RBP23. PABP1.

## ABSTRACT

Regulation of gene expression in *Leishmania* depends on the control of mRNA stability and translation and these events require the participation of RNA binding proteins (RBPs). Poly(A) Binding Protein (PABP), a major eukaryotic RBP, is known to have multiple roles associated with mRNA and its translation. In *Leishmania*, three PABPs have been identified, with PABP1 found to associate with undefined mRNA targets distinct from PABPs 2 and 3. Here, through co-precipitation and RNA-seq experiments, we found ribosomal protein (RP) mRNAs preferentially bound to PABP1, while PABP2 and PABP3 were enriched with unrelated messengers. Co-precipitation and mass-spectrometry analysis also revealed two RBPs differentially associated with PABP1 or PABP2, respectively RBP23 and DRBD2. Both RBPs bound directly to the three PABPs *in vitro*, but reciprocal experiments confirmed PABP1 only, plus the EIF4E/EIF4G3 translation complex and specific hypothetical proteins, co-precipitating with RBP23. In contrast, PABP2/PABP3 and many other proteins co-precipitated with DRBD2. Over 80% of the mRNAs bound to RBP23 were RP-mRNAs, mainly lacking from the DRBD2 bound messages. It instead co-precipitated with mRNAs more consistent with PABP2. These experiments raise the possibility of RBP23 mediating the recruitment of RP-mRNAs by PABP1 and channeling them to translation by the EIF4E/EIF4G3 complex.

## INTRODUCTION

The trypanosomatid protozoans constitute a group of parasitic microorganisms which include several species pathogenic to humans, all belonging to the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera. These are early divergent eukaryotes characterized by a number of unique features related to their gene expression and mRNA metabolism (1, 2). Noteworthy is the fact that due to a lack of RNA polymerase II promoters, which leads to the mRNAs being constitutively transcribed, expression of most of the trypanosomatid genes is regulated post-transcriptionally. It is assumed then that this regulation mainly targets mechanisms associated with the processing, transport, stability and translation of mature mRNAs (3–5). The trypanosomatids then emerge as relevant models for the understanding of mechanisms mediating post-transcriptional and translation regulation in eukaryotes.

In eukaryotes (including trypanosomatids), the RNA binding proteins (RBPs) recognize and bind regulatory sequences in targets RNAs and are required for events such as mRNA processing, subcellular transport, translation, storage and degradation (6–8). These proteins may interact with related sets of RNAs, suggesting an extensive level of regulation as seen in *Saccharomyces cerevisiae* (9). Trypanosomes have an unusually large number of RBPs belonging to distinct functional families and with different mRNA binding domains. These include those with the RRM (RNA Recognition Motif), ZF (Zinc Finger), PUF (Pumilio) and ALBA (acetylation lowers binding affinity) domains (10–13). In *Leishmania donovani* (*L. donovani*), a consistent number of classical RNA-binding domains (RBD), as other more unusual and even unknown RBDs, have been identified in 79 proteins (14). Many reports have shown RBPs acting as post-transcriptional regulators of gene expression in trypanosomatids, usually binding to sequence elements located within the 3' untranslated regions (3' UTRs) of mature transcripts. Different mRNAs containing the same motifs and coding for functionally related proteins appear to be similarly regulated (15). These motifs are targets for different RBPs and this association constitutes the mRNA-protein (mRNP) complexes which transport mRNAs from the nucleus to the cytoplasm. This nuclear export can be co-transcriptional (16) and once in the cytoplasm, the mRNAs can be: translated, degraded or stored in cytoplasmic granules through the condensation of different mRNP complexes (17).

The cytoplasmic poly(A) binding proteins, or simply PABPs (distinct from the NPABPs, nuclear and more functionally restricted), are the best known and the most abundant of the eukaryotic RBPs. They participate in most, if not all, mRNA associated events, a consequence of their high affinity to the 3' end adenosine tract, the poly(A) tail, found in most eukaryotic mRNAs. PABPs interact with many other proteins, thus promoting their involvement in various cellular events. Despite being mainly cytoplasmic, they are also found within the nucleus, where they may play a role in polyadenylation, determining the length of the poly(A) tail, and may be involved in mRNA export (18–20). Within the cytoplasm, PABPs bound to poly (A) tail may interact with the eIF4F, a translation initiation complex bound to the 5' end of the mRNA, contributing to the formation of a closed loop structure. A similar interaction with the termination factor eRF3 may also bring together the translation start and

stop codons, possibly facilitating translation reinitiation and/or ribosome recycling (21–23). In addition, PABPs may alternatively prevent the degradation of mRNAs, by binding to their poly(A) tails, or stimulate the mRNA decay, through interactions with deadenylase complexes (18, 24, 25). Three PABP homologues were identified in *Leishmania* and other trypanosomatids species (PABP1, PABP2 and PABP3), with PABP3 found to be lost from the *Trypanosoma* lineage (26, 27).

A classic eIF4F complex is composed by three subunits: eIF4E, eIF4A and eIF4G. This complex binds to the cap structure of mature mRNA through eIF4E, and then eIF4F mediates mRNA selection for translation (28). In trypanosomatids, several homologues were identified for each protein in the complex, 6 for eIF4E, 5 for eIF4G and 2 for eIF4A. Studies have defined at least six different complexes based on each eIF4E homologues (5, 29). The complex based on eIF4G3/eIF4E4, the eIF4F initiation complex best known to be involved with mRNA translation co-precipitated with *Leishmania* PABP1 (26, 30). A novel and direct interaction between PABP1 and eIF4E4 has been identified, mediated by three conserved PAM2 motifs within the N-terminus of eIF4E4 that bind to the PABP1 MLLE domain (31–33). *Leishmania* PABP2 and PABP3 co-precipitate together and both can migrate to the nucleus after transcription inhibition, while PABP1 remains predominantly in the cytoplasm (26). Similarly in *Trypanosoma brucei*, PABP2 but not PABP1 can also accumulate in the nucleus upon stress conditions (27), reinforcing a nuclear role for PABP2, and PABP2/PABP3, in *Leishmania* and *Trypanosoma* species, respectively. Recent studies of proteomic analysis for the two *T. brucei* PABPs showed that PABP2 interacts with a wide range of proteins while PABP1 binds to a small and distinct group of proteins (34). Furthermore, PABP1 is preferably located into a subfraction of small polysomes, while PABP2 is distributed across all polysomes, suggesting binding to distinct mRNA pools (27).

Since RBPs are essential for the control of gene expression we analyzed through mass spectrometry of *L. infantum* PABPs, the RNA binding proteins especially RRM containing, differentially associated to the PABP complexes. Two of them, named RBP23 and DRBD2 according to their homologues in trypanosomes species, were identified and selected for further characterization in *L. infantum* and for a better understanding of the distinct functions of PABPs. Mass spectrometry was performed for both, RBP23 and DRBD2, to confirm interactions with the PABP

homologues which confirmed RBP23 interacted with PABP1 and their partners, while DRBD2 is more related to PABP2 and a large range of proteins. Both complexes are related to distinct mRNA populations which were identified through RNA-seq. This set of experiments can indicate different mechanisms of mRNA selection for translation initiation as for example in the case of RBP23 that specifically binds to ribosomal proteins mRNAs.

## MATERIALS AND METHODS

### Plasmid constructs, DNA manipulations

The *L. infantum* genomic DNA from the MHOM/MA/67/ITMAP-263 strain was isolated using DNAzol (Life Technologies) following manufacturer's instructions. The full length *RBP23*, *DRBD2*, *PABP2* and *PABP3* were amplified using primers flanked by sites for the restriction enzymes BamHI and HindIII (listed in Supplementary Table 1). All PCR fragments were first cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) to prior sequencing and subcloning into the BamHI-HindIII sites of the *Leishmania* expression vector pSPBT1YNEOα (35) modified with a 27 nucleotide extension encoding the HA epitope (YPYDVPDYA), added immediately after the coding sequence and prior to the translation stop codon. The production of HA-tagged PABP1 and TP-SP (Phosphorylation PABP1 mutant) has been previously described (32). For pull-down assays, the genes *RBP23* and *DRBD2* were subsequently subcloned into the same sites of the pET-21a vector (Novagen) to be expressed as radiolabeled proteins *in vitro*. GST-tagged *L. infantum* PABP2 and PABP3 was generated after subcloning into a modified pGEX4T3 expression vector (GE Healthcare) to be expressed as recombinant proteins in *Escherichia coli* (36). The production of GST only and GST-tagged *L. infantum* PABP1 has been also previously described (32).

### Parasite growth and expression analysis

*Leishmania infantum* MHOM/MA/67/ITMAP-263 promastigotes were cultured in Schneider's insect medium supplemented with 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum and 2% hemin at pH 7.2, 25°C. For the expression analysis late exponentially grown *L. infantum* cultures were harvested and resuspended directly into denaturing

SDS-PAGE sample buffer (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glycerol, bromophenol blue and 5% 2-β-mercaptoethanol), submitted to 15% SDS-PAGE and then blotting with mouse monoclonal antibodies directed against the HA epitope (Anti-HA monoclonal antibody, 100ng ml<sup>-1</sup>, Applied Biological Materials). Transfection procedures used for circular plasmids (episomal expression) were carried out by electroporation. Briefly, grown cells were harvested and washed once in HEPES-NaCl buffer (21mM HEPES pH 7.05, 137mM sodium chloride, 5mM potassium chloride, 0.7mM disodium phosphate, 6mM glucose) and then transferred to cuvettes containing the plasmid DNA, which were submitted to a pulse of 450V, 500μF on the Gene Pulser Xcell™ electroporation system (Bio-Rad). Cells transfected with the *pSPBT1YNEOα* constructs, described below, were selected with G418 (20μg/ml, Sigma).

### Cytoplasmic extract preparation

For RNA sequencing, total cytoplasmic extracts of wild-type *Leishmania major* were produced in triplicate from late exponentially grown cultures of promastigotes cells harvested and washed once in ice cold PBS (Phosphate-buffered saline) and resuspended in IPM1 buffer [100mM KCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES, protease inhibitors (Roche), RNaseOUT and 0.5% IGEPAL CA-630 (Sigma)] to a concentration of 1-2x10<sup>9</sup> cells/ml. To improve the cells lysis, the resuspended cells were left 10 minutes on ice and then submitted to centrifugation as described above. Additionally, total cytoplasmic extracts from wild-type *L. infantum* and strains expressing HA-tagged RBP23 and DRBD2 as well as HA-tagged PABP1, PABP2 and PABP3 were generated in triplicate after cell lysis through nitrogen cavitation, as described below.

For the mass-spectrometry analysis, total cytoplasmic extracts from recombinant strains of *L. infantum* expressing HA-tagged PABP1, PABP2, PABP3 and a phosphorylation PABP1 mutant (TP-SP) were obtained in duplicate after cells lysis using through glass beads, acid-washed 425-600μm (Sigma). Then, total cytoplasmic extracts from wild-type *L. infantum* and recombinant strains expressing HA-tagged RBP23 and DRBD2 were obtained in duplicate after cell lysis through nitrogen cavitation. First, late exponentially grown *L. infantum* promastigotes were harvested and washed once in ice cold PBS, followed by resuspension in HEPES-

lysis buffer (20mM HEPES-KOH pH7.4, 75mM potassium acetate, 4mM magnesium acetate, 2mM DTT, supplemented with EDTA-free protease inhibitors from Roche) to a concentration of 1-2x10<sup>9</sup> cells/ml. Lysis was carried out using glass beads, as described (32), or using nitrogen cavitation (37), but with modifications. Briefly, the resuspended cells were transferred into the cavitation chamber of the cell disruption vessel (Parr Instruments) and incubated at 4°C under pressure (70bar) for 40 minutes, followed by rapid decompression and lysis. The lysates were submitted to centrifugation for 10 minutes at 17.000g, 4°C to remove cellular debris and the supernatants, the cytoplasmic extracts, aliquoted and stored at -80°C.

### Immunoprecipitation

Immunoprecipitation assays (IPs) for the native PABPs used the cytoplasmic extracts from wild type *L. major* and the affinity purified antibodies (anti-PABP1, anti-PABP2 and anti-PABP3) previously described (26) with PBS and RNaseOUT (Sigma) were incubate with approximately 0.1 mg protein A sepharose, previously washed with PBS, overnight at 4°C. Next day, the sepharose-antibody was washed three times with PBS before incubation with 1x10<sup>9</sup> of cytoplasmic extract for 1 h at 4°C under agitation. The supernatant was removed by centrifugation for 2 minutes at 600g, 4°C and the set were washed three times sequentially with lysis buffer, 1% IGEPAL CA-630 and lysis buffer. This IP assay using polyclonal antibodies and *L. major* extract was performed exclusively for RNA-seq.

For the IPs with the HA-tagged proteins, all cytoplasmic extracts from wild type or recombinant HA-tagged *L. infantum* strains, were mixed with Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads as per manufacturer's protocol. Briefly, 0.2mg of these anti-HA magnetic beads were washed three times with PBS followed by the incubation with the cytoplasmic extract for 1h at 4°C. After, the depleted supernatant was removed and the beads were washed three times with PBS. The resulting, specifically bound, immunoprecipitated antigen-antibody complexes were eluted in SDS-PAGE sample buffer. They were then analysed through SDS-PAGE and Western-blotting using antibodies against the HA-tag to confirm the efficiency of the precipitation reaction. The immunoprecipitations were performed in duplicates and triplicates for mass spectrometry and RNA-seq, respectively.

### Mass-spectrometry analysis

For mass-spectrometry (MS), IP of HA-tagged PABP1, TP-SP, PABP2 and PABP3 were submitted to Proteomics Platform of the Quebec Genomics Center, as described (38). The results of two independent experiments were analyzed in the Scaffold proteome software, used to validate the proteins identification based in the *L. infantum* genome. Only proteins identified with >1 peptide and a probability of >80.0% were considered. In Table 1 was listed a comparison between proteins co-purified with HA-tagged proteins that were RNA or translation related. Eluted proteins from IP of HA-tagged RBP23 and DRBD2 were submitted to Proteomics facility at the Carlos Chagas Institute - Fiocruz. The samples were loaded into 15% SDS-PAGE gels and allowed to migrate into the resolving gel, when the electrophoresis was interrupted prior to protein fractionation. Gel slices containing the whole IP products were then excised and submitted to an in-gel tryptic digestion and mass spectrometry analysis and validation as previously described (39). Protein identification was based on the *L. infantum* protein sequence database (*L. infantum* JPCM5, version from March 29, 2016 available at TriTrypDB). To confirm the specificity of the IP assays, for each polypeptide, a first normalization was performed from the sum of intensity of each replicate and the highest value sum was used to normalize the other values. For negative control and RBP23 or DRBD2 the averages of unique peptides and intensities was calculated. The ratio between the intensity averages was generated from the IPs using the extract expressing the HA-tagged RBP23 or DRBD2 and the average intensity from the control IP using an extract from non-transfected cells. The peptides present in both replicates and with a ratio >4.0 was selected and organized according the intensities average of RBP23 or DRBD2. Those with an intensity 1000-fold less than the highest intensity were excluded.

### RNA extraction and cDNA library construction

RNA ligands were extracted from three independent immunoprecipitations of wild-type *L. infantum*, HA-RBP23, HA-DRBD2 and HA-tagged PABP1-3 with the RNeasy Mini Kit (QIAGEN). The RNA samples were quantified by Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher) using to read the concentration the Qubit® 2.0 Fluorometer. At least 0.1-4 $\mu$ g of the total RNA was used to construct the cDNA library with the TrueSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina). First, the

mRNAs were purified by poly(A) and fragmented to synthesize the first strand of cDNA. After that, the second strand of cDNA was synthesized and the 3' ends were adenylated to the ligation of adapters. The DNA fragments that have adapter molecules on both ends were enriched by PCR and then the library was validated quantitatively for qPCR use the KAPA Library Quantification Kits and qualitatively by visualization in agarose gel. Finally, the libraries were normalized and the pool prepared to sequencing using the MiSeq® Reagent Kit v3, 150 cycle (Illumina). Similar RNA extraction was performed for *L. major* cytoplasmic extract IPs with anti-PABP1-3. Then, the total RNA was used to prepare the cDNA library with the SOLiD Whole Transcriptome Analysis Kit and the products were evaluated with an Agilent Bioanalyzer (Agilent). The cDNA library was used to clonal amplification according to the SOLiD Full-Scale Template Bead preparation protocol and sequenced with the SOLiD4 System (Applied Biosystems).

## Sequence analysis

Sequence analysis and alignment of the RBP23 and DRBD2 were carried out using the MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>), using selected trypanosomatid sequences recovered from TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>) and sequences from other organisms from GenBank. TriTrypDB accessions: *Leishmania infantum* (Li) RBP23 - LINF\_170011800; *Leishmania major* (Lm) RBP23 - LmjF.17.0550; *Leishmania braziliensis* (Lb) RBP23 - LbrM.17.0540; *Cryptosporidium fasciculata* (Cf) RBP23 - CFAC1\_280015000; *Trypanosoma brucei* (Tb) RBP23 - Tb927.10.11270; *Trypanosoma cruzi* (Tc) RBP23 - TcCLB.507711.40; *Bodo saltans* (Bs) RBP23 - BSAL\_25215; LiDRBD2 - LINF\_350027200; LmDRBD2 - LmjF.35.2200; LbDRBD2 - LbrM.34.2130; CfDRBD2 - CFAC1\_300070700; TbDRBD2 - Tb927.9.13990; TcDRBD2 - TcCLB.510755.120; BsDRBD2 - BSAL\_13490. Within the aligned regions, amino acids identical in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, while amino acids defined as similar, based on the BLOSUM 62 Matrix, on more than 60% of the sequences, are shown in pale gray. The secondary structure was predicted using the Phyre2 (40) automatic fold recognition server and the identification of the arginine methylation sites was done through visual inspection of sequences. The 3' UTR analysis were performed through MEME (41) using 300 nucleotides immediately after the stop codon from the

20 top-most mRNA sequences bound to *L. infantum* RBP23-HA. The already defined 3' UTRs of *L. donovani* orthologues were also retrieved and analyzed. Default parameters were used to detect the motifs, which any number sites per sequence and width between 6-50 nucleotides.

### RNA sequencing analysis

RNA-seq reads obtained from SOLiD data were mapped against the *Leishmania major* Friedlin genome assembly version 8.1 available at the TriTrypDB database by the SHRiMP software version 2.2.3 (42) with default parameters. All mappings whose score was higher than 350 were considered for further analyses, where all samples were normalized and the differential expression was assessed by the edgeR package (43), included in the Bioconductor package version 2.6 (44). Genes were considered over represented when a 4-fold increase was observed when compared to the negative control ( $\log_2$  ratio  $>=2$ ), with an FDR $<=0.01$ .

The data from Illumina were analyzed by the following bioinformatics tools: (1) FastQC to evaluate the quality of the sequences (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>); (2) Trimmomatic 0.36 version (45) to remove the adapters and the low-quality sequences; (3) STAR (46), an aligner to map the reads to the *L. infantum* genome, counting reads associated for each gene; (4) DEseq2 Galaxy version (47) to compare statically the samples. The minimum of 4-fold increase over the negative control (Log2 (I Ratio)  $>2$ ) and FDR of 0.05 were considered. The results of both analyses were plotted on graphs according to gene ontology (GO) functional terms classification of the upregulated mRNAs associated to each protein. The terms/categories used for the grouping were: binding, with a subcategory named DNA binding, which was divided in histone and non-histone; catalytic activity; structural molecule activity, subdivided in structural constituent of ribosome or structural constituent of nuclear pore; transcription regulator activity; translation regulator activity and transporter activity.

For RBP23 mRNA analysis, the transcript sequence containing the 3' UTR and the transcript sequence with HA but without the 3' UTR were used as reference. Bowtie2, a tool for aligning sequencing read (48) was used to generate the .bam

files, which were viewed in IGV, integrative genomics viewer, a visualization tool (49, 50).

### ***In vitro* pull-down assays**

Pull-down assays were performed using Glutathione Sepharose 4B beads (GE Healthcare), affinity purified GST-tagged recombinant proteins and  $^{35}\text{S}$ -labeled RBP23 and DRBD2 as described previously (de Melo Neto et al., 2015). GST alone and the three different GST-tagged PABPs were expressed in *Escherichia coli*, immobilized on the beads and incubated with  $^{35}\text{S}$ -labeled RBP23 and DRBD2. The labeled proteins were obtained through the linearization with HindIII of the corresponding constructs in the pET21a, followed by transcription with T7 RNA polymerase in the presence of the cap analogue and translation in the rabbit reticulocyte lysate (Promega or Ambion) supplemented with  $^{35}\text{S}$ -methionine (Perkin Elmer). The signal was detected by an autoradiographic film on the 15% polyacrylamide gel.

## **RESULTS**

### **mRNAs differentially bound to native *Leishmania* PABPs**

Immunoprecipitation (IP) assays have previously shown that *Leishmania* PABP1 does not co-precipitate with either PABP2 or PABP3 while, in contrast, reciprocal assays have confirmed that all or nearly all PABP2 and PABP3 co-precipitate together. These results suggest that PABP1 binds to mRNA targets distinct from the PABP2/PABP3 pair (26). In *T. brucei*, where PABP3 is missing, the PABP1 and PABP2 orthologues have also been shown to bind to different mRNA targets, with PABP1 binding to a subpopulation of small mRNAs, while PABP2 binds to most parasite messengers (34). Here, to better define the functional distinctions between the *Leishmania* PABPs, their mRNAs targets were first investigated. To accomplish this, we first opted to use purified polyclonal sera generated against the three native *Leishmania* PABPs. For the negative control, parallel experiments were carried out with beads and extracts but with the sera omitted. Transcripts with the highest number of reads and  $\log_2 > 2$  enriched, when compared with the negative control are listed in Supplementary Table 2. These were then grouped according to GO functional terms, as shown in Figure 1A.

As expected, the PABP1 profile of bound mRNAs is noticeably different from either PABP2 or PABP3, with the profiles from these last two proteins being very similar (Figure 1A). A total of 216 mRNAs were found enriched with PABP1, of which only 17 genes encode proteins with unknown functions. Among those transcripts functionally classified, 119 (60%) encode ribosomal proteins, 45 (23%) encode binding proteins of which 17 (9%) are histones mRNAs, 17 (9%) encode proteins with catalytic activity, 9 (5%) with translation regulator activity and 8 (4%) with transporter activity. In contrast PABP2/PABP3 co-precipitated with a total of 222 and 188 enriched transcripts, respectively, of which 26 and 21 encode proteins with unknown function. For PABP2, 70 (36%) mRNAs encode ribosomal proteins, with 39 (20%) transcripts encoding proteins with catalytic activity and 58 (30%) with binding functions, of which 29 (15%) are histone mRNAs. In addition, 6% and 9% of the transcripts encode proteins with translation regulator or transporter activity, respectively. The observed results for PABP3 were very similar to those found for PABP2 and are in agreement with these two proteins binding together to the same set of mRNAs.

### mRNAs bound to HA-tagged *Leishmania* PABPs

The polyclonal nature of the antibodies used for the set of IPs carried out for the native proteins might be associated with some degree of cross-reactivity and this might be the reason for the overlap seen in mRNAs bound by PABP1 and the PABP2/PABP3 pair. To clarify this possibility, we opted to carry out an independent confirmatory experiment for the analysis of PABP-bound mRNAs. With the availability of a previously described *L. infantum* cell line expressing the HA-tagged PABP1 (32), we now also generated cell lines expressing both PABP2 and PABP3 fused with an identical C-terminal HA tag. When compared with the ectopic PABP1-HA, represented by two major isoforms indicative of phosphorylation events, both HA-tagged PABP2 and PABP3 were visualized as single bands in whole cellular extracts derived from the transfected cell lines (Supplementary Figure 1). Cytoplasmic extracts of these cell lines were then prepared after lysis through cavitation, in the absence of any detergent, and then used in IPs performed with monoclonal anti-HA antibodies immobilized on magnetic beads. The negative controls used were cytoplasmic extracts made from cells having no HA-tagged protein. Co-purified

mRNAs were then extracted from the IPs and used for sequencing by the Illumina platform. Considering that the identity between the *L. major* and *L. infantum* orthologues is 97% - and that little significant difference in overall gene content is observed between the two species we opted then to compare the two sets of results for the three PABP homologues. The new approach, however, uses a different lysis method as well as distinct antibodies and immunoprecipitation/sequencing strategies. A first analysis of the bound mRNAs with a volcano plot confirms a reduced overlap in mRNA content bound between PABP1xPABP2 or between PABP1xPABP3 (Supplementary Figure 2A). In contrast, no difference between the mRNAs associated to PABP2 or PABP3 can be detected (Supplementary Figure 2B and 2C). This analysis confirms major distinctions in mRNA targets bound to PABP1 or PABP2/PABP3, while highlighting once again that the latter two proteins bind together to the same set of mRNAs.

The full set of mRNAs identified after the IPs with the anti-HA antibody are listed within Supplementary Table 3. An analysis using GO terms, as carried out for mRNAs immunoprecipitated with the native PABPs, was also performed with the new data (Figure 1B). A total of 113 upregulated mRNAs were found co-precipitated with PABP1 fulfilling the criteria of  $\log_2$  fold enrichment greater than 2, of which 27 transcripts encode proteins with unknown functions. From the remaining transcripts, 50 (58%) are grouped within the term structural constituent of ribosome, 19 (22%) encode binding proteins, 13 (15%) enzymes with catalytic activity, 2 (2%) proteins with transporter activity; and 1 (1%) each encoding proteins classified as transcription and translation regulator activities. PABP2 and PABP3 co-precipitated with totals of 135 and 118 enriched transcripts, respectively, of which 48 and 40 with unknown functions. Among the mRNAs associated with PABP2 and PABP3, however, only 3% and 4% were classified with the “structural constituent of ribosome” term. For PABP2, 35 (40%) transcripts encode proteins with catalytic activity and 38 (43%) with binding function. In addition, 8 (9%) genes encoding proteins with transporter activity, 2 (2%) with translation regulator activity and 1 (1%) transcription regulator was also found to be enriched. The observed data for PABP3 were very similar to those found for PABP2. It is notable that the mRNAs co-precipitated with HA-tagged PABP1, PABP2 and PABP3 are not so enriched with histone mRNAs as compared with *L. major*. The results overall resemble the first experiment with native proteins with respect to

PABP1 having a different profile of bound mRNAs than PABP2 and PABP3, with those two associated with an identical profile of bound mRNAs. The experiment with HA-tagged proteins, however, proved to be much more specific, with PABP1 having a clear preference for mRNAs encoding ribosomal proteins.

As well as mRNAs differentially bound by the PABP1 or PABP2/PABP3 pair, mRNAs commonly bound by all three PABPs were also identified. To better define those as well as mRNAs specifically bound individually by PABP2 or PABP3 and the distinct PABP pairs, we did a Wenn diagram analysis by the three HA-tagged PABPs from *L. infantum* (Figure 2). In depth analysis of the mRNAs bound by the *Leishmania* PABPs, of the selected mRNAs, a total of 71 mRNAs bind exclusively to PABP1, with 48 mRNAs of ribosomal proteins (30 RPL, 17 RPS and 1 RPP). Meanwhile, 59 mRNAs bind exclusively to PABP2 and 38 only to PABP3. PABP2 is associated with a large number of uncharacterized protein mRNAs (HP) when compared to the other two and histones are preferentially associated to PABP3. Remarkably, PABP2 and PABP3 share more mRNAs (45 total) than PABP1 and 2 (only 7) and PABP1 and 3 (only 11). The three PABPs share 23 mRNAs with each other. Histones are preferentially associated to PABP3. PABP2 is associated with a large number of protein mRNAs with unknown function compared to the other two.

### **RBPs differentially bound to PABP homologues *in vivo***

Aside from their strong specificity for poly(A) sequences (26, 51), so far the best studied eukaryotic PABPs have no known sequence specific affinity which could justify their selective binding to different sets of mRNAs. Binding to poly(A) has been shown to be mediated by specific residues within the PABP's RRM 1 and 2 which are generally conserved in *Leishmania* PABP1 and PABP3, whereas substitutions in these residues have been identified for PABP2 which might lead to changes in sequence binding specificity (26). For *Leishmania* PABP1 at least, and most likely for the PABP2/PABP3 pair also, their recognition of specific mRNAs targets might require the assistance of partner RBPs with distinct RNA binding specificities. Here, putative RNA binding proteins that might be involved in specific mRNA recognition were initially identified in a pilot mass spectrometry analysis of the proteins co-precipitated with the three different, HA-tagged, *L. infantum* PABPs. For these experiments no quantitative data was derived from the mass spectrometry analysis;

however, a minimum of two independent IPs was considered for validation. PABP1 and PABP1 phosphorylation mutant (TP-SP) was compared with PABP2 and PABP3. These experiments, summarized in the Table 1, mainly confirmed the strong association between PABP2 and PABP3 and with similar binding partners, as well as the specific association of the EIF4E4 initiation factor with PABP1. They also led to the identification of RNA binding proteins specifically associated with PABP1 (RBP23; DRBD3), PABP2/PABP3 (DRBD2; NRBD) or the three proteins (ZC3H41). The data for the wild-type PABP1 was subsequently confirmed using the milder lysis method based on cavitation followed by a quantitative mass spectrometry analysis (32).

### **RBP23 and DRBD2 bind directly to *Leishmania* PABPs**

Considering a possible role for RBPs in assisting the binding of their PABP partners to specific mRNAs, we then chose the two of them most strongly associated with either PABP1 or the PABP2/PABP3, respectively RBP23 and DRBD2, for further investigation. These two RBPs are both characterized by the presence of RRM domains, with one RRM previously described for RBP23 and two for DRBD2 (52). RBP23 is a 32.3 kDa protein (295 amino acids long) having its described RRM localized at its C-terminal end (Figure 3A and Supplementary Figure 3). Here, a second atypical RRM-like domain was identified using Phyre2, localized proximal to its N-terminus. DRBD2 is also a small protein with a molecular weight of 30.2 kDa (274 amino acids long) with its two RRMs also localized to the N and C-terminal ends of the protein (Figure 3A and Supplementary Figure 4). The two proteins are therefore very similarly organized.

Here, to first confirm if direct interactions occur between RBP23 and DRBD2 and the *Leishmania* PABP homologues, both *RBP23* and *DRBD2* genes were cloned and the corresponding proteins used for *in vitro* pull-down assays. The three PABPs were first expressed in *E. coli* with an N-terminal Glutathione S-transferase (GST) tag. After immobilization in Glutathione Sepharose these were then incubated with <sup>35</sup>S-labeled RBP23 and DRBD2, produced by *in vitro* transcription/translation. The two <sup>35</sup>S-labeled proteins bound to all three GST-tagged PABPs, although a stronger signal with PABP1 was observed (Figure 3B). No binding to the negative GST control was observed.

Both RBP23 and DRBD2 genes were also used for the ectopic expression of the C-terminally HA-tagged proteins in transfected *L. infantum* cell lines. As for the PABPs, whole cell extracts of these proteins were first tested with anti-HA antibody by western blot assays. The expression of these proteins was confirmed in exponentially grown promastigotes, with RBP23 and DRBD2 migrating as single bands with sizes in agreement with their predicted molecular weights (Figure 3C). No isoforms suggestive of post-translational modifications were seen. Prior to subsequent analyses investigating protein partners and mRNA targets, cytoplasmic extracts were then generated from the cell lines expressing both HA-tagged proteins and preliminary IPs were performed. The amount of RBP23 detected in the cytoplasmic extract and/or IPs is generally much lower than that observed for DRBD2 (Figure 3C) and contrasts with equivalent levels of expression for both ectopic proteins from whole cell extracts. RBP23 then is likely to be more susceptible to degradation than DRBD2.

### RBP23 binding partners

Here, an alignment comparing the sequences of RBP23 orthologues from five trypanosomatids plus the free-living relative *Bodo saltans* was carried out in order to find conserved or divergent features within the protein's sequence (Supplementary Figure 3). The alignment reveals a limited conservation in sequence which is mainly seen between more closely related species, such as within the *Leishmania* genus, and much more restricted between more distantly related organisms, such as *B. saltans*. When the *L. infantum* and *T. brucei* RBP23 orthologues are compared for instance, only 30% identity and 44% of similarity in sequence is seen, with the conservation mainly restricted to the RBP23 N- and C-terminal regions, where the atypical and typical RRM s have been mapped. Apart from the RRM s, some conservation is also observed in the segment connecting them with some aromatic residues. Noteworthy also is the presence of a glutamine rich sequence followed by a tract of multiple prolines found only in the *Leishmania* RBP23 orthologues as well as several RGG motifs present only in the *Leishmania* and *Crithidia* sequences. RGG motifs have been implicated in arginine methylations in trypanosomatids, with a role in regulation of gene expression and cell cycle (53).

To confirm the association of RBP23 with PABP1 and find additional protein partners, proteins co-precipitated with the HA-tagged RBP23 were next identified through mass-spectrometry. Results derived from the mass spectrometry analysis of two sets of replicates comparing the LFQ intensity of RBP23-HA with the respective negative control were summarized and categorized (Table 2). These results confirm the specific interaction between RBP23 with PABP1 as well as the translation initiation complex formed by EIF4E4 and EIF4G3. Several other proteins which have been shown to specifically co-precipitate with HA-tagged PABP1 using similar procedures (32) are also found associated with RBP23-HA. These include the zinc-finger ZC3H41, structurally similar to a DNA helicase according to Phyre2 predictions. Also associated with both PABP1 and RBP23 is the hypothetical protein LINF\_180008000, having a Nuclear Transport Factor 2 (NFT2)-like domain in its N-terminus. Yet another protein co-precipitated with both PABP1 and RBP23 is LINF\_050009500, structurally similar to Skp1 (S-phase kinase associated protein 1), a component of the ubiquitin ligase complex.

Twelve other uncharacterized proteins, with unknown function, were found co-precipitated with RBP23 but were not with PABP1 (Table 2) and deeper studies of them may lead to an understanding of the role of RBP23. Other several proteins are associated only with RBP23 but not PABP1. Among them, translation initiation factors (EIF3G and EIF4E1); RNA-binding proteins such as a potential Pentatricopeptide Repeat (PPR) protein, a MRB1-associated protein, a MYND finger containing protein (ZMYND), the RRM containing proteins, RBP7 and TRRM2, and a serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP); Proteins involved in polyadenylation as PAP regulatory subunit and PBP1 and in deadenylation as the three subunits of the CCR4-NOT transcription complex: CNOT10, CNOT11 and CAF1, the last one which displays deadenylase activity. In addition to these, three enzymes and six proteins involved in intracellular transport and cell motility also co-precipitated with RBP23 (Table 2). The orthologues in *T. brucei* of the partner proteins are mainly distributed by the cytoplasm (Figure 4A).

### **DRBD2 binding partners**

The alignment of several DRBD2 homologues (Supplementary Figure 4) demonstrated that the sequence is highly conserved when compared with RBP23,

especially in the RRM<sub>s</sub>. For example, comparing *L. infantum* and *T. brucei* DRBD2 homologues with 91% of coverage was observed 62% of identity and 70% of similarity. However, *T. brucei* reveals a polyglutamine (poly Q) between the two RRM<sub>s</sub>, not conserved in *L. infantum*. Interestingly, this specie presents an element with aromatic residues between the RRM<sub>s</sub>, as observed to RBP23.

Results derived from the mass spectrometry analysis of two sets of replicates comparing the LFQ intensity of DRBD2-HA with the respective negative control were categorized and most proteins are RNA binding (Table 3). The data confirm that DRBD2 preferentially associates with PABP2 and 3, as previously demonstrated. Curiously, DRBD2 also interacts with the translation initiation factor EIF4G3 involved in the complex associated to PABP1. However, most of the proteins that interact with DRBD2 are RNA related. In our analyses a total of five proteins with Zinc Finger domain (including ZC3H31, ZCH34, ZCH39, ZCH40 and ZCH41), three RBPs (RBP12, RBP23 and RBP43), two TRRMs (TRRM1-2) and a putative RBP with NTF2 domain (LINF\_210009700) were found. Highlight for Pumilio protein 6 (PUF6) and for PAN3, a Poly(A) Specific Ribonuclease Subunit. We can also observe 19 mitochondrial RNA related proteins, four of which are associated with guide RNA (GAP1-2 and GRBC5-6). In addition to these was detected three mitochondrial edited mRNA stability factors (MERS1-3), two mitochondrial RNA binding protein (MRP1-2), two mitochondrial RNA binding complex 1 subunits (MRB4150 and MRB1590), two RNA editing mediator complex proteins (REMC1 and REMC5), and two RGG-containing proteins (RGG1-2). These mitochondrial proteins represent 38% of the total proteins found associated with DRBD2 (Figure 4B) as opposed to RBP23 partners, of which only 2% are mitochondrial (Figure 4A). In addition, DRBD2 was also associated with the polyadenylation proteins, KPAF1, PAMC1 and PAMC3 (also located in the mitochondria), with a cellular component which plays a role in flagellar motility, and with 11 enzymes, four with RNA helicase activity (one with nucleolar location), two RNA methyltransferases and other five enzymes described in Table 3. Lastly DRBD2 also interacts with LINF\_190005100 and LINF\_050009500, both uncharacterized proteins and which also co-precipitated with RBP23, and with LINF\_200005800, which contains a structural similar to the nuclear receptor ligand-binding domain according Phyre2 prediction. The set of proteins associated with

DBRD2 demonstrates that it is somehow involved in regulation but not directly associate to translation, as seen for RBP23.

### **mRNAs populations associated with RBP23 and DRBD2 are different**

To understand the function of the complexes PABP1/RBP23 and PABP2/DRBD2 in *Leishmania*, similar assays were performed for HA-tagged RBP23 and DRBD2 by the Illumina platform to compare analyses with PABP Illumina data. For this experiment, mRNAs bound to either RBP23-HA or DRBD2-HA after the IPs were extracted and used to construct cDNA libraries and to perform next generation sequencing as was done for the PABPs. The data showed the mRNAs bound to both RBP23-HA and DRBD2-HA (listed in Supplementary Table 4). The upregulated mRNAs were functionally grouped according their molecular function description, as previously described for the HA-tagged PABPs. A total of 132 mRNAs enriched were found co-precipitated with RBP23 of which 8 genes encode proteins with unknown functions. The most enriched mRNA was the RBP23 transcript itself and the majority was 112 (90%) genes encoding ribosomal proteins, much more specific than PABP1 with about 60% of ribosomal proteins mRNAs (Figure 1B). In addition, 7 (6%) genes encoding binding proteins (including the RBP23 transcript); 3 (2%) protein-coding gene with transcription regulator activity; 1 (1%) with translation regulator activity, the initiation factor 5a; and 1 (1%) with transmembrane transporter activity, a pteridine transporter, were also found to be enriched (Figure 5A).

A different profile was observed for DBRD2 with a total of 301 mRNAs found co-precipitated of which 88 encode proteins with unknown functions. The two largest groups of mRNAs associated to DRBD2 comprises 94 (44%) genes encoding binding proteins and 68 (32%) with catalytic activity. In contrast to RBP23, only 18 (8%) genes encoding proteins with structural molecule activity (16 constituent of ribosome and 2 of nuclear pore) were found enriched with DRBD2. In addition, 18 (8%) protein-encoding gene with transporter activity, 9 (4%) with translation regulator and 6 (3%) with transcription regulator activity were also found to be enriched (Figure 5B). An analysis of the transcript length using the *L. donovani* orthologues sequences (54) of 20 transcripts for both proteins showed a noticeable difference between the size of RBP23 and DRBD2-associated mRNAs. The first, composed mostly of ribosomal protein mRNAs, has small mRNAs, while DRBD2 co-precipitates with larger mRNAs

(Figure 5C). The 5' UTR of *L. donovani* transcripts is particularly small in RP mRNAs as also observed in *T. brucei* (data not shown).

### ***In silico* motifs on RP mRNAs 3'UTR**

Next, we hypothesize about the sequence elements of the mRNAs, especially for RP mRNAs, that allow them to be selected by RBP23, since it is known that functionally related transcripts usually have common motifs for the binding of specific RBPs (55). In trypanosomatids, the mRNAs 5' end is not enriched in pyrimidines, so regulation of their translation may differ and be preferentially located in the 3' UTR of their transcripts (56). Considering the finding that RBP23 binds mostly to mRNAs encoding ribosomal proteins, we investigated conserved motifs within the 3' untranslated regions of these mRNAs from *L. infantum* and *L. donovani*. The 5' UTRs of these mRNAs are very small and have no evidence of a regulatory sequence as in mammals. Then, it was compared the 3' UTR of 19 sequences of ribosomal protein mRNAs more enriched, as well as the RBP23 mRNA sequence which was also highly enriched in the analyzes.

The *L. infantum* UTRs are not yet defined, then 300 bp post stop codon were used and the *L. donovani* 3' UTR already defined. The first 20 most enriched mRNAs found associated with DRBD2 were also analyzed as a control. A motif composed by T-rich sequences with 15 bp in *L. infantum* (TTTHYTTTTKTTTTB) and with 29 bp in *L. donovani* (HYYCTYTYCBTCYYYBTTTBBYTYYTYT) were detected (Figure 6A). These motifs were found one or even four times in most 3' UTRs of ribosomal proteins mRNAs analyzed and the first two was not detected in the RBP23 mRNA 3' UTR. Comparatively, for the 3' UTRs of the mRNAs found associated with DRBD2, a motif with TG repeats, was found in both *Leishmania* species (Figure 6B). In *L. infantum* and *L. donovani*, at least one motif was found before the 150 pairs after stop codon on most RP-mRNAs (Figure 6C). Particularly for the RBP23 transcript, an analysis was performed to verify whether the transcripts are from endogen or ectopic gene of RBP23. The results confirm reads for both genes (Supplementary Figure 5), demonstrating that the 3' UTR was not required for binding since the ectopic gene is transcribed without 3' UTR, which explains the motif absence.

## DISCUSSION

RNAi mediated depletion of RBP23 affects growth of the *T. brucei* bloodstream form (57) and the cells show a gain-of-fitness phenotype during differentiation, but depletion does not seem to affect procyclic cells (58). In *L. infantum* studies with isobaric tagging methodology (iTRAQ) showed RBP23 to be significantly downregulated during differentiation and in the mature amastigote form (59), so it does seem to be more needed during exponential growth phases. Our data confirm the association of RBP23 with EIF4E4/EIF4G3 complex and PABP1, known as translational activators and part of the polysomes (32, 60–62). Both PABP1 and EIF4E4 are simultaneously phosphorylated during exponential growth, possibly associated with activation of translation of target mRNAs. RBP23 may help to recruit PABP1 and the EIF4E4/EIF4G3 complex to selected mRNAs to promote their translation (32) with these mRNAs likely being mainly ribosomal protein mRNAs (RP-mRNAs). Here we propose a model (Figure 7) where RBP23 first interacts with the 3' UTRs motif of the RP-mRNAs and subsequently interact with PABP1. Thus, RBP23 marks the RP-mRNAs that should be translated by the complex PABP1 / EIF4E4 / EIF4G3 / EIF4AI. Preferential binding of this eIF4F complex to the RP-mRNAs would not only direct them to a translation pathway distinct from most other cellular mRNAs, perhaps avoiding competition, but would also allow their translation to be specifically regulated, presumably involving the phosphorylation of EIF4E4 and PABP1, an event already shown to be cell-cycle regulated (De Melo Neto et al., 2015; de Melo Neto et al., 2018; An et al., 2018).

2º parágrafo – RP-mRNAs e sua regulação diferenciada em diferentes organismos

Generally, Ribosomal proteins mRNAs (RP-mRNAs) have their translation regulated differently and different organisms can use diverse mechanisms. In yeasts, an activator (IFH1) and a repressor (CRF1) control the RP gene regulation (64) and the transcription of RP genes are strongly coordinated with that of rRNAs (65). RNA immunoprecipitation sequencing analysis demonstrated that many RP-mRNAs are enriched especially with the closed loop translation initiation components, eIF4E and both isoforms of eIF4G (66). In mammals, the translation control mechanism is another one, RP-mRNAs as well as some translation factors are encoded by mRNAs containing 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) sequence immediately before the cap structure. The La-related protein 1 (LARP1) when associated with the 5'TOP motif

and the cap, acts as a repressor. This protein is also able to bind to PABP and consequently form a translation-inactive mRNA loop. The mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), a kinase complex, phosphorylates LARP1 and releases it from 5'TOP mRNAs. This leads to the EIF4F assembly since mTORC1 also controls phosphorylation of 4E-BP1, thereby allowing eIF4G to bind to eIF4E and recruit the 43S complex (67–69). In contrast to RP-mRNAs which presents a possible downstream regulatory mechanism in mammals, histones mRNAs are upstream regulated by phosphorylation of the stem-loop-binding protein (SLBP) which binds the stem loop structure in 3' UTR (70, 71). Different RNA-binding protein binds to cis-acting elements in 3' UTRs and regulates mRNA translation. This regulation occurs by targeting the mRNA cap structure, eIF4E-eIF4G complex, ribosomes, and the poly(A) tail. In *T. brucei*, it was found sequences in 3' UTR that regulate the mRNA degradation as AU-rich elements (6). In bloodstream forms, ZC3H11 is bound to these mRNA elements, and recruits PABP via MKT1 and PBP1, which is a possible mechanism for mRNA stabilization (72).

RP-mRNAs are transported from the nucleus to the cytoplasm for immediate translation, storage or degradation. In *T. brucei*, RBP23 is localized within the cytoplasm with a reticulated distribution (73). In the cytoplasm, RBP23 recognizes the RP-mRNA probably through a motif localized in 3' UTR, since its 5' UTRs in *Leishmania* do not have TOP sequences as mammals and are also very small-sized. Other organisms with short UTRs have found solutions to activate translation. For example, mRNAs of *Giardia lamblia* which has even shorter UTRs (74) and missing initiation translation factors as eIF4G (75). Thus, factors present as eIF4E2 (one of the two homologues of *Giardia*) and eIF4A interact directly with components of the pre-initiation complex (PIC), eIF2beta and eIF3i, respectively, to facilitate the initiation of translation (76). Some of the hypothetical proteins found co-precipitated with RBP23 may aid in their function or in the translation process itself. LINF\_180008000 containing a NTF2 domain, commonly found in GTPase activating proteins that can stimulate the transport of proteins from the cytoplasm to the nucleus (77, 78). LINF\_050009500, structurally similar to SKP1 protein, a component of the ubiquitin ligase complex that signals through the ubiquitination of target proteins the degradation by the proteasome (79, 80). In *T. brucei*, the most enriched proteins co-precipitated with PABP1 are EIF4G3, EIF4E4, PABP1, RBP23, ZC3H41 and the

hypothetical protein Tb927.7.7460 (LINF\_050009500 homologue) (34). At least, the strong association between LINF\_050009500 with RBP23 and partner proteins, suggesting a critical function, perhaps mediating the specific binding of RBP23 to PABP1. After RBP23 interacts with the 3'UTR motif in the ribosomal protein mRNA, bind to PABP1 recruiting the EIF4E4-EIF4G3 complex. The association between RBP23 and the CCR4-NOT components may indicate that RBP23 could remain bound to mRNA even after translation initiation. Many RBPs bound to 3'UTR of mRNAs can associate with deadenylases complex as CCR4-NOT to enhance deadenylation (81). This complex is an important regulator during all gene expression pathways, interacting with transcription and translation activator and repressor factors and promoting mRNA decay (82). Furthermore, both RBP23 and DRBD2 together with PABPs and Alba 2 protein were co-purified with TSR1 which is involved in splicing regulation, mRNA stability, and rRNA processing (83). The data highlights the importance of these proteins in the mRNA regulation process.

4º (e talvez 5º) parágrafo Aqui vai a parte da DRBD2 e seus possíveis papéis, lembrando a ligação a proteínas mitocondriais, mas de localização diferente??? Lembrar de falar sobre o artigo recente da DRBD2 de cruzi, do pessoal do Paraná.

In contrast to RBP23, DRBD2 has been shown to repress translation when tethered to a reporter mRNA (60, 61) and phosphorylated in *T. cruzi* (84). In procyclic, no increase in ZC3H11, a stress-response RNA-binding protein, was observed during DRBD2 RNAi, which means that possibly the lack of DRBD2 does not disturb the cell so that ZC3H41 is not required (85). This protein is located in the cytoplasm distributed irregularly or in the form of points with more intense signal near the nucleus (73). In *L. infantum*, different DRBD2 isoforms were expressed in both amastigote and promastigote stages, but were found to interact with *L. infantum* Alba1 and Alba3 specifically only in amastigotes form through mass spectrometry analysis (38, 86). In contrast to PABP1, PABP2 (*T. brucei* and *L. major*) and PABP3 (*L. major*), migrate to the nucleus upon inhibition of transcription by Actinomycin D (26, 27) which may indicate a possible nuclear function. As in *T. brucei* DRBD3, a stabilizing protein, which is localized mainly in the cytoplasm but under oxidative stress remains bound to mRNA and concentrates in the nucleus, a typical behavior of a protein that transports target mRNAs (87). In *T. brucei*, DRBD2 was found distributed accumulated in perinuclear region (73) then the next step will be to

evaluate these proteins in presence of inhibitors. Due the localization of DRBD2, we believe that maybe it will migrate to nucleus as well as PABP2, correlating the function of both proteins.

In *T. cruzi*, DRBD2 mass spectrometry also interacted with PABP2, ZC3H40, MRP2, Hel67 and a RNA-binding and NFT2-like (LINF\_210009700 homolog) protein (88). In *T. brucei*, DRBD2 and two partner protein orthologues, RBP12 and the hypothetical protein Tb927.1.670 (LINF\_200005800 homolog), are described as translation repressors while other two partners, PABP2 and PUF6 are both activators of translation (60, 61). The latter (PUF6), however, is a translation repressor in *Saccharomyces cerevisiae* (89) and is involved in retroposon-mediated mRNA decay in *Leishmania* (90). This may indicate that DRBD2 also acts in different complexes with different functions. As well as two other partners ZC3H39/40 which are both activators and repressors of translation (60, 61). Beside that, almost 40% of proteins found associated with DRBD2 were mitochondrial proteins belonging to different mitochondrial RNA processing complexes. RNA-editing substrate-binding complex or RESC (GAP1/2 GRBC5/6, REMC1/5, MRB4150, RGG2, PAMC1/3 and MERS3) is responsible for coordinating pre- and postediting processing events and recruits 5' (MERS1/2) and 3' (KPAF1) modification complexes and auxiliary factors (MRP1/2, RGG1 and MRB1590) (91). This suggests a possible mitochondrial function for DRBD2.

About other partners, RBP43, also known as G1-IP2, interacts through its RRM-domain with EIF4G1 homologue which also interacts with PABP2 and a protein that may be involved in capping (5). PAN3 facilitates efficient mRNA recruitment and deadenylation in PAN2-PAN3 complex (92). *T. brucei* ZC3H39/40 were detected as regulators of the respiratome, or the mitochondrial complexes I-V (93). *T. brucei* ZC3H34 is phosphorylated (94) and arginine-methylated (95). *T. cruzi* ZC3H31 is sumoylated (96) and its knockout prevents differentiation in the parasitic infectious form (97). Both *T. brucei* ZC3H31/34 and Tb927.10.2240 (LINF\_210009700 homolog) interact with MKT1, a post-transcriptional regulatory factor (72). LINF\_210009700 is a conserved hypothetical protein homologue of Tb927.10.2240, an RNA-binding protein and a putative nuclear transport factor which interacts with DRBD3 (87).

Surprisingly, RBP23 co-precipitated with its own mRNA. RBP23 binds to both the native and HA-tagged protein mRNA (Supplementary Figure 5), which exclude

the precipitation of a nascent protein with the anti-HA antibody but suggests possible dimerization. It also excludes the binding to the UTR of the native mRNA, since the native mRNA of RBP23 does not have the elements of pyrimidines found in the other mRNAs (Figure 6C), so RBP23 may be undergoing a process of autoregulation. Similar to what happens with *S. cerevisiae* 4E-BP protein as known as the Caf20p (a translation repressor) which also interacts with its own transcript, may representing an auto regulatory mechanism (66). As observed *in vitro* studies for PABP binding to the adenylated tract present in the 5'UTR of its mRNA, which is necessary and sufficient to represses its own synthesis, supporting a model of autoregulation (98).

The results achieved with the proposed experiments help to better outline important aspects of the gene expression control and protein synthesis in protozoa so important for world public health.

## FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) [APQ-0239-2.02/12]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [475471/2008-3, 480899/2013-4]; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [23038.007656/2011-92].

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the members of Dr. de Melo Neto's laboratories for helpful discussions and technical assistance. The authors thank the Program for Technical Development of Health Inputs-PDTIS-FIOCRUZ for the funding and use of the automatic sequencing facility at the Instituto Aggeu Magalhães and the proteomics facility at the Instituto Carlos Chagas.

## REFERENCES

1. Haile,S. and Papadopoulou,B. (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.*, **10**, 569–577.
2. Jackson,A.P. (2015) Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology*, **142**, S40–S56.

3. Gaudenzi,J.G. De, Noé,G., Campo,V.A. and Frasch,A.C. (2011) Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.*, 10.1042/BSE0510031.
4. Clayton,C. and Shapira,M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **156**, 93–101.
5. Clayton,C. (2019) Regulation of gene expression in trypanosomatids : living with polycistronic transcription. *R. Soc. Publ.*
6. Kramer,S. and Carrington,M. (2011) Trans -acting proteins regulating mRNA maturation , stability and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitol.*, **27**, 23–30.
7. Müller-McNicoll,M. and Neugebauer,K.M. (2013) How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes. *TL* - 14. *Nat. Rev. Genet.*, **14** VN-r, 275–287.
8. Glisovic,T., Bachorik,J.L., Yong,J. and Dreyfuss,G. (2008) {RNA}-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett.*, **582**, 1977–1986.
9. Hogan,D.J., Riordan,D.P., Gerber,A.P., Herschlag,D. and Brown,P.O. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol.*, **6**, 2297–2313.
10. Clayton,C. (2013) The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. *PLOS Pathog.* /, **9**, 9–12.
11. Kolev,N.G., Ullu,E. and Tschudi,C. (2014) The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Cell. Microbiol.*, **16**, 482–489.
12. Oliveira,C., Faoro,H., Alves,L.R. and Goldenberg,S. (2017) RNA-binding proteins and their role in the regulation of gene expression in *trypanosoma cruzi* and *saccharomyces cerevisiae*. *Genet. Mol. Biol.*, **40**, 22–30.
13. Romagnoli,B.A.A., Holetz,F.B., Alves,L.R. and Goldenberg,S. (2020) RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 1–17.

14. Nandan,D., Thomas,S.A., Nguyen,A., Moon,K.M., Foster,L.J. and Reiner,N.E. (2017) Comprehensive identification of mRNABinding proteins of Leishmania donovani by interactome capture. *PLoS One*, **12**, 1–16.
15. Najafabadi,H.S., Lu,Z., MacPherson,C., Mehta,V., Adoue,V., Pastinen,T. and Salavati,R. (2013) Global identification of conserved post-transcriptional regulatory programs in trypanosomatids. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 8591–8600.
16. Goos,C., Dejung,M., Wehman,A.M., M-Natus,E., Schmidt,J., Sunter,J., Engstler,M., Butter,F. and Kramer,S. (2019) Trypanosomes can initiate nuclear export co-transcriptionally. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 266–282.
17. Romaniuk,M.A., Cervini,G. and Cassola,A. (2016) Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. *World J. Biol. Chem.*, **7**, 146–57.
18. Eliseeva,I.A., Lyabin,D.N. and Ovchinnikov,L.P. (2013) Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochem. Biokhimiâ*, **78**, 1377–91.
19. Goss,D.J. and Kleiman,F.E. (2013) Poly(A) binding proteins: Are they all created equal? *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **4**, 167–179.
20. Nicholson,A.L. and Pasquinelli,A.E. (2019) Tales of Detailed Poly(A) Tails. *Trends Cell Biol.*, **29**, 191–200.
21. Kahvejian,A., Roy,G. and Sonenberg,N. (2001) The mRNA closed-loop model: The function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **66**, 293–300.
22. Gallie,D.R. (2014) The role of the poly (A) binding protein in the assembly of the cap-binding complex during translation initiation in plants. *Translation*, **0731**, 1–14.
23. Wigington,C.P., Williams,K.R., Meers,M.P., Bassell,G.J. and Corbett,A.H. (2014) Poly(A) RNA Binding Proteins and Polyadenosine RNA: New Members and Novel Functions. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 601–622.
24. Huntzinger,E., Kuzuoğlu-Öztürk,D., Braun,J.E., Eulalio,A., Wohlbold,L. and Izaurrealde,E. (2013) The interactions of GW182 proteins with PABP and

- deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 978–994.
25. Yi,H., Park,J., Ha,M., Lim,J., Chang,H. and Kim,V.N. (2018) PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Mol. Cell*, **70**, 1081-1088.e5.
26. Tamara,D., Lima,C., Moura,D.M.N., Reis,C.R.S., Vasconcelos,J.R.C., Ellis,L., Carrington,M., Figueiredo,R.C.B.Q. and Neto,O.P.D.M. (2010) Functional Characterization of Three Leishmania Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. *Eukaryot. Cell*, **9**, 1484–1494.
27. Kramer,S., Bannerman-chukualim,B., Ellis,L., Boulden,E.A., Kelly,S., Field,M.C. and Carrington,M. (2013) 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*, **8**.
28. Merrick,W.C. (2015) eIF4F: A retrospective. *J. Biol. Chem.*, **290**, 24091–24099.
29. Freire,E.R., Sturm,N.R., Campbell,D.A. and Neto,O.P.D.M. (2017) The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. 10.3390/pathogens6040055.
30. Danielle MN Moura, Christian RS Reis, Camila C Xavier, Tamara D da Costa Lima, Rodrigo P Lima, Mark Carrington,O.P. de M.N. (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol.*, **12**, 37–41.
31. De Melo Neto,O.P., Da Costa Lima,T.D.C., Xavier,C.C., Nascimento,L.M., Romão,T.P., Assis,L. a., Pereira,M.M.C., Reis,C.R.S. and Papadopoulou,B. (2015) The unique Leishmania EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA Biol.*, **12**, 1209–1221.
32. De Melo Neto,O.P., da Costa Lima,T.D.C., Merlo,K.C., Romão,T.P., Rocha,P.O., Assis,L.A., Nascimento,L.M., Xavier,C.C., Rezende,A.M., Reis,C.R.S., et al. (2018)

Phosphorylation and interactions associated with the control of the Leishmania Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. *RNA Biol.*, **15**, 739–755.

33. dos Santos Rodrigues,F.H., Firczuk,H., Breeze,A.L., Cameron,A.D., Walko,M., Wilson,A.J., Zanchin,N.I.T. and McCarthy,J.E.G. (2018) The Leishmania PABP1-eIF4E4 interface: a novel 5'-3' interaction architecture for trans-spliced mRNAs . *Nucleic Acids Res.*, **47**, 1493–1504.
34. Zoltner,M., Krienitz,N., Field,M.C. and Kramer,S. (2018) Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **0**, 1–18.
35. Padmanabhan,P.K., Dumas,C., Samant,M., Rochette,A., Simard,M.J. and Papadopoulou,B. (2012) Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan Leishmania. *PLoS One*, **7**.
36. Dhalia,R., Reis,C.R.S., Freire,E.R., Rocha,P.O., Katz,R., Muniz,R.C., Standart,N. and Melo,O.P. De (2005) Translation initiation in Leishmania major: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **140**, 23–41.
37. Mureev,S., Kovtun,O., Nguyen,U.T.T. and Alexandrov,K. (2009) Species-independent translational leaders facilitate cell-free expression. *Nat. Biotechnol.*, **27**, 747–752.
38. Dupé,A., Dumas,C. and Papadopoulou,B. (2015) Differential subcellular localization of leishmania alba-domain proteins throughout the parasite development. *PLoS One*, **10**, 1–29.
39. Rezende,A.M., Assis,L.A., Nunes,E.C., da Costa Lima,T.D., Marchini,F.K., Freire,E.R., Reis,C.R. and de Melo Neto,O.P. (2014) The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates--identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. *BMC Genomics*, **15**, 1175.
40. Kelley,L., Mezulis,S., Yates,C., Wass,M. and Sternberg,M. (2015) The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. *Nat. Protoc.*, **10**, 845–858.

41. Bailey, Timothy L.; Elkan,C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. In *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI press, Menlo Park, California, pp. 28–36.
42. David,M., Dzamba,M., Lister,D., Ilie,L. and Brudno,M. (2011) SHRiMP2: Sensitive yet practical short read mapping. *Bioinformatics*, **27**, 1011–1012.
43. Robinson,M.D., McCarthy,D.J. and Smyth,G.K. (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, **26**, 139–140.
44. Gentleman RC,C. V, Bates,D.M., Bolstad,B., Dettling,M., Dudoit,S., Ellis,B., Gautier,L., Ge,Y., Gentry,J., Hornik,K., et al. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*, **5**.
45. Bolger,A.M., Lohse,M. and Usadel,B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114–2120.
46. Dobin,A., Davis,C.A., Schlesinger,F., Drenkow,J., Zaleski,C., Jha,S., Batut,P., Chaisson,M. and Gingeras,T.R. (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, **29**, 15–21.
47. Afgan,E., Baker,D., Batut,B., Van Den Beek,M., Bouvier,D., Ech,M., Chilton,J., Clements,D., Coraor,N., Grüning,B.A., et al. (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.*, **46**, W537–W544.
48. Langmead,B. and Salzberg,S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, **9**, 357–9.
49. Robinson,J.T., Thorvaldsdóttir,H., Winckler,W., Guttman,M., Lander,E.S., Getz,G. and Mesirov,J.P. (2011) Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.*, **29**, 24–26.
50. Robinson,J.T., Thorvaldsdóttir,H., Wenger,A.M., Zehir,A. and Mesirov,J.P. (2017) Variant review with the integrative genomics viewer. *Cancer Res.*, **77**, e31–e34.
51. Bates,E.J., Knuepfer,E. and Smith,D.F. (2000) Poly(A)-binding protein I of

- Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1211–1220.
52. Gaudenzi,J. De, Frasch,A.C. and Clayton,C. (2005) RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids : a Comparative Analysis RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids : a Comparative Analysis †. *Eukaryot. Cell*, **4**, 2106–2114.
53. Fisk,J.C. and Read,L.K. (2011) Protein arginine methylation in parasitic protozoa. *Eukaryot. Cell*, **10**, 1013–1022.
54. Camacho,E., González-de la Fuente,S., Rastrojo,A., Peiró-Pastor,R., Solana,J.C., Tabera,L., Gamarro,F., Carrasco-Ramiro,F., Requena,J.M. and Aguado,B. (2019) Complete assembly of the Leishmania donovani (HU3 strain) genome and transcriptome annotation. *Sci. Rep.*, **9**, 1–15.
55. Noé,G., Gaudenzi,J. De and Frasch,A.C. (2008) Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol. Biol.*, **9**, 1–19.
56. Jensen,B.C., Ramasamy,G., Vasconcelos,E.J.R., Ingolia,N.T., Myler,P.J. and Parsons,M. (2014) Extensive stage-regulation of translation revealed by ribosome profiling of Trypanosoma brucei. *BMC Genomics*, **15**, 911.
57. Wurst,M., Robles,A., Po,J., Luu,V.D., Brems,S., Marentje,M., Stoitsova,S., Quijada,L., Hoheisel,J., Stewart,M., et al. (2009) An RNAi screen of the RRM-domain proteins of Trypanosoma brucei. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **163**, 61–65.
58. Alsfeld,S., Turner,D.J., Obado,S.O., Sanchez-flores,A., Glover,L., Berriman,M., Hertz-fowler,C. and Horn,D. (2011) High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.*, **21**, 915–924.
59. Rosenzweig,D., Smith,D., Opperdoes,F., Stern,S., Olafson,R.W. and Zilberstein,D. (2008) Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB J.*, **22**, 590–602.
60. Erben,E.D., Fadda,A., Lueong,S., Hoheisel,J.D. and Clayton,C. (2014) A

Genome-Wide Tethering Screen Reveals Novel Potential Post-Transcriptional Regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog.*, **10**.

61. Lueong,S., Merce,C., Fischer,B., Hoheisel,J.D. and Erben,E.D. (2016) Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei* : insights into the role of the mRNA-binding proteome. *Mol. Microbiol.*, **100**, 457–471.
62. Klein,C., Terra,M., Gil,D.I. and Clayton,C. (2015) Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with initiation factors and RNA-binding proteins. *PLoS One*, **10**, 1–12.
63. An,T., Liu,Y., Gourguechon,S., Wang,C.C. and Li,Z. (2018) CDK Phosphorylation of Translation Initiation Factors Couples Protein Translation with Cell-Cycle Transition. *Cell Rep.*, **25**, 3204–3214.e5.
64. Wapinski,I., Pfiffner,J., French,C., Socha,A., Thompson,D.A. and Regev,A. (2010) Gene duplication and the evolution of ribosomal protein gene regulation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 5505–5510.
65. Mayer,C. and Grummt,I. (2006) Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, **25**, 6384–6391.
66. Costello,J., Castelli,L.M., Rowe,W., Kershaw,C.J., Talavera,D., Mohammad-Qureshi,S.S., Sims,P.F.G., Grant,C.M., Pavitt,G.D., Hubbard,S.J., et al. (2015) Global mRNA selection mechanisms for translation initiation. *Genome Biol.*, **16**, 1–21.
67. Fonseca,B.D., Zakaria,C., Jia,J.J., Graber,T.E., Svitkin,Y., Tahmasebi,S., Healy,D., Hoang,H.D., Jensen,J.M., Diao,I.T., et al. (2015) La-related protein 1 (LARP1) represses terminal oligopyrimidine (TOP) mRNA translation downstream of mTOR complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.*, **290**, 15996–16020.
68. Philippe,L., Vasseur,J.J., Debart,F. and Thoreen,C.C. (2018) La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Res.*, **46**, 1457–1469.

69. Fonseca,B.D., Lahr,R.M., Damgaard,C.K., Alain,T. and Berman,A.J. (2018) LARP1 on TOP of ribosome production. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **9**, 1–16.
70. Marzluff,W.F., Wagner,E.J. and Duronio,R.J. (2009) Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet.*, **9**, 843–854.
71. Zhang,J., Tan,D., DeRose,E.F., Perera,L., Dominski,Z., Marzluff,W.F., Tong,L. and Hall,T.M.T. (2014) Molecular mechanisms for the regulation of histone mRNA stem-loop-binding protein by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, E2937–E2946.
72. Singh,A., Minia,I., Droll,D., Fadda,A. and Clayton,C. (2014) Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11 : interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 4652–4668.
73. Dean,S., Sunter,J.D. and Wheeler,R.J. (2017) TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. *Trends Parasitol.*, **33**, 80–82.
74. Adam,R.D. (2001) Biology of Giardia lamblia. *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 447–475.
75. Li,L. and Wang,C.C. (2004) Capped mRNA with a Single Nucleotide Leader Is Optimally Translated in a Primitive Eukaryote, Giardia lamblia. *J. Biol. Chem.*, **279**, 14656–14664.
76. Adedoja,A.N., McMahan,T., Neal,J.P., Hamal Dhakal,S., Jois,S., Romo,D., Hull,K. and Garlapati,S. (2020) Translation initiation factors GleIF4E2 and GleIF4A can interact directly with the components of the pre-initiation complex to facilitate translation initiation in Giardia lamblia. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **236**, 111258.
77. Lui,K. and Huang,Y. (2009) RanGTPase: A Key Regulator of Nucleocytoplasmic Trafficking. *Mol. Cell. Pharmacol.*, **1**, 148–156.
78. Chafe,S.C., Pierce,J.B. and Mangroo,D. (2012) Nuclear-cytoplasmic trafficking of NTF2, the nuclear import receptor for the RanGTPase, is subjected to regulation. *PLoS One*, **7**.
79. Sakamoto,K.M., Kim,K.B., Kumagai,A., Mercurio,F., Crews,C.M. and Deshaies,R.J. (2001) Protacs: Chimeric molecules that target proteins to the Skp1-

- Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 8554–8559.
80. Zheng,N., Wang,Z. and Wei,W. (2016) Ubiquitination-mediated degradation of cell cycle-related proteins by F-box proteins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **73**, 99–110.
81. Takeuchi,O. and Yamashita,A. (2017) Translational control of mRNAs by 3'-Untranslated region binding proteins. *BMB Rep.*, **50**, 194–200.
82. Collart,M.A. (2016) The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *WIREs RNA*, **7**.
83. Gupta,S.K., Chikne,V., Eliaz,D., Tkacz,I.D., Naboishchikov,I., Carmi,S., Waldman Ben-Asher,H. and Michaeli,S. (2014) Two splicing factors carrying serine-arginine motifs, TSR1 and TSR1IP, regulate splicing, mRNA stability, and rRNA processing in *Trypanosoma brucei*. *RNA Biol.*, **11**, 715–731.
84. Marchini,F.K., de Godoy,L.M.F., Rampazzo,R.C.P., Pavoni,D.P., Probst,C.M., Gnad,F., Mann,M. and Krieger,M.A. (2011) Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. *PLoS One*, **6**.
85. Minia,I. and Clayton,C. (2016) Regulating a Post-Transcriptional Regulator: Protein Phosphorylation, Degradation and Translational Blockage in Control of the Trypanosome Stress-Response RNA-Binding Protein ZC3H11. *PLoS Pathog.*, **12**, 1–31.
86. Brotherton,M., Racine,G., Foucher,A.L., Drummelsmith,J., Papadopoulou,B. and Ouellette,M. (2010) Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum* research articles. *J. Proteome Res.*, **9**, 3842–3853.
87. Fernández-Moya,S.M., García-Pérez,A., Kramer,S., Carrington,M. and Estévez,A.M. (2012) Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One*, **7**, 1–10.
88. Wippel,H.H., Malgarin,J.S., Inoue,A.H., Leprevost,V., Carvalho,P.C., Goldenberg,S. and Alves,L.R. (2019) Unveiling the partners of the DRBD2-mRNP complex , an RBP in *Trypanosoma cruzi* and ortholog to the yeast SR-protein Gbp2.

BMC Microbiol.

89. Shahbabian,K., Jeronimo,C., Forget,A., Robert,F. and Chartrand,P. (2014) Co-transcriptional recruitment of Puf6 by She2 couples translational repression to mRNA localization. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 8692–8704.
90. Azizi,H., Dumas,C. and Papadopoulou,B. (2017) The Pumilio-domain protein PUF6 contributes to SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay in Leishmania. *RNA J.*, 10.1261/rna.062950.117.
91. Aphasizheva,I., Alfonzo,J., Carnes,J., Cestari,I., Cruz-Reyes,J., Göringer,H.U., Hajduk,S., Lukeš,J., Madison-Antenucci,S., Maslov,D.A., et al. (2020) Lexis and Grammar of Mitochondrial RNA Processing in Trypanosomes. *Trends Parasitol.*, **36**, 337–355.
92. Wolf,J., Valkov,E., Allen,M.D., Meineke,B., Gordiyenko,Y., McLaughlin,S.H., Olsen,T.M., Robinson,C. V, Bycroft,M., Stewart,M., et al. (2014) Structural basis for P an3 binding to P an2 and its function in mRNA recruitment and deadenylation . *EMBO J.*, **33**, 1514–1526.
93. Trenaman,A., Glover,L., Hutchinson,S. and Horn,D. (2019) A post-transcriptional respiratome regulon in trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 25–28.
94. Urbaniak,M.D., Martin,D.M.A. and Ferguson,M.A.J. (2013) Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of Trypanosoma brucei. *J. Proteome Res.*, **12**, 2233–2244.
95. Lott,K., Li,J., Fisk,J.C., Wang,H., Aletta,J.M., Qu,J. and Read,L.K. (2013) Global Proteomic Analysis in Trypanosomes Reveals Unique Proteins and Conserved Cellular Processes Impacted by Arginine Methylation. *J Proteomics*, **91**, 210–225.
96. Bayona,J.C., Nakayasu,E.S., Laverrière,M., Aguilar,C., Sobreira,T.J.P., Choi,H., Nesvizhskii,A.I., Almeida,I.C., Cazzulo,J.J. and Alvarez,V.E. (2011) SUMOylation pathway in Trypanosoma cruzi: Functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol. Cell. Proteomics*, **10**, 1–13.

97. Alcantara,M.V., Kessler,R.L., Gonçalves,R.E.G., Marliére,N.P., Guarneri,A.A., Picchi,G.F.A. and Fragoso,S.P. (2018) Knockout of the CCCH zinc finger protein TcZC3H31 blocks *Trypanosoma cruzi* differentiation into the infective metacyclic form. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **221**, 1–9.
98. De Melo Neto,O.P., Standart,N. and De Sa,C.M. (1995) Autoregulation of poly(A)-binding protein synthesis in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2198–2205.
99. de Melo Neto,O.P., da Costa Lima,T.D., Merlo,K.C., Romão,T.P., Rocha,P.O., Assis,L.A., Nascimento,L.M., Xavier,C.C., Rezende,A.M., Reis,C.R.S., et al. (2018) Phosphorylation and interactions associated with the control of the Leishmania Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. *RNA Biol.*, **15**, 739–755.

Table 1. Summary of relevant proteins co-purifying with HA-tagged PABPs\*

Name	TriTrypDB ID	TP-SP <sup>a</sup>		PABP1		PABP2		PABP3	
<b>Translation initiation complex</b>									
PABP1	LINF_350055900	26	25	22	10	4	0	-	0
PABP2	LINF_350047100	2	2	1	2	30	17	15	9
PABP3	LINF_250005800	-	0	-	0	7	0	9	5
EIF4E4	LINF_300009600	3	2	2	0	1	0	-	0
EIF4AI	LINF_010012900	2	3	2	8	-	6	-	7
<b>RNA-binding proteins</b>									
RBP23	LINF_170011800	3	5	5	0	-	0	-	0
DRBD2	LINF_350027200	-	0	-	0	4	5	-	0
DRBD3	LINF_040016900	1	-	1	-	-	-	-	-
NRBD	LINF_320013000	-	-	-	-	3	-	1	-
MRP2	LINF_090018500	-	-	-	-	2	-	-	-
ZC3H41	LINF_270019700	5	1	6	2	10	0	4	0
NTF2 and RRM domain	LINF_180008000	4	5	1	0	-	0	0	0

\*RBPs are shown differentially co-immunoprecipitated with PABP1 and PABP2/3 in two independent immunoprecipitation (IP) assays. The values are the hits of proteins bound for each PABP. Only proteins identified with >1 peptide and a probability of >80.0% were considered. <sup>a</sup>TP-SP: PABP1 phosphorylation mutant.

Table 2. Proteins co-purifying with HA-tagged RBP23\*

Name	TritrypDB ID	Average intensity	Ratio>4
<b>Translation initiation complex</b>			
→PABP1	LINF_350055900	1.39E+09	66.01
→EIF4G3	LINF_160022100	8.29E+07	25.39
→EIF4E4	LINF_300009600	7.52E+07	129.78
EIF3G	LINF_340033000	2.87E+07	4.28
EIF4E1	LINF_270023100	1.65E+06	4.81
<b>RNA-binding proteins</b>			
→RBP23	LINF_170011800	7.57E+08	291.09
→ZC3H41	LINF_270019700	6.45E+08	10.09
PPR	LINF_210020800	4.20E+07	16.41
MRB1AP	LINF_110015300	2.00E+07	36.82
TRRM2	LINF_300016700	6.78E+06	7.81
ZMYND	LINF_310023900	4.65E+06	4.63
RBP7	LINF_310036300	1.44E+06	5.17
<b>Polyadenylation and Deadenylation</b>			
CNOT10	LINF_360070900	1.40E+08	7.86
CNOT11	LINF_230005100	6.53E+07	7.32
CAF1	LINF_220022600	3.95E+07	10.72
<b>PAP regulatory subunit</b>			
PPB1	LINF_240005900	3.29E+06	11.85
<b>Other RNA-binding proteins</b>			
→Protein with NFT2 and RRM domains	LINF_180008000	7.44E+07	23.88
STRAP	LINF_270018900	5.20E+07	6.11
<b>Enzymes</b>			
CPS	LINF_160011200	2.51E+07	21.79
Y-ECS	LINF_180022300	5.01E+06	11.00
DHFR-TS	LINF_060014300	2.96E+06	5.95
<b>Intracellular transport and cell motility</b>			
DNM1	LINF_290029700	3.82E+07	4.97
DHC	LINF_230022400	2.62E+06	∞
<b>SNF7 Family protein</b>			
Vps24	LINF_330027600	2.33E+06	265.39
Rab11	LINF_360043000	2.17E+06	4.10
RabX1	LINF_100015800	2.09E+06	5.72
<b>Uncharacterized proteins</b>			
-	LINF_040006400	9.00E+07	15.62
→Skp1-like	LINF_050009500	3.52E+07	10.62
-	LINF_110013800	3.45E+07	4.06
-	LINF_200021500	3.37E+07	81.43
-	LINF_190005100	2.94E+07	10.27
-	LINF_310020800	1.78E+07	13.69
-	LINF_080013100	1.40E+07	11.66
-	LINF_260021000	4.12E+06	12.25
-	LINF_330014600	2.78E+06	5.81
-	LINF_360018200	2.68E+06	9.01
-	LINF_330010200	2.14E+06	6.51
-	LINF_250013900	1.68E+06	∞
-	LINF_240010700	1.43E+06	5.93

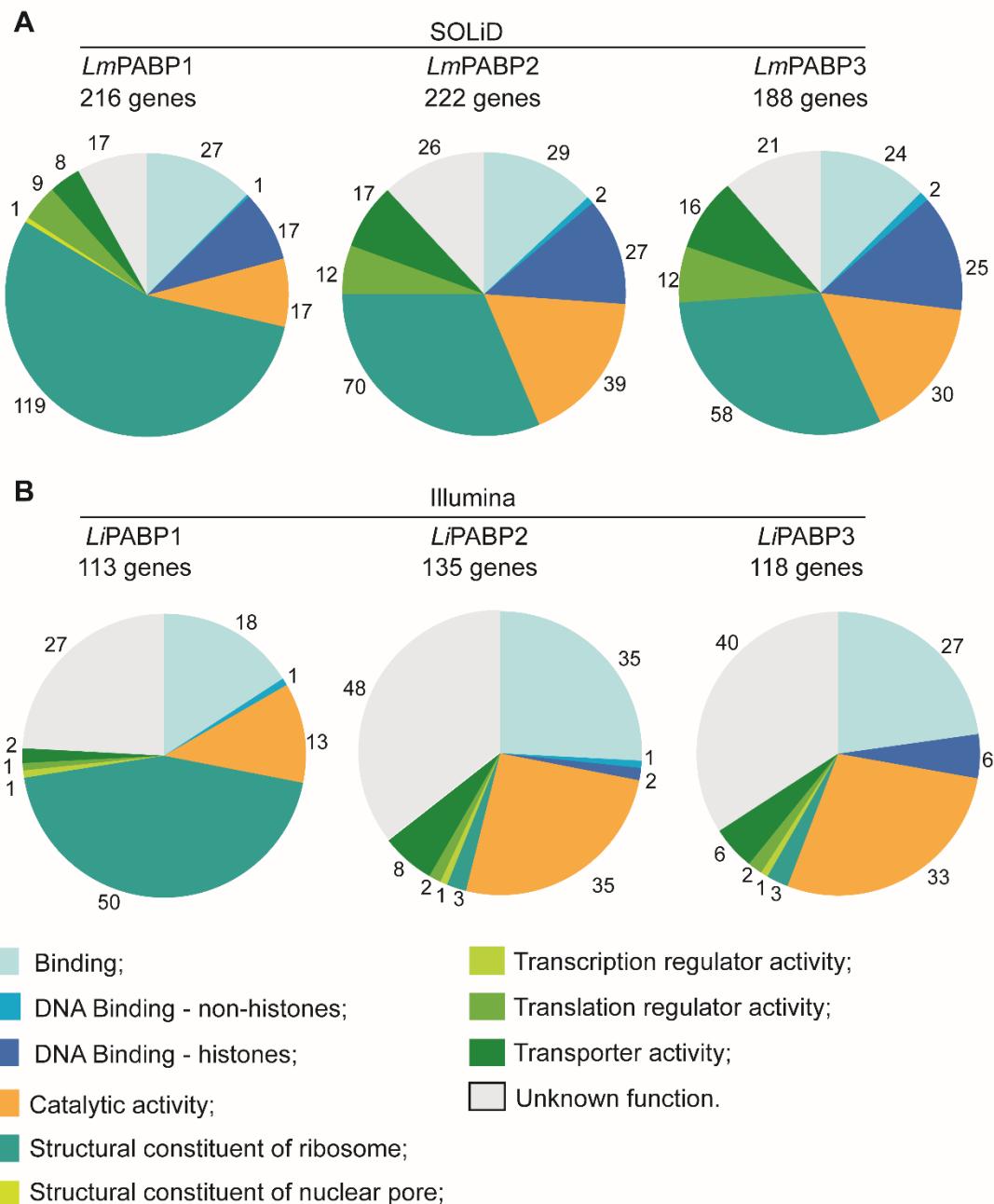
\*40 polypeptides are shown which specifically co-immunoprecipitated with the HA-tagged RBP23 in two independent immunoprecipitation experiments, with a minimum of 4-fold increase over the negative control (ratio) and with the average intensities up to 1000-fold lower than the highest. Proteins co-purifying with both *L. infantum* HA-tagged PABP1 (de Melo Neto et al., 2018) and RBP23 are indicated by arrows.

Table 3. Proteins co-purifying with HA-tagged DRBD2\*

Name	TritrypDB ID	Average intensity	Ratio>4
<b>Translation initiation complex</b>			
→PABP2	LINF_350047100	7.44E+08	12.45
PABP3	LINF_250005800	1.35E+08	13.95
EIF4G3	LINF_160022100	1.94E+07	4.45
<b>RNA-binding proteins</b>			
→DRBD2	LINF_350027200	3.68E+09	110.30
ZC3H41	LINF_270019700	2.46E+08	4.69
RBP with NTF2 domain	LINF_210009700	1.58E+08	13.15
ZC3H39	LINF_190007800	1.01E+08	63.35
→ZC3H40	LINF_190007900	8.78E+07	44.40
PUF6	LINF_330019100	4.94E+07	15.58
ZC3H31	LINF_360013000	4.18E+07	11.02
RBP43	LINF_250008000	3.11E+07	13.62
RBP12	LINF_180010900	2.67E+07	7.15
TRRM1	LINF_270028100	1.53E+07	4.84
TRRM2	LINF_300016700	1.31E+07	4.68
PAN3	LINF_320012700	7.14E+06	6.02
RBP23	LINF_170011800	6.55E+06	4.85
ZC3H34	LINF_310005700	4.11E+06	5.95
<b>Mitochondrial RNA-binding proteins</b>			
→MRP2	LINF_090018500	8.25E+07	16.51
KPAF1	LINF_180005000	7.68E+07	38.84
MRP1	LINF_270017500	3.76E+07	11.72
MERS2	LINF_280005300	3.54E+07	34.51
GAP2	LINF_220011900	3.18E+07	44.35
REMC5	LINF_310012100	2.10E+07	14.21
GAP1	LINF_330036600	1.92E+07	22.44
MERS1	LINF_320031100	1.73E+07	100.81
GRBC6	LINF_080016600	1.48E+07	8.32
RGG2	LINF_330007800	1.42E+07	26.08
MRB4150	LINF_310012000	1.38E+07	12.86
PAMC1	LINF_200014400	9.91E+06	11.84
REMC1	LINF_360057200	9.18E+06	16.85
GRBC5	LINF_330020200	8.85E+06	15.47
RGG1	LINF_300013200	6.20E+06	11.28
PAMC3	LINF_210011600	5.77E+06	8.34
MRB1590	LINF_250021900	4.64E+06	4.16
MERS3	LINF_360078000	3.81E+06	32.73
<b>RNA Helicases</b>			
→HEL67	LINF_320009100	1.40E+09	7.75
DBP2B	LINF_070008800	3.60E+07	4.92
DDX21	LINF_050006300	2.22E+07	6.97
DEAD/H RNA helicase	LINF_220021200	4.58E+06	4.20
<b>RNA Methytransferases</b>			
mRNA cap (guanine-N7-) -MT	LINF_110010500	3.40E+07	6.23
tRNA(uracil-5-) -MT	LINF_200021600	4.32E+06	7.44
<b>Other enzymes</b>			
PFK	LINF_290032900	4.25E+07	7.58
PAS-PGK	LINF_300039500	5.04E+06	7.09
MO	LINF_060018400	4.35E+06	4.58
ABH	LINF_280021800	3.89E+06	7.85
IMPDH	LINF_190022000	3.65E+06	9.16
<b>Cell motility</b>			
DLC p28	LINF_240013500	1.46E+07	9.51
<b>Uncharacterized proteins</b>			
-	LINF_190005100	3.73E+07	31.44
-	LINF_050009500	1.42E+07	4.42
-	LINF_200005800	6.19E+06	7.11

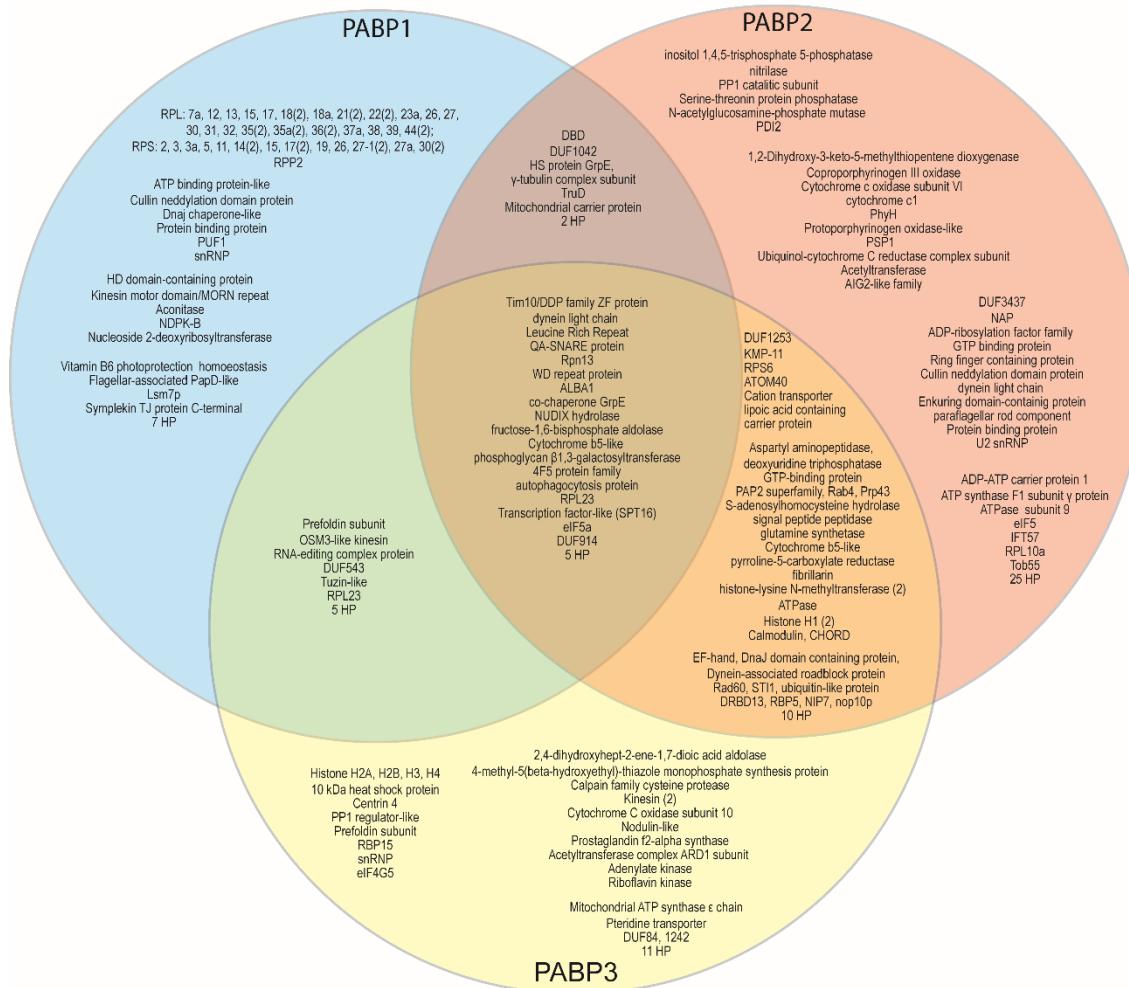
\*49 polypeptides are shown which specifically co-immunoprecipitated with the HA-tagged DRBD2 in two independent immunoprecipitation experiments, with a minimum of 4-fold increase over the negative control (ratio) and with the average intensities up to 1000-fold lower than the highest. Proteins co-purifying with both *T. cruzi* DRBD2 (Wippel et al., 2019) and *L. infantum* HA-tagged DRBD2 are indicated by arrows.

**Assis et al., 2020 - Figure 1**



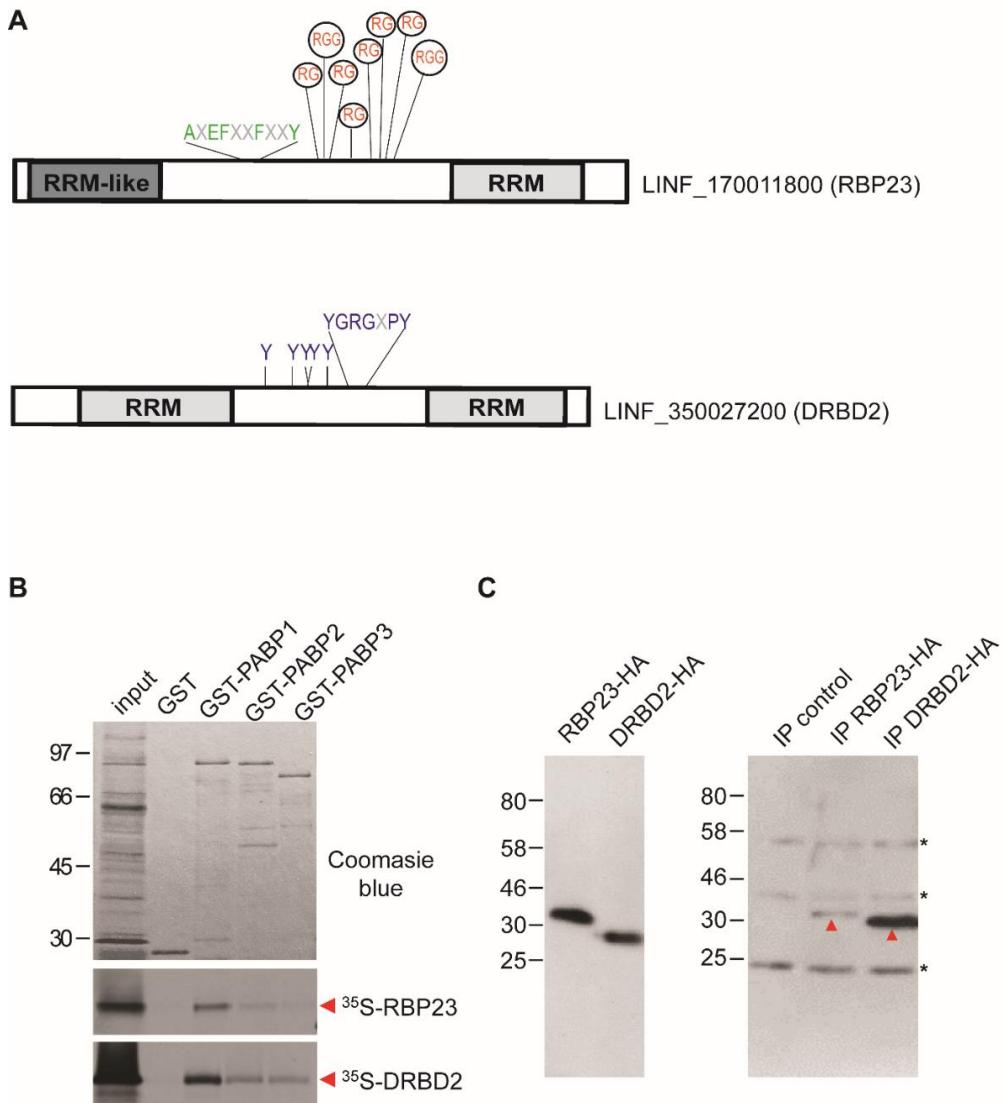
**Figure 1. Analysis of mRNAs populations associated with the three PABPs in *Leishmania* spp.**  
 Upregulated genes in at least two of three available RNA-seq datasets were manually classified and grouped using the gene ontology terms according their molecular function. ‘Upregulated’ means at least twofold more abundant than in the negative control; **A)** mRNAs groups associated to native PABP1, PABP2 and PABP3 from *L. major* (SOLiD); **B)** mRNAs groups associated to recombinant PABP1, PABP2 and PABP3 from *L. infantum* (Illumina).

## Assis et al., 2020 - Figure 2

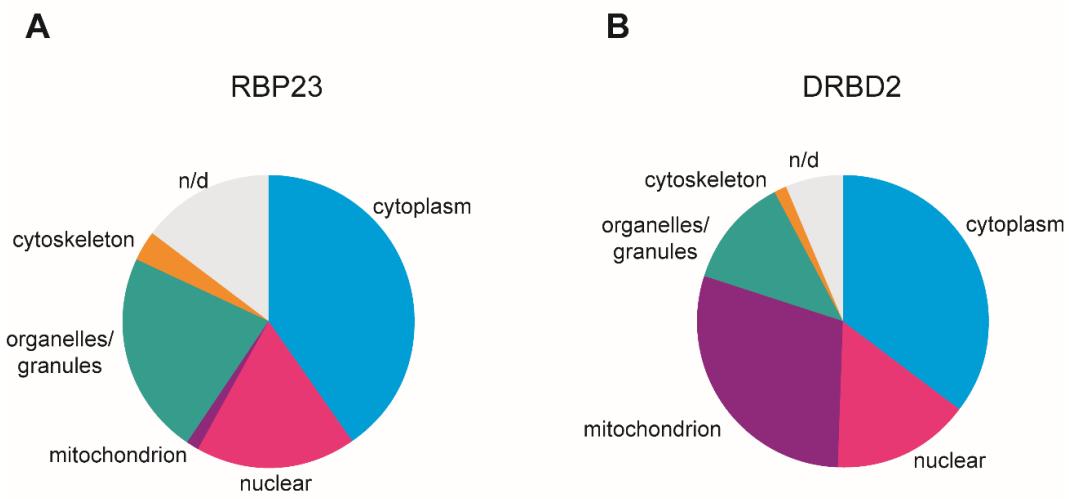


**Figure 2. Comparison of RNAseq dataset of three PABPs of *Leishmania infantum*. The mRNAs associated to each PABP homologue are indicated in a Venn diagram from their respective RNAseq datasets.**

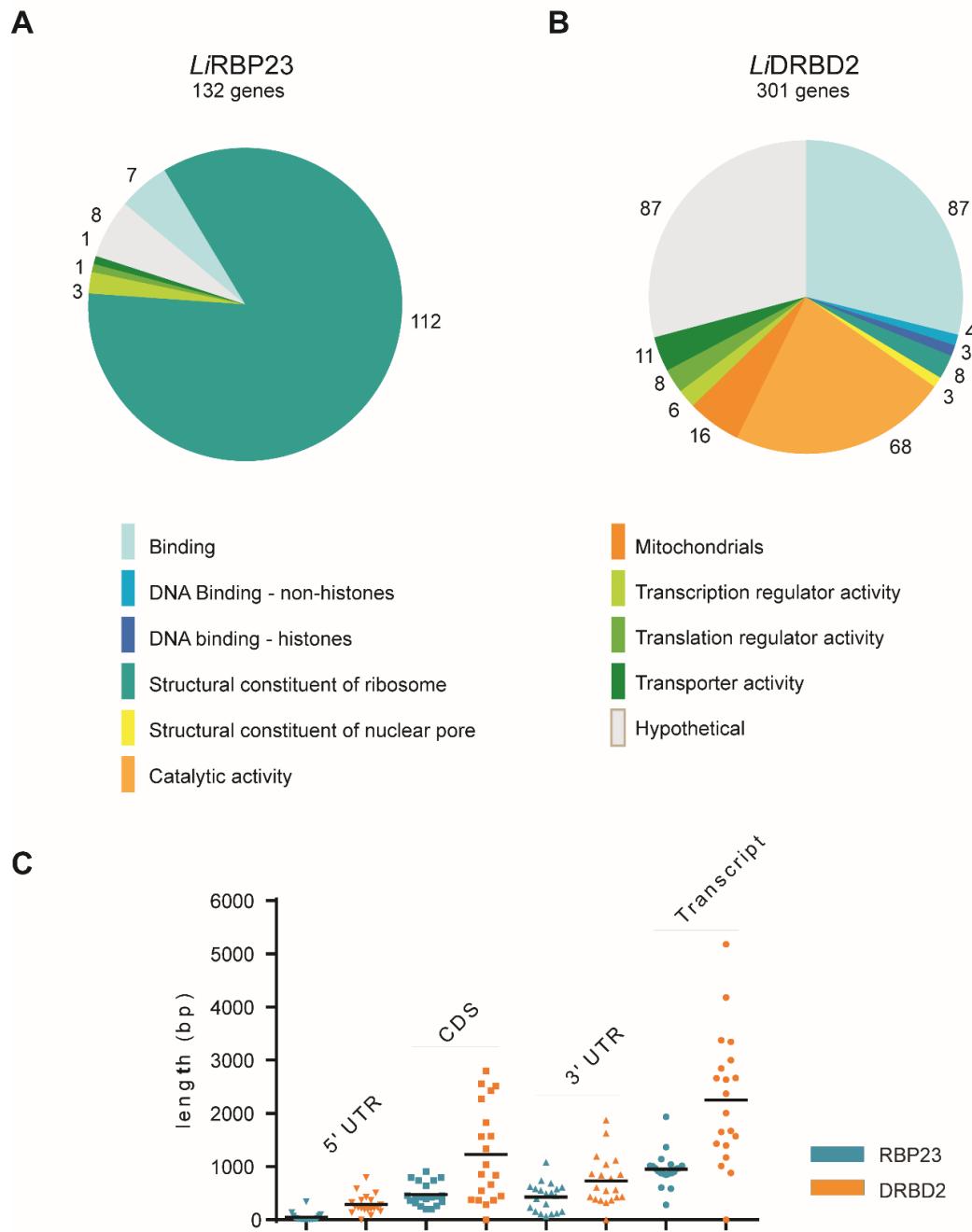
Assis et al., 2020 - Figure 3



**Figure 3. Schematic representation of *L. infantum* RBP23 and DRBD2, their direct binding partners and their HA-tagged expression.** **A)** RBP23 presents an RRM-like in N-terminal and a typical RRM domain in C-terminal. Eight putative arginine methylation sites are indicated (RG or RGG) as a conserved set of aromatic amino acids between both RRMs. Besides two well-defined RRMs, DRBD2 presents a highly conserved sequence of amino acid and several tyrosine; **B)** Pull down assays between radiolabeled RBP23 or DRBD2 and three recombinant PABPs; The upper panels shows the Coomassie-blue stained gel indicating the radiolabeled protein input, the GST recombinant (negative control) and the GST-PABP homologues; The panels below are autoradiographs showing the result of the interactions between radiolabeled RBP23 or DRBD2 and recombinant proteins. The recombinant proteins are indicated by arrows. **C)** Immunodetection with monoclonal anti-HA of *L. infantum* cell extracts expressing RBP23-HA and DRBD2-HA with the size approximate of 32 and 30 kDa, respectively.

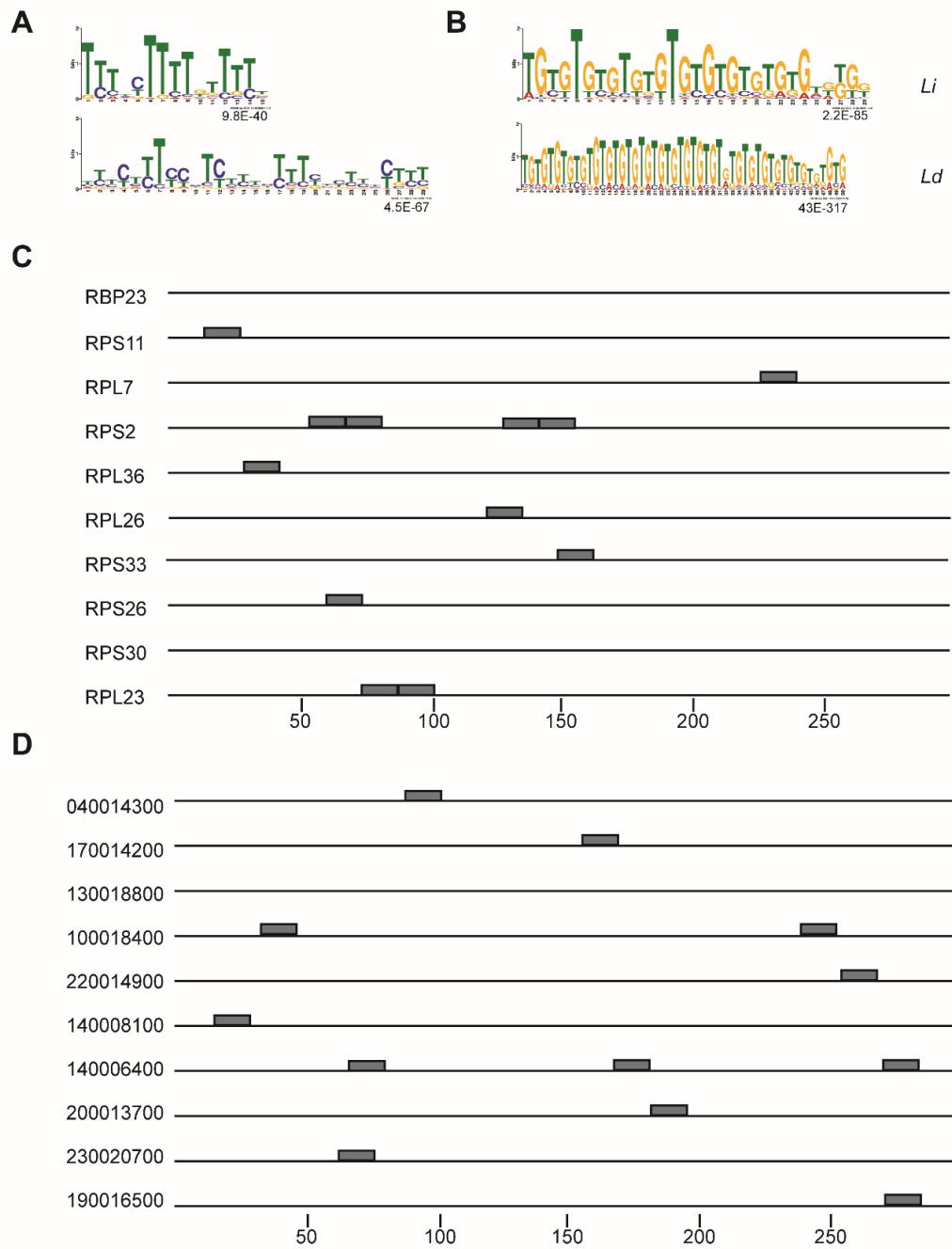
**Assis et al., 2020 - Figure 4**

**Figure 4. Localization of proteins co-purifying with HA-tagged RBP23 and DRBD2.** Localization defined based on cellular component classes (cytoskeleton, cytoplasm; mitochondrion; nuclear; organelles/granules; n/d or not defined) and for uncharacterized proteins using the localization of their respective orthologues in *T. brucei*, according to TrypTag.org. **A)** Pie chart with subcellular localization of RBP23 partners; **B)** Pie chart with subcellular localization of DRBD2 partners.

**Assis et al., 2020 - Figure 5**


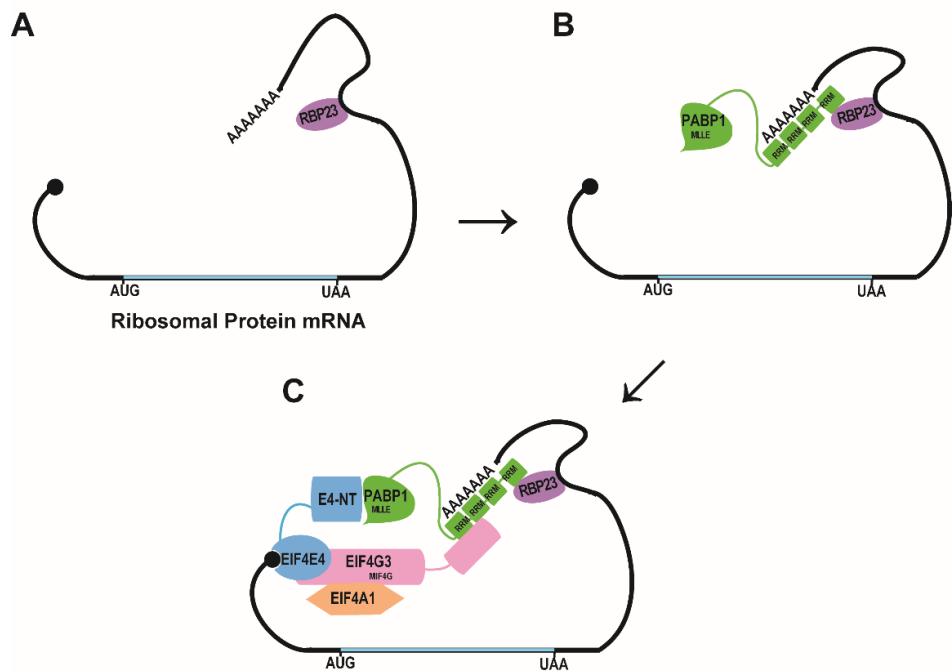
**Figure 5. Analysis of mRNAs populations and transcript length associated with RBP23 and DRBD2 in *L. infantum*.** Genes were classified and grouped as detailed in Figure 1; **A)** Upregulated mRNAs groups associated to RBP23. **B)** Upregulated mRNAs groups associated to DRBD2. **C)** Comparison of RBP23 (cyan) and DRBD2 (orange) 5' (▼) and 3' (▲) UTR, CDS (■) and total transcripts length (●) according to *L. donovani* orthologues sequences (Camacho et al., 2019). Mean is represented by a black line.

**Assis et al., 2020 - Figure 6**

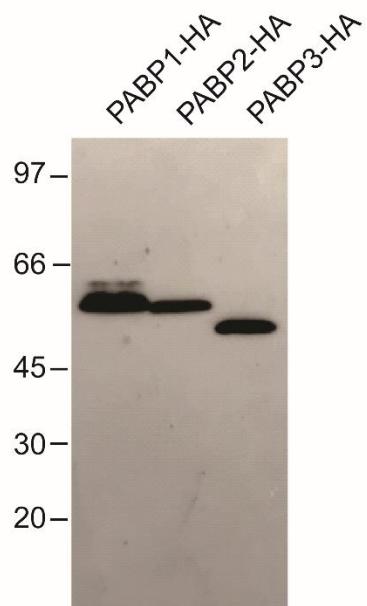


**Figure 6. Sequence elements in 3' UTR of trypanosomatid mRNAs populations associated with RBP23 and DRBD2.** **A)** Putative upstream motifs for RBP23 mRNA and the first 19 RP-mRNAs associated to HA-tagged RBP23 in *L. infantum* and *L. donovani*; **B)** Putative upstream motifs for the first 20 mRNAs associated to HA-tagged DRBD2 in *L. infantum* and *L. donovani*; All logos were generated by MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) and the relative height of each nucleotide represents the conservation measure at that specific position; The e-values are in the right corner of each logo; **C)** Localization of T-rich motifs in the 3' UTR of the 10 mRNAs more enrichment associated with RBP23 of *L. infantum*; **D)** Localization of motifs with TG repeats in the 3' UTR of the 10 mRNAs more enrichment associated with DRBD2 of *L. infantum*.

**Assis et al., 2020 – Figure 7**



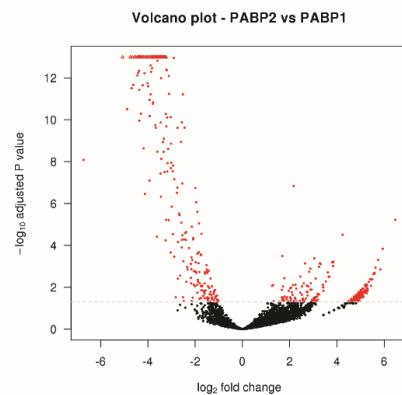
**Figure 7. Proposed model for RBP23 selection mRNA to translation. (A)** RBP23 interacts with 3' UTR motif on the ribosomal protein mRNA, (B) then it interacts with PABP1 probably via RRM4. (C) This set of proteins recruits the complex EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI.

**Assis et al., 2020 – Supplementary Figure 1**

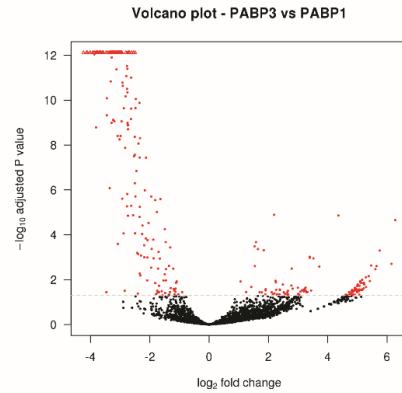
**Supplementary Figure 1. Expression of proteins HA-tagged by immunodetection with a monoclonal anti-HA.** Western-blot assays of cell extract expressing PABP1-HA, PABP2-HA and PABP3-HA with the size approximate of 62.7, 65.4 and 60.9 kDa, respectively.

**Assis et al., 2020 – Supplementary Figure 2**

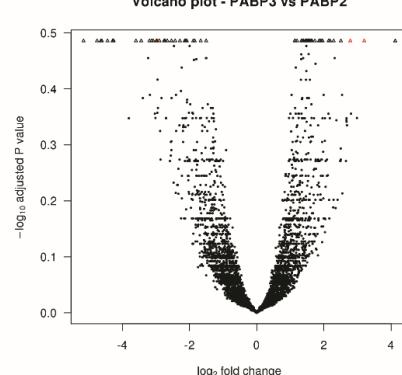
**A**



**B**

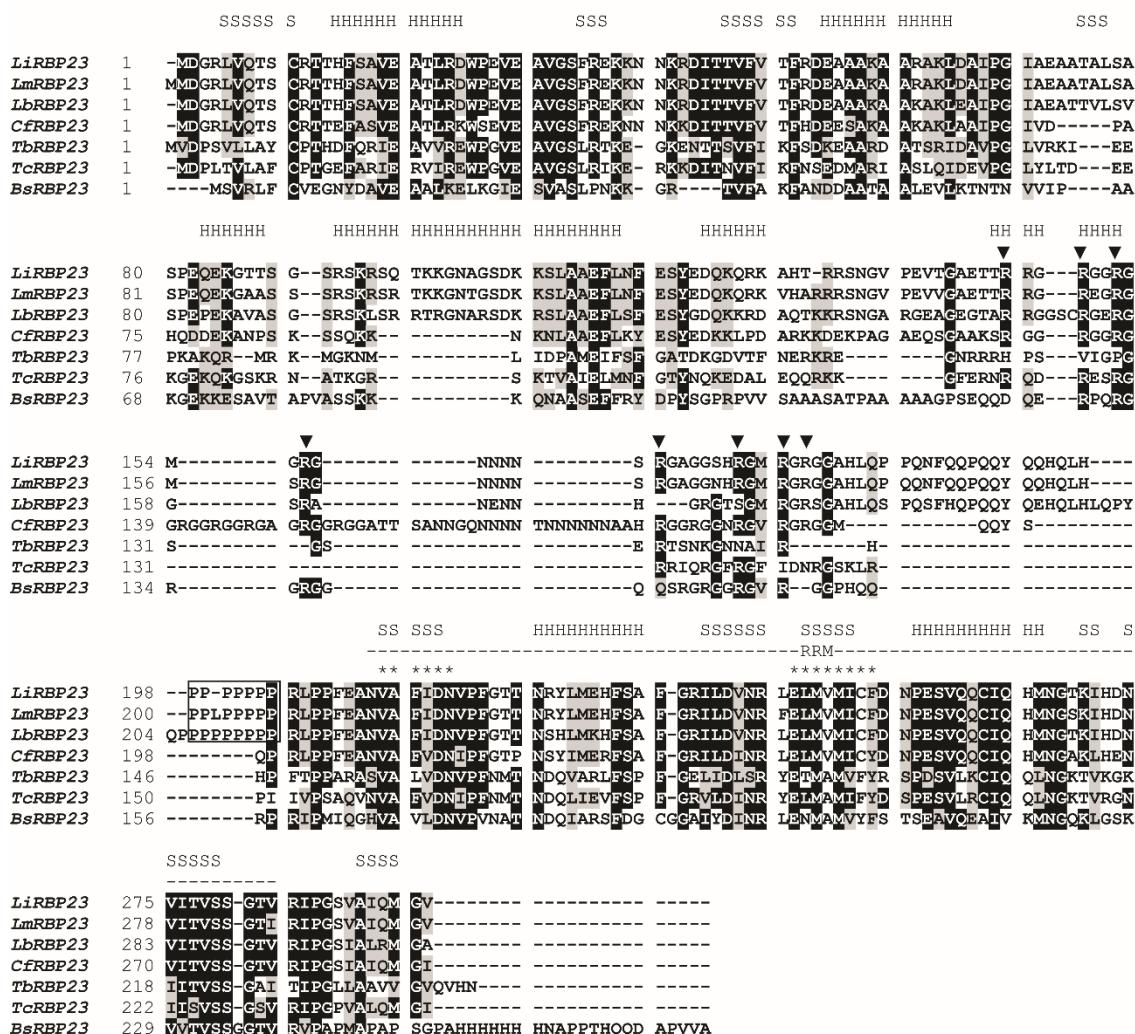


**C**



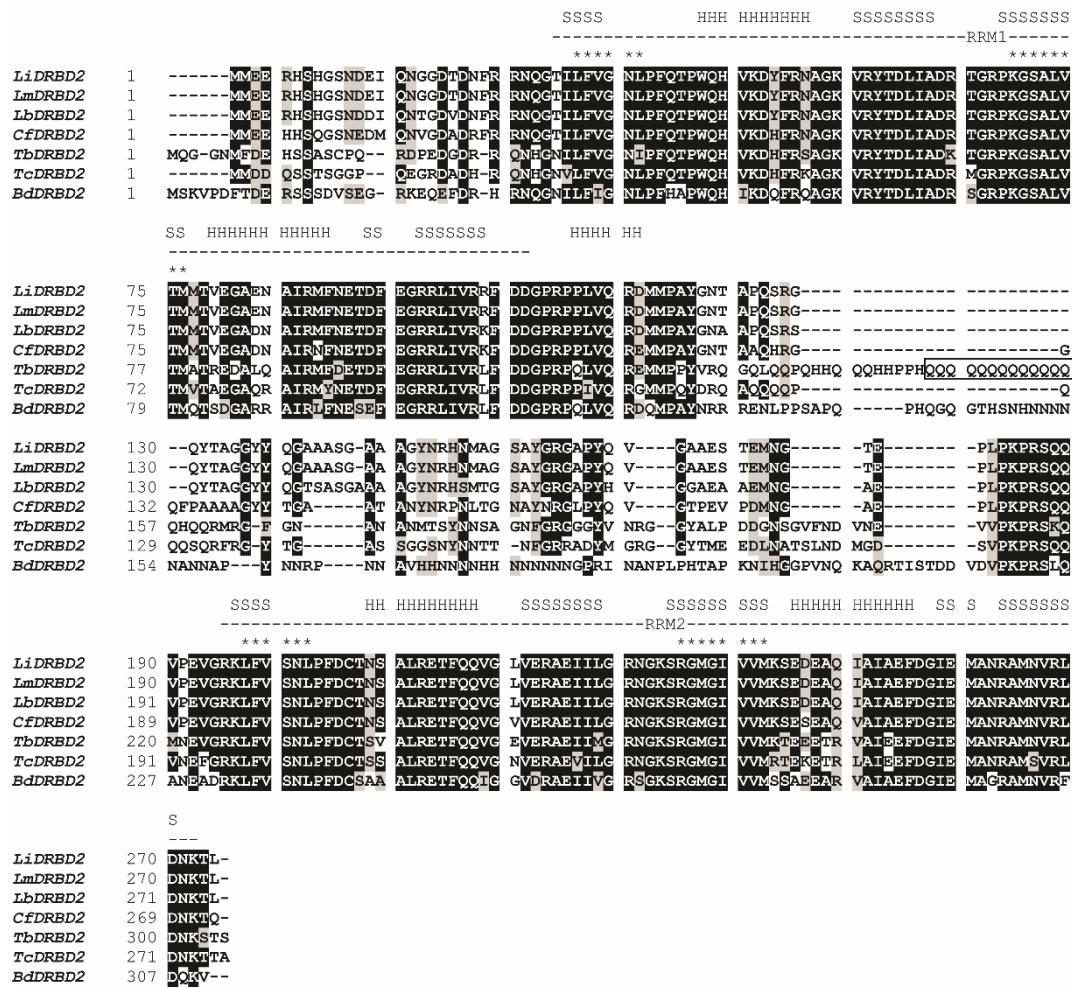
**Supplementary Figure 2. Volcano Plot comparing mRNA content of *L. infantum* PABPs RNAseq dataset.** Axis Y represent the statistical test significance 0.05 ( $>0.05$  red and  $<0.05$  black) and the axis X represent the genes at least 4-fold up- or down-regulated ( $\log_2$  fold change  $>2$ );  $\Delta$  very high value to be ranked; **A)** PABP2xPABP1 **B)** PABP3xPABP1 **C)** PABP3xPABP2.

### Assis et al., 2020 – Supplementary Figure 3



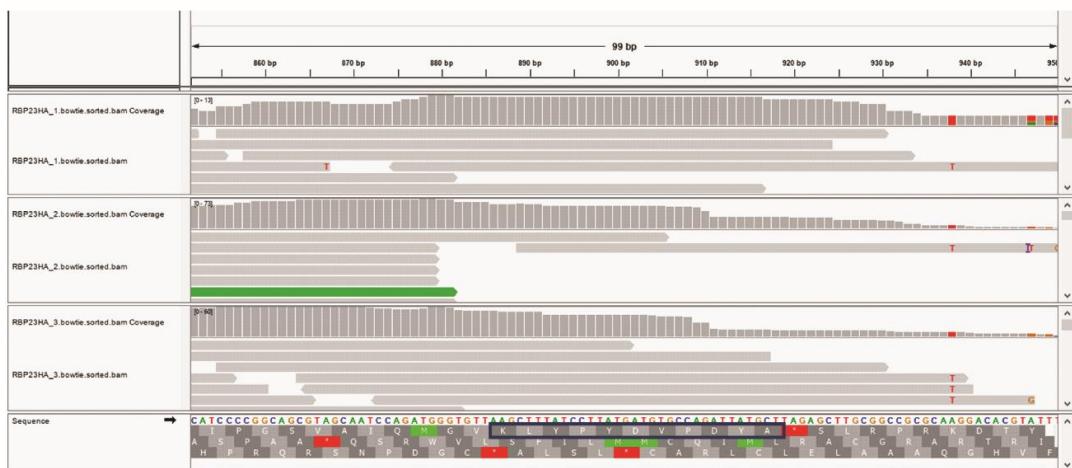
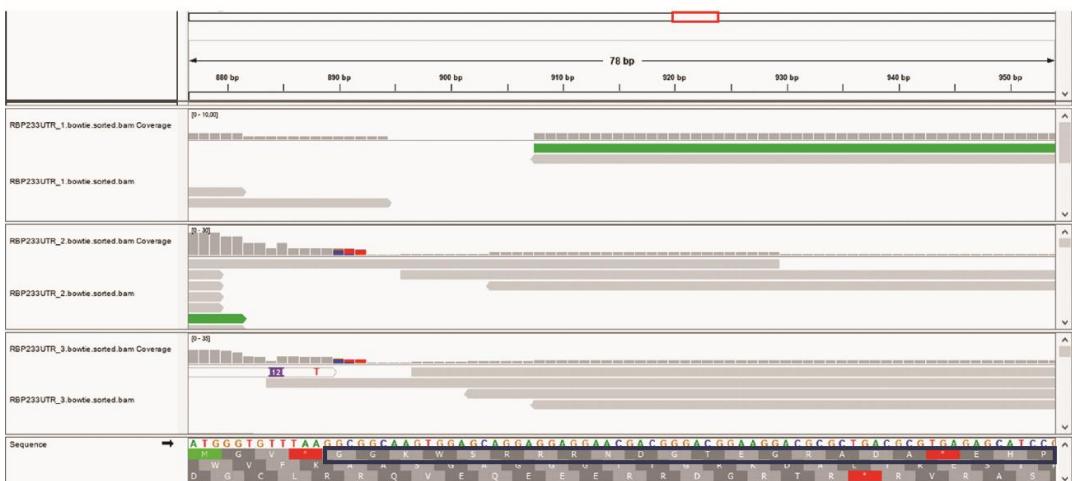
**Supplementary Figure 3. Sequences analysis of the RBP23 from seven organisms of the Kinetoplastida class.** MAAFT alignment comparing the sequences showing the conserved and divergent motifs in seven organisms of the kinetoplastida class: *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*, *C. fasciculata*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *B. saltans*. Identical amino acids in more than 60% of the sequences are highlighted in dark gray, while amino acids defined as similar, based on the BLOSUM60 matrix, on more than 60% of the sequences are highlighted in light gray. When necessary, spaces were inserted within the various sequences (dashes) to allow better alignment. The RRMs of *L. infantum* sequence are indicated as well as the secondary structures predicted. H and S represent  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheet, respectively. The asterisks define the two RNP motifs.  $\blacktriangledown$  define the putative arginine methylation sites (RG or RGG). The P-repeat sequence of *Leishmania* genus was highlighted. Access numbers: *LiRBP23* - LINF\_170011800; *LmRBP23* - LmjF.17.0550; *LbRBP23* - LbrM.17.0540; *CfRBP23* - CFAC1\_280015000; *TbRBP23* - Tb927.10.11270; *TcRBP23* - TcCLB.507711.40; *BsRBP23* - BSAL\_25215.

**Assis et al., 2020 – Supplementary Figure 4**



**Supplementary Figure 4. Sequences analysis of the DRBD2 from seven organisms of the Kinetoplastida class.** The alignment was carried out as described for Figure 1. The Q-repeat sequence of *T. brucei* was highlighted. Relevant access numbers: *LiDRBD2* - LINF\_350027200; *LmDRBD2* - LmjF.35.2200; *LbDRBD2* - LbrM.34.2130; *CfDRBD2* - CFAC1\_300070700; *TbDRBD2* - Tb927.9.13990; *TcDRBD2* - TcCLB.510755.120 and *BsDRBD2* - BSAL\_13490.

## Assis et al., 2020 – Supplementary Figure 5

**A****B**

**Supplementary Figure 5.** RBP23 reads are derived from both endogenous and HA-tagged overexpressed protein transcripts. Screenshot of IGV in the region after the stop codon, showing the coverage (vertical bars) and alignment (horizontal bars) track for three replicates. The 'reference genome' was the RBP23 sequence with 3' UTR or with HA but without 3' UTR. **A)** RBP23 mRNA reads align with the sequence of RBP23 plus HA, the blue box highlights the amino acid sequence of HA; **B)** The RBP23 mRNA reads align with the RBP23 plus 3' UTR sequence, the blue box highlights the beginning of the 3' UTR amino acid sequence.

#### **4 IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTEICOS DIFERENCIALMENTE ASSOCIADOS ÀS PABPs 2 E 3 DE *Leishmania infantum* COM A CARACTERIZAÇÃO DE MOTIVOS DE INTERAÇÃO**

**Autores:** Moezio V. C. Santos Filho, Kleison C. Merlo, Maria J. R. Bezerra, Ludmila A. Assis, Tamara D. C. da Costa Lima, Eden R. Freire e Osvaldo P. de Melo Neto

**Periódico:** *Genetics and Molecular Biology*

Este capítulo abrange o manuscrito em redação como primeiro autor, o qual é referente aos parceiros proteicos associados às PABPs 2 e 3 de *L. infantum*. O artigo a seguir está sendo adequado de acordo com as normas da revista *Genetics and Molecular Biology*. Como primeiro autor, a responsabilidade foi a realização do ensaio de espectrometria de massa e das etapas anteriores que foram pré-requisitos (extratos citoplasmáticos e imunoprecipitações), além das análises estatísticas (incluindo a tabulação e interpretação dos dados obtidos) e a escrita final do artigo. Os resultados proporcionaram a identificação das proteínas co-precipitadas com as PABPs 2 e 3, estabelecendo propriedades específicas desses homólogos envolvidas na formação, transporte e degradação de mRNAs, bem como na potencialização do processo de tradução em *Leishmania* spp.

## IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS PROTEICOS DIFERENCIALMENTE ASSOCIADOS ÀS PABPs 2 E 3 DE *Leishmania infantum* COM A CARACTERIZAÇÃO DE MOTIVOS DE INTERAÇÃO

**Moezio V. C. Santos Filho<sup>1,2</sup>, Kleison C. Merlo<sup>1</sup>, Maria J. R. Bezerra<sup>1</sup>, Ludmila A. Assis<sup>1,2</sup>, Tamara D. C. da Costa Lima<sup>3</sup>, Eden R. Freire<sup>4</sup> e Osvaldo P. de Melo Neto<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Centro Universitário Tabosa de Almeida, Caruaru, PE, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Controle da Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Curitiba, PR, Brasil.

\*E-mail para correspondência: [opmn@cpqam.fiocruz.br](mailto:opmn@cpqam.fiocruz.br)

**Palavras-chave:** Trypanosomatidae. PABP2. PABP3.

## Resumo

As PABPs são proteínas que se ligam à cauda poli-A na extremidade 3' dos mRNAs e que tem função crítica na sua tradução e em outros processos, podendo ainda participar em eventos de regulação da expressão gênica. Em *Leishmania*, onde a regulação da expressão gênica atua fortemente no metabolismo dos mRNAs, foram identificados três homólogos de PABP com funções ainda pouco conhecidas. Este trabalho teve como objetivo identificar parceiros proteicos das PABPs 2 e 3, com vistas a melhor definir sua função, bem como avaliar motivos relevantes em suas interações. Ambas as PABPs 2 e 3 foram expressas em *L. infantum* fusionadas ao epítopo HA e utilizadas em ensaios de imunoprecipitação, com as proteínas parceiras co-precipitadas identificadas por espectrometria de massa. Em sua maioria as mesmas proteínas co-precipitaram com as PABPs 2 e 3 e entre estas se destacam proteínas de ligação ao RNA de diferentes classes: RBP45 e DRBD2, com domínio RRM; ZC3H34, ZC3H40 e ZC3H41, com motivos de dedos de zinco; Puf6, com o domínio Pumilio; e Alba3. A associação das PABPs 2 e 3 com a exportina XPO1 e outra proteína de domínio NTF2 (sem anotação), sugere funções no transporte núcleo-citoplasma de mRNAs. Já a co-precipitação com fatores de iniciação da tradução, como os EIF4G5, EIF4E4, EIF3b e EIF6, é indicativo de atividades também na tradução. Mutantes da PABP2 foram ainda testados quanto à capacidade de complementar a função da proteína nativa após a deleção das cópias do gene endógeno, onde se observou a essencialidade do motivo TGM no seu domínio MLLE. Os dados obtidos reforçam a similaridade entre as funções das PABPs 2 e 3 e poderão contribuir na elucidação de interações envolvendo fatores participantes da tradução e outros processos em *Leishmania* spp.

## Introdução

A família Tripanosomatidae compreende organismos eucariotos unicelulares e uniflagelados que pertencem à ordem Kinetoplastida, filo Euglenozoa. Os principais representantes são protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, que compreendem espécies de importância médica e veterinária de caráter zoonótico e de ampla distribuição geográfica, ocasionando enfermidades como doença de Chagas, doença do sono e diversas

formas de leishmanioses (Borghesan, 2013). Estas foram inicialmente caracterizadas como doenças silvestres restringindo-se às áreas rurais, mas apresentam uma crescente expansão para ambientes urbanos tornando-se um grave problema de saúde pública. Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são definidos de acordo com parâmetros morfológicos que levam em conta a posição do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria que possui moléculas circulares de DNA mitocondrial (Stuart et al., 2008).

Nos tripanosomatídeos, a regulação da atividade da RNA Polimerase II no processo de transcrição não é observada. Ao mesmo tempo, as proteínas são codificadas por genes que se organizam em grupos transpcionais com a presença de uma única região regulatória dando origem aos mRNAs precursores policistrônicos (pré-mRNAs). Os mRNAs monocistrônicos maduros são derivados destes a partir de eventos de *trans-splicing* e poliadenilação (Liang et al., 2003; Arthur; Gunzl, 2010). Os mecanismos moleculares associados à regulação da expressão gênica em *Leishmania* spp. são influenciados pelo controle do processamento e estabilidade de mRNAs e também de sua tradução. Essa regulação tem sido descrita envolvendo novos mecanismos, no entanto, ainda não foi completamente elucidada (Inoue et al., 2014).

Em eucariotos o processo de tradução é mediado pelos ribossomos e por um grande número de macromoléculas, como proteínas e RNAs. O início da tradução é uma etapa importante para o controle do processo e é caracterizado pela interação entre os ribossomos e o mRNA, bem como pelo posicionamento correto do códon de início da tradução (Ramakrishnan, 2002). Entre as diversas macromoléculas que auxiliam na atividade ribossomal destacam-se os fatores proteicos denominados de eIFs (*Eucaryotic Initiation Factors*). Um destes, o complexo heterotrimérico eIF4F, se liga aos mRNAs através da interação de uma de suas subunidades e o cap localizado na extremidade 5' dos transcritos. As subunidades do eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G) também tornam-se relevantes por interagirem com outras proteínas que se ligam ao RNA e aos ribossomos, como as PABPs (*Poly-A Binding Proteins*) (Rezende et al., 2014).

As PABPs representam um grupo altamente conservado de proteínas eucarióticas de ligação ao RNA, as quais reconhecem especificamente a sequência do ácido poliadenílico (poli-A), comumente presente na extremidade 3' da maioria dos mRNAs eucarióticos. Através da ligação à cauda poli-A, essas

proteínas atuam de forma relevante na tradução, assim como são necessárias à biogênese, ao transporte e ao controle da estabilidade dos mRNAs (Burgess; Gray, 2010; Gallie; Liu, 2014). Essas proteínas possuem em suas estruturas uma porção N-terminal e outra C-terminal constituídas respectivamente por quatro domínios de ligação ao RNA - RREMs (*RNA Recognition Motifs*) - e um domínio de interação proteína-proteína (MLLE). Além do reconhecimento do poli-A, Parte dos RREMs realiza o reconhecimento de sequências distintas de mRNAs, com funções pouco definidas. Além do mRNA, a PABP interage com alguns fatores de iniciação da tradução como o eIF4G, que controla de forma positiva a afinidade para a formação de complexos de iniciação da tradução. A interação eIF4G-PABP está bem caracterizada e favorece a iniciação da tradução, regulando a estabilidade do mRNA e mantendo a integridade do transcrito antes da tradução (Eliseeva et al., 2013).

Foram identificados três homólogos de PABP em tripanosomatídeos (PABPs 1, 2 e 3), que se encontram presentes em diferentes gêneros, sendo o terceiro ausente em algumas espécies de *Trypanosoma*. Analisando as interações desses homólogos, foi relatada a associação específica da PABP1 à cauda poli-A, enquanto as ligações das PABPs 2 e 3 não parecem ser tão específicas (Da Costa Lima et al., 2010). A co-precipitação das PABPs 1 e 2 em *T. brucei* indicou que estes dois homólogos estão associados com mRNAs que possuem propriedades distintas, com aqueles ligantes da PABP1 apresentando tamanhos significativamente reduzidos (Zoltner et al., 2018).

Estudos anteriores relataram a localização citoplasmática das PABPs 2 e 3. Entretanto, em condições de inibição transcrional com actinomicina D (as duas proteínas em *Leishmania*) ou inibição de maturação por sinefugina (PABP2 em *T. brucei*), ambas migram para o núcleo celular. Isso indica uma função associada ao processamento de mRNA ou a sua exportação para o citoplasma. Nas mesmas condições, a PABP1 permanece no citosol, sugerindo a sua relação exclusiva com as funções citoplasmáticas da PABP (Da Costa Lima et al., 2010; Kramer et al., 2013). Diante de uma possível importância das PABPs para o controle da expressão gênica em *Leishmania* spp., tornou-se importante a análise por espectrometria de massa dos possíveis parceiros proteicos das PABPs 2 e 3, identificando possíveis complexos e avaliando sua participação na tradução e em outros processos ligados ao metabolismo dos mRNAs, quando comparados com

análises já realizadas para a PABP1 (De Melo Neto et al., 2018). Neste trabalho, a análise de proteínas co-precipitadas com as PABPs 2 e 3 identificou parceiros ligantes de RNAs e atuantes no transporte de transcritos, além de fatores de tradução. Também foi confirmado na PABP2 um importante papel para o motivo TGM que está localizado no domínio MLLE. Este motivo pode participar de interações importantes para a viabilidade celular, podendo ser o foco de estudos direcionados que busquem novas estratégias terapêuticas.

## **Materiais e Métodos**

### **Cultivo celular e análise de expressão**

A manutenção das culturas da linhagem de *L. infantum* MHOM/MA/67/ITMAP-263 foi realizada numa temperatura de 26°C em meio Schneider (Sigma®) com pH 7,2 e mantidas com SFB (Soro Fetal Bovino) a 10% e hemina a 2%. As células foram mantidas numa fase exponencial de crescimento com repasses sucessivos a intervalos variáveis de três a quatro dias. O crescimento parasitário foi confirmado através de contagem em câmara de Neubauer. Para a análise da expressão das proteínas, foram produzidos extratos das células de *L. infantum*, por ressuspensão no tampão de amostra para SDS-PAGE, seguido de eletroforese em gel 15%. Após a separação eletroforética (V: 300, mA: 35), por ~110 minutos, e eletrotransferência (V: 25, mA: 400), por 60 minutos, para uma membrana de PVDF (0.45µm), foram realizados os ensaios de *Western-Blot* através de incubações com anticorpo monoclonal de camundongo (1:3000) direcionado contra o epítopo HA (anticorpo monoclonal anti-HA Sigma®) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:3000) (Sigma®). A revelação ocorreu em filme fotográfico por quimioluminescência.

### **Transfecção em células de *L. infantum***

Os procedimentos de transfecção utilizando o plasmídeo pSPBT1YNEOα (Padmanabhan et al., 2012), modificado com uma extensão de 27 nucleotídeos codificando o epítopo HA, foram realizados por eletroporação em células de *L. infantum*. As células crescidas foram colhidas, centrifugadas, lavadas uma vez e ressuspensas em tampão HEPES-NaCl (HEPES 21mM, pH 7,05, cloreto de sódio 137mM, cloreto de potássio 5mM, fosfato dissódico 0,7mM, glicose 6mM). Após

este processo foram transferidas para cuvetas de eletroporação (0.2mm) contendo o DNA oriundo do plasmídeo. Após o resfriamento no gelo por 5 minutos ocorreu a eletroporação pelo sistema Gene Pulser XcelITM (Bio-Rad®) com pulso de 450V, 500µF. As células transfectadas com as construções pSPBT1YNEOα, foram selecionadas com o marcador de seleção G418 (20µg/ml, Sigma®).

### **Obtenção dos extratos citoplasmáticos**

Os extratos citoplasmáticos das linhagens transfectadas (cepas recombinantes) de *L. infantum* que expressam as PABPs 2 e 3 marcadas com HA e também da linhagem selvagem foram produzidos em triplicata a partir de células promastigotas em fase exponencial. Estas foram lavadas uma vez em PBS gelado (4°C) e ressuspendidas em tampão HEPES [HEPES-KOH 20mM, pH 7,4, acetato de potássio 75mM, pH 7,4, acetato de potássio 75mM, acetato de magnésio 4mM, 2mM DTT, suplementado com inibidor de protease (Roche®)], para uma concentração de  $1,0 \times 10^8$  células/mL. Os lisados foram obtidos por cavitação utilizando uma bomba de ruptura celular por compressão em N<sub>2</sub> (ParrInstruments®), após incubação a 4°C sob uma pressão de 70bar por 40 minutos seguida de rápida descompressão e lise. Os lisados foram submetidos a centrifugação a 17.000g por 10 minutos para remover os restos celulares do sobrenadante que foi distribuído em alíquotas e armazenado a -80°C.

### **Ensaios de imunoprecipitação**

Os extratos citoplasmáticos da linhagem selvagem de *L. infantum* e das linhagens recombinantes com o peptídeo marcador HA foram utilizados para a realização do ensaio de imunoprecipitação (IP), utilizando microesferas magnéticas contendo anti-HA (PierceTM®) conforme o protocolo do fabricante. Cerca de 0,2mg das microesferas magnéticas anti-HA foram lavadas três vezes com PBS, seguido da incubação com os lisados citoplasmático por 1 hora a 4°C. O sobrenadante, ou lisado depletado (LD), foi retirado e as microesferas lavadas três vezes com PBS. Os complexos formados por antígeno-anticorpo imunoprecipitados foram eluídos em tampão de amostra para SDS-PAGE e separados por eletroforese em gel 15% (V: 300, mA: 35). A análise por Western-

*Blot* também utilizou anticorpos anti-HA para confirmar a eficiência da reação de imunoprecipitação em comparação com os lisado depletados. As IPs foram realizadas em triplicata e enviadas para a espectrometria de massa.

### Análise por espectrometria de massa

Para espectrometria de massa (MALDI-TOF/TOF, MS/MS) as IPs das PABPs 2 e 3 marcadas com HA foram submetidas à plataforma de proteômica do Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ-PR). As amostras foram concentradas em SDS-PAGE a 15% (V: 300, mA: 35) e deixadas para migrar até o gel de resolução, onde a separação eletroforética foi interrompida antes do fracionamento das proteínas. As bandas do gel contendo as IPs foram cortadas e submetidas a análise e validação por espectrometria de massa como já descrito (Rezende et al., 2014). A identificação das proteínas co-precipitadas se baseou nas informações depositadas no banco de dados de sequências de proteínas de *L. infantum* (*L. infantum* JPCM5, versão de junho de 2019, disponível no banco de dados TriTrypDB). Para confirmar a especificidade dos ensaios de imunoprecipitação referentes cada polipeptídeo, foi feita uma normalização baseada na intensidade total gerada a partir das IPs usando os extratos que expressaram as PABPs 2 e 3 marcadas com HA e o controle usando os extratos de células da linhagem selvagem (WT). O maior valor obtido foi utilizado para se definir uma razão em relação as demais amostras e esta razão utilizada para se normalizar os resultados de cada uma das amostras, e proteínas co-precipitadas, analisadas por espectrometria de massa. Diante das triplicatas, foram observadas as intensidades médias individuais das proteínas usadas como iscas (as PABPs 2 e 3) e foram excluídas das análises as proteínas co-precipitadas cujos valores médios de intensidade eram 1000 vezes menores em comparação à média destas proteínas iscas e aquelas cuja razão em relação ao controle eram inferiores a 4. Os polipeptídeos identificados foram listados classificados por valor de intensidade.

### Ensaios de complementação da PABP2

Células promastigotas de *L. infantum* foram submetidas a três etapas sucessivas de transfecção: uma primeira com o cassette para deleção da primeira

cópia endógena do gene da PABP2 com marca de seleção de higromicina (transfecção integrativa – seleção a 20µg/ml); em seguida foi realizada a transfecção epissomal com o plasmídeo contendo o próprio gene da PABP2 selvagem ou mutante, com seleção com neomicina (G418) a 20µg/ml; e por último, mais uma transfecção integrativa, com o cassete para deleção da segunda cópia endógena do gene da PABP2, com marca de seleção de puromicina e seleção com este antibiótico a 140µg/ml. Após cada transfecção as células foram selecionadas com o respectivo antibiótico em meio Schneider (Sigma®) líquido, sendo que apenas após a primeira transfecção foi realizada a seleção clonal em placa contendo meio Schneider concentrado duas vezes com ágar e higromicina para a seleção de clones individuais antes das transfecções seguintes.

## **Resultados**

### **Identificação dos parceiros proteicos através de espectrometria de massa das PABPs 2 e 3 fusionadas ao HÁ**

Com o intuito de complementar as análises de interação entre os homólogos de PABP e seus parceiros, bem como caracterizar as possíveis associações que evidenciam atividades diferenciadas dessas proteínas, foi confirmada a eficiência dos lisados citoplasmáticos de células de *L. infantum* que estavam expressando as PABPs 2 e 3 fusionadas ao HA (Figura 1A).

Em seguida, os lisados foram utilizados nos ensaios de imunoprecipitação, incluindo a linhagem selvagem que foi utilizada como controle negativo. Após a confirmação das IPs por *Western-Blot* (Figura 1B), as triplicatas das amostras precipitadas e ligadas às esferas magnéticas com anti-HA foram submetidas à análise por espectrometria de massa. Foram consideradas apenas as proteínas que tiveram níveis substanciais de intensidade de co-precipitação com as PABPs em comparação ao controle, após normalização de acordo com a intensidade total gerada por cada imunoprecipitação.

### **Parceiros proteicos associados à PABP2**

Os resultados da espectrometria tendo como alvo a PABP2 mostraram a co-precipitação deste homólogo com a PABP3 e também com a PABP1,

entretanto, tanto a média das intensidades das co-precipitações quanto o enriquecimento da associação da PABP2 com a PABP3 em relação ao controle, foram significativamente maiores quando comparados àqueles referentes à ligação da PABP2 com a PABP1 (Figura 2A). Esses resultados reforçam especificamente as funções compartilhadas entre a PABP2 e a PABP3.

Várias outras proteínas de ligação ao RNA também co-precipitaram com a PABP2. Entre as proteínas que possuem em sua estrutura o domínio RRM, se destacam a DRBD2 pela sua abundância, porém com baixo valor de enriquecimento em relação ao controle; e as proteínas chamadas de RBP1 e RBP2 mitocondriais, com altos valores de enriquecimento, respectivamente de ~69 e ~37. Outras RBPs com o mesmo domínio também co-precipitadas com a PABP2 foram as a RBP45, RBP35, uma proteína denominada apenas de RBP (LINF\_180010900) e a proteína La (LINF\_210011000). As proteínas com domínios de dedos de zinco (*Zinc Fingers*) também foram observadas, como as ZC3H34, ZC3H39, ZC3H40 e ZC3H41. A ZC3H39 se destacou nas imunoprecipitações por ter sido uma das proteínas mais enriquecidas na amostra em relação ao controle, listada com uma razão de enriquecimento de ~111 (Figura 3 e Tabela 1). Proteínas de ligação ao RNA com domínio Pumílio e Alba também apareceram associadas com o segundo homólogo de PABP. A Alba3 pode ser observada na tabela apesar da não inclusão da Alba1, a qual se associa. Já a Puf6 foi o único homólogo com domínio Pumílio que foi incluído na lista de associações. Vale ressaltar, contudo, que proteínas como a Alba1 e a Puf2, foram vistas enriquecidas em relação ao controle na tabela de dados brutos gerados pela espectrometria de massa, no entanto não foram listadas na Tabela 1 e na Figura 3 devido à sua razão de enriquecimento estar abaixo do ponto de corte usado como critério de inclusão.

Com relação aos fatores de início da tradução, somente dois apareceram imunoprecipitando com a PABP2. Entre os cinco homólogos do eIF4G, apenas o EIF4G5 apareceu nas co-precipitações, entretanto o seu parceiro EIF4E6 permaneceu ausente nesses resultados por ter ficado abaixo do ponto de corte utilizado nos critérios de inclusão, além de ser menos abundante. O EIF3b também apareceu nas associações, mas sem a presença de nenhuma outra subunidade do eIF3, e embora o enriquecimento desse polipeptídio na amostra em relação ao controle não seja tão alto, ele demonstrou possuir um alto nível de

intensidade de co-precipitação com a PABP2, indicando uma possível interação específica com este homólogo da PABP. Além dos fatores de iniciação da tradução, ainda foram observadas três aminoacil-tRNA sintetases na classe de proteínas que participam da tradução: LINF\_110005900, LINF\_300036900 e LINF\_210013900, onde as duas últimas se associaram especificamente à PABP2. Essas proteínas são responsáveis por ligar covalentemente os aminoácidos aos seus respectivos tRNAs na etapa inicial da tradução. (Figura 2A).

Outros dados que chamaram a atenção foram as associações com uma proteína que possui um domínio de fator de transporte nuclear (NFT2) e com uma exportina (XPO1). Essas proteínas participam de processos que envolvem a dinâmica do canal do poro nuclear com a participação de outras nucleoporinas. Tanto o domínio NTF2 quanto a XPO1 foram classificados no mesmo grupo junto com a CCR4-Not e a PSF (*Polyadenylation Specificity Factor*), proteínas que atuam na formação de RNAs no núcleo e na estruturação da cauda poli-A, respectivamente. A presença dessas proteínas nas imunoprecipitações, principalmente aquelas que atuam no transporte núcleo-citoplasma, sugere a participação da PABP2 na biogênese de mRNAs e em seu transporte para o citoplasma (Tabela 1). Já na classificação das proteínas quinases, são incluídas a CRK3, a RK2 e a PK, onde as duas primeiras estão relacionadas com o controle do ciclo celular e a terceira é uma proteína que está presente apenas em *Leishmania* spp. As proteínas quinases foram agrupadas junto com as proteínas fosfatases que também apareceram nas co-precipitações; e todas elas imunoprecipitaram exclusivamente com a PABP2 nesses resultados.

Com relação às proteínas hipotéticas, foi observado um número relativamente alto entre aquelas relacionadas à PABP2. Para este grupo foi realizada a busca por domínios estruturais através do software *Phyre2* e diante de semelhanças não substanciais com domínios de hidrolases e ligação aos RNAs, esses polipeptídios continuaram sendo classificados como não caracterizados. É importante destacar que após a aplicação dos critérios de inclusão para as proteínas relacionadas à PABP2, tanto as UBP<sub>s</sub> (*Uridine-Rich Binding Proteins*) quanto as proteínas ribossomais estiveram ausentes na lista de proteínas coprecipitadas, possivelmente devido à baixa razão de enriquecimento da amostra

em relação ao controle, já que a PABP2 se liga a muitos polipeptídios diferentes e isso pode diminuir esta razão para proteínas abundantes.

### **Parceiros proteicos associados à PABP3**

Para a PABP3 foi confirmada sua co-precipitação com os homólogos PABP2 e PABP1, com a intensidade de co-precipitação e a razão de enriquecimento da amostra em relação ao controle sendo muito maiores para a PABP2 do que para a PABP1. Esses dados reforçam a relação funcional específica entre a PABP2 e a PABP3 quando comparadas com a PABP1. Outras proteínas de ligação ao RNA, que a princípio não compõem complexos para o início da tradução, também co-precipitaram com a PABP3. É o caso da DRBD2 e das *Zinc Fingers* ZC3H34, ZC3H40 e ZC3H41, além de uma proteína não tão bem caracterizada e que também possui um domínio de dedo de zinco (*ZF domain* - LINF\_270029500). A ZC3H41 aparece como a *Zinc Finger* de maior intensidade de co-precipitação com a PABP3 em comparação com as outras duas mencionadas, entretanto, a proteína com o domínio *Zinc Finger* (LINF\_270029500), chamou bastante atenção por ter uma alta intensidade de co-precipitação e por ter sido o polipeptídio com a segunda maior razão de enriquecimento, com o valor de ~205, ficando atrás somente da própria PABP3 (Tabela 2).

Ainda na classificação de proteínas de ligação ao RNA, aquelas com domínio Pumílio e Alba também apareceram com a PABP3. Ainda assim, a Alba3 e a Puf6 foram as únicas com esses respectivos domínios observadas na lista de proteínas associadas. Vale ressaltar, contudo, que a Alba1 – parceira da Alba3 – e outros homólogos com domínio Pumílio, não foram incluídos entre as proteínas listadas, mas foram observadas logo abaixo do ponto de corte utilizado para inclusão. Com relação às RBPs, foram observadas a presença da RBP23, RBP45 e de uma RBP menos caracterizada com domínio RRM (LINF\_180010900), além das RBPs mitocondriais (RBP1 e RBP2). Essas RBPs mitocondriais apareceram com as razões significativamente altas em relação aos controles, com os respectivos valores ~76 e ~54. É destacada ainda para as proteínas de ligação a presença da helicase DEAD/H (LINF\_220021200), que apresentou um grande enriquecimento, tendo na razão o valor de ~61 (Tabela 2).

Entre os fatores de iniciação da tradução, quatro foram observados co-imunoprecipitando com a PABP3: EIF4G5, EIF3b, EIF4E4 e EIF6. O EIF4G5 veio com a proteína de interação G5IP, entretanto também não foi incluído o parceiro menos abundante EIF4E6, que ficou logo abaixo do ponto de corte usado no critério de inclusão. O EIF3b co-precipitou mais uma vez sem as outras subunidades deste grupo, sugerindo participar de interações específicas envolvendo esta proteína e as PABPs 2 e 3. Assim como a RBP23, o EIF4E4 pode estar presente somente com a PABP3 de forma indireta, já que este fator faz parte do mesmo complexo de início da tradução que engloba a PABP1. Envolvidas ainda na tradução, quatro aminoacil-tRNA sintetasas imunoprecipitaram com a PABP3: LINF\_270019800, LINF\_360047300, LINF\_350019000 e LINF\_110005900, onde as três primeiras podem estar relacionadas especificamente com a PABP3 (Figura 2B).

Outras proteínas relevantes na lista das co-precipitações da PABP3, estão aquelas que atuam no transporte e processamento de RNAs, como o domínio NTF2, a XPO1 e a PSF, além dos fatores de transcrição como o TFLP (transcription factor-like protein), o qual é pouco caracterizado, mas com um valor significativo de enriquecimento (Tabela 2). Estes polipeptídios indicam a participação da PABP3 na formação e transporte de mRNAs e também no processamento desses transcritos. Em outros grupos, são observadas as proteínas 60SL11 e 60SL18, ambas indicando papéis nas associações com polissomos. Já a proteína 6-PD (*6-phosphogluconate dehydrogenase*) foi descrita anteriormente participando do metabolismo de *Leishmania* spp. (Maugeri et al., 2003; Leifso et al., 2007), sendo listada neste resultado como uma das proteínas pertencentes ao grupo de atividade catalítica. A 6-PD se destacou devido ao seu alto enriquecimento na amostra em relação ao controle negativo, onde obteve um valor de razão de 100 (Tabela 2). Com relação aos polipeptídios hipotéticos, foram listados apenas quatro não caracterizados, onde os mesmos não apresentaram similaridade representativa com os domínios estruturais presentes no banco do software *Phyre2*.

### **Comparação entre as imunoprecipitações da PABP2 e da PABP3**

As PABPs 2 e 3 co-precipitaram de forma comum com a maioria das proteínas listadas nas tabelas 1 e 2, principalmente com aquelas que foram incluídas nos grupos de proteínas que participam do processo de tradução e de ligação à RNAs. Todavia, vale ressaltar que apesar da possível redundância funcional entre esses dois homólogos, alguns polipeptídios imunoprecipitados de forma específica com um dos homólogos de PABP chamaram a atenção pela forte intensidade de co-precipitação e/ou pelo enriquecimento das ligações das PABPs-HA em relação ao controle negativo, representado neste resultado através dos valores da razão.

A PABP2 e a PABP3 imunoprecipitaram de forma recíproca e com uma alta intensidade entre elas. O comportamento espelhado destes dois homólogos incluiu também a presença da PABP1, no entanto esta relação não foi tão forte quanto à ligação das duas primeiras. Com relação aos fatores de iniciação da tradução, tanto o EIF4G5 quanto o EIF3b se associaram de forma semelhante entre as PABPs 2 e 3, entretanto a proteína de interação com o EIF4G5, a G5IP, apareceu apenas nas co-precipitações da PABP3. Outros dois fatores que se ligaram somente com o terceiro homólogo de PABP foram o EIF4E4 e o EIF6, no entanto ficaram próximos ao ponto de corte nas associações da PABP2. Apesar dos possíveis papéis semelhantes das PABPs 2 e 3 em comparação à PABP1, A PABP3 pareceu imunoprecipitar com algumas proteínas comuns àquelas ligadas ao primeiro homólogo, o que pode ou não ser devido às ligações indiretas (Figura 4).

A DRBD2 e a ZC3H41 foram as proteínas listadas no grupo de ligação ao RNA que apareceram entre as de maior intensidade de co-precipitação, tanto com a PABP2 quanto com a PABP3. Outras proteínas com domínios de dedo de zinco como a ZC3H34 e a ZC3H40 também co-precipitaram com ambos os homólogos de PABP, entretanto a ZC3H39 se associou especificamente à PABP2, enquanto que outra proteína pouco caracterizada (*ZF domain - LINF\_270029500*) se ligou apenas à PABP3. Essas duas proteínas se destacaram pelo alto enriquecimento nas amostras durante as associações com as respectivas PABPs. Já em relação às RBPs listadas, a maioria precipitou com os dois homólogos de PABPs estudados, exceto a RBP35 que se ligou apenas com a PABP2, e a RBP23 que ligada especificamente com a PABP3 (Figura 4).

Além das proteínas intimamente relacionadas aos RNAs, os polipeptídios das classes de proteínas quinases e fosfatases tiveram uma preferência apenas pela PABP2, incluindo as que estão relacionadas com o ciclo celular como a CRK3 e a RK2. A fosfatase PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) chamou a atenção nos resultados pelo enriquecimento amostral no valor de ~131, e mesmo em abundância não apareceu relacionada com a PABP3. Por outro lado, proteínas constituintes do ribossomo se associaram especificamente com a PABP3, identificadas na tabela 2 como “60S L11” e “60S L18”. As co-precipitações do domínio NTF2, XPO1 e PSF ocorreram com a PABP2 e a PABP3. No entanto, a CCR4-Not, a qual também foi classificada no grupo de transporte e processamento de RNA, se ligou à PABP3 apenas abaixo do ponto de corte, não sendo listada na tabela desses resultados. Com relação às proteínas hipotéticas, apenas duas foram comuns às PABPs 2 e 3: LINF\_160020100 e LINF\_230005800, com o enriquecimento representado pelas razões sendo um pouco maior nos dados da PABP2 (Tabelas 1 e 2).

### Avaliação das regiões da PABP2 nos ensaios de complementação

Visando melhor entender o modo de ação da PABP2 e a maneira como regiões específicas dessa proteína participam desse modo de ação, experimentos de complementação foram realizados utilizando mutantes dessa proteína, como originalmente descritos para a PABP1 (De Melo Neto et al., 2018). Diferentes mutantes foram avaliados apresentando motivos específicos em diferentes domínios alterados por mutagênese sítio dirigida. Células promastigotas de *L. infantum* foram então geradas para se obter linhagens SKO (*single knockout*), com deleção de uma das cópias do gene endógeno da PABP2; e DKO (*double knockout*), com deleção das duas cópias endógenas do gene da PABP2 na presença da proteína selvagem ou mutante codificada por vetor plasmidial. As linhagens celulares contendo as substituições da ORF pelos genes de resistência à higromicina e à puromicina foram selecionadas em meio de cultura contendo os marcadores de seleção, com a manutenção do gene plasmidial mediada por seleção com neomicina. Os sete mutantes de PABP2 avaliados apresentam mutações distribuídas entre as regiões N- e C-terminal, nos domínios considerados importantes para as funções específicas das PABPs como seus

quatro RRM s e o domínio MLLE: 80**IAK/AAA**82, 137**YAR/AAA**139, 169**RYQ/AAA**171 263**FRS/AAA**265, 284**HSK/AAA**286, 385**RQN/AAA**387 e 547**TGM/AAA**549. Destes, o último mutante foi escolhido por ser dirigido a um motivo localizado no centro conservado do domínio MLLE e que também foi avaliado na PABP1 (Figura 5A). As regiões que sofreram mutação continham os aminoácidos originais substituídos por três alaninas (AAA). Estes ensaios de complementação foram realizados para dois clones distintos e todos os tipos celulares contendo os mutantes mostraram-se viáveis, exceto o DKO do 547**TGM/AAA**549. Neste caso, não foi possível garantir a sobrevivência celular após a deleção das duas cópias do gene, mesmo diante das tentativas com os dois clones utilizados. (Figura 5B).

Apesar dos DKO s da maioria dos mutantes permitirem a sobrevivência das linhagens, alguns a princípio, influenciaram a morfologia e a velocidade de crescimento. Entre eles, os que se destacaram foram 80**IAK/AAA**82, 284**HSK/AAA**286 e 385**RQN/AAA**387, onde o crescimento celular estava bem mais lento quando comparados aos outros mutantes e com as células apresentando uma morfologia mais arredondada e diferente da convencional.

## Discussão

Os organismos do gênero *Leishmania* são caracterizados por uma variedade de processos moleculares que garantem a sua sobrevivência. O reduzido número de elementos promotores para a transcrição está relacionado com uma regulação da expressão gênica através de eventos pós-transcpcionais, sendo de interesse científico uma melhor compreensão dos processos nesses parasitos (De Melo Neto et al., 2016). Os dados referentes às PABPs 2 e 3 indicam que esses dois homólogos possuem papéis relacionados de acordo com os perfis similares dos polipeptídeos com os quais imunoprecipitaram. A diversidade das associações pode evidenciar um papel menos específico para essas PABPs com funções direcionadas não apenas ao processo de tradução, como previamente sugerido (Da Costa Lima et al., 2010).

A PABP2 e a PABP3 co-precipitaram em maioria com as mesmas proteínas de ligação ao RNA. Entre essas associações está a DRBD2, uma proteína pequena que possui dois RRM s localizados nas extremidades N e C-

terminal. Em *T. brucei* a DRBD2 foi encontrada distribuída ao longo da região perinuclear (Dean et al., 2017), sugerindo a sua migração para o núcleo e interação com as PABPs 2 e 3. Já em estudos de *T. cruzi*, é descrita participando de complexos da tradução, tendo como proteínas parceiras na regulação de RNAs a ZC3H39, Alba3, Alba4, UBP1, UBP2, além da PABP2 presente em abundância (Wippel et al., 2019). A DRBD2 foi descrita ainda como um ortólogo da Gbp2 de leveduras, uma proteína que está envolvida no controle da exportação de RNAs (Hackmann et al., 2014). Estas afirmações são reforçadas por dados ainda não publicados que foram obtidos através de ensaios recíprocos de imunoprecipitação que teve como alvo a DRBD2, onde a mesma estava associada especificamente às PABPs 2 e 3 em *Leishmania* spp (Assis et al., manuscrito em preparação).

Com relação às *Zinc Fingers*, em espécies do gênero *Trypanosoma*, essas proteínas foram observadas associando-se às sequências de regiões não traduzidas 3' UTR que regulam os níveis de degradação de mRNAs com regiões ricas em AU (Kramer; Carrington, 2011; Singh et al., 2014). Incluída neste grupo está a ZC3H41, uma proteína estruturalmente semelhante a uma DNA helicase, ligada a polissomos e que co-precipitou com as PABPs 2 e 3 com uma alta intensidade nesses resultados; e também com a PABP1 em trabalhos anteriores (Klein et al., 2015; De Melo Neto et al., 2018). Outras proteínas *Zinc Fingers* que também imunoprecipitaram com as PABPs 2 e 3 foram a ZC3H40 e a ZC3H34, além da ZC3H39 associando-se com uma alta razão apenas à PABP2. A ZC3H39 e a ZC3H40 já foram descritas na regulação da atividade mitocondrial em tripanosomatídeos, enquanto que a ZC3H34 está relacionada com o metabolismo de RNAs de uma forma geral (Kramer et al., 2010; Trenaman et al., 2019). A ZC3H39 também apareceu nas imunoprecipitações da PABP2 de *T. brucei* junto com proteínas que possuem outros domínios como a Alba3 e a Puf6, as quais serão discutidas mais adiante (Zoltner et al., 2018).

Os fatores de início da tradução que se associaram aos homólogos de PABP estudados neste trabalho incluem o EIF4G5, o EIF4E4, o EIF3b e o eIF6, estando alguns desses ligados especificamente à PABP3. O EIF4G5 co-precipitou com ambas as PABPs, entretanto a proteína parceira G5IP (*G5-interacting protein*) veio apenas com a PABP3. A presença do EIF4G5 corroborou com dados encontrados em estudos de *T. brucei*, onde este fator foi descrito

imunoprecipitando especificamente com a PABP2. Além disso, o EIF4G5 também foi observado formando complexos que não estão diretamente relacionados ao início da tradução (Freire et al., 2014; Zoltner et al., 2018). Entretanto, assim como o EIF4E4, é provável que o EIF4G5 participe de alguma forma da síntese proteica, tendo em vista trabalhos mais recentes que mostraram a associação do complexo EIF4E6-EIF4G5 com outras proteínas envolvidas na tradução como a MKT1 e MKT1L (Nascimento et al., 2020). É importante destacar também o fato do EIF4G5 a princípio não ter aparecido com o EIF4E6, mas este parceiro é menos abundante e ficou logo abaixo do ponto de corte utilizado como critério de inclusão, o que reforça sua necessidade para a ação do EIF4G5. O mesmo pode ter ocorrido em *T. brucei*, com os dados da PABP2, no entanto mais estudos serão necessários para elucidar possíveis interações específicas em *Leishmania* spp. Em relação ao EIF4E4, este é um dos homólogos do eIF4E capazes de interagir com os homólogos do eIF4G, onde junto com o EIF4G3 pode ser considerado fundamental durante o início da tradução (Moura et al., 2015). Já está bem caracterizado o complexo formado pelo EIF4E4, EIF4G3 e PABP1, onde o EIF4G3 interage diretamente com a PABP1. Foi descrito também a interação da região N-terminal do EIF4E4 com a PABP1, o que poderia explicar a presença específica do EIF4E4 nas co-precipitações da PABP3, já que a PABP1 também está presente, possibilitando uma associação indireta entre o EIF4E4 e a PABP3 (Zinoviev et al., 2011; Moura et al., 2015; Freire et al., 2017).

Em *T. brucei*, estudos sobre a função do complexo eIF3 evidenciaram a presença se suas subunidades em frações polissômicas. Já em espécies do gênero *Leishmania*, ensaios de interação mostraram as subunidades do eIF3 interagindo com o EIF4G3 que foi expresso em células transgênicas, o que pode sugerir a este homólogo do eIF4G a atividade de recrutamento das subunidades do eIF3 junto com o complexo de pré-iniciação 43S aos mRNAs (Klein et al., 2015; Meleppattu et al., 2015). Contudo, os resultados deste trabalho não evidenciaram presença do EIF4G3, mesmo diante das co-precipitações dos parceiros funcionais EIF4E4 e PABP1 e também do EIF3b. A imunoprecipitação deste único homólogo do eIF3 nesses dados motiva a hipótese de interações específicas com a PABP2 e a PABP3 de *Leishmania* spp. Já o eIF6 é um fator de início de tradução de polipeptídeo único que, assim como os outros de sua classe, possui ortólogos entre os tripanosomatídeos anotados nos genomas

sequenciados e presentes nos bancos de dados. Embora o eIF6 tenha sido descrito desde o início em *T. cruzi*, este ainda não foi devidamente estudado em tripanosomatídeos, o que dificulta a formação de um cenário mais claro envolvendo a PABP3 (Levin, 2000; Vazquez-Pianzola, 2005). Além dos fatores de iniciação da tradução, as amioacil-tRNA sintetases também co-precipitaram com ambos os homólogos de PABP, uma vez que essas proteínas também participam do início da tradução ligando covalentemente os aminoácidos aos seus respectivos tRNAs. (Rajendran et al., 2017).

Outro resultado relevante nas imunoprecipitações com as PABPs 2 e 3 foi a presença de um domínio de fator de transporte nuclear (NTF2) e a proteína exportina XPO1, que atuam facilitando o transporte de proteínas entre o núcleo e o citoplasma. A região NTF2 possui uma forma dimérica e participa de interações que envolvem outros componentes do poro nuclear como a RanGDP e outras nucleoporinas. Estas ligam-se às proteínas migradoras, sendo parte fundamental no sistema de importação nuclear (Stewart, 2000). Já a XPO1, reconhece o sinal de exportação nuclear (NES) e atua na retirada de elementos do núcleo através do canal do poro (Ullman et al., 1997). A associação com proteínas de funções relacionadas como essas e o acúmulo das PABPs 2 e 3 no núcleo, torna-se uma evidência da participação desses homólogos na síntese, processamento e transporte núcleo-citoplasma de mRNAs. A presença de NTF2 e XPO1 pode ser uma resposta à facilitação do tráfego dessas PABPs na dinâmica do núcleo celular. O fato da PABP2 ter se ligado também à CCR4-Not e à PSF, pode ser uma evidência de um papel mais ativo desta PABP na biogênese de RNAs no núcleo, tendo em vista que a CCR4-Not atua na formação de RNAs. Já a PABP3 se associou apenas com a PSF que participa de atividades relacionadas à estruturação da cauda poli-A (Barabino et al., 1997; Collart, 2016).

Ainda na lista das proteínas de ligação ao RNA co-precipitadas com as PABPs 2 e 3, são inseridas as RBPs, que atuam como reguladoras da expressão gênica em tripanosomatídeos (Kramer; Carrington, 2011; Clayton, 2013). A RBP23 estimula a tradução quando ligada à extremidade 3' de mRNAs e apareceu associada especificamente com a PABP3. Da mesma forma que o EIF4E4 esta associação pode ser explicada devido à presença também da PABP1 nas imunoprecipitações com a PABP3, uma vez que em estudos anteriores foi relatada a associação exclusiva da RBP23 com a PABP1 em *T.*

*brucei* (Zoltner et al., 2018). É importante considerar que apesar do que foi descrito para as possíveis interações *in vitro* da RBP23 e do EIF4E4 com a PABP3, outras ligações podem acontecer *in vivo*, permitindo apenas a interação direta dessas proteínas com a PABP1. Já a RBP35 co-precipitou somente com a PABP2 e é uma das proteínas desta classe que foi descrita próximo à RBP23 em estudos filogenéticos de *T. brucei* (Gaudenzi et al., 2005). Entre as RBPs que imunoprecipitaram com ambos os homólogos de PABP está incluída a RBP45, uma proteína que apresenta níveis diferentes de fosforilação ao longo do ciclo celular e que só foi observada dentro da ordem Kinetoplastida, onde possui a sua região C-terminal conservada entre as espécies deste grupo (Mittra; Ray, 2004). As RBPs mitocondriais, que também co-precipitaram com ambas PABPs com um enriquecimento amostral substancial, foram descritas participando de atividades mitocondriais que aumentam durante a diferenciação em amastigotas. Esses processos ocorrem devido a expressão de diversas enzimas metabólicas que são atuantes ao longo da diferenciação celular em *Leishmania* spp. (Bent et al., 2003; Brotherton et al., 2010).

A presença de outras proteínas de ligação ao RNA como Puf6 e Alba3 associando-se especificamente às PABPs 2 e 3 ocorreu diante da ausência de parceiros e homólogos dessas proteínas que também regulam a estabilidade de mRNAs em tripanosomatídeos. No entanto, proteínas como Puf2 e Alba1 ficaram logo abaixo do ponto de corte utilizado para as associações dessas PABPs. Em *L. infantum* a Alba3 se associa à Alba1 e foi descrita tendo um papel na regulação do processamento de mRNAs em células amastigotas, quando ligadas à extremidade 3'UTR desses transcritos. A depleção genética de Alba3 levou ainda a alterações na motilidade e no metabolismo desses parasitos (Dupé et al., 2014; Santana Da Costa et al., 2017). Já a Puf6 possui uma interação com motivos de regiões não traduzidas 3'UTRs que estão envolvidos no decaimento de mRNAs através de clivagem por endonucleases. Foi mostrado que essa relação com a Puf6 estimulou a degradação de RNAs, diminuindo o tempo de atividade desses transcritos (Folgueira et al., 2010; Klein et al., 2015; Azizi et al., 2017).

A presença das proteínas quinases dependentes de ciclinas como CRK3 e RK2 (LINF\_220017500) associando-se especificamente com a PABP2 pode sugerir uma participação mais ativa deste homólogo numa regulação influenciada pelo ciclo celular, uma vez que essas proteínas quinases foram descritas como

sendo essenciais para a progressão dos estágios em *Leishmania* spp. (Hassan et al., 2001). Essa hipótese é reforçada pela presença da PP2A, que é uma fosfatase conservada em eucariotos e descrita com um papel importante na regulação das atividades das quinases, dependentes do ciclo celular. Assim como as proteínas quinases descritas acima, a PP2A co-precipitou apenas com a PABP2, tendo um dos enriquecimentos mais altos das amostras em relação ao controle negativo (Millward et al., 1999). Com relação a outras imunoprecipitações, a PABP2 já foi descrita em polissomos (Kramer et al., 2013) e a completa ausência de proteínas ribossomais com este homólogo ocorreu também devido às considerações de inclusão das proteínas associadas. Já a PABP3 imunoprecipitou com as proteínas 60S L11 e 60S L18, ambas constituintes do ribossomo (Leifso et al., 2007). Com relação às proteínas não caracterizadas presentes em grande quantidade com a PABP2 e co-precipitadas também com a PABP3, não foi possível a visualização de um cenário envolvendo possíveis interações entre esses polipeptídeos.

Quanto à confirmação da essencialidade da PABP2, estudos anteriores que realizaram ensaios de *knockdown* em *T. brucei* por meio de RNAi, mostraram que a PABP1 e a PABP2 são independentemente necessárias para a sobrevivência celular e que estes homólogos não apresentam funções redundantes (Da Costa Lima et al., 2010). A análise dos motivos localizados nos RRM s 1 e 2 mostraram que estes parecem não exercer um papel determinante na PABP2, diferente do que acontece com os seus equivalentes na PABP1, os quais demonstraram ser essenciais. Nos eucariotos, os RRM s 1 e 2 são domínios que estão mais relacionados a ligações específicas com a cauda poli-A (Cheng; Gallie, 2007). O fato do motivo 137YAR139 não interferir nas funções da PABP2 em células de *L. infantum*, indica interações menos específicas entre este homólogo e a cauda poli-A, uma vez que nesses parasitos esta sequência foi considerada crítica para este tipo de interação. O Domínio MLLE, abriga o único motivo considerado fundamental para a viabilidade de *L. infantum*, sugerindo a importância dessa região para interações essenciais da PABP2, o que também não aconteceu para a PABP1 (De Melo Neto et al., 2018). Já a influência dos DKO s no crescimento e na morfologia celular envolvendo os motivos localizados nos RRM s 1 e 4 e na região Linker, pode significar a relevância dessas regiões na conformação da proteína ou em interações que ocorrem em outros estágios do

desenvolvimento de *Leishmania* spp. Serão necessárias novas abordagens como a identificação de proteínas co-precipitadas com esses mutantes, para uma melhor compreensão da importância dos respectivos motivos da PABP2 desses parasitos.

### **Financiamento**

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE); Pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Agradecimentos**

Agradecemos à toda equipe do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM / FIOCRUZ-PE) coordenada pelo Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pelas importantes discussões e assistência técnica. Os autores agradecem também à FIOCRUZ através do financiamento do Programa de Plataformas Tecnológicas com o uso da espectrometria de massa realizada no setor de proteômica no Instituto Carlos Chagas (ICC / FIOCRUZ-PR).

### **Referências**

- Azizi H, Dumas C, Papadopoulou B (2017) The Pumilio-domain protein PUF6 contributes to SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay in *Leishmania*. RNA J 1874–1885. doi: 10.1261/rna.062950.117.
- Barabino SML, Hiibner W, Jenny A, Minvielle-sebastia L (1997) The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. GENES Dev 11:1703–1716.
- Borghesan TC (2013) Diversidade e Filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros.
- Brotherton M, Racine G, Foucher AL, Drummelsmith J, Papadopoulou B, Ouellette M (2010) Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania*

infantum research articles. *J Proteome Res* 9:3842–3853.

Burgess HM, Gray NK (2010) mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins. 1517–1522. doi: 10.1042/BST0381517

Cheng S, Gallie DR (2007) eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B Bind the Poly(A)-binding Protein through Overlapping Sites within the RNA Recognition Motif Domains. *J Biol Chem* 282:25247–25258. doi: 10.1074/jbc.M702193200

Clayton C (2013) The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. *PLOS Pathog* | 9:9–12. doi: 10.1371/journal.ppat.1003680

Collart MA (2016) The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *WIREs RNA*. doi: 10.1002/wrna.1332

Da Costa Lima TD, Lima C, Moura DMN, Reis CRS, Vasconcelos JRC, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RCBQ, De Melo Neto OP (2010) Functional Characterization of Three Leishmania Poly(A)-Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. *Eukaryot Cell* 9:1484–1494. doi: 10.1128/EC.00148-10

Dean S, Sunter JD, Wheeler RJ (2017) TrypTag . org: A Trypanosome Protein Localisation Resource. *Trends Parasitol* 33:80–82. doi: 10.1016/j.pt.2016.10.009

De Melo Neto OP, Reis CRS, Moura DMN, Freire ER, Carrington M (2016) Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (Trypanosoma and Leishmania) Species. doi: 10.1007/978-3-319-39468-8

De Melo Neto OP, Da Costa Lima TD, Lima C, Merlo KC, Romão TP, Rocha PO, Assis LA, Larissa M, Xavier CC, Rezende AM (2018) Phosphorylation and interactions associated with the control of the Leishmania Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. *RNA Biol*. doi: 10.1080/15476286.2018.1445958

Dupé A, Dumas C, Papadopoulou B (2014) An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in Leishmania. *Mol Microbiol*

91:548–561. doi: 10.1111/mmi.12478

Eliseeva IA, Lyabin DN, Ovchinnikov LP (2013) Poly (A)-Binding Proteins: Structure, Domain Organization and Activity Regulation. *Biochem* 78:1377–1391.

Folgueira C, Martínez-bonet M, Requena JM (2010) The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. *BMC Res. Notes*

Freire ER, Malvezzi AM, Vashisht AA, Zuberek J, Saada EA, Langousis G, Moura D, Darzynkiewicz E, Hill K, De Melo Neto OP (2014) Trypanosoma brucei Translation Initiation Factor Homolog EIF4E6 Forms a Tripartite Cytosolic Complex with EIF4G5 and a Capping. *Eukaryot Cell* 13:896–908. doi: 10.1128/EC.00071-14

Freire ER, Sturm NR, Campbell DA, De Melo Neto OP (2017) The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. doi: 10.3390/pathogens6040055

Gallie DR, Liu R (2014) Phylogenetic analysis reveals dynamic evolution of the poly(A)-binding protein gene family in plants. 1–17.

Gaudenzi JD, Frasch AC, Clayton C (2005) RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis †. *Eukaryot Cell* 4:2106–2114. doi: 10.1128/EC.4.12.2106

Gunzl A (2010) The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes : Complex or Simplified. *Eukaryot Cell* 9:1159–1170. doi: 10.1128/EC.00113-10

Hackmann A, Wu H, Schneider U, Meyer K, Jung K, Krebber H (2014) Quality control of spliced mRNAs requires the shuttling SR proteins Gbp2 and Hrb1. *Nat Commun.* doi: 10.1038/ncomms4123

Hassan P, Fergusson D, Grant KM, Mottram JC (2001) The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 113:189–198.

Inoue AH, Serpeloni M, Hiraiwa PM, Yamada- SF, Muniz C, Cristina M, Motta M,

- Vidal NM (2014) Identification of a Novel Nucleocytoplasmic Shuttling RNA Helicase of Trypanosomes. PLoS One 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0109521
- Klein C, Terrao M, Gil DI, Clayton C (2015) Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with Initiation Factors and RNA- Binding Proteins. PLoS One 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0135973
- Kramer S, Bannerman-chukualim B, Ellis L, Boulden EA, Kelly S, Field MC, Carrington M (2013) 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. doi: 10.1371/journal.pone.0054004
- Kramer S, Carrington M (2011) Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. Trends Parasitol 27:23–30. doi: 10.1016/j.pt.2010.06.011
- Kramer S, Kimblin NC, Carrington M (2010) Genome-wide in silico screen for CCCH-type zinc finger proteins of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. BMC Genomics 11
- Leifso K, Cohen-freue G, Dogra N, Murray A, Mcmaster WR (2007) Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. Mol Biochem Parasitol 152:35–46. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.11.009
- Levin MJ (2000) The genes for a DEAH RNA helicase, a NifU like protein and the translation factor eIF6 constitute the SZ5 locus of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 111:207–211.
- Liang X, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003) Trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism, Factors, and Regulation. Eukaryot Cell 2:830–840. doi: 10.1128/EC.2.5.830
- Maugeri DA, Cazzulo JJ, Burchmore RJS, Barrett MP, Ogbunude POJ (2003) Pentose phosphate metabolism in *Leishmania mexicana*. Mol Biochem Parasitol 130 130:117–125. doi: 10.1016/S0166-6851(03)00173-7

Meleppattu S, Kamus-elimeleh D, Zinoviev A, Cohen-mor S, Orr I, Shapira M (2015) The eIF3 complex of Leishmania - subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. *Nucleic Acids Res* 43:6222–6235. doi: 10.1093/nar/gkv564

Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA (1999) Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Elsevier Sci* 24:186–191.

Mittra B, Ray DS (2004) Presence of a Poly(A)-Binding Protein and Two Proteins with Cell Cycle-Dependent Phosphorylation in *Crithidia fasciculata* mRNA Cycling Sequence Binding Protein II. *Eukaryot Cell* 3:1185–1197. doi: 10.1128/EC.3.5.1185

Moura DMN, Reis CRS, Xavier CC, Da Costa Lima TD, Lima C, Lima RP, Carrington M, De Melo Neto OP (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol* 12:305–319.

Nascimento LMD, Terra M, Marucha KK, Liu B, Egler F, Clayton C (2020) *Trypanosoma brucei*. *JBC Pap Press*. doi: 10.1074/jbc.RA120.013306

Padmanabhan PK, Dumas C, Samant M, Rochette A, Simard MJ (2012) Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan *Leishmania*. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0052612

Rajendran V, Kalita P, Shukla H, Kumar A, Tripathi T (2017) Aminoacyl-tRNA synthetases: structure, function, and drug discovery. *Biol Macromol*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.157

Ramakrishnan V (2002) and the Mechanism of Translation. *Cell* 108:557–572.

Rezende AM, Assis LA, Nunes EC, Da Costa Lima TD, Lima C, Marchini FK, Freire ER, Reis CRS, De Melo Neto OP (2014) The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates - identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. *BMC Genomics* 15:1–19. doi: 10.1186/1471-2164-15-1175

Santana da Costa K, Marcos Pereira Galúcio J, Leonardo ES, Cardoso G, Leal E, Conde G, Lameira J (2017) Molecular & Biochemical Parasitology Structural and evolutionary analysis of *Leishmania Alba* proteins. *Mol Biochem Parasitol* 217:23–31. doi: 10.1016/j.molbiopara.2017.08.006

Singh A, Minia I, Droll D, Fadda A, Clayton C (2014) Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. *Nucleic Acids Res* 42:4652–4668. doi: 10.1093/nar/gkt1416

Stewart M (2000) Insights into the Molecular Mechanism of Nuclear Trafficking Using Nuclear Transport Factor 2 (NTF2). *Cell Struct Fuction* 225:217–225.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S and RT (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118:1301–1310. doi: 10.1172/JCI33945

Trenaman A, Glover L, Hutchinson S, Horn D (2019) A post-transcriptional respiratome regulon in trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 47:25–28. doi: 10.1093/nar/gkz455

Ullman KS, Powers MA, Forbes DJ (1997) Nuclear Export Receptors: From Importin to Exportin. *Cell* 90:967–970.

Vazquez-Pianzola P (2005) Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mech Dev* 122:865–876. doi: 10.1016/j.mod.2005.04.002

Wippel HH, Malgarin JS, Inoue AH, Leprevost V, Carvalho PC, Goldenberg S, Alves LR (2019) Unveiling the partners of the DRBD2-mRNP complex, an RBP in *Trypanosoma cruzi* and ortholog to the yeast SR-protein Gbp2. *BMC Microbiol* 1–12.

Zinoviev A, Léger M, Wagner G, Shapira M (2011) A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Res* 39:8404–8415. doi: 10.1093/nar/gkr555

Zoltner M, Krienitz N, Field MC, Kramer S (2018) Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Negl Trop Dis* 0:1–18. doi: 10.1371/journal.pntd.0006679

Tabela 1. Proteínas co-precipitadas com PABP2-HA\*

<b>Nome</b>	<b>TryptDB Identificação</b>	<b>Média da Intensidade</b>	<b>Razão&gt;4</b>
<b>Tradução</b>			
→PABP2	LINF_350047100	1,28E+10	27,73
→PABP3	LINF_250005800	1,24E+09	17,25
→PABP1	LINF_350055900	7,25E+08	4,13
→EIF3b	LINF_170020200	2,78E+08	5,28
→EIF4G5	LINF_100017900	4,07E+07	5,86
tRNA S	LINF_300036900	3,45E+07	6,13
tRNA S	LINF_210013900	3,42E+07	4,81
→tRNA S	LINF_110005900	2,49E+07	8,42
<b>Transcrição</b>			
→PTSR1	LINF_070014900	6,88E+07	4,74
<b>Ligaçao ao RNA</b>			
→ZC3H41	LINF_270019700	3,38E+09	5,94
→DRBD2	LINF_350027200	1,42E+09	5,06
→Alba3	LINF_340031800	8,07E+08	4,05
→Pumilio P6 (Puf6)	LINF_330019100	5,47E+08	6,97
→Mitochondrial RBP2	LINF_090018500	3,80E+08	36,91
→Mitochondrial RBP1	LINF_270017500	2,78E+08	69,39
RBP (RRM)	LINF_180010900	2,47E+08	6,02
RBP35	LINF_350037400	8,91E+07	4,82
→ Ia RNA binding protein	LINF_210011000	8,47E+07	8,03
→RBP45	LINF_110006300	4,53E+07	5,10
→ZC3H34	LINF_310005700	3,59E+07	7,17
ZC3H39	LINF_190007800	3,16E+07	110,84
→REMC5	LINF_310012100	2,40E+07	4,51
→ZC3H40	LINF_190007900	1,90E+07	4,05
<b>Atividade catalítica</b>			
→Enolase	LINF_140018000	2,40E+08	5,17
RAB-like GTPase	LINF_320039600	1,52E+08	5,59
GTPase	LINF_360075000	1,27E+08	4,04
→PPD	LINF_110016000	1,02E+08	8,61
→GLP	LINF_260013100	8,32E+07	17,46
→MIM1/4M1	LINF_170021300	6,46E+07	15,54
SHMT-L	LINF_140019600	6,10E+07	6,21
2-ODa	LINF_210022900	5,88E+07	8,70
ATPS	LINF_210021600	5,77E+07	9,61
→SDF	LINF_240021800	5,30E+07	21,85
cAMP PA	LINF_180016300	3,60E+07	4,53
5-FCL	LINF_230019200	3,33E+07	12,83
→AE	LINF_010008000	3,19E+07	8,00
RRP40	LINF_040006300	2,61E+07	9,29
→1-2D3K5MD	LINF_340052200	2,47E+07	4,68
T1B	LINF_360048900	2,34E+07	4,37
→RNase PH	LINF_020008200	2,26E+07	6,84
<b>Transporte e processamento de RNA</b>			
→NTF2	LINF_210009700	7,63E+08	11,59
CCR4-Not	LINF_250025200	3,37E+08	4,24
→XPO1	LINF_320016700	2,28E+08	75,10
→PSF	LINF_340041200	7,77E+07	20,70
<b>Proteínas quinases e fosfatases</b>			
CRK3	LINF_360011000	2,24E+08	5,98
RK2	LINF_310038400	1,77E+08	5,10
PP2C	LINF_250013300	6,19E+07	10,66
PP2A	LINF_320037900	3,96E+07	130,63
PK	LINF_220017500	3,85E+07	4,82
S/T PP4	LINF_240006600	2,65E+07	17,02
<b>Proteínas flagelares e de citoesqueleto</b>			
PRC	LINF_360068600	2,28E+07	16,04
→CAP	LINF_220013200	2,06E+07	4,18
<b>Outras proteínas</b>			
RF A	LINF_280024500	2,63E+08	6,09
PX	LINF_140007100	1,92E+08	4,14
→DALC	LINF_240013500	1,66E+08	53,84
C40	LINF_350053300	1,48E+08	4,32
GRAM	LINF_040007500	1,40E+08	5,14
→UDPCP	LINF_050009500	1,29E+08	11,31
TPR	LINF_300040300	1,14E+08	5,15
H2A	LINF_210016900	8,90E+07	7,09
Leucine RRP	LINF_320037600	8,79E+07	6,66
PFC4	LINF_300033900	8,02E+07	50,11
CRAL/TRIO	LINF_300021700	7,56E+07	4,25
ATP11	LINF_350024500	4,94E+07	4,02

GOG7	LINF_260019800	4,00E+07	4,08
GTP BCM	LINF_280027300	3,99E+07	67,49
→VDASC	LINF_020009800	3,62E+07	12,11
WDRP	LINF_270033000	3,49E+07	5,04
D1L	LINF_290029700	2,38E+07	19,44
→TPR	LINF_330013900	2,27E+07	4,00
<b>Proteínas hipotéticas</b>			
-	LINF_060007800	1,42E+08	4,37
-	LINF_230011000	1,12E+08	4,67
→ -	LINF_160020100	5,05E+07	5,39
-	LINF_350023200	4,83E+07	56,89
-	LINF_040015700	3,88E+07	4,37
-	LINF_250007300	2,78E+07	10,43
-	LINF_210007300	2,44E+07	10,46
-	LINF_070008900	2,41E+07	5,45
-	LINF_340014500	2,28E+07	4,58
→ -	LINF_230005800	2,15E+07	5,19
-	LINF_290021100	2,12E+07	5,58

\*Na tabela são classificadas 81 proteínas que co-imunoprecipitaram com PABP2-HA através dos ensaios de imunoprecipitação realizados em triplicata. A razão mostrada para as amostras possui o aumento mínimo de 4 vezes sobre o controle negativo, com a consideração mínima das médias da intensidade até 1.000 vezes menor do que a mais alta. As proteínas que co-imunoprecipitaram também com a PABP3-HA são indicadas pelas setas antes das siglas.

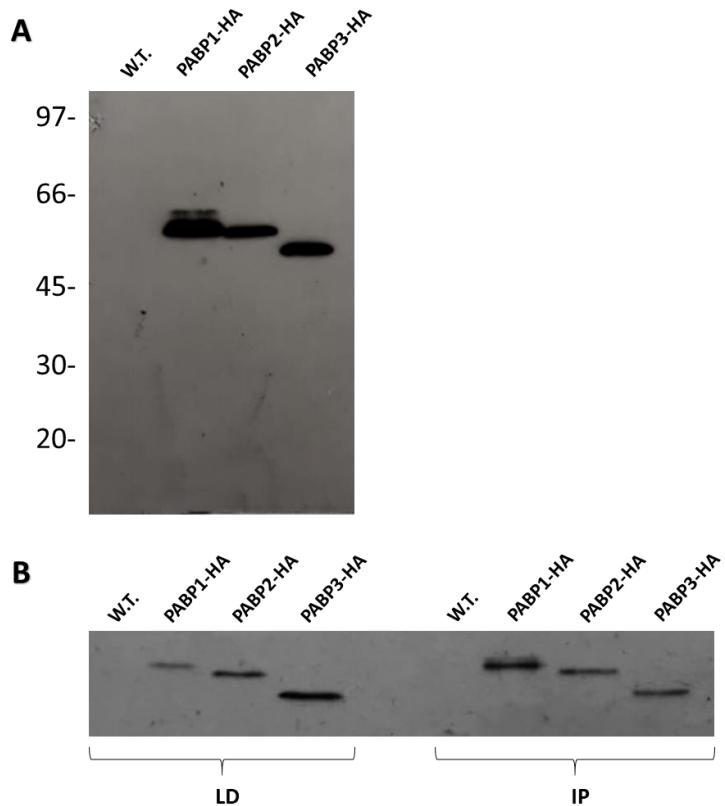
Tabela 2. Proteínas co-precipitadas com PABP3-HA\*

<b>Nome</b>	<b>TritrypDB Identificação</b>	<b>Média da Intensidade</b>	<b>Razão&gt;4</b>
<b>Tradução</b>			
→PABP3	LINF_250005800	1,55E+10	215,76
→PABP2	LINF_350047100	8,88E+09	19,19
→PABP1	LINF_350055900	9,80E+08	5,59
EFTu	LINF_180012600	8,72E+08	4,64
→EIF3b	LINF_170020200	2,88E+08	5,47
EIF4E4	LINF_300009600	7,71E+07	4,51
→EIF4G5	LINF_100017900	5,58E+07	8,05
tRNA S	LINF_270019800	5,44E+07	4,18
tRNA S	LINF_360047300	4,78E+07	6,51
tRNA S	LINF_350019000	4,72E+07	4,11
→tRNA S	LINF_110005900	1,70E+07	5,76
G5IP	LINF_320019400	4,69E+07	6,61
EIF6	LINF_360014600	1,59E+07	5,84
<b>Transcrição</b>			
TFIPL	LINF_290005100	2,86E+08	51,82
→PTSR1	LINF_070014900	7,89E+07	5,44
TFIIB	LINF_150019100	4,67E+07	6,57
<b>Ligação ao RNA</b>			
→ZC3H41	LINF_270019700	4,24E+09	7,44
ZF domain	LINF_270029500	3,07E+09	205,18
→DRBD2	LINF_350027200	1,48E+09	5,27
→Alba3	LINF_340031800	1,31E+09	6,59
→Mitochondrial RBP2	LINF_090018500	5,61E+08	54,44
→Pumilio P6 (Puf6)	LINF_330019100	4,92E+08	6,26
→Mitochondrial RBP1	LINF_270017500	3,04E+08	75,94
→RBP (RRM)	LINF_180010900	2,66E+08	6,49
RBP23	LINF_170011800	6,25E+07	9,03
→RBP45	LINF_110006300	5,84E+07	6,57
→ZC3H34	LINF_310005700	5,69E+07	11,39
→ Ia RNA binding protein	LINF_210011000	4,39E+07	4,16
→ REMC5	LINF_310012100	3,93E+07	7,40
DEAD/H	LINF_220021200	3,48E+07	61,47
→ZC3H40	LINF_190007900	2,13E+07	4,52
RRM	LINF_290036100	1,60E+07	5,10
<b>Atividade catalítica</b>			
5-HSS	LINF_290015200	5,68E+08	8,71
I5MD	LINF_190022000	3,88E+08	5,24
→Enolase	LINF_140018000	2,94E+08	6,32
CS	LINF_180012100	2,84E+08	12,37
→PPD	LINF_110016000	1,72E+08	14,47
6-PD	LINF_350038800	1,03E+08	100,36
→GLP	LINF_260013100	4,49E+07	9,43
→AE	LINF_010008000	4,32E+07	10,83
NOL1/NOP2	LINF_290033200	4,09E+07	4,51
tRNA U5M	LINF_200021600	3,39E+07	8,36
NatB	LINF_300010300	3,12E+07	4,22
→MI1/4M1	LINF_170021300	3,03E+07	7,29
→SDF	LINF_240021800	2,99E+07	12,33
S14αD	LINF_110017200	2,88E+07	4,91
DBCT	LINF_050006700	2,68E+07	37,68
→1-2D3K5MD	LINF_340052200	2,14E+07	4,05
ATP	LINF_310007700	2,02E+07	7,17
→RNase PH	LINF_020008200	1,65E+07	4,99
<b>Transporte e processamento de RNA</b>			
→NTF2	LINF_210009700	8,99E+08	13,65
→XPO1	LINF_320016700	4,69E+08	154,44
→PSF	LINF_340041200	2,17E+07	5,78
<b>Estrutura ribossomal</b>			
60S L18	LINF_360054400	4,82E+07	5,58
60S L11	LINF_220005300	4,35E+07	11,51
<b>Proteínas flagelares e de citoesqueleto</b>			
→CAP	LINF_220013200	2,70E+07	5,48
<b>Outras proteínas</b>			
HSP100	LINF_290018600	2,74E+08	5,30
→UDPCP	LINF_050009500	1,79E+08	15,66
→DALC	LINF_240013500	1,15E+08	37,53
LRRP	LINF_320037600	9,00E+07	6,82
→VDASC	LINF_020009800	5,48E+07	18,32
ATP11	LINF_350024500	4,98E+07	4,05
i6ALP	LINF_220020700	4,44E+07	5,88
PCNA	LINF_150022600	4,13E+07	5,69

<b>Proteínas hipotéticas</b>	→TPR	LINF_330013900	2,38E+07	4,20
	GTP BP	LINF_330027200	2,16E+07	77,55
	RAD51	LINF_280010500	1,63E+07	96,46
	-	LINF_190017000	8,52E+07	4,73
	→ -	LINF_160020100	3,89E+07	4,15
	→ -	LINF_230005800	3,07E+07	7,43
	-	LINF_100006500	2,21E+07	8,34

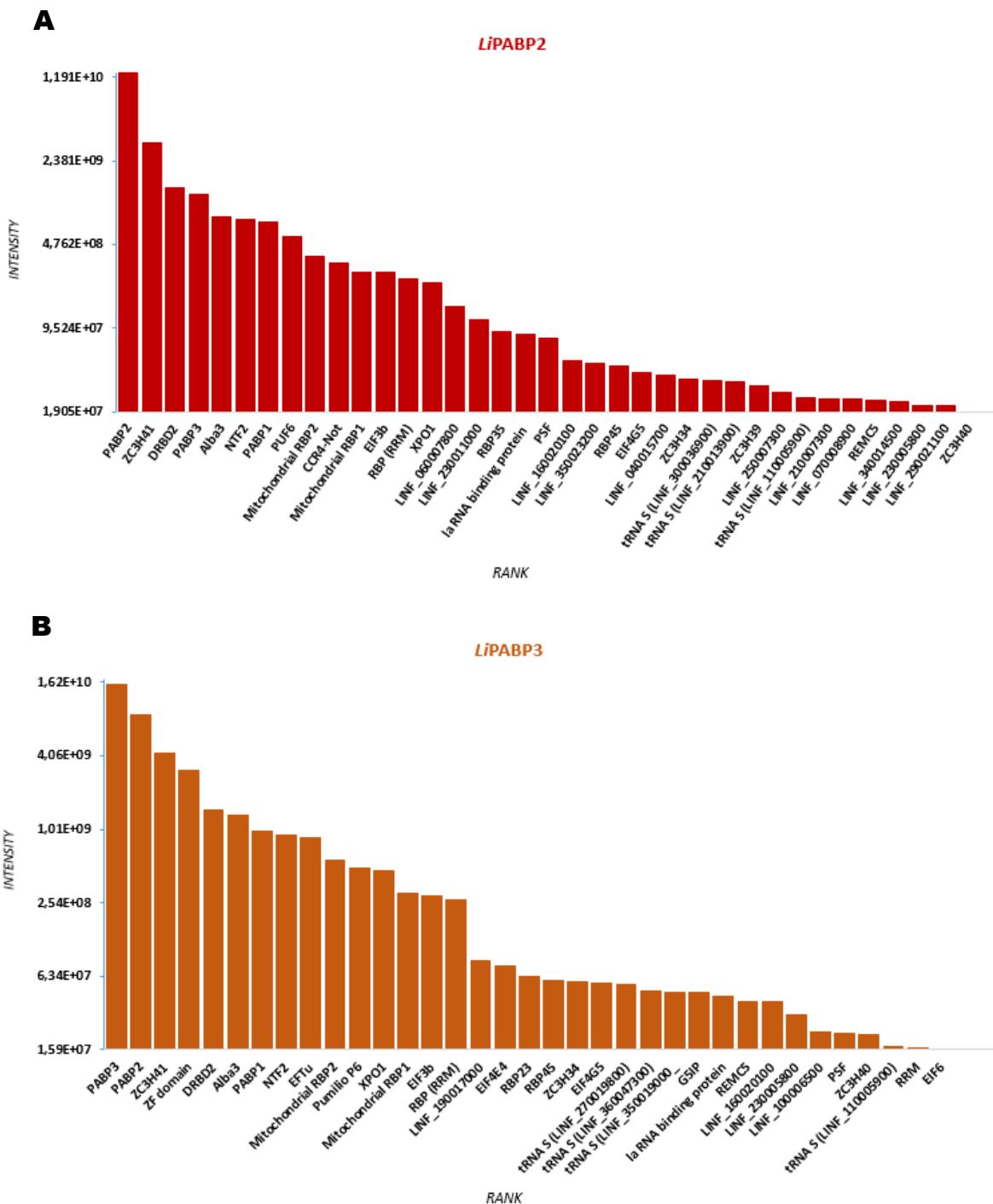
\*Na tabela são classificadas 71 proteínas que co-imunoprecipitaram com PABP3-HA através dos ensaios de imunoprecipitação realizados em triplicata. A razão mostrada para as amostras possui o aumento mínimo de 4 vezes sobre o controle negativo, com a consideração mínima das médias da intensidade até 1.000 vezes menor do que a mais alta. As proteínas que co-imunoprecipitaram também com a PABP2-HA são indicadas pelas setas antes das siglas.

**Santos Filho et al., 2020 - Figura 1**



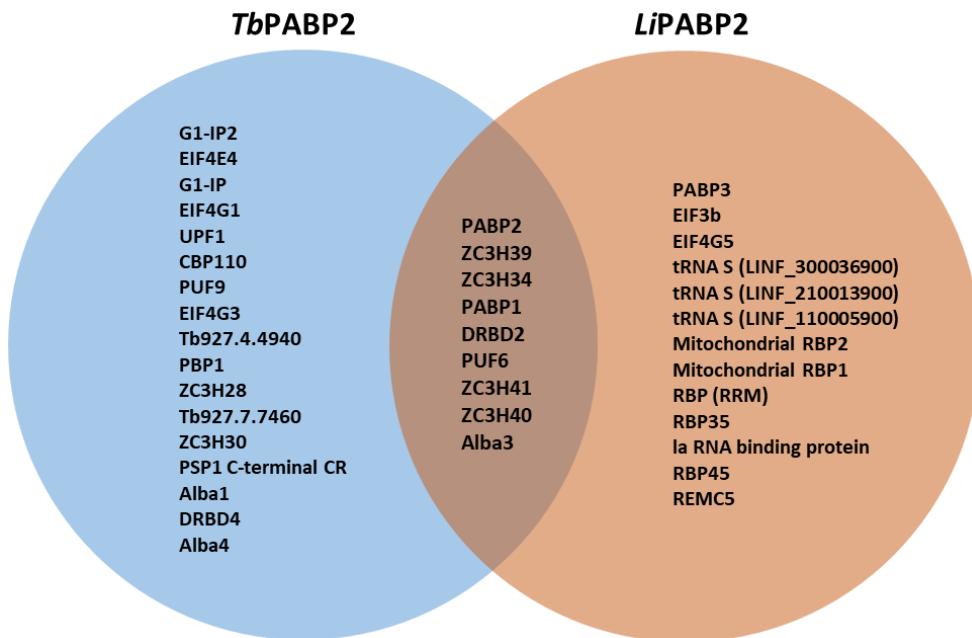
**Figura 1. Filme do western blot confirmando a presença das PABPs fusionadas ao epítopo HA nos lisados citoplasmáticos e nas imunoprecipitações.** Como controle negativo foi utilizada uma linhagem selvagem (WT) de *L. infantum*. A PABP2-HA e a PABP3-HA foram comparadas também com a PABP1-HA, a qual já tinha sido estudada em trabalhos anteriores do grupo (De Melo Neto et al., 2018). Para este ensaio foi utilizado um anticorpo comercial anti-HA. **A)** Filme do *Western-Blot* confirmando os lisados citoplasmáticos realizados através de cavitação. **B)** Filme do *Western-Blot* confirmando as imunoprecipitações (IP) em comparação aos lisados depletados (LD).

## Santos Filho et al., 2020 - Figura 2



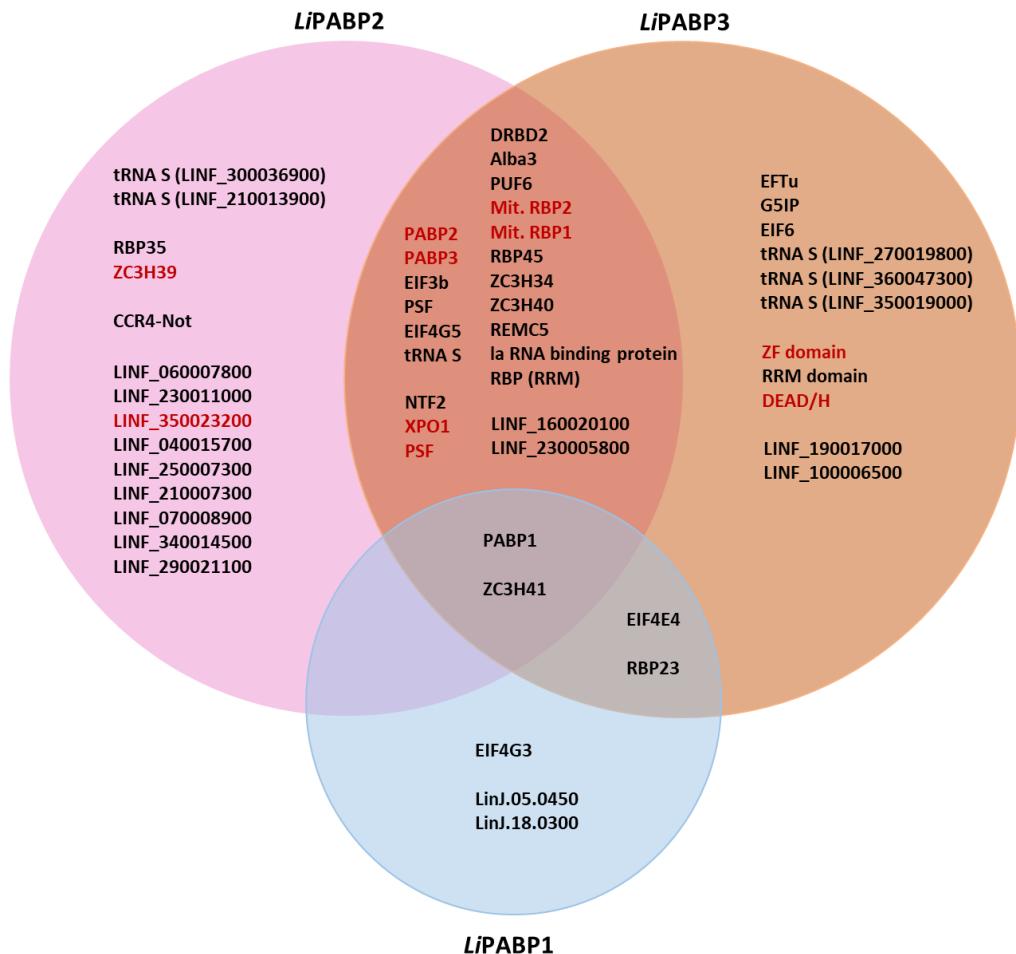
**Figura 2. Proteínas associadas às PABPs 2 e 3 organizadas de acordo com as taxas médias de intensidade.** Os gráficos são um resumo das tabelas gerais e foram construídos selecionando apenas as proteínas presentes nos grupos relacionados à tradução, ligação aos RNAs, transporte núcleo-citoplasma e proteínas hipotéticas. Os intervalos foram adequados de acordo com as proteínas de maior intensidade nas respectivas co-precipitações com as PABPs 2 e 3. **A)** Proteínas que co-precipitaram com a PABP2 (vermelho). **B)** Proteínas que co-precipitaram com a PABP3 (laranja).

**Santos Filho et al., 2020 - Figura 3**



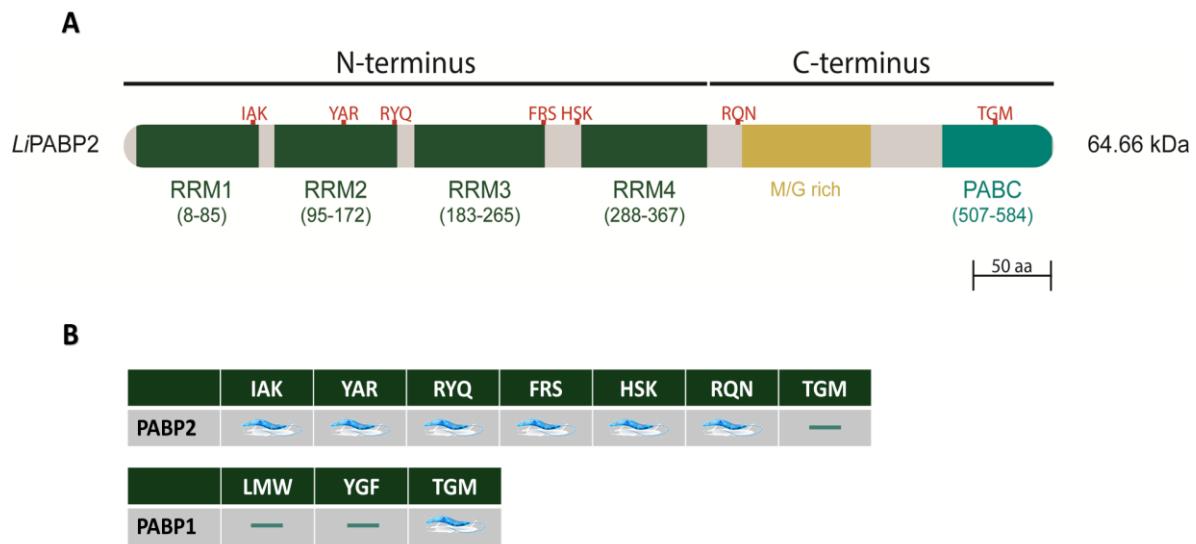
**Figura 3. Diagrama de Venn comparando as proteínas co-precipitadas com a PABP2 de *Trypanosoma brucei* e com a PABP2 de *Leishmania infantum*.** Para a comparação equivalente foram consideradas as proteínas pertencentes aos grupos relacionados à tradução e à ligação ao RNA. No círculo azul estão os parceiros de associação específica com a PABP2 de *T. brucei* (*TbPABP2*) e no círculo rosa estão as proteínas que imunoprecipitaram especificamente com a PABP2 de *L. infantum* (*LiPABP2*). Na região de intersecção estão os polipeptídios co-precipitados de forma comum entre a *TbPABP2* e a *LiPABP2*. Os dados referentes às co-precipitações de *T. brucei* foram obtidos de um trabalho anterior (Zoltner et al., 2018).

### Santos Filho et al., 2020 - Figura 4



**Figura 4. Diagrama de Venn das proteínas co-precipitadas com os três homólogos de PABP.** O diagrama é um resumo das tabelas gerais. Foram consideradas apenas as proteínas pertencentes aos grupos relacionados à tradução, ligação aos RNAs, transporte núcleo-citoplasma e proteínas hipotéticas, onde estão destacadas em vermelho as proteínas com um alto enriquecimento da amostra em relação ao controle negativo (valores da razão  $\geq 20$ ). Para fins comparativos, foram adicionados à figura os dados de co-precipitação com a PABP1 de um trabalho anterior do grupo (De Melo Neto et al., 2018). É possível observar co-precipitações que foram comuns às PABPs (PABP1 e a zinc finger ZC3H41) e aquelas que foram comuns às PABPs 1 e 3 (o fator de iniciação da tradução EIF4E4 e a proteína de ligação ao RNA, RBP23).

Santos Filho et al., 2020 - Figura 5



**Figura 5. Esquema da localização dos motivos da PABP2 de *L. infantum* que sofreram mutação e seus respectivos efeitos na viabilidade celular.** A) Localização dos mutantes da PABP2, incluindo aqueles presentes exclusivamente neste homólogo (RYQ, FRS, HSK e RQN). B) Comparação dos efeitos dos mutantes da PABP1 e da PABP2 na viabilidade das linhagens celulares. Os desenhos de *Leishmania* indicam a sobrevivência das células, enquanto os traços apontam os motivos essenciais devido à inviabilidade celular. Os dados dos mutantes da PABP1 foram obtidos através de trabalhos anteriores do grupo (DE MELO NETO et al., 2018).

## 5 DISCUSSÃO GERAL

As possíveis diferenças descritas na literatura sobre o comportamento das PABPs de *Leishmania* spp. e outros tripanosomatídeos, tanto em comparação com seus equivalentes em outros eucariotos como entre os três homólogos de PABP identificados nestes organismos, estimulou a busca pelas funções e mecanismos de ação dessas proteínas e seu papel em processos como biogênese, transporte e tradução de mRNAs. Tanto a PABP2 quanto a PABP3 se acumulam no núcleo diante da inibição da transcrição utilizando actinomicina D, enquanto a PABP1 permanece, em maioria, no citoplasma (DA COSTA LIMA et al., 2010). Ainda diferente da PABP1, em ensaios de inibição da maturação de mRNAs por sinefungina associados à indução de choque térmico, a PABP2 também foi detectada se concentrando no núcleo celular, principalmente no estudo de grânulos de estresse por choque térmico (KRAMER et al., 2013).

Diante da diferença de comportamento entre as PABPs presentes em tripanosomatídeos, já era esperado a co-precipitação com populações de mRNAs também distintas; ao menos no que diz respeito à comparação da PABP1 com as PABPs 2 e 3. Na verificação de associações exclusivas entre os transcritos e as PABPs, a PABP1 manteve associações muito mais direcionadas com os seus transcritos, ligando-se em grande maioria aos mRNAs de proteínas ribossomais. Esses dados corroboram com estudos anteriores onde foram observadas atividades muito mais específicas da PABP1 em relação às suas interações (DE MELO NETO et al., 2018; ZOLTNER et al., 2018).

Com relação aos dados obtidos referentes aos transcritos associados à PABP2, foi observado uma diversidade muito maior entre a distribuição das populações de mRNAs. Essa distribuição se apresentou de maneira semelhante ao perfil dos transcritos co-precipitados com a PABP3, o que mais uma vez sugere atividades redundantes entre esses dois homólogos no que concerne às ligações com mRNAs alvos. Além disso, uma redundância funcional entre as PABPs 2 e 3 poderia ser um dos motivos que levou a perda deste terceiro homólogo em algumas espécies de *Trypanosoma* (KRAMER et al., 2013). Por outro lado, entre os mRNAs mais enriquecidos nas associações, não foram observados mRNAs imunoprecipitados comuns à PABP1 e à PABP2, fortalecendo um cenário de

atividades diferentes entre essas proteínas como foi sugerido em estudos mais recentes (ZOLTNER et al., 2018).

Mesmo não sendo os transcritos mais enriquecidos como aqueles classificados em “atividade catalítica” e “atividade de ligação”, os mRNAs de histonas se mostraram presentes na seleção diferencial, tanto para a PABP2 quanto para a PABP3, uma vez que nos tripanosomatídeos, diferente de eucariotos complexos, os mRNAs de histonas também se apresentam poliadenilados (ASLUND et al., 1994; LÓPEZ; SAMUELSSON, 2008). Já foi observado que esses mRNAs não são transcritos apenas durante a fase S do desenvolvimento (RECINOS et al., 2001), mas os nossos dados sugerem que parte da regulação desses parasitos pode ser influenciada por estágios específicos do ciclo celular.

Nos resultados obtidos por espectrometria de massa, as associações das PABPs 2 e 3 evidenciam um comportamento recíproco entre esses dois homólogos por imunoprecipitarem juntos. A possibilidade de funções parecidas pode ter feito com que ambos se associem de forma similar à grande parte dos parceiros proteicos e também às mesmas populações de mRNAs. A PABP2 e a PABP3 co-precipitaram em maioria com as mesmas proteínas de ligação aos RNAs (RBPs). Essas proteínas, interagem com motivos de mRNAs usando domínios funcionais como RRM, dedo de zinco (*Zinc Finger*), Pumilio e Alba, os quais são considerados os mais relevantes dessa classe em tripanosomatídeos (CLAYTON, 2013; KOLEV et al., 2015).

Com relação aos domínios citados, entre os dados que chamaram a atenção, está a presença das proteínas Pumilio e Alba associando-se exclusivamente às PABPs 2 e 3. As proteínas Alba desempenham importantes funções na regulação e controle da tradução de mRNAs (ARAVIND et al., 2003; MANI et al., 2011). Já as proteínas de ligação ao RNA da família Pumilio constitui um grupo de proteínas conservadas em eucariotos com afinidade à região 3'UTR de mRNAs, controlando também a estabilidade e a tradução desses transcritos (WICKENS et al., 2002; FOLGUEIRA et al., 2010; WANG et al., 2018). A associação específica das PABPs 2 e 3 com proteínas desses grupos também pode sugerir outras funções distintas para esses dois homólogos.

Nas co-precipitações de ambos os homólogos de PABP, foi constatada a presença de proteínas *Zinc Fingers*, geralmente observadas ligando-se às sequências de regiões não traduzidas 3' UTRs, regulando os níveis de degradação

de mRNAs com regiões ricas em AU (KRAMER; CARRINGTON, 2011). Incluída nessas imunoprecipitações está a ZC3H41, que é estruturalmente semelhante a uma helicase e que está associada a polissomos. Nas formas sanguíneas de *Trypanosoma* spp. a ZC3H41 atua recrutando as PABPs na formação de um possível cenário de estabilização desses transcritos (SINGH et al., 2014; KLEIN et al., 2015).

Outra proteína de ligação que já foi alvo de estudos anteriores e que também se mostrou associada às PABPs 2 e 3 foi a DRBD2, uma proteína reguladora da expressão de mRNAs e que foi descrita distribuída ao longo da região perinuclear em tripanosomatídeos (LUEONG et al., 2016; DEAN et al., 2017), o que motivaria a sua migração para o núcleo e a interação com as PABPs 2 e 3. Essa afirmação é reforçada através da comparação com outras DRBDs, localizadas principalmente no citoplasma e que possuem um comportamento similar ao da DRBD2, onde em condições de estresse permanecem ligadas aos mRNAs, concentrando-se no núcleo, sendo este um comportamento típico de proteínas que atuam no transporte de mRNAs (FERNA; ESTE, 2012).

As PABPs 2 e 3 imunoprecipitaram com proteínas que atuam no transporte núcleo-citoplasma, incluindo um domínio de fator de transporte nuclear (NTF2) e uma exportina (XPO1). Essas proteínas reconhecem sinais de importação e exportação do núcleo e atuam no transporte de elementos através do canal do poro nuclear (ULLMAN et al., 1997), além de interagirem com nucleoporinas que se ligam às proteínas migradoras e que são essenciais aos sistemas de transporte (STEWART, 2000). As associações dessas proteínas com os homólogos 2 e 3 de PABP pode ser uma resposta da facilitação do tráfego entre o núcleo e o citoplasma, contribuindo para a dinâmica e para as funções de transporte das PABPs.

Entre os fatores de iniciação da tradução que foram comuns às coprecipitações com as PABPs 2 e 3 estão o EIF4G5 e o EIF3b. A associação do EIF4G5 nos dados de imunoprecipitação em *L. infantum* pode indicar funções dessas PABPs que estão além daquelas relacionadas diretamente com a tradução. Em estudos anteriores realizados em *T. brucei*, o EIF4G5 não tinha sido diretamente relacionado ao processo de tradução (FREIRE et al., 2014), no entanto, estudos mais recentes mostraram a associação deste homólogo e do seu parceiro EIF4E6 com proteínas envolvidas na tradução como MKT1 e MKT1L (NASCIMENTO et al., 2020). Em *Leishmania* spp., ensaios de interação mostraram as subunidades do

elf3 associando-se com o EIF4G3, o que sugere uma atividade de recrutamento do elf3 pelo EIF4G3 (MELEPPATTU et al., 2015). Trabalhos mais recentes envolvendo os tripanosomatídeos mostraram a co-precipitação da PABP2 com o EIF4G3 (ZOLTNER et al., 2018). Caso essa associação também ocorra em espécies de *Leishmania*, poderia estar relacionado com a presença da subunidade do elf3 nestes resultados, além da possibilidade de realmente ocorrer interações específicas entre o EIF3b e as PABPs de *Leishmania* spp.

Entre os fatores de iniciação que imunoprecipitaram apenas com a PABP3, estão o EIF4E4 e o elf6. O EIF4E4 é uma proteína abundante que reconhece o cap do mRNA e faz parte do complexo elf4F que é responsável pela regulação do início da tradução nos tripanosomatídeos. Este fator é expresso ao longo de todo o desenvolvimento do parasito e possui uma região N-terminal que pode ser direcionada para fosforilação (YOFFE et al., 2009; ZINOVIEV et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; MOURA et al., 2015). A presença do EIF4E4 nas co-precipitações da PABP3 pode ser devido à sua interação com a PABP1, já que este homólogo de PABP também co-precipitou com a PABP3 (ZINOVIEV et al., 2011; DE MELO NETO et al., 2015). Com relação à classe do elf6, ainda não foram descritas informações detalhadas nesses parasitos, tornando difícil evidenciar o verdadeiro motivo de sua presença nos dados da PABP3 (LEVIN, 2000; VAZQUEZ-PIANZOLA, 2005).

Assim como as PABPs, a RBP23 é uma das proteínas de ligação ao RNA que estimulam a tradução quando ligadas à extremidade 3' dos mRNAs. Nos dados obtidos, a RBP23 apareceu co-precipitada com a PABP3 e da mesma forma que o EIF4E4 isto pode ter acontecido devido à sua associação exclusiva com a PABP1 em *T. brucei* (ZOLTNER et al., 2018). Uma outra explicação é que em *Leishmania* spp. a RBP23 interage não somente com PABP1, mas também com as outras PABPs, uma vez que os três homólogos de PABP possuem presumivelmente o domínio de interação com a RBP23, descrito a princípio como sendo o RRM4 que é localizado na região N-terminal (ASSIS et al., não publicado). Apesar do que é discutido para as possíveis interações *in vitro* da RBP23 com as PABPs, outras ligações podem acontecer *in vivo*, permitindo realmente a interação direta desta proteína de ligação apenas com a PABP1.

Nos ensaios de complementação com os mutantes, foi demonstrada a essencialidade da PABP2 em células de *L. infantum*, tendo em vista que a deleção dos dois alelos do gene deste homólogo não permitiu a sobrevivência das células.

Entre as regiões observadas, o domínio MLLE compreende o único motivo que demonstrou ser essencial, sugerindo o papel desta região para as interações importantes da PABP2; o que não acontece na análise do mesmo motivo interno nos trabalhos com a PABP1 (DE MELO NETO et al., 2018). Esse dado corrobora com estudos anteriores que realizaram *knockdown* em *T. brucei* através de RNAi, onde descreveram a PABP1 e a PABP2 como homólogos independentes e essenciais para esses organismos (DA COSTA LIMA et al., 2010).

O domínio MLLE é responsável pelas interações a diferentes parceiros (KOZLOV et al., 2010) e os resultados obtidos indicam que esse domínio é fundamental para a PABP2, mas pode não ser para a PABP1, indicando então atividades menos específicas da PABP2. Um cenário parecido é observado nos resultados relacionados ao RRM2, relatado como essencial para a PABP1 com base na mutagênese de um motivo crítico para sua função, mas não para a PABP2 com mutação em motivo equivalente. Em eucariotos, os dois primeiros RRMs da PABP medeiam as ligações mais direcionadas ao poli-A e de fato os motivos alvos de mutagênese estão diretamente implicados nessa função, com os resultados obtidos indicando talvez uma menor necessidade de reconhecimento específico da PABP2 dos seus alvos, algo que talvez poderia ser compensado pela PABP3. Já os RRMs 3 e 4 não participam das interações com a cauda poli-A, estando mais relacionados às ligações com regiões ricas em AU na 3'UTR, que são importantes para a estabilidade de mRNAs (SLADIC et al., 2004; CHENG; GALLIE, 2007; GUERRA et al., 2011).

Com relação aos outros motivos investigados localizados nos RRMs 1 e 4 e na região *Linker*, estes ainda podem ser importantes para a conformação da PABP2 ou para possíveis interações que ocorrem em outros estágios do desenvolvimento de *Leishmania* spp, tendo em vista a diminuição na taxa de crescimento e a alteração da morfologia convencional ocasionadas pelas mutações desses motivos. Pesquisas mais direcionadas através de ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massa devem ser realizadas, buscando principalmente o perfil de parceiros proteicos diante das alterações nos domínios descritos. No geral, foi possível determinar que apesar das PABPs 2 e 3 participarem também do processo de tradução, associam-se à diferentes mRNAs quando comparados à PABP1 – dados sugeridos por Da Costa Lima (2010) e De Melo Neto (2018). Além da participação na síntese proteica, estes dois homólogos possivelmente possuem

papeis importantes nos processos de transporte de mRNAs e no metabolismo dos transcritos. Os resultados obtidos poderão contribuir com os estudos de regulação de *Leishmania* spp. e de outros trimanosomatídeos.

## 6 CONCLUSÕES

- Diferente da PABP1, as PABPs 2 e 3 praticamente não se associaram com mRNAs codificantes de proteínas ribossomais, o que caracteriza uma divergência de atividades entre esses homólogos
- As PABPs 2 e 3 estão associadas às mesmas populações de mRNAs e à maioria dos parceiros proteicos, comprovando a similaridade de funções entre elas.
- A co-precipitação de um fator de transporte nuclear (NTF2) e de uma exportina (XPO1) com as PABPs 2 e 3 é sugestivo para uma possível caracterização quanto às suas funções no transporte núcleo-citoplasma de mRNAs.
- A associação das PABPs 2 e 3 com diferentes fatores de iniciação da tradução como EIF4G5, EIF4E4, EIF3b e EIF6 é uma indicação de atividades relacionadas ao processo de tradução.
- A PABP2 possui um papel essencial para o funcionamento e sobrevivência das células de *L. infantum*, tendo como domínio fundamental para as suas interações o MLLE através do motivo 547**TGM**549.
- As alterações ocasionadas pelo DKO dos mutantes 80**IAK/AAA**82, 284**HSK/AAA**286 e 385**RQN/AAA**387, sugerem a influência dos respectivos motivos no auxílio de outras interações ou simplesmente atuando na conformação da PABP2.

## REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI M.; KUHLS K.; CANNET A.; VOTÝPKA J.; MARTY P. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n.3, p.1-40, 2016.
- ALI M.U.; SAIF M.; RAHMAN U. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. **Tumor Biol**, v.39, n.6, 2017.
- ALSFORD S.; ECKERT S.; BAKER N.; GLOVER L.; SANCHEZ-FLORES A.; LEUNG KF.; TURNER D.J.; FIELD M.C.; BERRIMAN M.; HORN D. Europe PMC Funders Group High-throughput decoding of anti-trypanosomal drug efficacy and resistance. **Nature**, v.482, p.232-236, 2012.
- ARAVIND L.; IYER LM.; ANANTHARAMAN V. The two faces of Alba: the evolutionary connection between proteins participating in chromatin structure and RNA metabolism. **Genome Biol**, v.4, p.1-9, 2003.
- ASLUND L.; CARLSSON L.; HENRIKSSON J.; RYDGTKER M.; TORO G.C.; GALANTI N. A gene family encoding heterogeneous histone H1 proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.65, p.317-330, 1994.
- BATES E.J.; KNUEPFER E.; SMITH D.F. Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. **Nucleic Acids Res**, v.28, p.1211-1220, 2000.
- BROWNING K.S.; BAILEY-SERRES J. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. **Am Soc Plant Biol**, v.13, 2015.
- CAMPBELL D.A.; THOMAS S.; STURM N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect**, v.5, p.1231-1240, 2003.
- CASTELLO A.; FISCHER B.; HENTZE M.W.; PREISS T. RNA-binding proteins in Mendelian disease. **Trends Genet**, v.29, p.318-327, 2013.
- CAVALLI A.; BOLOGNESI M.L. Neglected Tropical Diseases : Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against Trypanosoma and Leishmania. **J Med Chem**, v.52, n.23, p.7339-7359, 2009.
- CHENG S.; GALLIE D.R. eIF4G, eIFiso4G and eIF4B Bind the Poly(A)-binding Protein through Overlapping Sites within the RNA Recognition Motif Domains. **J Biol Chem**, v.282, p.25247-25258, 2007.
- CLAYTON C. The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. **PLOS Pathog**, v.9, p.9-12, 2013.
- CLAYTON C.; SHAPIRA M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, v.156, p.93-101, 2007.

DA COSTA LIMA T.D.; LIMA C.; MOURA D.M.N.; REIS C.R.S.; VASCONCELOS J.R.C.; ELLIS L.; CARRINGTON M.; FIGUEIREDO R.C.B.Q.; DE MELO NETO O.P. Functional Characterization of Three *Leishmania* Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. **Eukaryot Cell**, v.9, p.1484-1494, 2010.

DANTAS-TORRES F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Vet Parasitol**, v.149, p.139-146, 2007.

DE MELO NETO O.P.; DA COSTA LIMA T.D.C.; MERLO K.C.; ROMÃO T.P.; ROCHA P.O.; ASSIS L.A.; NASCIMENTO L.M.; XAVIER C.C.; REZENDE A.M.; REIS C.R.S. Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. **RNA Biol**, v.15, p.739-755, 2018.

DE MELO NETO O.P.; REIS C.R.S.; MOURA D.M.N.; FREIRE E.R.; CARRINGTON M. **Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (Trypanosoma and Leishmania) Species**, v.1, 2016.

DE MELO NETO O.P.; DA COSTA LIMA T.D.; LIMA C.; MERLO K.C.; ROMÃO T.P.; ROCHA P.O.; ASSIS L.A.; NASCIMENTO L.M.; XAVIER C.C.; REZENDE A.M. Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* poly(A)-binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. **RNA Biol**, v.15, n.6, p.739-755, 2018.

DE MELO NETO O.P.; DA COSTA LIMA T.D.; LIMA C.; XAVIER C.C.; NASCIMENTO L.M.; ROM T.P. The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. **RNA Biol**, v.12, n.11, p.1209-1221, 2015.

DE SOUZA ROCHA L.; DOS SANTOS C.B.; FALQUETO A.; GRIMALDI G.; CUPOLILLO E. Molecular biological identification of monoxenous trypanosomatids and *Leishmania* from antropophilic sand flies (Diptera: Psychodidae) in Southeast Brazil. **Parasitol Res**, v.107, p.465-468, 2010.

DEAN S.; SUNTER J.D.; WHEELER R.J. A Trypanosome Protein Localisation Resource. **Trends Parasitol**, v.33, p.80-82, 2017.

DEO RC.; BONANNO J.B.; SONENBERG N.; BURLEY S.K. Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein. **RNA Biol**, v.98, p.835-845, 1999.

TEIXEIRA M.C.A.; SANTOS R.J.; SAMPAIO R.B.; PONTES-DE-CARVALHO L.; DOS-SANTOS W.L.C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitol Res**, v.88, n.11, p.963-968, 2002.

DOSTÁLOVÁ A.; VOLF P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors** v.5, p.1-12, 2012.

DOWER K.E.N.; ROSBASH M. T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' End formation to mRNA nuclear export. **RNA**, v.8, p.686-697, 2002.

ECKMANN C.R.; RAMMELT C.; WAHLE E. Control of poly(A) tail length. **RNA**, v.2, n.3, p.348-361, 2011.

ELISEEVA I.A.; LYABIN D.N.; OVCHINNIKOV L.P. Poly(A)-Binding Proteins : Structure, Domain Organization and Activity Regulation. **Biochem**, v.78, p.1377-1391, 2013.

FERNA S.M.; ESTE A.M. Alterations in DRBD3 Ribonucleoprotein Complexes in Response to Stress in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One** v.7, p.1-10, 2012.

FILEMON, P.; PIMENTA P.V.C. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus insetos vetores. **Top Avançados em Entomol Mol**, v.1, p.1-45, 2012.

FOLGUEIRA C.; MARTÍNEZ-BONET M.; REQUENA J.M. The *Leishmania infantum* PUF proteins are targets of the humoral response during visceral leishmaniasis. **BMC Res. Notes**, v.3, p.13, 2010.

FREIRE E.R.; MALVEZZI A.M.; VASHISHT A.A.; ZUBEREK J.; SAADA E.A.; LANGOUSIS G.; MOURA D.; DARZYNKIEWICZ E.; HILL K.; DE MELO NETO O.P. *Trypanosoma brucei* Translation Initiation Factor Homolog EIF4E6 Forms a Tripartite Cytosolic Complex with EIF4G5 and a Capping. **Eukaryot Cell**, v.13, p.896-908, 2014.

FREIRE E.R.; STURM N.R.; CAMPBELL D.A.; DE MELO NETO O.P. The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. **Pathogens**, v.6, n.4, p.55, 2017.

FREITAS-JUNIOR L.H.; CHATELAIN E.; ANDRADE H.; SIQUEIRA-NETO J.L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int J Parasitol Drugs Resist**, v.2, p.11-19, 2012.

GAUDENZI J.G.; NOÉ G.; CAMPO V.A.; FRASCH A.C. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays Biochem**, v.51, p.31-46, 2011.

GOSS D.J.F.E.K. Poli(A)-binding proteins: are they all created equal? **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v.4, p.167-179, 2014.

GUERRA N.; VEGA-SENDINO M.; PÉREZ-MORGADO M.I.; RAMOS E.; SOTO M.; GONZALEZ V.M.; MARTÍN M.E. Identification and functional characterization of a poly(A)-binding protein from *Leishmania infantum* (*LiPABP*). **FEBS Lett**, v.585, p.193-198, 2011.

GÜNESDOGAN U.; JÄCKLE H.; HERZIG A. Histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression. **eLife**, v.146, p.1-19, 2014.

GUNZL A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryot Cell**, v.9, p.1159-1170, 2010.

HAILE S.; PAPADOPOULOU B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion Microbiology**, v.10, p.669-577, 2007.

HAMMELL C.M.; GROSS S.; ZENKLUSEN D.; HEATH C.V.; STUTZ F.; MOORE C.; COLE C.N. Coupling of Termination, J Processing and mRNA Export. **Mol Cell Biol**, v.22, p.6441-6457, 2002.

HINNEBUSCH A.G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. **Annu Rev Biochem**, v.83, p.779-812, 2014.

HU H.; WANG C.C.; LI Z. The G1 Cyclin-dependent Kinase CRK1 in *Trypanosoma brucei* Regulates Anterograde Protein Transport by Phosphorylating the COPII Subunit Sec31. **J Biol Chem**, v.291, p.15527-15539, 2016.

JACKSON R.J.; HELLEN C.U.T.; PESTOVA T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.11, n.2, p.123-127, 2010.

KACHAEV Z.M.; LEBEDEVA L.A.; SHAPOSHNIKOV A.V.; MORESCO J.J. Paip2 cooperates with Cbp80 at an active promoter and participates in RNA Polymerase II phosphorylation in *Drosophila*. **FEBS Lett**, v.593, p.1102-1112, 2019.

KHALEGHPOUR K.; SVITKIN Y.V.; CRAIG A.W.; DEMARIA C.T.; DEO R.C.; BURLEY S.K.; SONENBERG N. Translational Repression by a Novel Partner of Human Poly(A)-Binding Protein, Paip2. **Mol Cell**, v.7, p.205-216, 2001.

KLEIN C.; TERRAO M.; GIL D.I.; CLAYTON C. Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with Initiation Factors and RNA-Binding Proteins. **PLoS One**, v.10, n.8, p.1-12, 2015.

KOLEV N.G.; ULLU E.; TSCHUDI C. The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **Cell Microbiol**, v.16, p.482-489, 2015.

KOZLOV G.; MÉNADE M.; ROSENAUER A.; NGUYEN L.; GEHRING K.; OSLER W. Molecular Determinants of PAM2 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein. **J Mol Biol**, v.397, p.397-407, 2010.

KRAMER S.; BANNERMAN-CHUKUALIM B.; ELLIS L.; BOULDEN E.A.; KELLY S.; FIELD M.C.; CARRINGTON M. 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, 2013.

KRAMER S.; CARRINGTON M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends Parasitol**, v.27, p.23-30, 2011.

KUHLS K.; ZAHANGIR M.; CUPOLILLO E.; FERREIRA G.E.M.; ISABEL L.;

ODDONE R.; FELICIANGELI M.D.; WIRTH T.; MILES M.A. Comparative Microsatellite Typing of New World Leishmania infantum Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. **PLoS Negl Trop Dis**, v.5, p.1–16, 2011.

KUHN U.; WAHLE E. Structure and function of poly(A)-binding proteins. **Biochim Biophys Acta** v.1678, p.67-84, 2004.

LAURENTI M.D. **Patologia e patogenia das leishmanioses**. Tese de Doutorado. São Paulo, 2010.

LEVIN M.J. The genes for a DEAH RNA helicase a NifU like protein and the translation factor eIF6 constitute the SZ5 locus of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v.111, p.207-211, 2000.

LIANG X.; HARITAN A.; ULIEL S.; MICHAELI S. Trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors and Regulation. **Eukaryot Cell**, v.2, p.830-840, 2003.

LÓPEZ M.D.; SAMUELSSON T. Early evolution of histone mRNA and processing. **RNA**, v.14, p.1-10, 2008.

LUEONG S.; MERCE C.; FISCHER B.; HOHEISEL J.D.; ERBEN E.D. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Mol Microbiol**, v.100, p.457-471, 2016.

LUKES J.; SKALICKY T.; TYC J.; VOTYPKA J.Y. Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellate. **Mol Biochem Parasitol**, v.195, n.2, p.115-122, 2014.

MANGUS D.A.; EVANS M.C.; JACOBSON A. Protein family review Poly(A)-binding proteins : multifunctional scaffolds for the post- transcriptional control of gene expression. **Genome Biol**, v.4, p.1-14, 2003.

MANI J.; GUTTINGER A.; SCHIMANSKI B.; HELLER M.; ACOSTA-SERRANO A.; MANI J.; GU A. Alba-Domain Proteins of *Trypanosoma brucei* Are Cytoplasmic RNA-Binding Proteins That Interact with the Translation Machinery. **PLoS One** v.6, n.7, 2011.

MANNAERT A.; DOWNING T.; IMAMURA H.; DUJARDIN J.C. Adaptive mechanisms in pathogens: Universal aneuploidy in Leishmania. **Trends Parasitol**, v.28, p.370-376, 2012.

MARCONDES M.; ROSSI C.N. Visceral leishmaniasis in Brazil. **Brazilian J Vet Res Anim Sci**, v.50, n.5, p.341-352, 2013.

MARTÍNEZ-CALVILLO S.; VIZUET-DE-RUEDA JC.; LEF M.; FIGUEROA-ANGULO R.G.M. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites Gene Expression in Trypanosomatid Parasites, **J. Biomed Biotech**, v.2010, n.2, 2010.

MELEPPATTU S.; KAMUS-ELIMELEH D.; ZINOVIEV A.; COHEN-MOR S.; ORR I.;

SHAPIRA M. The eIF3 complex of Leishmania subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. **Nucleic Acids Res**, v.43, p.6222-6235, 2015.

MOURA D.M.N.; REIS C.R.S.; XAVIER C.C.; DA COSTA LIMA T.D.; LIMA R.P.; CARRINGTON M.; DE MELO NETO O.P. Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA Biol**, v.12, p.305-319, 2015.

MYLER P.J.; DEVOS T.; SISK E.; SUNKIN S.M. *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes Leishmania major Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.96, p.2902-2906, 1999.

NASCIMENTO L.M.; TERRAO M.; MARUCHA K.K.; LIU B.; EGLER F.; CLAYTON C. Essential PBP1-associated proteins in *Trypanosoma brucei*. **JBC Pap Press**, p.1-41, 2020.

NAULA C.; PARSONS M.; MOTTRAM J.C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochim Biophys Acta**, v.1754, p.151-159, 2005.

PEREIRA M.M.C.; MALVEZZI A.M.; NASCIMENTO L.M.; DA COSTA LIMA T.D.; LIMA C.; ALVES V.S.; PALMA M.L.; FREIRE E.R.; MOURA D.M.N.; REIS C.R.S. The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. **Mol Biochem Parasitol**, v.190, p.82-86, 2013.

PESTOVA T.V.; HELLEN C.U.T. Small molecule derails translation initiation. **Nat Chem Biol**, v.2, p.176-177, 2006.

PIGOTT D.M.; BHATT S.; GOLDING N.; DUDA K.A.; BATTLE K.E.; BRADY O.J.; MESSINA J.P.; BALARD Y.; BASTIEN P.; PRATLONG F. Global distribution maps of the Leishmanias. **eLife**, v.2014, p.1-21, 2014.

RECINOS R.F.; KIRCHHOFF L.V.; DONELSON J.E. Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.113, p.215-222, 2001.

RICHTER J.D.; SONENBERG N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature**, v.433, n.7025, p.477-480, 2005.

SHRIVASTAVA R.; DRORY-RETWITZER M. Nutritional stress targets LeishIF4E-3 to storage granules that contain RNA and ribosome components in *Leishmania*. **PLoS Negl Trop Dis**, v.13, n.3, p.1-30, 2019.

SIMPSON A.G.B.; STEVENS J.R.; LUKES J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **TRENDS Parasitol**, v.22, p.169-174, 2006.

SINGH A.; MINIA I.; DROLL D.; FADDA A.; CLAYTON C. *Trypanosome* MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11 : interactions and potential roles in post-

transcriptional regulatory networks. **Nucleic Acids Res**, v.42, p.4652-4668, 2014.

SLADIC R.T.; LAGNADO C.A.; BAGLEY C.J.; GOODALL G.J. Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. **Eur J Biochem**, v.457, p.450-457, 2004.

SMITH R.W.P.; BLEE T.K.P.; GRAY N.K. Poly(A)-binding proteins are required for diverse biological processes in metazoans. **Biochem Soc Trans**, v.42, p.1229-1237, 2014.

STEWART M. Insights into the Molecular Mechanism of Nuclear Trafficking Using Nuclear Transport Factor 2 (NTF2). **Cell Struct Fuction**, v.225, p.217-225, 2000.

STUART K.; BRUN R.; CROFT S.; FAIRLAMB A.; GÜRTLER R.E.; MCKERROW J.; REED S. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**, v.118, p.1301-1310, 2008.

TEIXEIRA S.M.; DE PAIVA R.M.C.; KANGUSSU-MARCOLINO M.M.; DAROCHA W.D. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genet Mol Biol**, v.35, p.1-17, 2012.

UETZ P.; GIOT L.; CAGNEY G.; MANS T.A.; JUDSON R.S.; KNIGHT J.R.; LOCKSHON D.; NARAYAN V.; SRINIVASAN M.; POCHART P. A comprehensive analysis of protein ± protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v.403, p.623-627, 2000.

ULLMAN K.S.; POWERS M.A.; FORBES D.J. Nuclear Export Receptors : From Importin to Exportin. **Cell**, v.90, p.967-970, 1997.

VAZQUEZ-PIANZOLA P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. **Mech Dev**, v.122, p.865-876, 2005.

WANG M.; HAMAMA L.; SAKR S. The PUF Protein Family: Overview on PUF RNA Targets , Biological Functions , and Post Transcriptional Regulation. **Int J Mol Sci**, v.19, n.2, p.410-422, 2018.

WANG Z.; KILEDJIAN M. The Poly(A)-binding Protein and an mRNA Stability Protein Jointly Regulate an Endoribonuclease Activity. **Mol Cell Biol**, v.20, p.6334-6341, 2000.

WICKENS M.; BERNSTEIN D.S.; KIMBLE J.; PARKER R.; WICKENS M.; BERNSTEIN D.S. A PUF family portrait: 3' UTR regulation as a way of life. **TRENDS Genet**, v.18, p.150-157, 2002.

WIGINGTON C.P.; WILLIAMS K.R.; MEERS M.P.; BASSELL G.J.; CORBETT A.H. Poli(A) RNA binding proteins and polyadenosine RNA. NIH Public Access. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v.5, p.601-622, 2015.

YOFFE Y.; LÉGER M.; ZINOVIEV A.; ZUBEREK J.; DARZYNKIEWICZ E.; WAGNER G.; SHAPIRA M. Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve

variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Res.**, v.37, p.3243-3253, 2009.

ZHAO P.; LIU Q.; MILLER WA.; GOSS D.J. Eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) coordinates interactions with eIF4A, eIF4B, and eIF4E in binding and translation of the barley yellow dwarf virus 3 cap-independent translation element (BTE). **J Biol Chem.**, v.292, p.5921-5931, 2017.

ZINOVIEV A.; LÉGER M.; WAGNER G.; SHAPIRA M. A novel 4E-interacting protein in Leishmania is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic Acids Res.**, v.39, p.8404-8415, 2011.

ZOLTNER M.; KRIENITZ N.; FIELD M.C.; KRAMER S. Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. **PLoS Negl Trop Dis** v.0, p.1-18, 2018.