

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

CAMILA CAVALCANTI XAVIER

CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE SUBUNIDADES DO COMPLEXO
DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4F E HOMÓLOGOS DA PROTEÍNA DE
LIGAÇÃO AO POLI- A (PABP) DE *Leishmania sp*

RECIFE

2015

CAMILA CAVALCANTI XAVIER

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE SUBUNIDADES DO COMPLEXO
DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4F E HOMÓLOGOS DA PROTEÍNA DE
LIGAÇÃO AO POLI- A (PABP) DE *Leishmania sp***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- X3c Xavier, Camila Cavalcanti.
 Caracterização de interações entre subunidades do complexo de iniciação da tradução EIF4F e homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania* sp / Camila Cavalcanti Xavier. - Recife: [s.n.], 2015.
 99 p. : ilus.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
 Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.
 Co-orientadora: Christian Robson de Souza Reis.
1. *Leishmania*. 2. Fator de Iniciação 4F em Eucariotos. 3. Ligação Proteica. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio. ths. II. Reis, Christian Robson de Souza. ths. III. Título.

CDU 616.993.161

CAMILA CAVALCANTI XAVIER

**CARACTERIZAÇÃO DE INTERAÇÕES ENTRE SUBUNIDADES DO COMPLEXO
DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4F E HOMÓLOGOS DA PROTEÍNA DE
LIGAÇÃO AO POLI- A (PABP) DE *Leishmania sp***

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Biociências e Biotecnologia
em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para
a obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Aprovada em: 27 / 02 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto – Orientador
Depto de Microbiologia – CPqAM – FIOCRUZ PE

Dr. Rafael Dhalia
Depto de Virologia – CPqAM – FIOCRUZ PE

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Depto de Entomologia – CPqAM – FIOCRUZ PE

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar meu caminho e aos meus pais que nunca mediram esforços para proporcionar as melhores condições de estudo, além de minha irmã que é um exemplo a seguir.

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Christian Robson de Souza Reis, que muito influenciou em minha formação acadêmica. Nunca mediu esforços para ajudar, passar todo seu conhecimento e esteve presente em cada etapa de trabalho. Além disso, é uma excelente pessoa e amigo.

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, que mesmo muito ocupado, acompanhou as etapas do trabalho, nunca evitou tirar dúvidas e também é responsável por parte de minha formação acadêmica. Tenho grande admiração pelo seu trabalho e agradeço pela confiança.

A Dra. Danielle Moura que sempre ensinou muito pacientemente tudo que sabe e tenho grande admiração pelo trabalho dela. Também é um exemplo a seguir.

Ao Dr. Antonio Rezende que muito contribuiu com os dados de bioinformática.

Aos meus companheiros de laboratório que sempre me ajudaram com dicas, ensinamentos e momentos de descontração nos intervalos dos experimentos. Em especial aos mestrandos Rômulo, Ludmila e Wagner que passaram pelas mesmas dificuldades juntos, sempre apoiando um ao outro diariamente. Mais especialmente agradeço ao meu grande amigo Diego, que me ajudou nos experimentos e não permitiu que eu desanimasse.

Aos meus amigos da pós-graduação, destacando Renata Lins, que de longe e de perto contribuíram nessa etapa. Por fim, aos meus amigos fora da ciência, em especial Ana Cláudia e Tauane, que mesmo não estando na rotina sempre estiveram presentes de alguma forma.

Ao CPqAM - FIOCRUZ PE que forneceu toda a infra-estrutura e equipamentos necessários no desenvolvimento deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

XAVIER, C. C. **Caracterização de interações entre subunidades do complexo de iniciação da tradução EIF4F e homólogos da proteína de ligação ao poli- a (PABP) de *Leishmania sp.*** 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

Os tripanossomatídeos são caracterizados por processos moleculares diferenciados como a transcrição policistrônica e regulação pós-transcricional da expressão gênica. Em mamíferos, a tradução se inicia com a ligação do complexo eIF4F (formado pelos eIF4A, eIF4E e eIF4G) a extremidade 5' dos mRNAs, o que facilita seu reconhecimento pelo ribossomo. A atividade do eIF4F é reforçada pela proteína de ligação a cauda poli-A (PABP), na extremidade 3' dos mRNAs, que interage com o eIF4G. Dois complexos do tipo eIF4F foram identificados em tripanossomatídeos: o primeiro formado pelos EIF4G3, EIF4E4 e EIF4A1 com a PABP1; e um outro baseado na interação do EIF4G4 com o EIF4E3 e o EIF4A1. Este trabalho buscou caracterizar as interações entre as subunidades destes complexos e sua associação com PABPs de *Leishmania*, avaliando o efeito de mutações em motivos específicos. Proteínas recombinantes foram geradas fusionadas a GST e avaliadas quanto a sua habilidade de interagir com parceiros marcados radioativamente em ensaios do tipo *pull-down*. Para o EIF4G3, mutações individuais em dois resíduos vizinhos (I8A e R9A), afetaram a interação com o EIF4E4 e a mutação de ambos os resíduos equivalentes do EIF4G4 (IL25-26AA) também impediu sua ligação ao EIF4E3, sugerindo um motivo comum para a ligação aos seus parceiros. As proteínas EIF4E3 e EIF4E4 foram avaliadas quanto à capacidade de interagir com a PABP2 e PABP1 respectivamente, e mutações em motivos conservados nas regiões N-terminais dos EIF4E (Boxes A, B e C) aboliram sua interação com os homólogos da PABP. Para identificar que regiões da PABP1 estão relacionadas às interações com o parceiro EIF4E4, foram obtidas proteínas PABP1 mutantes em motivos conservados e observou-se que a mutação no motivo TGM, C-terminal, aboliu sua interação com o EIF4E4. Com estas abordagens conseguiu-se avançar na definição das interações entre as referidas subunidades do eIF4F e PABP, identificando-se diferenças relevantes em relação a outros eucariotos.

Palavras-chave: *Leishmania sp.*, complexo EIF4F e PABP, interação proteica.

XAVIER, C. C. **Caracterização de interações entre subunidades do complexo de iniciação da tradução EIF4F e homólogos da proteína de ligação ao poli- a (PABP) de *Leishmania sp.*** 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

The trypanosomatids are characterized by unique molecular processes such as polycistronic transcription and post-transcriptional regulation of gene expression and differential mRNA processing and possibly translation. In mammals, translation begins with the binding of the eIF4F complex (formed by eIF4A, eIF4E and eIF4G) to the 5' end of the mRNAs, facilitating its recognition by the ribosome. eIF4F activity is enhanced by its binding to the poly A binding protein (PABP), bound to the 3' end of the mRNAs, which interacts with eIF4G. Two eIF4F-like complexes were identified in trypanosomatids: one formed by EIF4G3, EIF4E4 and EIF4A1 with PABP1 and another based on the interactions between EIF4G4, EIF4E3 and EIF4A1. This study aimed to characterize the interactions between the subunits of these complexes, as well as their association with *Leishmania* PABPs, evaluating the effect of mutations in specific motifs. Recombinant proteins fused to GST were generated and evaluated for their ability to interact with radioactive partners through pull-down assays. Individual mutations in two neighboring residues in EIF4G3 (I8A and 9A) impaired its interaction with EIF4E4 and simultaneous mutations in two equivalent residues in EIF4G4 (IL25-26AA) also prevented its binding to EIF4E3, suggesting a common binding motif mediating these interactions. The EIF4E3 and EIF4E4 proteins were assayed for their ability to interact with PABP2 and PABP1 respectively, and mutations in motifs within their N-terminal regions (A, B and C) abolished their interaction with the PABP partners. To identify which region of PABP1 mediates its interactions with EIF4E4, PABP1 mutants were generated and a mutation targeting the conserved TGM motif, within its C-terminus, abolished its interaction with EIF4E4. With these approaches a significant improvement in the definition of the interactions between the eIF4F subunits and PABPs was achieved, identifying relevant differences in comparison with other eukaryotes.

Keywords: *Leishmania sp.*, EIF4F complex and PABP, protein interaction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vetores invertebrados da Leishmaniose	20
Figura 2 - Formas evolutivas da <i>Leishmania</i>	21
Figura 3 - Ciclo evolutivo da <i>Leishmania</i>	23
Figura 4 - Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos	27
Figura 5 - Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos	30
Figura 6 - Estrutura tridimensional do eIF4E de camundongo	32
Figura 7 - Esquema do eIF4GI humano e seus principais sítios de ligação a outras proteínas	34
Figura 8 - Esquema geral da PABP em eucariotos	35
Figura 9 - Esquema dos possíveis complexos eIF4F nos tripanossomatídeos	39
Figura 10 - Esquema dos homólogos ao eIF4G de <i>L. major</i> e seus principais domínios.....	42
Figura 11 - Esquema geral da PABP1 em <i>Leishmania</i>	44
Figura 12 - Mapeamento da região de interação da PABP1 com os fatores EIF4E3 e 4/	44
Figura 13 - Candidatos a motivos de ligação ao eIF4E encontrados nas proteínas EIF4G3 e EIF4G4 de tripanossomatídeos	54
Figura 14 - Expressão e purificação das proteínas selvagem e mutantes	56
Figura 15 - Transcrição e tradução <i>in vitro</i> dos <i>LmEIF4E3</i> e <i>LmEIF4E4</i>	57
Figura 16 - Análise da interação entre as proteínas recombinantes mutantes GST- <i>LmEIF4G3</i> com a proteína radioativa ³⁵ S- <i>LmEIF4E4</i>	58
Figura 17 - Análise da interação entre as proteínas recombinantes mutantes GST- <i>LmEIF4G4</i> com a proteína radioativa ³⁵ S- <i>LmEIF4E3</i>	59
Figura 18 - Análise comparativa da região N-terminal do EIF4E4 de diferentes tripanossomatídeos	61

Figura 19 - Sequencias de aminoácidos conservadas na região dos Boxes do EIF4E4	61
Figura 20 - Confirmação da subclonagem dos genes selvagens e mutantes do <i>LiEIF4E4</i> no plasmídeo pET21a.....	62
Figura 21 - Transcrição e tradução <i>in vitro</i> de mutantes do <i>LiEIF4E4</i>	63
Figura 22 - Confirmação da subclonagem dos genes selvagem e mutantes do <i>LiPABP1</i> no plasmídeo pGEX4T3.....	64
Figura 23 - Expressão e purificação da proteína <i>LiPABP1</i> selvagem (WT) e seus mutantes fusionados a GST	65
Figura 24 - Análise da interação entre proteína a proteína GST- <i>LiPABP1</i> com a proteína radioativa ³⁵ S- <i>LiEIF4E4</i>	66
Figura 25 - Análise da interação entre a <i>LiPABP1</i> com as proteínas mutantes do <i>LiEIF4E4</i>	67
Figura 26 - Análise da interação entre a proteína <i>LmEIF4G3</i> com o <i>LiEIF4E4</i> mutante	68
Figura 27 - Análise comparativa do EIF4E3 de <i>Leishmania infantum</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>	69
Figura 28 - Confirmação da clonagem dos genes selvagens e mutantes do <i>LiEIF4E3</i> no plasmídeo pET21a	70
Figura 29 - Transcrição e tradução <i>in vitro</i> da proteína selvagem e mutantes do <i>LaEIF4E3</i>	71
Figura 30 - Análise da interação entre as proteínas <i>LmPABP2</i> e <i>LiPABP1</i> com a proteína <i>LaEIF4E3</i>	72
Figura 31 - Análise da interação entre a <i>LmPABP2</i> com as proteínas mutantes do <i>LaEIF4E3</i>	73
Figura 32 - Modelagem <i>in silico</i> da região PABC da proteína PABP1	74
Figura 33 - Alinhamento <i>in silico</i> de domínios conservados que se ligam a PABC com o EIF4E4.....	75

Figura 34 - Análise e modelagem *in silico* da PABP1, destacando a mutação na PABC e o motivo PAM2 com a sequência conservada no EIF4E4.76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Construções selvagens e mutantes subclonadas nos vetores pET21a e pGEX4T3.....	48
Quadro 2 - Proteínas selvagens, mutantes e truncadas expressas fusionadas a Glutathione S-transferase (GST).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AUG – Códon de iniciação da tradução
- DNA – Ácido desoxiribonucléico (*Desoxiribonucleic acid*)
- eIF – Fator de iniciação da tradução eucariótico (*Eukaryotic Initiation factor*)
- GST – Glutathione S Transferase
- HEAT– Huntingtin, EF3, PR/65A, e Target of rapamycin 1
- IPTG – Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
- kDa – kiloDálton
- LB – Luria Bertani
- LC – Leishmaniose cutânea
- LCD – Leishmaniose cutânea difusa
- LMC – Leishmaniose mucocutânea
- LV – Leishmaniose visceral
- MIF4G– Domínio medial do fator de iniciação eucariótico (*4G Middle domain of eukaryotic Initiation Factor 4G*)
- Mnk1 – proteína quinase MAP de integração de sinal (*MAP-kinase signal integrating kinases*)
- OD – Densidade Óptica (*Optic Density*)
- PABP – Proteína de ligação a cauda poli-A (*Poly(a)-binding protein*)
- PABC – Domínio C-terminal da PABP (*PABP C-terminal Domain*)
- PAM – Motivo de interação a PABP (*PABP-interacting motif*)
- pb – pares de base
- RNA – Ácido ribonucléico (*Ribonucleic Acid*)
- RRMs – Motivos de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif*)
- SDS-PAGE – Gel de poli(acrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*)
- SL – Sequência *spliced leader* ou mini-éxon
- tRNA – Ácido ribonucléico transportador
- TriTryps – Tri-Trypanosomatidae (os três tripanossomatídeos de maior destaque: *Leishmania spp*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*)
- UTR – Região não traduzida (*Untranslated Region*)
- WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Família Trypanosomatidae	19
2.2 O gênero <i>Leishmania</i> e as Leishmanioses	19
2.2.1 Distribuição da Leishmaniose.....	21
2.2.2 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	22
2.3 Biologia molecular dos tripanossomatídeos	23
2.3.1 Regulação gênica.....	23
2.3.2 Organização genômica dos tripanossomatídeos.....	24
2.3.3 Transcrição policistrônica e RNA polimerases	25
2.3.4 <i>Trans-splicing</i> do mRNA e a poliadenilação.....	26
2.4 Síntese de proteínas em eucariotos	28
2.4.1 Complexo eIF4F e PABP nos eucariotos	29
2.4.2 eIF4E	30
2.4.3 eIF4G	32
2.4.4 Proteína de ligação à cauda poli-A – PABP	34
2.5 Uso de moléculas para inibir a ligação de fatores da tradução	36
2.6 Iniciação da tradução nos tripanossomatídeos	37
2.6.1 Homólogos de eIF4A.....	39
2.6.2 Homólogos de eIF4E.....	40
2.6.3 Homólogos de eIF4G	41
2.6.4 Homólogos de PABP.....	42
3 JUSTIFICATIVA	45
4 OBJETIVOS	46
4.1 Objetivo geral	46

4.2 Objetivos específicos.....	46
5 METODOLOGIA	47
5.1 Subclonagem dos genes EIF4E3, EIF4E4 e PABP1 de <i>Leishmania</i>.....	47
5.2 Expressão de proteínas recombinantes.....	48
5.3 Purificação e diálise de proteínas recombinantes	49
5.4 Transcrição e tradução <i>in vitro</i>	50
5.5 Ensaio de interação proteína- proteína (<i>pull-down</i>).....	51
5.6 Modelagem de proteínas <i>in silico</i>	52
6 RESULTADOS.....	53
6.1 Identificação dos motivos responsáveis pela ligação dos EIF4G3 e EIF4G4 aos EIF4E4 e EIF4E3, respectivamente	54
6.1.1 Expressão e purificação de proteínas recombinantes.....	55
6.1.2 Transcrição e tradução <i>in vitro</i> dos genes <i>LmEIF4E3</i> e <i>LmEIF4E4</i>	55
6.1.3 Ensaio de interação proteína-proteína para investigar as interações entre os EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3.....	57
6.2 Identificação dos motivos responsáveis pela interação entre a PABP1 e o EIF4E4	60
6.2.1 Produção das proteínas EIF4E4 selvagem e mutantes marcadas radioativamente.....	62
6.2.2 Expressão e purificação das proteínas PABP1 selvagem e mutantes fusionadas a GST.....	63
6.2.3 Análise da interação entre mutantes da PABP1 e o homólogo EIF4E4 de <i>L. infantum</i>	65
6.2.4 Análise reversa da interação entre os mutantes do EIF4E4 e o homólogo PABP1 de <i>L.infantum</i>	66
6.2.5 Análise da interação entre o mutante no sítio de ligação ao 4G (W305A) do <i>LmEIF4E4</i> e o homólogo <i>LmEIF4G3</i>	67

6.3 Confirmação da interação entre o EIF4E3 e homólogos de PABP e definição dos motivos responsáveis por essa interação.....	68
6.3.1 Produção das proteínas EIF4E3 selvagem e mutantes marcadas radioativamente.....	70
6.3.2 Avaliação da interação entre os fatores EIF4E3 com os homólogos PABP1 e PABP2.....	71
6.4 Análise e modelagem <i>in silico</i> da interação das proteínas PABP1 e EIF4E4	74
7 DISCUSSÃO	77
8 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A família Tripanosomatidae é formada por nove gêneros de parasitas obrigatórios, com destaque para os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Estes protozoários apresentam uma organização genômica, estruturas celulares e processos biológicos semelhantes, contudo se destacam por apresentarem mudanças morfológicas significantes durante seu ciclo de vida, visto que habitam dois diferentes hospedeiros, o homem e insetos vetores. As principais doenças humanas causadas por estes protozoários são as tripanossomíases, doença de Chagas e doença do Sono, e as diversas formas de leishmanioses, sendo causados respectivamente pelo *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e várias espécies do gênero *Leishmania*.

Os tripanossomatídeos são eucariotos que apresentam particularidades quanto a sua expressão gênica. Seus genes estão presentes em grandes blocos nos cromossomos que são transcritos em RNAs policistrônicos, e após processamento por *trans-splicing* geram mRNAs monocistrônicos que são transportados do núcleo para o citoplasma, para serem utilizados na síntese de proteínas ou tradução. A regulação da expressão gênica nestes protozoários é pós-transcricional, ocorrendo em pequeno percentual via processamento (estabilidade/degradação dos mRNAs). Mecanismos durante e/ou após o processo de síntese de proteínas devem constituir os principais alvos para controle da expressão gênica nestes protozoários.

A tradução é um importante e complexo mecanismo que é imprescindível a todos os seres vivos. Em eucariotos, este processo pode ser dividido em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A etapa submetida à maior regulação e controle é a iniciação da tradução, processo em que participam os fatores de iniciação eucarióticos (eIFs – *Eukariotic Initiation Factors*). A iniciação da tradução começa então com a formação do complexo eIF4F, constituído pelas subunidades eIF4E (proteína que se liga ao *cap* dos mRNAs na sua extremidade 5'), eIF4A (RNA helicase) e eIF4G (proteína mantenedora do complexo que interage com eIF4E e eIF4A). O principal papel do complexo eIF4F é fazer o reconhecimento dos mRNAs e mediar sua associação com os ribossomos, para a formação do complexo 48S e dar andamento a tradução. Nesse contexto o eIF4F participa de interações críticas com o complexo eIF3 (interação mediada pelo

eIF4G), que faz a conexão entre a subunidade menor ribossomal e o mRNA, e com a PABP (proteína de ligação a cauda poli-A) que promove a circularização do mRNA durante o processo de tradução.

O processo de iniciação da tradução em tripanossomatídeos é o foco da pesquisa realizada pelo grupo de pesquisa no qual esse projeto de mestrado está inserido. Análises prévias identificaram diferentes homólogos de subunidades de eIF4F e diferentes homólogos de PABP conservados em todas as espécies destes protozoários: cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 a 5), seis de eIF4E (EIF4E1 a 6), dois de eIF4A (eIF4AI e AIII) e dois de PABP (PABP1 e 2, com a PABP3 só encontrada no gênero *Leishmania*). Ensaio de interação proteína-proteína demonstraram a formação de dois complexos do tipo eIF4F associados ao processo de tradução: EIF4G3/EIF4E4/EIF4AI, interagindo ainda com a PABP1; EIF4G4/EIF4E3/EIF4AI.

Algumas das interações entre os fatores de tradução de tripanossomatídeos citados ocorrem em domínios similares aos descritos para outros eucariotos, como por exemplo, a interação do EIF4G3 com o EIF4AI. Entretanto, existem diferenças no processo de iniciação da tradução em relação aos eucariotos, e uma evidência disso foi a constatação que o EIF4E4 interage com a PABP1, representando a primeira descrição de interação direta entre homólogos de eIF4E e PABP. Dados não publicados indicam ainda que esta interação é mediada pela região C-terminal da PABP1 que interage com motivos presentes da região N-terminal do EIF4E4 (e também do EIF4E3). Experimentos utilizando proteínas mutantes em *L. infantum* confirmaram que a interação entre o EIF4E4/PABP1 é mais importante para viabilidade celular que a interação EIF4E4/EIF4G3, reforçando as diferenças no processo de tradução destes protozoários.

Dentro deste contexto, a proposta deste trabalho foi a de estudar os motivos envolvidos na interação entre as proteínas EIF4E4/EIF4G3, EIF4E3/EIF4G4 e PABP1/EIF4E4, assim como confirmar se há interação entre a proteína EIF4E3 com homólogos de PABP e identificar os domínios envolvidos nesta interação. Espera-se que a compreensão do modo de interação entre as proteínas permita avançar no conhecimento sobre o processo de iniciação da tradução, uma etapa crítica de um dos principais processos biológicos encontrados nos seres vivos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família Trypanosomatidae

Os tripanossomatídeos são organismos unicelulares flagelados que incluem parasitas intra e extracelulares e pertencentes à ordem Kinetoplastida. São representados por nove gêneros distintos, classificados de acordo com suas características morfológicas bem como sua interação com seus hospedeiros. (SZÖÖR *et al.*, 2010). Estes protozoários possuem uma organização genômica, estruturas celulares, e processos biológicos semelhantes, porém apresentam diferenças morfológicas significantes em seu ciclo de vida, visto que habitam nichos biológicos diferentes e são transmitidos por diferentes insetos vetores (STUART *et al.*, 2008). Além dessas características, a sua organela mais marcante é o kinetoplasto, o DNA mitocondrial dos kinetoplastídeos, denominado kDNA, presente nas suas mitocôndrias únicas (POVELONES, 2014).

Nos tripanossomatídeos destacam-se os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, sendo responsáveis por enfermidades de importância médica e veterinária causando doenças de grande impacto mundial, tais como as várias formas de Leishmaniose (*Leishmania sp.*), a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e a Doença do Sono (*Trypanosoma brucei*) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). O tratamento dessas doenças ainda é insatisfatório em termos de segurança e eficácia, o que contrasta fortemente com as necessidades terapêuticas das pessoas que se encontram em situação de risco, com o número de pacientes afetados e o de mortes associadas (FLOHÉ, 2012).

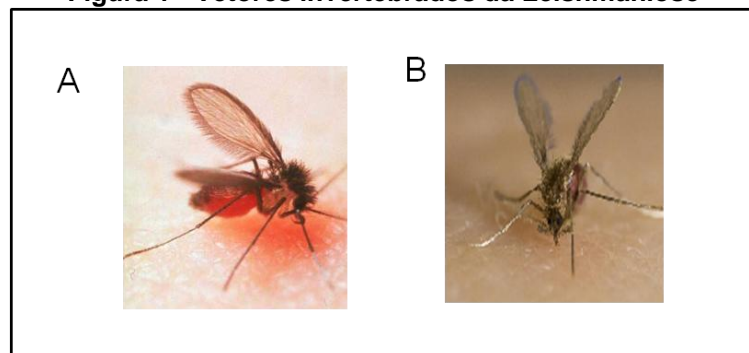
2.2 O gênero *Leishmania* e as Leishmanioses

O gênero *Leishmania* é formado por um grupo de protozoários que possui mais de 20 espécies patogênicas, onde a manifestação clínica da doença que provocam irá depender, dentre outros aspectos, da espécie infectante, variando desde lesões simples de pele que podem regredir por cura espontânea, passando por lesões desfigurantes das mucosas, até a forma mais grave da doença, acometendo as vísceras, que é letal (SCHELTEMA *et al.*, 2010). As espécies

pertencentes a este gênero podem ainda ser divididas em dois subgêneros, o *Leishmania* (*Leishmania*), encontrado no Velho e Novo Mundo e o *Leishmania* (*Viannia*), presente apenas no Novo Mundo. Estes sub-gêneros foram divididos de acordo com o local de desenvolvimento do parasita no interior do intestino do mosquito flebotomíneo vetor (hospedeiro invertebrado) (BATES, 2007).

A Leishmaniose é transmitida para o hospedeiro vertebrado por cerca de 30 espécies diferentes de fêmeas de flebotomíneos, insetos hematófagos da família *Psychodidae* e ordem *Diptera*. Os vetores flebotomíneos que foram comprovadamente associados à infecção por espécies do gênero *Leishmania* pertencem aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Figura 1) (KATO *et al.*, 2010).

Figura 1 - Vetores invertebrados da Leishmaniose



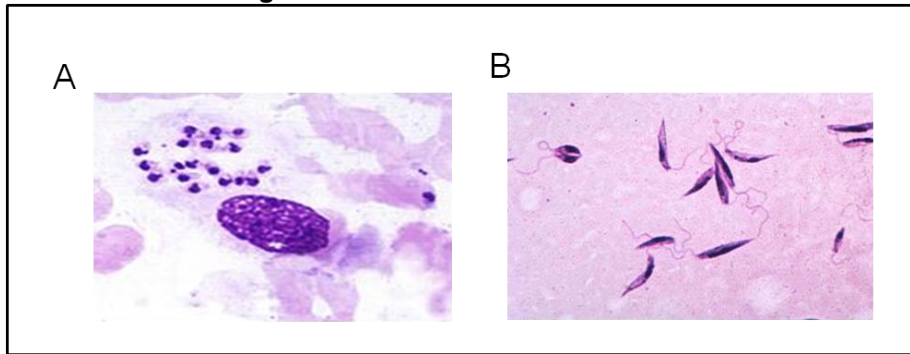
Fonte: Vectorbase (2014).

Nota: Figura 1A. *Phlebotomus*. Figura 1B. *Lutzomyia*.

Durante seu ciclo de vida os protozoários do gênero *Leishmania* possuem duas formas evolutivas principais, sendo uma aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados em células do sistema fagocítico mononuclear, e outra flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (BRASIL, 2010). A forma promastigota compreende células alongadas que possuem um flagelo livre emergindo da sua região anterior. O núcleo é único e esférico, variando bastante quanto a sua posição. O tamanho da forma promastigota varia muito, mesmo dentro da mesma espécie, de 1,5 a 3 μm de largura e 16 a 40 μm de comprimento incluindo o flagelo, que é muitas vezes maior do que o corpo celular (Figura 2A) (LACOMBLE, 2012). Já a forma amastigota apresenta-se ovóide ou arredondada, com um único núcleo semelhante ao encontrado na forma promastigota que geralmente fica disposto em um dos lados da célula. Não possui

flagelo aparente, apenas um rudimentar associado à bolsa flagelar, e seu tamanho varia entre 3 a 6,5 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de largura, dependendo da espécie (Figura 2B) (NEVES, 2011; SCHMIDT; ROBERTS, 2009).

Figura 2 - Formas evolutivas da *Leishmania*



Fonte: Fundação Oswaldo Cruz (2015a, 2015b) .

Nota: **Figura 2A.** Formas amastigotas encontradas parasitando os macrófagos do hospedeiro vertebrado. **Figura 2B.** Formas promastigotas encontradas no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado.

2.2.1 Distribuição da Leishmaniose

A Leishmaniose ocupa a nona posição entre as doenças infecciosas individuais, no entanto, ela ainda não é tratada como prioridade pelas políticas de saúde públicas (HOTEZ *et al.*, 2006; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). A doença apresenta uma incidência anual de cerca de 1 a 1,5 milhões de casos para as variedades de leishmaniose cutânea e de 500 mil para a forma visceral, afetando 12 milhões de pessoas em diferentes países do mundo, incluindo o Brasil (ALVAR *et al.*, 2012). Aproximadamente 350 milhões de pessoas vivem em área de risco, sendo a doença endêmica no norte da África, Oriente Médio, regiões da Europa, América Central e do Sul.

Estima-se que mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorre em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (GRIENSVEN; DIRO, 2012). Nos casos de leishmaniose cutânea aproximadamente 95% ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central (ALVAR *et al.*, 2012) e mais de dois terços dos novos casos aparecem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Já a leishmaniose mucocutânea, forma mais severa da leishmaniose cutânea, é mais encontrada na América do Sul,

onde aproximadamente 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

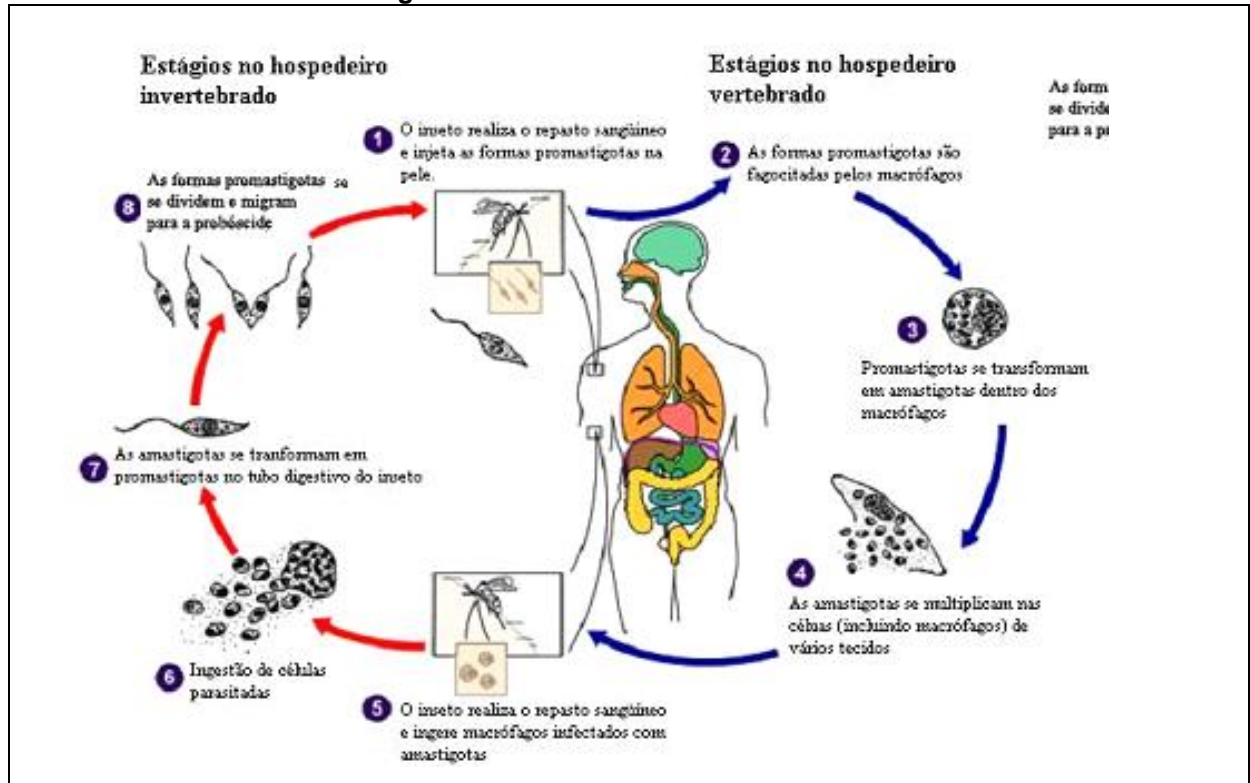
Com relação à leishmaniose cutânea no Brasil, foram registrados casos autóctones em todas as unidades federadas do país. No período de 1991 a 2010, a região Norte contribuiu com o maior número de casos (36,4 casos por 100.000 habitantes) seguida das regiões Centro-oeste (36,5 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (19,9 casos por 100.000 habitantes). No caso da leishmaniose visceral, no Brasil, no período entre 2006 e 2010 foram registrados 18.168 casos e em 2010, a região Nordeste representou 47,1% dos casos, seguida pelas regiões Norte (18,0%), Sudeste (17,8%), Centro-Oeste (8,6%) e Sul (0,1%). Atualmente, ambas estão distribuídas em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões brasileiras.

2.2.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

O ciclo biológico do parasita *Leishmania* se inicia com a infecção dos hospedeiros vertebrados, pelas formas promastigotas infectantes (metacíclicas) geradas após o repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor. Estas formas metacíclicas se utilizam de mecanismos que permitem resistir à ação de elementos do soro, principalmente do complemento. Por outro lado, algumas de suas moléculas de superfície agem facilitando a adesão do parasito e a sua endocitose pelos macrófagos. Após interiorização, o macrófago promove a formação do fagolisossomo e o parasito adapta-se às condições do novo ambiente, transformando-se na forma amastigota, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido do vacúolo digestivo. Após sucessivas multiplicações por divisão binária simples, os amastigotas são liberados pelo rompimento da célula hospedeira e fagocitados por outros macrófagos. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre pela ingestão das formas amastigotas durante o repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado. No inseto, os parasitas se transformam novamente em promastigotas e podem ser encontrados em processo de multiplicação, aderidos à parede intestinal ou livres no lúmen. As formas metacíclicas infectantes podem ser encontradas livres ou aderidas na porção anterior do aparelho bucal do inseto. A fêmea do inseto, ao se alimentar novamente, inocula no hospedeiro vertebrado as

formas infectantes, permitindo assim a conclusão do ciclo (Figura 3) (WILSON *et al.*, 2010).

Figura 3 - Ciclo evolutivo da *Leishmania*



Fonte: Modificado de Centers of Disease Control and Prevention (2014).

Nota: O inseto ao realizar o repasto sanguíneo deposita as formas promastigotas na pele do hospedeiro vertebrado (1). As promastigotas são fagocitadas por macrófagos (2) onde se transformam em amastigotas (3) e se multiplicam (4). Ao realizar novo repasto sanguíneo o inseto ingere os macrófagos infectados com as amastigotas (5). Em seguida ocorre ingestão das células parasitadas (6) e estas se transformam em promastigotas no tubo digestivo dos insetos (7). As promastigotas migram até a probóscide onde ficam até novo repasto sanguíneo (8).

2.3 Biologia molecular dos tripanossomatídeos

2.3.1 Regulação gênica

A família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, divergiu muito cedo da linhagem eucariótica, entre 200-500 milhões de anos, exibindo várias características biológicas específicas (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007), como por exemplo, uma notável conservação no número e na organização dos genes (GHEDIN *et al.*, 2004; KISSINGER, 2006).

Os tripanossomatídeos possuem um genoma organizado em blocos gênicos, contendo de dezenas a centenas de genes, que codificam proteínas funcionalmente não relacionadas, transcritos a partir de uma das cadeias do DNA (MARTINÉZ-CALVILLO *et al.*, 2010; SIMPSON *et al.*, 2006). Outra característica é que esses organismos não apresentam promotores típicos para RNA polimerase II (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Após o processo de transcrição ocorre a maturação dos mRNAs pelo processo de *trans-splicing* com posterior poliadenilação. Sendo assim, o controle da expressão de genes nesses microorganismos ocorre a nível pós-transcricional, em eventos de processamento e/ou degradação de mRNAs que podem aumentar ou diminuir a estabilidade dessas moléculas, controle da tradução e mecanismos pós-traducionais (KRAMER, 2012).

2.3.2 Organização genômica dos tripanossomatídeos

A publicação dos genomas dos protozoários *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*, referidos como *TriTryps*, foi de extrema importância e relevância por impulsionar pesquisas que permitem a compreensão da biologia destes protozoários, além de facilitar o desenvolvimento de testes de diagnósticos, quimioterápicos e vacinas.

Os *TriTryps* apresentam uma alta conservação na organização dos genes (sintenia), assim como um grande número de genes em comum. Especula-se que tal conservação seja devido a algum tipo de pressão seletiva que deve restringir o rearranjo dos genes, tais como a incidência relativamente baixa de recombinação sexual, a organização policistrônica ou a replicação, porém a razão de tal fenômeno ainda não está bem clara (EL-SAYED *et al.*, 2005; GHEDIN *et al.*, 2004).

Os genomas de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* contém 8100, 12000 e 8300 genes que codificam para proteínas, respectivamente para cada espécie. Destes, aproximadamente 6200 são comuns para as três espécies e estão organizados em agrupamentos de genes sintênicos, que fornecem as unidades para transcrição policistrônica de dezenas de genes não relacionados (GINGER, 2005; EL-SAYED *et al.*, 2005). A identidade de aminoácidos entre proteínas das três espécies tem uma média de 57% entre *T. brucei* e *T. cruzi*, e de 44% entre *L. major* e as duas espécies de *Trypanosoma*, refletindo suas relações filogenéticas (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Os genomas das espécies *Leishmania major*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, respectivos agentes etiológicos das LC, LMC e LV, já estão disponíveis em bancos públicos de dados (PEACOCK *et al.*, 2007). O tamanho do genoma de espécies do gênero *Leishmania* é conservado, de aproximadamente 34 Mpb e distribuídos em 36 cromossomos para *L. major* e *L. infantum* e 35 cromossomos para *L. braziliensis*, além disso sabe-se que a sintonia dos blocos gênicos entre as espécies é de 99%.

Comparando as espécies de *Leishmania* que possuem seus genomas já publicados, foram identificadas cerca de 200 diferenças do conteúdo de genes ou pseudogenes, incluindo aproximadamente 80 genes que são restritos a uma única espécie. Estas diferenças sugerem que alguns genes específicos de uma única espécie são importantes na patogênese e manifestação clínica da doença, além de diferenças de expressão observada nos genes comuns entre as espécies (PEACOCK *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007).

2.3.3 Transcrição policistrônica e RNA polimerases

O arranjo de genes em tripanossomatídeos se assemelha em alguns pontos aos conhecidos operons bacterianos. Os genes deste grupo de eucariotos são transcritos em unidades policistrônicas, onde um único promotor é utilizado na transcrição de múltiplos genes. No entanto ao contrário dos operons bacterianos, as unidades policistrônicas dos tripanossomatídeos não codificam genes funcionalmente relacionados (FERNANDEZ-MOYA; ESTEVEZ, 2010; PREUßER *et al.*, 2012). Também, ao contrário das bactérias, esses RNAs sofrem um processo de maturação através de um mecanismo conhecido como *trans-splicing*, explicado detalhadamente adiante (CAMPBELL, 2003).

Nos tripanossomatídeos a transcrição policistrônica engloba grande parte do genoma, com os transcritos contendo dezenas de genes e se iniciando numa região não-transcrita denominada de região de troca de fitas (SSR, do inglês *Strand Switch Region*) as quais devem ser responsáveis por direcionar a transcrição (DANIELS *et al.*, 2010). Essas regiões são ricas em guanina (ou citosina), ainda que não se consiga divisar um promotor específico, e a partir delas um segundo grupo de genes pode ser codificado na outra fita em sentido contrário (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

Os tripanossomatídeos apresentam três RNA polimerases conservadas em relação aos demais eucariotos: RNA pol I, II e III. Nesses organismos, a função de cada uma delas permaneceu em geral conservada: a RNA pol I transcreve pré-rRNAs e, em *T. brucei*, VSGs (expressas no parasitismo ao hospedeiro vertebrado) e prociclinas (no parasitismo ao hospedeiro invertebrado); a RNA pol II sintetiza os mRNAs, como nos demais eucariotos, e o RNA *Spliced Leader* (RNA SL), essencial para o *trans-splicing* do transcrito policistrônico; e a RNA pol III transcreve um último rRNA (o RNA 5S), snRNAs ricos em uracila e tRNAs (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Até o momento não foram encontradas regiões regulatórias para os grandes grupos de genes transcritos pela RNA pol II nos tripanossomatídeos. Esses promotores só foram identificados para RNA pol I e III e, no caso da RNA pol II, exclusivamente para a transcrição do RNA SL (DANIELS *et al.*, 2010).

2.3.4 *Trans-splicing* do mRNA e a poliadenilação

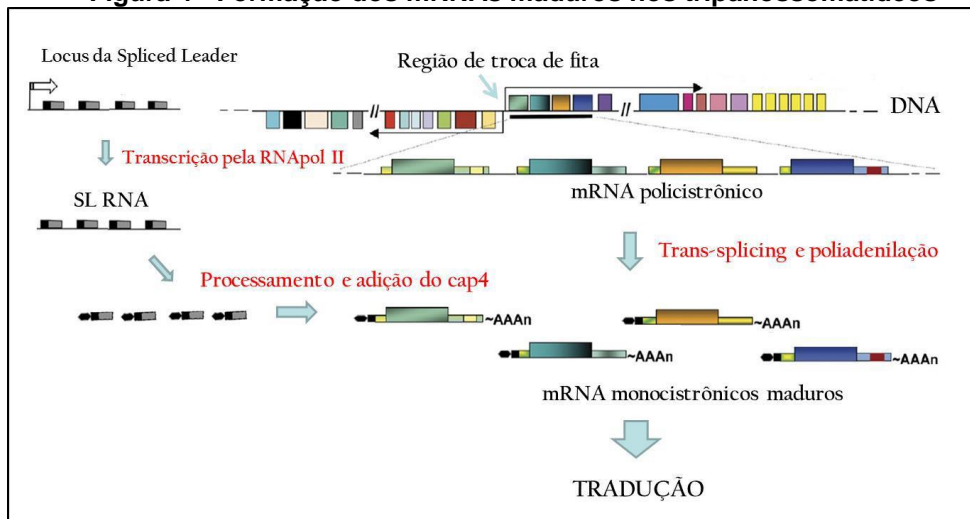
Os tripanossomatídeos, diferentemente dos eucariotos em geral, não possuem íntrons na maioria dos seus genes (com apenas quatro exceções identificadas) (IVENS *et al.*, 2005), e o processamento de seus mRNAs policistrônicos ocorre através do mecanismo denominado de *trans-splicing*, que permite a junção de duas moléculas separadas de RNA para formar um mRNA quimérico final (HASTING, 2005).

O *trans-splicing* atua nos tripanossomatídeos adicionando um éxon denominado de *spliced leader* (SL), que possui 39 nucleotídeos, na região 5' dos mRNAs monocistrônicos maduros, juntamente com uma estrutura cap (7-metil guanosina) modificada nos tripanossomatídeos, denominado de cap4 (HAILE; PAPADOPOLOU, 2007; KRAMER; CARRINGTON, 2011). Todos os mRNAs de tripanossomatídeos possuem essa sequência *spliced leader*, por isso, dependem de uma taxa de síntese do SL-RNA bastante elevada (PREUßER *et al.*, 2012). O mecanismo de *trans-splicing* se dá através de duas reações de transesterificação, onde o sítio GU doador presente no RNA SL precursor funde-se a uma região próxima ao sítio AG receptor do mRNA policistrônico, denominado ponto de ramificação, formando uma estrutura em forma de "Y", que permite a inserção do

cap no transcrito e sua separação das demais ORFs (PREUßER *et al*, 2012) (Figura 4).

Diferentemente dos demais eucariotos, a poliadenilação nos tripanossomatídeos é um processo que ocorre paralelamente ao *trans-splicing*, visto que ambos os mecanismos utilizam o mesmo sinal para realizar o processamento do pre-mRNA, a região rica em pirimidinas. Sendo assim, a poliadenilação por sua vez é a adição de uma sequência de adeninas 100 a 300nt a jusante do sinal de *trans-splicing* do cistron seguinte, fazendo com que a 3'-UTR anterior seja poliadenilada e clivada dos demais (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Além disso, a poliadenilação influencia na transcrição, processamento, qualidade, transporte, tradução, silenciamento e destruição dos mRNAs (YAN, 2014).

Figura 4 - Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos



Fonte: Modificado de Haile e Papadopolou (2007).

Nota: A transcrição se inicia a partir da região de troca de fita, bilateralmente e em sentido contrário, utilizando as fitas opostas do DNA (neste caso, no sentido divergente). Os genes transcritos pela RNA polimerase II formam o pré-mRNA policistrônico, que é processado pelo mecanismo de *trans-splicing*. Os genes que codificam a sequência *spliced leader* (SL) também são transcritos pela RNA polimerase II e a estrutura cap modificada, cap4, é adicionada na porção 5' do SL-RNA. A partir do *trans-splicing*, os pré-mRNAs são separados, na região 5' é adicionado o SL-RNA + cap4 e, em paralelo, ocorre a poliadenilação na região 3'. Com estas etapas, o mRNA se torna maduro e pronto para ser utilizado na síntese de proteínas.

2.4 Síntese de proteínas em eucariotos

A síntese de proteínas ou tradução é um importante e complexo processo imprescindível a todos os seres vivos e cuja regulação tem um importante papel no controle da expressão gênica. A regulação da tradução é clara em eventos celulares tais como crescimento, proliferação e desenvolvimento celular (GINGRAS *et al.*, 1999). O controle da expressão gênica durante a tradução é responsável por mudanças rápidas, reversíveis e espaciais nas concentrações celulares das proteínas (JACKSON *et al.*, 2010).

O processo de tradução pode ser dividido em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. Na iniciação, as subunidades ribossomais são reunidas sobre o códon de iniciação, no mRNA ligado ao tRNA iniciador. Durante a etapa de alongamento, a cadeia polipeptídica é formada pela formação de ligações peptídicas entre os aminoácidos que vão sendo trazidos para dentro do ribossomo pelo RNA transportador que através do seu anticódon reconhece o códon do RNA mensageiro específico a medida que o ribossomo vai se deslocando sob o mesmo. A terminação ocorre com a chegada do ribossomo ao códon de parada e a liberação da proteína. E, finalmente, na reciclagem, as subunidades ribossomais são dissociadas e o mRNA e os tRNAs são liberados para iniciarem um novo ciclo de tradução (JACKSON *et al.*, 2010).

A maior parte dos mecanismos de controle desse processo ocorre na etapa de iniciação da tradução no qual compreende o processo de montagem das partículas ribossomais 80S funcionais, onde o códon AUG inicial do mRNA é pareado com o anticódon do tRNA iniciador (Met-tRNA_i) no sítio P ribossomal. Esta fase requer no mínimo nove fatores de iniciação da tradução (eIFs) e compreende algumas etapas que envolvem a formação do complexo de iniciação 43S e a sua união com a subunidade 60S (HINNEBUSCH, 2014; JACKSON *et al.*, 2010; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009):

1) Formação do complexo pré-iniciação 43S: Ocorre a seleção do tRNA_i a partir do conjunto de tRNAs celulares que, juntamente com o fator eIF2, forma o chamado complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA_i). Em seguida ocorre a ligação

desse complexo com outros fatores de iniciação, como o eIF3, promovendo assim a ligação com a subunidade ribossomal 40S resultando em um complexo de pré-iniciação 43S;

2) Ligação do complexo 43S ao mRNA: O recrutamento do complexo 43S acontece por ação cooperativa do complexo eIF4F (composto de três subunidades - eIF4E, eIF4A e o eIF4G) juntamente com os fatores eIF4B ou eIF4H, que desfazem as estruturas secundárias presentes na 5' UTR e preparam essa região para a ligação do ribossomo. O recrutamento do complexo 43S ao mRNA é resultado de uma cadeia de interações entre *cap*-eIF4E-eIF4G-eIF3-43S, formando o complexo 48S;

3) Varredura da região 5' UTR do mRNA pelo ribossomo: Ocorre o movimento do complexo ribossomal ao longo da região 5' UTR do mRNA até alcançar o codon AUG de iniciação. Nesta etapa atuam a subunidade eIF4A do complexo eIF4F que, com ajuda do eIF4B, apresenta atividade de helicase removendo estruturas secundárias;

4) Reconhecimento do códon de iniciação pelo ribossomo: Ao alcançar o códon AUG ocorre a formação do complexo 48S no qual o codon de iniciação tem suas bases pareadas com as bases do anticódon do tRNA_i. Essa etapa é fundamental para assegurar a fidelidade da iniciação, prevenindo pareamentos errôneos do tRNA_i na 5'UTR;

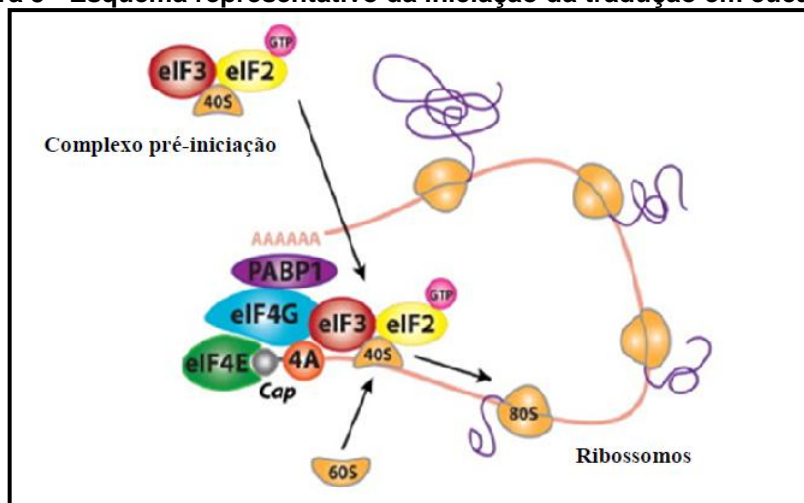
5) Formação da partícula ribossomal completa: Ocorre a liberação dos fatores de iniciação do complexo 48S para que a subunidade ribossomal 60S possa ser recrutada para formação do ribossomo 80S, deixando o tRNA_i no sítio P ribossomal.

2.4.1 Complexo eIF4F e PABP nos eucariotos

O processo de reconhecimento da molécula do mRNA envolve a formação do complexo eIF4F, constituído pelas subunidades eIF4E (proteína que se liga ao *cap* dos mRNAs na sua extremidade 5'), eIF4A (RNA helicase) e eIF4G (proteína mantenedora do complexo que interage com eIF4E e eIF4A). O principal papel do complexo eIF4F é fazer o reconhecimento da extremidade 5' dos mRNAs e mediar a associação destes com a subunidade 40S ribossomal, para formar o complexo 48S

e dar início a tradução. Nesse contexto o eIF4F participa de interações críticas com o complexo eIF3, mediadas pelo eIF4G e que fazem a conexão entre esta subunidade ribossomal e o mRNA. Outra interação do eIF4F, com a PABP (proteína de ligação a cauda poli-A), promove a circularização do mRNA e também parece ser crítica para uma tradução eficiente (MARINTCHEV; WAGNER, 2004). A PABP, apesar de não ser considerada um fator de iniciação da tradução clássico, tem um papel de destaque na iniciação da tradução, através da sua ligação a extremidade 3' do mRNA, pela cauda poli-A, e sua interação com o eIF4G (JACKSON *et al.*, 2010).

Figura 5 - Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos



Fonte: Modificado de Yángüez e Nieto (2011).

Nota: Reconhecimento do *cap* e da ligação das subunidades do complexo eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G) ao mRNA, a PABP e ao eIF3, como parte do processo de recrutamento do complexo ribossomal.

2.4.2 eIF4E

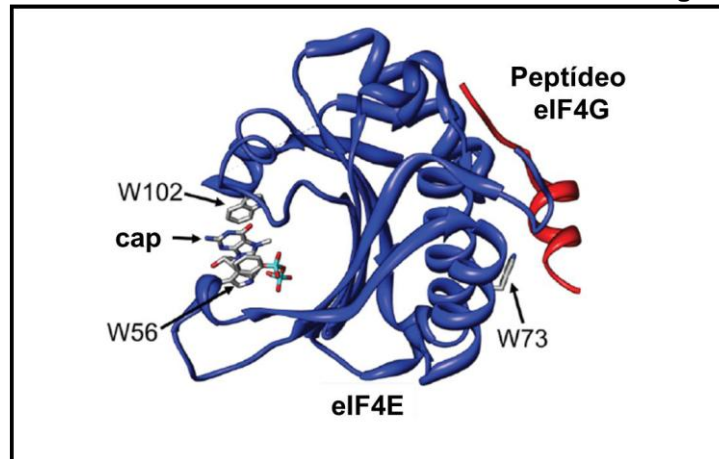
A proteína eIF4E (24 kDa) é o fator de iniciação responsável pelo reconhecimento do *cap*, presente na grande maioria dos mRNAs eucarióticos, etapa crítica para se dar início ao processo de tradução (SONENBERG, 2008). A família eIF4E de proteínas pode ser encontrada em diversos organismos, normalmente com múltiplos homólogos por espécie, sendo pelo menos um destes envolvido com tradução e os demais relacionados a outras funções celulares relacionadas ao metabolismo dos mRNAs (JOSHI *et al.*, 2005; RHOADS, 2009).

A função da proteína eIF4E, e sua regulação, é mediada em parte por interações com outras proteínas, como as 4E-BPs (*4E binding proteins*– proteínas

de ligação ao eIF4E) e seu parceiro funcional, o eIF4G. A ligação do eIF4E às 4E-BPs atua reprimindo a tradução, através do sequestro do eIF4E (JOSHI *et al.*, 2004). A ligação eIF4E-eIF4G é necessária para a tradução dos mRNAs com *cap*, e o motivo de interação na proteína eIF4G é o mesmo encontrado na 4E-BPs. (RICHTER; SONENBERG, 2005). A maioria dos parceiros do eIF4E identificados em eucariotos, incluindo o eIF4G e as 4E-BPs, contêm uma sequência de ligação YXXXXL ϕ , sendo o X qualquer aminoácido e o ϕ qualquer resíduo hidrofóbico, podendo ser preferencialmente Leucina, Metionina ou Fenilalanina (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008; RHOADS, 2009).

A análise estrutural do eIF4E foi de grande importância para a compreensão molecular das interações com o *cap* e com seus vários parceiros funcionais. Estudos mostraram que as estruturas terciárias do eIF4E de camundongo, humano e de levedura se ligam a análogos do *cap*, e que cada um deles é constituído por oito cadeias de folhas β suportadas por três α -hélices, conferindo a proteína a forma de uma mão côncava, em forma de concha (MARCOTRIGIANO *et al.*, 1997; MATSUO *et al.*, 1997; TOMOO *et al.*, 2002). O segmento responsável pelo reconhecimento do *cap* localiza-se na face côncava, através da ação de dois resíduos do aminoácido aromático triptofano, altamente conservados. A Figura 6 mostra o sítio responsável pela ligação do eIF4E de camundongo ao *cap*, onde os dois resíduos de triptofano, encontrados nas posições 56 e 102, empacotam a guanosina metilada do *cap* (JOSHI *et al.*, 2005; NIEDZWIECKA *et al.*, 2002). Ligações químicas estabilizam ainda mais essa ligação, como as pontes de hidrogênio entre o *cap* e os aminoácidos triptofano 102 e glutamato 103, ligações polares entre aminoácidos carregados positivamente e grupamentos fosfato e várias interações de *van der Waals* (FISCHER, 2009; JACKSON *et al.*, 2010). A maioria dos parceiros funcionais do eIF4E se ligam na face convexa da estrutura, como o eIF4G por exemplo, no qual envolve outro triptofano conservado, o W73 (Figura 6) (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008).

Figura 6 - Estrutura tridimensional do eIF4E de camundongo



Fonte: Modificado de Goodfellow e Roberts (2008).

Nota: Conformação da proteína eIF4E (em azul), demonstrando o sítio de ligação ao *cap* na região côncava da proteína, nos aminoácidos W56 e W102. A figura mostra também o aminoácido W73, que está envolvido na ligação com o eIF4G (em vermelho), na parte convexa da proteína.

A proteína eIF4E pode ter sua função regulada por fosforilação. Em mamíferos, essa regulação se dá através da fosforilação da serina 209 (S209) pelas quinases Mnk1 e Mnk2. As Mnks interagem com o eIF4G, através de seu domínio C-terminal, que funciona como sítio de ancoragem para as quinases permitindo que as mesmas se posicionem próximas ao seu substrato principal, o eIF4E (GINGRAS *et al.*, 1999). A ligação ao eIF4G parece então modular a fosforilação do eIF4E (GINGRAS *et al.*, 1999; PARRA-PALAU *et al.*, 2003). Esta fosforilação aumenta a sua afinidade pelo *cap*, mas não resulta em aumento da atividade traducional (SCHEPER; PROUD, 2002).

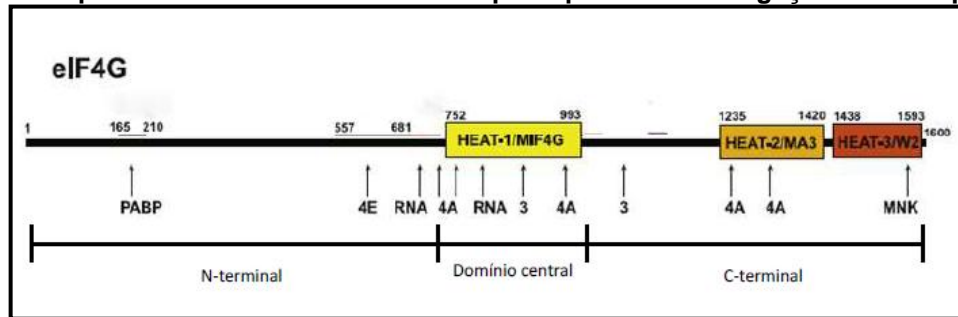
2.4.3 eIF4G

O fator de iniciação da tradução eucariótico eIF4G é uma proteína de alto peso molecular, de 220 kDa em humanos, cujo papel crucial é coordenar a formação do complexo eIF4F na iniciação da tradução. Esta proteína participa e influencia na eficiência de tradução dos mRNAs devido ao seu papel na formação do complexo eIF4F-mRNA-PABP, que é crucial para o acoplamento do complexo de pré-iniciação 43S junto a extremidade 5' do mRNA, (PARK *et al.*, 2004). Durante a iniciação da tradução, o eIF4G interage com o eIF3, eIF4A, eIF4E, PABP, com a própria molécula de RNA e com outras proteínas (PRÉVÔT *et al.*, 2003).

Em plantas, leveduras e mamíferos existem duas isoformas de eIF4G. No homem elas são denominadas de eIF4GI e eIF4GII. Estas isoformas exibem discreta homologia nas espécies de eucariotos avaliadas, mas mostram atividades bioquímicas semelhantes (GALLIE; BROWNING, 2001; TARUN *et al.*, 1997). A proteína eIF4GI humana possui aproximadamente 1600 aminoácidos e se divide em três regiões: N-terminal (aminoácidos 1 a 612), central (aminoácidos 613 a 1090) e C-terminal (aminoácidos 1091 a 1560), de acordo com um padrão de clivagem gerado por proteases virais (revisado por PRÈVÔT *et al.*, 2003). Na região N-terminal há domínios para interações com as proteínas PABP e eIF4E, associando as regiões 5' e 3' do mRNA. A região central inclui um domínio contendo repetições *HEAT* (HEAT-1/MIF4G) comuns em proteínas envolvidas na formação de complexos multiméricos. Este domínio constitui a região mais conservada evolutivamente em homólogos do eIF4G em diferentes organismos. Na região central, se ligam o eIF3 e o eIF4A (LEFEBVRE *et al.*, 2006) e esta região possui ainda um motivo para ligação de RNA (PESTOVA *et al.*, 2001). A região C-terminal, contém um segundo sítio de ligação ao eIF4A, o domínio HEAT-2/MA3 e um sítio de ligação às proteínas quinases Mnk, o domínio HEAT-3/W2 (BELLSOLELL *et al.*, 2006; MARINTCHEV *et al.*, 2009; JACKSON *et al.*, 2010) (Figura 7).

Além do motivo de ligação ao eIF4E, já descrito, o motivo de ligação a PABP também foi mapeado na região N-terminal da proteína eIF4G em diferentes modelos de estudo. Apesar de estar localizado na região N-terminal das diferentes proteínas de eucariotos, o motivo não é conservado em sequência de aminoácidos (IMATAKA *et al.*, 1997; PRÈVÔT *et al.*, 2003). Uma exceção a essa forma de ligação é encontrada em um homólogo do eIF4G de plantas, o eIFiso4G. Nesta proteína, o sítio de ligação a PABP está presente no domínio HEAT-1/MIF4G, sobrepondo-se ao sítio de ligação ao eIF4A e ao eIF4B, e assim as três proteínas competem pela interação ao eIFiso4G (CHENG; GALLIE, 2010).

Figura 7 - Esquema do eIF4GI humano e seus principais sítios de ligação a outras proteínas



Fonte: Marintchev (2009).

Nota: O eIF4GI possui na sua região N-terminal os sítios de ligação à PABP e eIF4E. Na região central desta proteína encontra-se o domínio central de ligação ao eIF4A, além de uma região de ligação a RNA (RRM) e do sítio de ligação ao eIF3. Já na sua porção C-terminal se encontram um segundo sítio de ligação ao eIF4A (apenas em mamíferos) e o sítio de ligação da proteína Mnk1 (quinase de eIF4E). O eIF4G humano, proteína protótipo da família, é formada por três domínios HEAT: HEAT-1/MIF4G, HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2.

2.4.4 Proteína de ligação à cauda poli-A – PABP

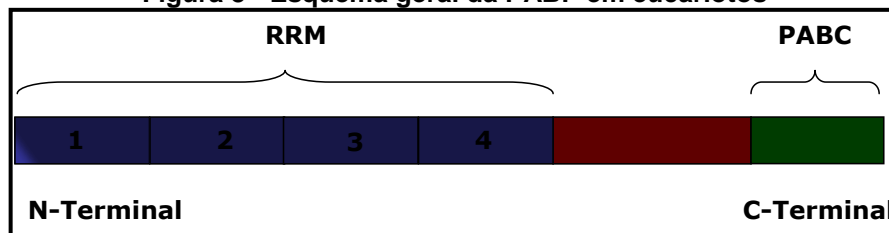
A PABP atua como um fator auxiliar durante a síntese protéica, ligando-se especificamente à cauda poli-A presente na região 3' dos mRNAs eucarióticos. Além disso, atua participando de vários processos celulares relacionados aos mRNAs, tais como biossíntese, processamento, transporte e degradação (CHANG *et al.*, 2004; DUNN *et al.*, 2005; HOSODA *et al.*, 2006). A estrutura da PABP é altamente conservada em diferentes organismos (KUHN; WAHLE, 2004) e se caracteriza por uma região N-terminal que apresenta quatro motivos de ligação a RNA (RRMs), uma região intermediária de conexão rica em prolina/glutamina e uma região C-terminal contendo um domínio chamado PABC cuja função é mediar interações com outras proteínas (KUHN; WAHLE, 2004). Embora seja pouco conservada, a região de conexão parece estar envolvida em processos de multimerização onde moléculas de PABP se associam umas às outras presas à cauda poli-A dos mRNAs (MELO *et al.*, 2003) (Figura 8).

Os RRM presentes na região N-terminal da PABP diferem em suas especificidades de ligação ao RNA e a proteínas, sendo os dois primeiros RRM responsáveis pela ligação específica ao poli-A e o RRM2 responsável pela ligação ao fator de iniciação da tradução eIF4G (CHENG; GALLIE, 2007). Os RRM3 e 4 estão envolvidos na ligação a sequências não poli-A e ricas em AU (SLADIC *et al.*, 2004). Evidências experimentais sugerem que a extremidade C-terminal da PABP

participa na estabilização dos mRNAs, na iniciação e terminação da tradução (WANG; GRUMET, 2004), bem como na exportação dos mRNAs contendo cauda poli-A recém sintetizados (AFONINA *et al.*, 1998).

Até o momento foram determinadas as estruturas do domínio PABC em humanos, leveduras e *T. cruzi* (DEO *et al.*, 2001; KOZLOV *et al.*, 2002; SIDDIQUI *et al.*, 2003) a partir da ressonância magnética nuclear e cristalografia de raios-X de um segmento conservado de 75 aminoácidos. A análise mostrou que esta região consiste de quatro ou cinco alfa-hélices e que se liga especificamente através de uma região hidrofóbica a um motivo de aproximadamente 12 aminoácidos, encontrados em todos seus parceiros ligantes. Observou-se nesse domínio, em um grande número de organismos diferentes, um alto grau de conservação de sequência nas hélices 2, 3 e 5, que correspondem aos sítios de ligação dos peptídeos alvos (KOZLOV *et al.*, 2001, 2004; KOZLOV; GEHRING, 2010; LEI *et al.*, 2011).

Figura 8 - Esquema geral da PABP em eucariotos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Em destaque a região N-terminal que possui quatro domínios de ligação ao mRNA (RRMs), a extremidade C-terminal que possui o domínio denominado PABC. Entre esses domínios localiza-se a região central da proteína, pouco conservada.

Em mamíferos a PABP associa-se ao eIF4G através de sua região N-terminal resultando em circularização do mRNA, conectando o *cap* com a cauda poli(A) durante a iniciação da tradução (VALASÉK, 2012). Esta interação estabiliza o complexo de iniciação da tradução e é, portanto, alvo da ação de proteínas regulatórias, tais como as proteínas de ligação a PABP, PAIP1 e PAIP2, que atuam melhorando ou reprimindo a atividade de PABP, respectivamente (DERRY *et al.*, 2006).

Já foram descritos isoformas da PABP em diferentes organismos, tais como plantas, trigo e leveduras. A fosforilação é a provável responsável por tais

modificações (DRAWBRIDGE *et al.*, 1990; LE *et al.*, 2000). Em plantas o estado fosforilativo da PABP não só influencia a ligação cooperativa com o poli-A como também determina a interação específica com aqueles fatores já identificados como capazes de interagir com a PABP (LE *et al.*, 2000; MELO *et al.*, 2003).

2.5 Uso de moléculas para inibir a ligação de fatores da tradução

As regiões de interação eIF4E/*cap*, eIF4G/eIF4E, eIF4G/eIF4A, eIF4G/PABP, eIF4G/eIF3, eIF4G/mRNA e PABP/mRNA foram em sua maioria identificados em eucariotos e são fundamentais para o processo de tradução. A ligação estudada em maior detalhe se refere à interação eIF4G/eIF4E, onde se mostrou que, no eIF4G, o sítio de ligação ao eIF4E é o motivo YXXXXL Φ (onde X pode ser qualquer aminoácido e Φ é um resíduo hidrofóbico), altamente conservado em homólogos de eIF4G de vários organismos (MADER *et al.*, 1995).

Estudos estruturais mostram que este motivo assume a estrutura de uma hélice curta que se associa à superfície dorsal, convexa do eIF4E (MARCOTRIGIANO *et al.*, 1999). Em mamíferos, um peptídeo de 16 aminoácidos do eIF4GII, contendo o motivo YXXXX Φ , liga-se a face dorsal do eIF4E com uma alta afinidade e a conformação do eIF4E não se altera quando ligado a este peptídeo (MARCOTRIGIANO *et al.*, 1999). Em contraste, em levedura o peptídeo do eIF4G correspondente liga-se ao eIF4E com baixa afinidade (GROSS *et al.*, 2003). A ligação do eIF4G ao eIF4E causa uma mudança de conformação em ambas as proteínas, conduzindo a formação de um complexo estável.

A tradução constitui ainda um dos principais sítios de ação de vários agentes antimicrobianos procarióticos e eucarióticos e dentre estes podemos citar antibióticos classicamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Entre alguns mecanismos de ação de antibióticos que paralisam a tradução estão os aminoglicosídeos, a espectinomicina, a tetraciclina, o cloranfenicol e os macrolídeos (BLANCHARD; COOPERMAN; WILSON, 2010; TENSON; MANKIN, 2006).

O desenvolvimento de moléculas que inibam etapas da iniciação da tradução tem sido visto como possível alternativa para o tratamento do câncer. Assim, a

inibição da interação eIF4G/eIF4E utilizando uma molécula específica (4EGI-1), que compete com o eIF4E pela ligação ao eIF4G, reduziu a eficiência de tradução exibindo atividade contra várias linhagens de células cancerígenas (MOERKE *et al.*, 2007). Além disso, o bloqueio da interação do eIF4G/eIF4A tem sido obtida utilizando uma molécula inibidora que liga-se especificamente ao eIF4A, o hippuristanol (LINDQVIST *et al.*, 2008).

Outra via alvo é a via que bloqueia a quinase Mnk, responsável pela fosforilação do eIF4E e que promove a proliferação celular, sendo crítica para o desenvolvimento de tumores malignos. Uma droga inibidora da Mnk tem se mostrado promissora para ser utilizado no tratamento de vários tipos de cânceres humanos (KONICEK *et al.*, 2011). Vale ressaltar que o desenho racional de pequenas moléculas que inibam a tradução, como as descritas acima, só é possível a partir do conhecimento adquirido de como as interações entre diferentes proteínas ocorrem.

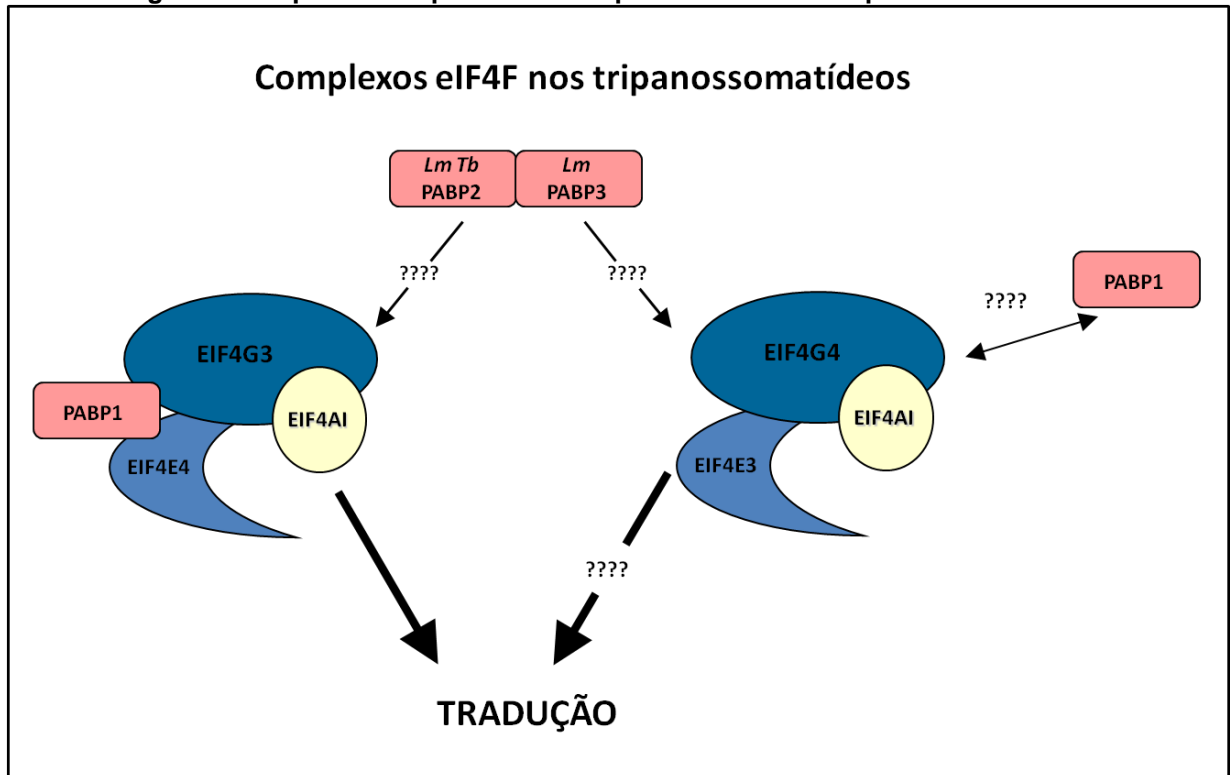
2.6 Iniciação da tradução nos tripanossomatídeos

Os mecanismos de expressão gênica já vem sendo estudado ao longo dos últimos anos nos tripanossomatídeos, e estes estudos vem ganhando complexidade nos últimos anos, principalmente após o seqüenciamento de genomas de espécies importantes destes protozoários (EL-SAYED *et al.*, 2005). Este tem sido o ponto de partida para análises mais refinadas em relação à busca da função de proteínas homólogas a fatores de iniciação da tradução, fatores estes originalmente estudados em outros eucariotos. Uma vez que o processo de tradução é um dos processos mais complexos de todos os seres vivos, e tendo em vista que a iniciação da tradução é a etapa mais complexa de todo o processo e a mais variável entre diferentes grupos de seres vivos, trabalhos vêm se detendo na caracterização funcional de homólogos de fatores de iniciação da tradução nos tripanossomatídeos. Dente estes, um dos focos principais tem sido o estudo das subunidades do complexo eIF4F e a PABP, por conta do seu papel no recrutamento dos mRNAs para a tradução.

Em relação às subunidades do complexo eIF4F, já foram descritos nos tripanossomatídeos dois homólogos do fator eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII), seis de

eIF4E (EIF4E1, EIF4E2, EIF4E3, EIF4E4, EIF4E5 e EIF4E6), cinco de eIF4G (EIF4G1, EIF4G2, EIF4G3, EIF4G4 e EIF4G5), além de três de PABP (PABP1, PABP2 e PABP3) em *Leishmania* (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; DHALIA *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2014; YOFFE *et al.*, 2004, 2006). Com exceção da PABP, que possui apenas dois homólogos encontrados em *T. brucei* e *T. cruzi*, todos os outros fatores possuem o mesmo número de homólogos nas diferentes espécies de tripanossomatídeos. Em trabalhos anteriores, foi demonstrado a formação de dois complexos: o primeiro formado pelos EIF4G3, EIF4E4, EIF4AI e PABP1, envolvido com o processo de iniciação da tradução, e o segundo formado pelas proteínas EIF4G4 e EIF4E3 com papel ainda não bem caracterizado e que podem ou não se associarem ao EIF4AI e a homólogos de PABP (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015; REIS, 2009). Para algumas destas interações, foi demonstrando que trechos de resíduos nas proteínas EIF4G3 e EIF4G4 estão envolvidos respectivamente na ligação com as proteínas EIF4E4 e EIF4E3 (REIS,CRS., 2009) (Figura 9), entretanto não ficou esclarecido se a ligação EIF4G/EIF4E nos dois complexos ocorre de forma similar.

Figura 9 - Esquema dos possíveis complexos eIF4F nos tripanossomatídeos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Esquema representativo de complexos do tipo eIF4F: À esquerda formado pelos homólogos EIF4G3, EIF4E4, EIF4A1 e PABP1, envolvido com o processo de iniciação da tradução, e à direita formado pelas proteínas EIF4G4, EIF4E3 e, possivelmente, EIF4A1, com papel ainda não bem caracterizado.

2.6.1 Homólogos de eIF4A

O fator eIF4A foi a primeira helicase identificada que exibe um papel na iniciação da tradução eucariótica (também conhecida como DDX2). A família das helicases conhecidas como “DEAD-box” compreende proteínas que possuem nove motivos conservados, e com base na sua homologia, foi demonstrado que o eIF4A possui o motivo II que é o mais conservado dentro da superfamília SFII, denominado “DEAD” (L-D-E-A-D-X-X-L) (LINDER, 2003; PARSYAB *et al.*, 2011).

A maioria das helicases de RNAs envolvidos na tradução também desempenham uma variedade de papéis em outros processos do metabolismo do RNA, incluindo a degradação, exportação, e processamento dos mRNAs. As proteínas “DEAD-box” usam a energia do ATP para desmanchar regiões curtas de fita dupla de RNAs. Alternativamente elas também podem funcionar como grampos

nos RNAs dependentes de ATP, gerando centros estáveis para auxiliar na formação de complexos RNA-proteínas (LINDER; JANKOWSKY, 2011).

Nos tripanossomatídeos o EIF4A é um dos fatores mais bem caracterizados. Foi constatado que o EIF4AI possui função RNA helicase dependente de ATP (*in vitro*), além de capacidade de ligação direta ao eIF4G de levedura (BARHOUMI *et al.*, 2006). Além disso, o EIF4AI é bastante abundante na forma promastigota de *L. major* e é capaz de interagir com o domínio HEATMIF4G do fator EIF4G3, diferentemente do EIF4AIII, incapaz de se ligar a esse homólogo do eIF4G e expresso de forma bem menos abundante nesta mesma fase celular (DHALIA *et al.*, 2006).

2.6.2 Homólogos de eIF4E

Com relação aos homólogos de eIF4E de tripanossomatídeos, dentre os seis homólogos identificados, apenas dois, os EIF4E3 e EIF4E4, se mostraram capazes de interagir respectivamente com homólogos de eIF4G potencialmente envolvidos no processo de tradução, os EIF4G4 e EIF4G3 (REIS, Tese de Doutorado, 2009). De fato, diversas linhas de evidência implicam o homólogo EIF4E4 como o candidato mais provável para melhor realizar as funções atribuídas para o eIF4E na iniciação da tradução (JAGUS *et al.*, 2012; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012). Do ponto de vista das interações entre os dois pares de homólogos de eIF4E e eIF4G, estas parecem exigir o resíduo de triptofano conservado nos homólogos de eIF4E (equivalente ao W73 de mamíferos), e motivos presentes na curta extremidade N-terminal dos homólogos de eIF4G que divergem do consenso descrito em outros eucariotos (o motivo YXXXXLΦ) (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008). Recentemente foram descritas interações entre outros homólogos de eIF4E e eIF4G, formando novos complexos eIF4F cujas funções ainda não estão bem caracterizadas (FREIRE *et al.*, 2014).

Os homólogos EIF4E3 e EIF4E4 são proteínas abundantes, de localização estritamente citoplasmática, que se destacam ainda por possuírem em comum extensas regiões N-terminais de homologia limitada e que não foram vistas em homólogos de eIF4E em outros organismos (FREIRE *et al.*, 2011). Uma evidência clara das diferenças existentes no processo de iniciação da tradução nos

tripanossomatídeos foi a identificação de uma interação entre o EIF4E4 com a PABP1, descrita em *Leishmania*. Esta interação envolve a região N-terminal da proteína EIF4E4 e representa o único caso descrito até o momento em eucariotos de interação direta entre homólogos de eIF4E e PABP (ZINOVIEV *et al.*, 2011). Dados não publicados indicam ainda que esta interação é mediada pela região C-terminal da PABP1 que parece interagir com motivos presentes da região N-terminal do EIF4E4 (e também do EIF4E3), mas ausentes de outros homólogos de eIF4E de *Leishmania* e de outros organismos. Experimentos de complementação que expressaram proteínas mutantes em *L. infantum* confirmaram que a interação entre o EIF4E4/PABP1 é mais importante para o processo de tradução que a interação EIF4E4/EIF4G3, reforçando as diferenças no processo de tradução destes protozoários (DA COSTA LIMA, 2012; DE MELO NETO, manuscrito em fase de redação).

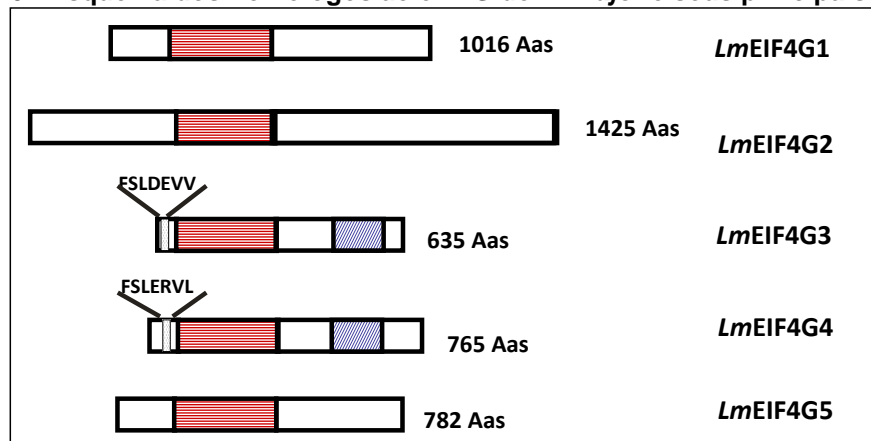
2.6.3 Homólogos de eIF4G

Em *L. major*, entre os cinco homólogos de eIF4G encontrados, nenhum domínio óbvio para ligação ao eIF3, ao eIF4E ou à PABP foi identificado baseado apenas em homologia de sequências, entretanto todos apresentam o domínio HEAT-1/MIF4G (Figura 10). Uma análise mais detalhada das suas sequências revela que estes homólogos de uma forma geral não compartilham outras semelhanças, com exceção dos EIF4G3 e EIF4G4. Estas duas proteínas apresentam uma região N-terminal curta e uma região conservada de aproximadamente 120 aminoácidos localizada cerca de 180 aminoácidos após o domínio HEAT-1/MIF4G, com similaridade aos dois outros domínios HEAT do eIF4GI humano (HEAT-2/MA3 e ou HEAT-3/W2) (DHALIA *et al.*, 2005). No entanto, análises de predição da região C-terminal dos homólogos EIF4G3 e EIF4G4 previu com alta confiança um domínio MA3 semelhante a um domínio regulador de tradução de mamífero Pcd4 (CHANG *et al.*, 2009). Além disso, resíduos de triptofano conservados, também na extremidade C-terminal dos eIF4Gs de tripanossomatídeos assemelham-se a aminoácidos aromáticos conservados no domínio W2 de mamíferos e afins (BELLSOLELL *et al.*, 2006; LIBERMAN *et al.*, 2008).

Apesar das suas regiões N-terminais do EIF4G3 e EIF4G4 terem um tamanho muito curto, observa-se que nas mesmas estão localizados os motivos de interação ao EIF4E3 e EIF4E4 respectivamente. Estas interações ocorrem através de motivos semelhantes aos descritos para outros eucariotos, mas que seriam posicionados em regiões não correspondentes nos dois homólogos de eIF4G (YOFFE *et al.*, 2009, ZINOVIEV *et al.*, 2012).

A proteína EIF4G3 demonstrou ainda ser capaz de interagir com a proteína PABP1, e polipeptídeos contendo o domínio MIF4G e/ou o domínio C-terminal da proteína EIF4G3 são capazes de interagir com a proteína PABP1, através das suas regiões N e C-terminais. Estes resultados sinalizam para um modo de interação eIF4G/PABP diferente do que foi descrito até o momento em outros eucariotos (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; REIS CRS, Tese de doutorado 2009; XAVIER *et al.*, 2013).

Figura 10 - Esquema dos homólogos ao eIF4G de *L. major* e seus principais domínios



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A região mais conservada das proteínas, semelhante a outros organismos, é o domínio MIF4G (listras vermelhas). Os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 aparentemente são funcionalmente relacionados, uma vez que além do domínio HEAT-1/MIF4G, ambos possuem uma região N-terminal curta e uma região conservada de 120 aminoácidos na região C-terminal (listras azuis) que poderia ser um segundo domínio presente em eucariotos, o HEAT-2/MA3 ou o HEAT-3/W2 ou ambos.

2.6.4 Homólogos de PABP

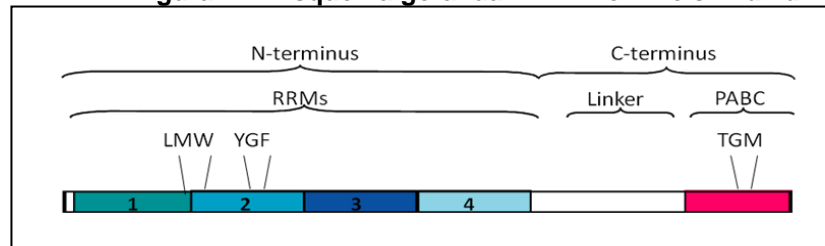
Homólogos da PABP nos tripanossomatídeos foram identificados e caracterizados em *T. brucei*, *T. cruzi*, e *L. major*. Análises de bioinformática confirmaram que todos os tripanossomatídeos estudados apresentam dois

homólogos de PABP (PABP1 e 2) e que espécies de *Leishmania* apresentam um terceiro homólogo (PABP3) (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). Os três homólogos da PABP em *Leishmania sp.* possuem localização predominantemente citoplasmática, entretanto foi observado que as três proteínas diferem na maneira de se ligar ao RNA alvo. Experimentos de imunoprecipitação mostram que as PABP2 e 3 interagem entre si e com as mesmas populações de mRNAs. Nenhuma das duas, entretanto, se ligam a PABP1, que parece se associar a populações diferentes de mRNAs. Até o momento somente a PABP1 foi identificada se ligando a um homólogo de eIF4G, o EIF4G3 (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010).

A estrutura da PABP é altamente conservada e assim como nos demais eucariotos, os homólogos de tripanossomatídeos se caracterizam por uma região N-terminal que apresenta quatro motivos de ligação a RNA (RRMs), uma região intermediária rica em prolina/glutamina e uma região C-terminal contendo um domínio chamado PABC. Além disso, por análises de sequências de bioinformática foram avaliados motivos relevantes da proteína, que parecem mediar interações com parceiros proteicos ou RNAs (Figura 11).

Recentemente, foi descrito na literatura que a PABP1 de *Leishmania* é capaz de interagir diretamente com o fator EIF4E4, uma interação nova que até o momento não foi observada em outros eucariotos (ZINOVIEV *et al.*, 2011). Dados recentes não publicados, realizados a partir de experimentos de interação *in vitro*, confirmaram de fato a ligação da PABP1 tanto com o EIF4E4 como com o EIF4E3 e verificaram que esta é mediada pela região C-terminal da PABP1 (Figura 12). Já a interação da PABP1 com o EIF4G3 é bem mais fraca que a interação entre PABP1 e EIF4E4 ou entre o EIF4G3 e EIF4E4. Esta interação parece envolver múltiplos segmentos, com a região central e C-terminal do EIF4G3 interagindo com motivos distintos e ainda não definidos da PABP1.

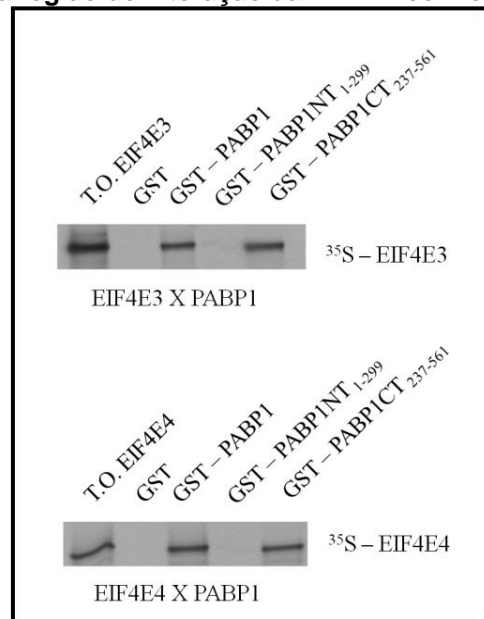
Figura 11 - Esquema geral da PABP1 em *Leishmania*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Em destaque a região N-terminal que possui quatro domínios de ligação ao mRNA (RRMs), a extremidade C-terminal que possui o domínio denominado PABC (KUHN; WAHLE, 2004). Entre esses domínios a região central da proteína, de conexão. Outros motivos relevantes da proteína, que podem mediar interações com parceiros protéicos (LMW e TGM) ou com RNAs (YGF), estão indicados.

Figura 12 - Mapeamento da região de interação da PABP1 com os fatores EIF4E3 e 4/



Fonte: Da Costa Lima (2012).

Nota: Autorradiografias dos ensaios de *pull-down* entre as PABP1 completa, PABP1NT₁₋₂₉₉ e PABP1CT₂₃₇₋₅₆₁, fusionadas a GST, com os EIF4E3 e 4 marcados [³⁵S]. Os EIF4E3 e 4, ao contrário do EIF4G3, interagem não só com a PABP1 completa como especificamente com a sua região C-terminal. (T.O. = tradução original).

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho está inserido em um projeto maior que tem por finalidade investigar o processo de iniciação da tradução em tripanossomatídeos. É importante ressaltar que estes protozoários são responsáveis por causar doenças que afetam milhares de pessoas no mundo, incluindo o Brasil e Pernambuco, causadas por diferentes espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. A Organização Mundial de Saúde classifica essas doenças como negligenciadas e estimula a produção de conhecimento científico referente às mesmas, o que pode possibilitar o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle. A caracterização do processo de iniciação da tradução, a partir da identificação das proteínas envolvidas e de como essas interagem entre si, se enquadra dentro dessa perspectiva. Nesta proposta, pretende-se avaliar o papel de interações específicas entre homólogos de eIF4F e PABP *in vitro*, e determinar os sítios de interação e os aminoácidos chaves, utilizando proteínas recombinantes de espécies de *Leishmania* submetidas a mutagênese e/ou truncagem contendo domínios e motivos específicos. Os conhecimentos obtidos neste trabalho podem ser muito úteis no desenvolvimento racional de moléculas inibidoras das interações que resultem em ação antiparasitária.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar em *Leishmania sp.* interações específicas, conservadas ou não, entre homólogos de subunidades do complexo de iniciação da tradução eIF4F e entre estes e homólogos de sua proteína parceira PABP, avaliando o efeito sobre estas interações de mutações direcionadas a domínios e/ou motivos específicos.

4.2 Objetivos específicos

- a) Confirmar os motivos de ligação nas proteínas EIF4G3 e EIF4G4 aos parceiros EIF4E4 e EIF4E3, respectivamente.
- b) Identificar os motivos requeridos para a ligação entre as proteínas PABP1 e EIF4E4.
- c) Identificar os motivos requeridos para a ligação entre a proteína PABP2 e o homólogo de EIF4E3.

5 METODOLOGIA

5.1 Subclonagem dos genes EIF4E3, EIF4E4 e PABP1 de *Leishmania*

Para as subclonagens, as construções plasmidiais no vetor pGEMT-easy contendo os genes mutados dos diferentes homólogos (EIF4E3, EIF4E4 e PABP1), já disponíveis no laboratório, foram individualmente digeridos com enzimas de restrição *Bam* HI/ *Hind* III, para obtenção dos fragmentos de DNA correspondente. Os diferentes fragmentos obtidos foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com *Syber*® *Safe* (Invitrogen®) e visualizados em aparelho emissor de ultravioleta de ondas longas. As bandas de interesse foram excisadas e purificadas utilizando-se o sistema de purificação GFX (GE Helthcare®) conforme recomendação do fabricante.

Os fragmentos resultantes foram então subclonados em vetores plasmidiais de expressão (pET21d da Novagen® e pGEX4T3 da GE Helthcare®) previamente digeridos com as mesmas enzimas e purificados em gel, por incubação durante 20 h a 16°C com a enzima T4 DNA Ligase (New England BioLabs®). Estas construções foram transformadas em bactérias *Escherichia coli* cepa DH5α e a partir dos clones positivos selecionados foram realizadas extração de DNA plasmidial por lise alcalina em pequena e/ou larga escala, segundo Sambrook e Russel (2001). Todas as construções foram confirmadas por sequenciamento.

Quadro 1 - Construções selvagens e mutantes subclonadas nos vetores pET21a e pGEX4T3.

pET21a <i>Li</i> EIF4E4WT (selvagem)	pET21a <i>La</i> EIF4E3WT (selvagem)	pGEX4T3 <i>Li</i> PABP1WT (selvagem)
pET21a <i>Li</i> EIF4E4AB (EY-AA/EF-AA)	pET21a <i>La</i> EIF4E3AB (Y-A/PF-AA)	pGEX4T3 <i>Li</i> PABP1LMW/YGF (LMW-AAA/YGF-AAA)
pET21a <i>Li</i> EIF4E4C (Y-A)	pET21a <i>La</i> EIF4E3C (DW-AA)	pGEX4T3 <i>Li</i> PABP1TGM (TGM-AAA)
pET21a <i>Li</i> EIF4E4ABC (EY-AA/EF-AA/Y-A)	pET21a <i>La</i> EIF4E3ABC (Y-A/PF-AA/ DW-AA)	-
pET21a <i>Li</i> EIF4E4MUT4G (W305A)	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os prefixos *Li* e *La* se referem às espécies de *Leishmania* de onde os genes foram obtidos (*L. infantum* ou *L. amazonensis*). Os aminoácidos que foram mutados estão identificados entre parênteses abaixo de cada construção.

5.2 Expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a proteína Glutathione S-transferase (GST), o vetor de expressão procariótico pGEX4T3, contendo os fragmentos gênicos ou genes que codificam domínios das proteínas, proteínas selvagens ou proteínas contendo mutações em resíduos de aminoácidos (*EIF4G3*, *EIF4G4* e *PABP1*) foram transformados em cepas de células BL21 star (Invitrogen®) de *E. coli* através de transformação por choque térmico. Para a transformação, as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4° C, seguido de choque térmico a 37°C por 5 minutos, com subsequente semeio das células transformadas em placa de Petri contendo meio Agar LB (Luria-Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µg/µL) e incubadas a 37°C por 18 horas. As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico, como descrito anteriormente, e foram crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm por 18 horas. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 10 mL das culturas crescidas foram inoculadas em 500 mL de meio LB com antibiótico e crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm e o crescimento bacteriano foi

acompanhado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,5 ou 0,8, dependendo da proteína a ser expressa. Em seguida foi adicionado o indutor de síntese de proteínas, IPTG (isopropil- β -D-tio-galactosídeo - Sigma-Aldrich®), na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C (D.O. de 0,5) ou 1 hora (D.O. de 0,8).

Quadro 2 - Proteínas selvagens, mutantes e truncadas expressas fusionadas a Glutathione S-transferase (GST).

GST-LmG3WT	GST-LmG4WT	GST- LiPABP1WT
GST-LmG3I8A	GST-LmG4I25A	GST- LiPABP1LMW/YGF
GST-LmG3R9A	GST-LmG4L26A	GST- LiPABP1TGM
GST-LmG3R12A	GST-LmG4I25AL26A	GST- LmPABP2WT
GST-LmG3Y15A	GST-LmG4R9A	-
GST-LmG3FSL	GST-LmG4W32A	-
GST-LmG3NT+MIF	GST-LmG4FSL	-
GST-LmG3MIF+CT	GST-LmG4NT+MIF	-
-	GST-LmG4MIF+CT	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os prefixos *Lm* e *Li* se referem às espécies de *Leishmania* de onde os genes foram obtidos (*L. major* ou *L. infantum*).

5.3 Purificação e diálise de proteínas recombinantes

Culturas bacterianas após indução foram centrifugadas a ~10000 g durante 10 minutos e o sedimento bacteriano obtido foi ressuspenso em 20mL de PBS, acrescido de inibidor de protease livre de EDTA, de acordo com as instruções do fabricante (Roche). Em seguida a lise das bactérias foi realizada através de ultrasonicação (6 pulsos de 30 segundos com intervalos de 1 minuto), com posterior adição de 1% de Triton-X e centrifugação a ~10000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante após lise foi incubado com 200 μ L de resina Glutathione sefarose (GE Biosciences), previamente equilibrada em PBS, após três lavagens de 10 mL cada. A incubação foi realizada por 1 hora à temperatura de 4°C sob leve agitação. Após a

incubação foi realizada uma centrifugação de 1000 g por 1 minuto, descartado o sobrenadante, a resina foi lavada três vezes com 1 mL de PBS, três lavagens de 1 mL. Em seguida foram eluídas duas vezes com 500 µL de glutathione reduzida (em 50mM de Tris-HCl pH 9.0) por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 200 µL de PBS a resina e a amostra congelada a -80°C . Para 15 µL de cada eluato e da resina foi acrescido igual volume de tampão de gel de eletroforese de proteínas (duas vezes concentrado), 15 µL desta mistura fracionados em SDS-PAGE 15% e visualizados após coloração com azul de Coomassie R-250.

Após purificação, as proteínas purificadas foram submetidas à diálise no qual os eluatos foram transferidos para sacos de diálise de 6 mm de diâmetro (Sigma) e incubadas com 700 mL de tampão de diálise (44 mM de Na_2HPO_4 ; 5,2 mM NaH_2PO_4 , 50 mM de NaCl; 5 % de glicerol; 0,1 % TritonX-100), sob leve agitação por 6 horas a 4°C , sendo o tampão trocado três vezes a cada intervalo de duas horas. As proteínas dialisadas foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% como descrito, sendo a quantificação das mesmas realizadas através da comparação da intensidade das bandas de diluições seriadas das proteínas recombinantes com diluições seriada de concentrações conhecidas de BSA, por meio do programa da câmera digital, *Kodak 1D Image Analysis Software*.

5.4 Transcrição e tradução *in vitro*

Para a transcrição *in vitro* foram utilizadas as construções contendo os genes *EIF4E3* e *EIF4E4* clonados no vetor pET21d. Para a reação foram utilizados 3 µg de DNA linearizado na região 3' com a enzima *HindIII*, posicionado imediatamente após o fim do gene, e a enzima T7 RNA polimerase (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de transcrição foram realizadas em um volume final de 50 µL na presença de tampão de transcrição (40 mM Tris pH 8,0, 15 mM MgCl_2), rNTPs (4 mM de ATP, CTP e UTP, cada; 0,4 mM de GTP; todos da GE Healthcare), 0,5 mM de m7-GTP (New England Biolabs), 10 mM DTT, 30 U de inibidor de RNase (Promega), 10 U de T7 RNA polimerase (Pharmacia) e água deionizada, tratada com DEPC. A reação foi incubada por 2 horas a 37°C e após os 30 minutos iniciais foi adicionado GTP para uma concentração final de 1 mM. Após mais 30 minutos de reação foi adicionado 2,5U de T7 RNA polimerase. Ao término

das reações de transcrição, 1 µL de cada transcrito sintetizado foi analisado em gel de agarose 1% corado com *Syber® Safe*. Os mRNAs sintéticos obtidos foram precipitados com 0,3 M NaCl e 2,5 volumes de etanol 100 % e o sedimento ressuspenso em água deionizada tratada com DEPC. Alíquotas de 0,1, 0,2 e 1 µL dos RNAs purificados foram traduzidos em lisado de reticulócito de coelho (RRL) suplementado com metionina marcada radioativamente com ³⁵S, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega). As reações de tradução foram realizadas na temperatura de 30°C, durante 90 minutos. Após a tradução, alíquotas de 5 µL de cada amostra foram acrescidas de tampão de amostra para gel SDS-PAGE, e submetidas à migração por eletroforese. Após a migração, o gel foi corado com azul de Coomassie R-250 (Sigma) e submetido a secagem em papel de filtro a 70°C, durante uma hora, sob vácuo. Para visualização das proteínas recombinantes marcadas com ³⁵S, o gel foi exposto a um filme de autorradiografia Hiperfilme MP Amersham (GE Healthcare®) e revelada com dektol 1:1 (Kodak®).

5.5 Ensaio de interação proteína- proteína (*pull-down*)

Para os ensaios de interação proteína-proteína, a resina Glutathiona-Sefarose 4B (GE Biosciences®) foi previamente equilibrada com o tampão de ligação BB3 (100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 50 mM Hepes pH 7.2, 0,2% NP-40, 5% glicerol). Em seguida a resina foi bloqueada utilizando o tampão BB3 acrescido de 10 µg/mL de BSA para evitar ligações inespecíficas. Para cada ensaio, aproximadamente 10 µL de cada resina bloqueada foi incubada com 2 µg de proteína recombinante em um volume final de 200 µL (em tampão BB3), durante 1 hora sob agitação, a 4°C. As resinas foram lavadas duas vezes com tampão BB3 e incubadas com 5 µL de proteínas marcadas radiotivamente (no volume final de 200 µL de tampão BB3), durante 2 horas sob agitação a 4°C. Após três lavagens com 500 µL de tampão BB3, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 40 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e 10 µL de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel 15%. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250, para visualização das proteínas recombinantes, e submetidos à autorradiografia para visualização das proteínas radioativas marcadas com ³⁵S (DHALIA *et al.*, 2005), verificando a associação ou não das proteínas avaliadas.

5.6 Modelagem de proteínas *in silico*

Para o estudo da interação PABP1/EIF4E4 as modelagens *in silico* das proteínas foi realizada através do programa disponível na web MHOLline que combina um conjunto específico de programas para análise da estrutura de proteínas, incluindo os métodos de modelagem comparativos e identificação regiões transmembrana.

O MHOLline começa com um arquivo de entrada no formato FASTA contendo uma ou mais sequências de proteínas. Para identificação da estrutura modelo, MHOLline usa o algoritmo BLAST (versão 2.2.25) para pesquisar estruturas tridimensionais (3D) no Protein Data Bank (PDB). Um refinamento na etapa de busca de modelo foi implementado com o desenvolvimento de um programa chamado BATS (Explosão automática Segmentação de Estruturas). O alinhamento global automatizada e a construção de modelos 3D das proteínas são executados pelo programa MODELLER (versão 9v13). Modelos construídos são avaliados, de acordo com a sua qualidade estereoquímica, pelo PROCHECK programa (versão 3.5.4). Para cada programa, MHOLline retorna os arquivos de saída de costume e quando todo programa selecionado terminar, MHOLline retorna um arquivo de resumo.

Além disso, também foi utilizado o programa KBDOCK que é um sistema de banco de dados 3D que define e aglomera espacialmente sítios de ligação de proteínas. O KBDOCK extrai informações do PDB (banco de dados de proteínas) de interação domínio-domínio (DDI) e interação domínio-peptideo (DPI) das proteínas, utilizando a classificação de domínio PFAM (banco de dados de família de proteínas), a fim de analisar os arranjos espaciais de DDIs e DPIs por família Pfam e propor modelos estruturais para acoplamento (*docking*) de proteínas.

6 RESULTADOS

Os dados obtidos até agora a respeito dos mecanismos de interação entre as subunidades dos complexos do tipo eIF4F e PABP de tripanossomatídeos indicam múltiplos aspectos que os diferenciam de complexos equivalentes em outros eucariotos. Sendo assim, esta dissertação teve como proposta dar continuidade ao esforço de caracterização das interações necessárias para a função de proteínas selecionadas na iniciação da síntese proteica nos tripanossomatídeos. Acredita-se que a identificação dos motivos de interação e a validação de novas interações que possam ser avaliadas podem contribuir na identificação de novos alvos para o desenvolvimento de agentes inibidores do processo de tradução.

No presente trabalho, três conjuntos distintos de interações foram investigadas e que parecem ser críticas para a função dos dois complexos do tipo eIF4F mais relevantes para a iniciação da síntese proteica em *Leishmania* e outros tripanossomatídeos: o primeiro formado pelas interações já definidas entre os EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1/PABP1; e o segundo formado pelas interações entre os EIF4E3/EIF4G4 que podem ou não interagir ainda com homólogos de PABP e com o EIF4A1. Na primeira etapa dos procedimentos, foram investigadas as interações entre as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 com seus parceiros EIF4E4 e EIF4E3 respectivamente. Dados da literatura apontam que o domínio de interação entre estas proteínas é diferente, mas os resultados apresentados não são conclusivos e precisam de uma reavaliação. Num segundo momento, os motivos de ligação na nova interação identificada entre as proteínas EIF4E4 e PABP1 foram avaliadas. Foi investigada também a possível interação entre a PABP2 com o EIF4E3, bem como os motivos envolvidos nesta ligação. Por fim, ferramentas de bioinformática foram utilizadas para se definir melhor as propriedades das interações evidenciadas entre os homólogos de PABP e eIF4E.

6.1 Identificação dos motivos responsáveis pela ligação dos EIF4G3 e EIF4G4 aos EIF4E4 e EIF4E3, respectivamente

Os dados da literatura indicam que as interações entre os EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3 ocorrem através de motivos semelhantes aos descritos para outros eucariotos, mas que seriam posicionados em regiões não correspondentes nos dois homólogos de eIF4G (YOFFE *et al.*, 2009; ZINOVIEV *et al.*, 2012). Entretanto o alto grau de semelhança na estrutura e sequência dos homólogos de eIF4G, bem como seus parceiros, homólogos de eIF4E, sugeriria elementos mais conservados para estas interações. Desta forma, esta dissertação de mestrado se iniciou com a continuação de trabalho anterior que teve como propósito avaliar a possibilidade de que as duas interações utilizem um motivo comum. Para isso, proteínas EIF4G3 e EIF4G4 contendo mutações em resíduos previamente identificados, e equivalentes nas duas sequências (Figura 13A caixa vermelha), foram expressas em fusão com a Glutathiona S-transferase (GST) e testadas quanto a sua capacidade de interação com os parceiros eIF4Es marcados radioativamente. Todas as construções plasmidiais necessárias para esta etapa do trabalho já estavam disponíveis quando do início de sua execução.

Figura 13 - Candidatos a motivos de ligação ao eIF4E encontrados nas proteínas EIF4G3 e EIF4G4 de tripanossomatídeos

LmEIF4G3	1	M	Q	F	T	V	E	Q	L	R	S	V	R	N	N	L	E	P	-	P	Y	P	G	F	S	L	D	E	V	V	R																					
TbEIF4G3	1	M	H	V	Y	T	I	D	Q	I	L	E	L	R	S	L	Y	P	E	P	-	P	Y	P	G	F	S	L	E	E	A	C	R																			
TcEIF4G3	1	M	H	V	Y	S	I	Q	I	L	E	V	R	S	M	Y	K	D	A	-	P	Y	P	G	F	S	L	E	E	A	C	R																				
LmEIF4G4	1	M	L	F	N	L	R	G	I	V	P	Q	K	E	E	K	V	K	N	--	Q	M	L	A	D	I	L	L	A	F	R	D	T	W	T	A	I	-	P	E	P	N	F	S	L	E	R	V	L	L		
TbEIF4G4	1	M	L	F	K	P	R	G	V	T	S	N	D	P	R	Y	A	G	G	S	R	L	M	S	V	S	D	L	L	A	Y	R	D	T	W	R	G	R	E	P	E	T	E	S	F	S	L	A	Q	I	L	R
TcEIF4G4	1	M	L	F	K	P	R	G	V	T	S	N	D	P	K	Y	A	G	N	S	R	L	M	T	I	P	D	L	L	A	Y	R	D	T	W	K	E	R	-	L	S	D	D	F	S	L	G	R	I	L	F	

A

B

Fonte: Reis (2009).

Nota: (A) o primeiro motivo M/F/YXXXXI/LL possui características semelhantes ao motivo clássico, nas proteínas EIF4G3 e EIF4G4, exceto pela mutação no *LmEIF4G3* de um aminoácido hidrofóbico por um básico (L/R). Este motivo foi relacionado a interação das proteínas EIF4G4 e EIF4E3 (caixa azul) (Zinoviev *et al.*, 2012). (B) o segundo motivo conservado, foi relacionado a interação entre EIF4G3 e EIF4E4 (caixa verde) (Yoffe *et al.*, 2009). A interação entre EIF4G3/EIF4E4 pode envolver aminoácidos presentes em A num motivo de interação que seria comum ao EIF4G4/EIF4E3 (caixa vermelha).

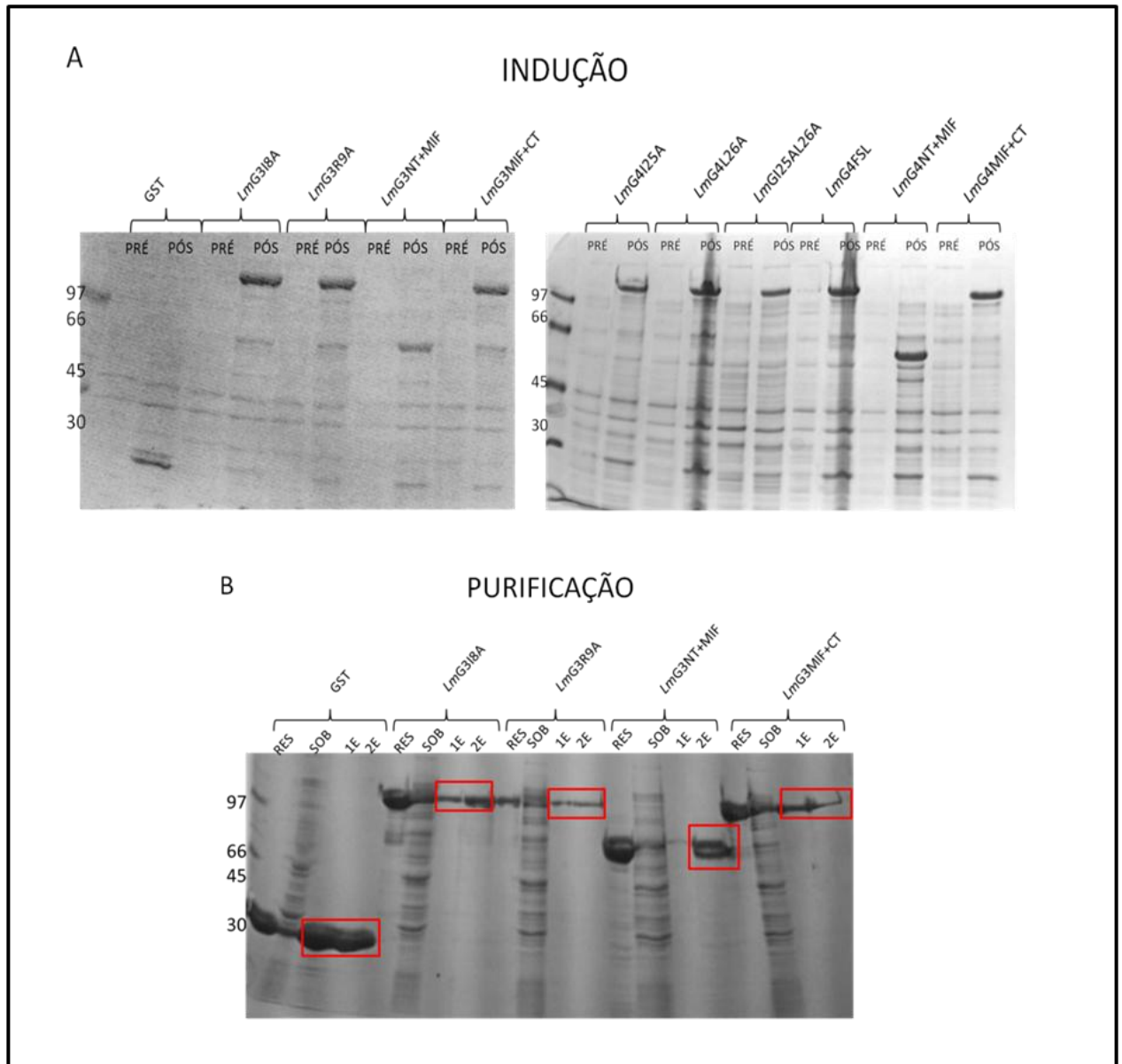
6.1.1 Expressão e purificação de proteínas recombinantes

Nesta etapa foram utilizadas as construções disponíveis no laboratório contendo os genes codificando diferentes construções do EIF4G3 e EIF4G4 de *L. major* clonados no plasmídeo pGEX4T3. As referidas construções do EIF4G3 (*EIF4G3* selvagem, mutantes I8A, R9A, R12A, Y15A, FSL-AAA e truncagens NT+MIF, MIF+CT) e EIF4G4 (*EIF4G4* selvagem, mutantes I25A, L26A, I25AL26A, R29A, W32A, FSL/AAA e truncagens NT+MIF, MIF+CT) foram inicialmente transformadas em *Escherichia coli* para a indução e purificação de proteínas recombinantes fusionadas a cauda GST. Alíquotas pré- e pós-indução, assim como resina, sobrenadante e eluatos das purificações foram submetidos a migração em gel SDS-PAGE (Figura 14). Todas as proteínas foram em seguida dialisadas e quantificadas.

6.1.2 Transcrição e tradução *in vitro* dos genes *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4*

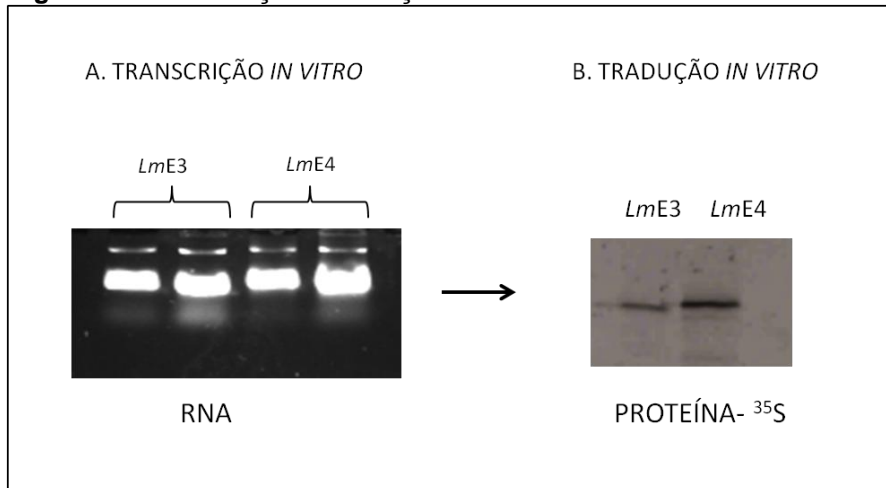
Para as proteínas radioativas, foi necessário primeiramente a obtenção de mRNAs por transcrição *in vitro* dos genes *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4*. Os mRNAs sintéticos obtidos foram analisados em gel de agarose quanto a sua integridade (Figura 15A) e foram traduzidos *in vitro*, permitindo a obtenção das proteínas radioativas visualizadas em autoradiografia (Figura 15B) que posteriormente foram utilizadas no ensaio de interação com as proteínas recombinantes mutantes *LmEIF4G4* e *LmEIF4G3* respectivamente.

Figura 14 - Expressão e purificação das proteínas selvagem e mutantes GST-*LmEIF4G3* e GST-*LmEIF4G4*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Géis de SDS-PAGE demonstrativos com parte das proteínas expressas e purificadas fusionadas a GST. **Figura 14A.** Para a indução das proteínas de fusão foi adicionado às culturas bacterianas IPTG (pós-IPTG). Como controle, foram crescidas culturas nas mesmas condições sem adição de IPTG (pré-IPTG). **Figura 14B.** Purificação de proteínas representativas, com as amostras retidas na resina e as duas eluições destacadas nos quadros vermelhos. O tamanho das proteínas foi de aproximadamente 97 kDa. Os valores do marcador de peso molecular, a esquerda, estão expressos em kilodaltons (kDa).

Figura 15 - Transcrição e tradução *in vitro* dos *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4*

Fonte: Elaborado pelo autor.

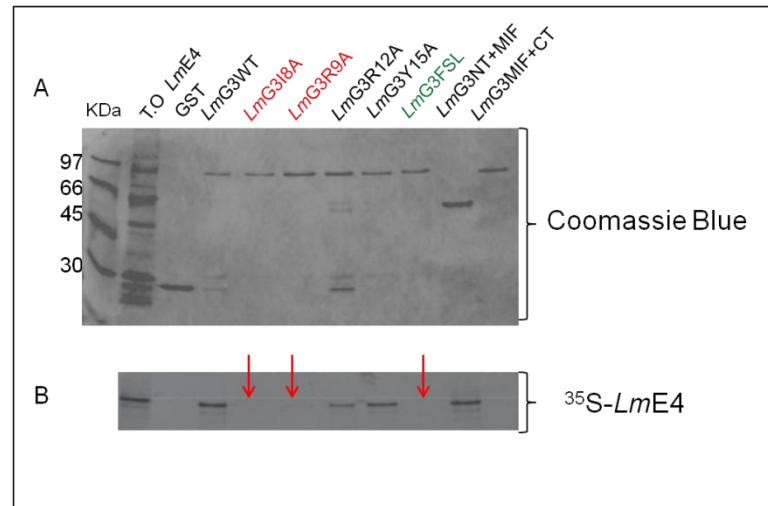
Nota: Figura 15A. Gel de agarose após eletroforese dos mRNAs provenientes da reação de transcrição *in vitro* dos genes *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4* no plasmídeo pET21a. **Figura 15B.** Expressão das proteínas *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4* que foram fracionadas em gel SDS-PAGE, submetidas a exposição de filme autoradiográfico para revelação das proteínas radioativas.

6.1.3 Ensaios de interação proteína-proteína para investigar as interações entre os EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3

Para se investigar diretamente qual o sítio envolvido nas interações entre os fatores EIF4G3 e EIF4E4, bem como a interação EIF4G4 e o parceiro EIF4E3 de *L. major*, foram realizados ensaios de interação proteína-proteína do tipo *pull-down*. No primeiro ensaio as proteínas do *LmEIF4G3* contendo mutações em resíduos de aminoácidos específicos fusionadas a GST (selvagem, I8A, R9A, R12A, Y15A, FSL-AAA, NT+MIF e MIF+CT) foram imobilizadas na resina Glutathiona Sefarose 4B e em seguida incubadas com a proteína *LmEIF4E4* marcada com ^{35}S . A resina foi coletada, lavada para remoção de interações inespecíficas e as proteínas retidas foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 16 A). Apenas no caso de interações específicas, entre as proteínas com GST e àquela marcada com ^{35}S , as proteínas radioativas seriam detectadas junto à resina. A proteína GST foi incubada com as radioativas para ser utilizada como um controle negativo, a fim de descartar qualquer interação inespecífica. Além disso, também foram usados como controle de ligação no ensaio as proteínas truncadas NT+MIF e MIF+CT, pois estudos prévios demonstraram a região N-terminal+MIF4G e a proteína completa EIF4G3 interagem com a proteína EIF4E4 enquanto que a região MIF4G+C-terminal não interage.

Como pode ser visto na Figura 16B, as proteínas do *LmEIF4G3* contendo mutações em resíduos conservados I8A, R9A e FSL-AAA afetaram a ligação ao *LmEIF4E4*.

Figura 16 - Análise da interação entre as proteínas recombinantes mutantes GST-*LmEIF4G3* com a proteína radioativa ³⁵S-*LmEIF4E4*

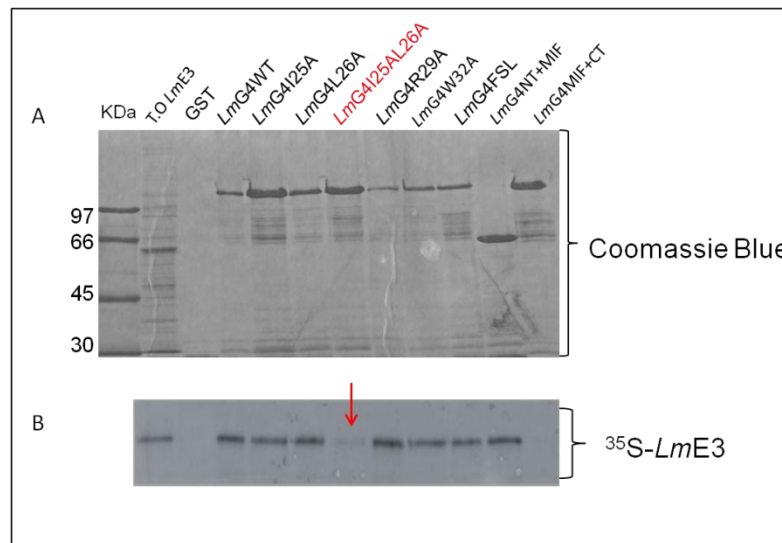


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As diferentes proteínas recombinantes *LmEIF4G3* fusionadas à GST, foram imobilizadas na resina Glutaciona Sefarose 4B e incubadas com a proteína ³⁵S-*LmEIF4E4*. **Figura 16A.** Representa o *input* da tradução original juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie. **Figura 16B.** Representa a autoradiografia mostrando que a mutação nos resíduos I8A, R9A e FSL na proteína *LmEIF4G3* afeta a ligação ao seu parceiro *LmEIF4E4* (setas).

No segundo ensaio de *pull-down*, as proteínas do *LmEIF4G4* contendo mutações em resíduos de aminoácidos em posições equivalentes ao *LmEIF4G3* fusionadas a GST (selvagem, I25A, L26A, I25AL26A, R9A, W32A, FSL-AAA, NT+MIF e MIF+CT) foram imobilizadas na resina Glutaciona Sefarose 4B e em seguida incubadas com a proteína *LmEIF4E3* marcada com ³⁵S (Figura 17A). A proteína GST utilizada como um controle negativo, além disso, também foram usados como controle de ligação no ensaio as proteínas truncadas NT+MIF e MIF+CT, pois estudos prévios demonstraram a região N-terminal+MIF4G e a proteína completa EIF4G4 interagem com a proteína EIF4E3 enquanto que a região MIF4G+C-terminal não interage. Como pode ser visto na Figura 17B, as proteínas com a mutação dupla de resíduos vizinhos equivalentes do *LmEIF4G4* (IL25-26AA) impediu a ligação ao *LmEIF4E3*, enquanto que as mutações simples nos resíduos I25A e L26A, bem como o FSL-AAA não foram capazes de interromper a interação analisada.

Figura 17 - Análise da interação entre as proteínas recombinantes mutantes GST-*LmEIF4G4* com a proteína radioativa ³⁵S-*LmEIF4E3*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As diferentes proteínas recombinantes *LmEIF4G4* fusionadas à GST foram imobilizadas na resina Glutationa Sefarose 4B e incubadas com a proteína ³⁵S-*LmEIF4E3*. **Figura 17A.** Representa o *input* da tradução original juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie. **Figura 17B.** Representa a autoradiografia mostrando que a mutação de resíduos equivalentes do *LmEIF4G4* (IL25-26AA) impediu a ligação ao parceiro *LmEIF4E3* (seta vermelha).

É importante ressaltar que os resultados obtidos e descritos para as interações EIF4G3/EIF4E4 e EIF4E3/EIF4E4 foram importantes para definir os motivos de ligação envolvidos entre essas proteínas e foram incluídos no manuscrito intitulado “*Two trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with two distinct eIF4F complexes*” aceito para a publicação.

6.2 Identificação dos motivos responsáveis pela interação entre a PABP1 e o EIF4E4

Em trabalhos que precederam a realização dessa dissertação, foi realizado o alinhamento no Clustal W da sequência de aminoácidos do segmento N-terminal da proteína EIF4E4 de diferentes espécies de tripanossomatídeos. Este alinhamento levou a identificação de três motivos distintos conservados que foram denominadas Boxes A, B e C (Figuras 18 e 19). Em um primeiro momento postulou-se que os aminoácidos encontrados nestes motivos poderiam estar envolvidos na ligação do EIF4E4 com novos parceiros e possivelmente com a PABP1, tendo em vista que a região N-terminal do EIF4E4 foi identificada como possível domínio de ligação desta proteína (ZINOVIEV *et al.*, 2011).

Para investigar os motivos de ligação na interação PABP1/EIF4E4, os EIF4E4 selvagem e/ou mutantes foram sintetizados marcados com ^{35}S . Ao mesmo tempo, diferentes proteínas PABP1 (selvagem e mutantes) foram expressas fusionadas a GST e em seguida testadas quanto a sua capacidade de se ligar às construções do EIF4E4 marcado radioativamente. Neste tópico, a região C-terminal da PABP1, já relacionada à ligação com a proteína EIF4E4 (conforme descrito na introdução dessa dissertação), foi avaliada através de mutantes direcionados ao domínio PABC da proteína e como controle foram utilizados mutantes direcionados a sua região N-terminal. Em seguida, a região N-terminal do EIF4E4, contendo mutações em aminoácidos presentes nos motivos denominados Boxes foi avaliada em relação à interação com a PABP1. Por fim, foi avaliado o efeito de uma mutação direcionada ao resíduo de triptofano responsável pela ligação ao EIF4G3 tanto na interação EIF4G3/EIF4E4 como também na PABP1/EIF4E4.

Figura 18 - Análise comparativa da região N-terminal do EIF4E4 de diferentes tripanossomatídeos

L1EIF4E4	1	MSTPLDVRAA	EYSP	SFAVTM	KKTA	AAAPPR	LPA-PAKSKI	SVTRTGVNTT	YMP	PPPPPM	PEKNYAPFFA	AGCQTFAASK	
LmEIF4E4	1	MSTPLDVRAA	EYSP	SFAVTM	KKTVA	AAAPPK	SPA-PAKSKI	SVTRTGVNTT	YMP	PPPP--M	PEKNYAPFFA	EGCQTIAASK	
LmxEIF4E4	1	MSTPLDVRAA	EYSP	SFAVTV	KRTVA	AAVPPK	SPA-PAKSKI	SVTRTGINTT	YMP	PPPPM	PEKNYTPFFA	AGCQTFAASK	
LbEIF4E4	1	MSTPLDVRAA	EYSP	SFAITM	KKALAA	AAAPPK	SLA-PAKPKI	SVTCTGVNTT	YMP	PPPP-L	HAKNDLLSPA	PAYLTPAASK	
LtEIF4E4	1	MTTPLDVRAA	EYSP	SFAVSM	KKTLTT	APPK	SPT-PAKSKI	SVTRTGANTT	YMP	PPPP-M	PEKNYTHLFA	AGCQPPVCK	
CeEIF4E4	1	MTT-LKADAS	DYMTPLMKK	KAAPSP	PAPA	EPQ-PVK	PTP	PPFHP-APTA	SP	QAPPPPTA	TKSKI	SVTRT SANTTSPMPS	
TcEIF4E4	1	MSSVLKADV	EYIPSWANKR	SSGVN	PAATS	-----	-----	-TNKNGPATS	-----	-V	PTSNVMTTHS	G--CTG--IN	
TbEIF4E4	1	MONLRADAV	EYTPSWQ-KR	SSAVAVTAPT	PTTLPARATL	PTPKTGPTTS	-----	-----	-M	TSTNTITTHS	G--PSAQATT		
BOX A													
L1EIF4E4	80	AWMPPLQPAS	PLPPMHSAPP	TASVVSNSIP	PSSPATAPGE	RSPA	VAARSV	PTRFSPATVP	RHM	MNP	NATE	FMPGRRNGPD	
LmEIF4E4	77	ASMPFYQPAS	PLPPMHSAPP	TASVVSNSIP	PSSPATAPGE	RSPA	VAARSV	PTRFSPATVP	RHM	MNP	NATE	FMPGRRNGPD	
LmxEIF4E4	79	APMPALQPGS	QPPPMHSAPP	TVSVGSNSIP	PSSPATAPGE	RSPA	VAARSV	PTRFSPATVP	RHM	MNP	NATE	FMPGRRNGPD	
LbEIF4E4	79	APAPFYQPAP	QLPPMHSAPP	TAPTVSNSLIP	PRSPATAPGE	RSPA	VAARSV	PTRFSPATVP	R-	HMNP	NATE	FVPGRRNGPV	
LtEIF4E4	79	APMPFYQPVS	QLPPMHSASP	TVSVVSNSIP	PRSPALAPGE	RSPA	VAARSV	PTRFSPATVP	RHM	MNP	NATE	FVPGRRNGPD	
CeEIF4E4	78	SQMSPAHPPP	PSPGAERTAH	TSMP----	YP	PPSPASMAAE	RSPA	VAARSH	PARMS	PFVAP	RVHMNP	NAMD FVPGRRNTAD	
TcEIF4E4	78	QONFTSSPR-	----AAAGLP	LCSP----	----	TTALRLPTR	MSP	HAP--	----	PPSV	SIS	MNP	NATD FVF--HLTGA
TbEIF4E4	68	PQSPSCPPQG	QQQQTVVPPP	TRSP----	----	VSTHVLPTR	MSP	VHA--	----	PSA	APHM	SP	NAVS YVF--RGAAA
BOX B													
L1EIF4E4	160	GCLEALPTST	ADMELAKTPA	GAAAAAVHAP	--SLPGAARR	SLQNSPIIQP	SRLS-----	----	AKSASE	IEAI	SKNSAL		
LmEIF4E4	157	GCLEALPTST	ADMELAKTPA	GAAAAAVHAP	--SLPGAARR	SLQNSPIIQP	SRLS-----	----	VKSASE	IEAI	SKNSAL		
LmxEIF4E4	159	GCLEALPTST	ADMELAKTPA	GAAAAAVHAS	--ALPGAARR	SLHNSPIIQP	SRLN-----	----	VKSASE	IEAI	SKNSAL		
LbEIF4E4	158	GCLEALPTST	ADMELAKAPP	---ATAGYAP	--SPAGAARR	SLHSSPIIQP	SRLS-----	----	VKSASE	IEAI	SKNSAL		
LtEIF4E4	159	GCLEALPTST	ADMELAKTPA	GAAAAADHAP	--SLSGAARR	SLHNSPIIQP	SRLS-----	----	VKSASE	IEAI	SKNSAL		
CeEIF4E4	154	GCLEALPTST	ADMELTKSST	TNAAAAAVAG	KLTTPAVLRR	SVQNSPIIQP	ARLE-----	----	AKSAKE	IEAI	SKNSAL		
TcEIF4E4	114	NSLAPLPTST	ADLAEEKERQ	QKQESHLS	SS MKWTTTSTRK	NITQPALPLA	VKANFTTFA	PIYVEKTEE	IEAI	SKNSAL			
TbEIF4E4	128	GSLMPLPTST	ADLAVEKELQ	RKQQSGSPST	SSWVTTCTKS	NGVRSATSPV	PRAGSTPIVA	BISVDKTDRE	VLEI	SRCS	SL		
Core eIF4E													
L1EIF4E4	228	NAAAAAYVFQ	RTLARVVLTQ	PSPLALAPSE	DP	AKDN	IEMM	267					
LmEIF4E4	225	NAAAAAYVFQ	RTLARVVLTQ	PSPLALAPSE	DP	AKKN	IEMM	264					
LmxEIF4E4	227	NAAAAAYVFQ	RTLARVVLTQ	PSPLALAPSE	DP	AKDN	IEMM	266					
LbEIF4E4	223	NAAAAAYVFQ	RTLARVVLAQ	PSPLALAPSE	DP	VKDN	IEMM	262					
LtEIF4E4	227	NAAAVAYVFQ	RTLARVVLTQ	PSPLVLPSE	DP	AKDN	IEMM	266					
CeEIF4E4	224	HVGAAAYVFQ	RTLARVVLVK	PSPLTLIPSE	DPE	KDN	IEMM	263					
TcEIF4E4	194	KVGAAAFVPR	RTLNRVMIAK	PSPFSLTPAT	G-----	EMT	237						
TbEIF4E4	208	KASAPAFLEP	RTLNRNMTK	PSPFLLTPDS	G-----	DMR	241						
BOX C													

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os três motivos distintos encontrados ao longo da sequência estão indicados (caixas A, B e C) e as setas indicam os resíduos de aminoácidos conservados que foram mutados nesses motivos conservados.

Figura 19 - Sequências de aminoácidos conservadas na região dos Boxes do EIF4E4

BOX A	LDVRAAEYSP
BOX B	MNPNAEEFMP
BOX C	LNAAAAAYVP

Fonte: Elaborado pelo autor.

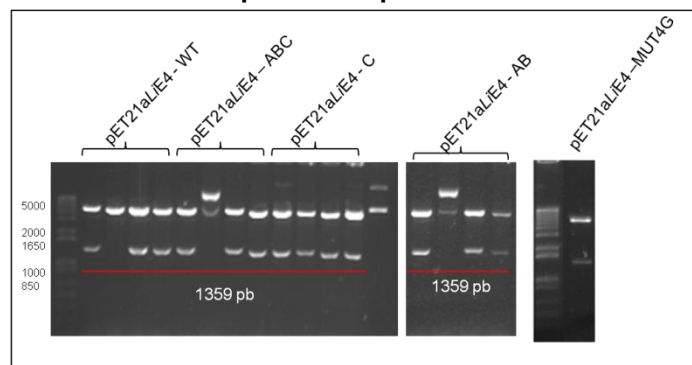
Nota: A sequência de aminoácidos dos três BOX (A, B e C) distintos encontrados ao longo da sequência da região N-terminal do EIF4E4. Os aminoácidos mutados estão destacados nos quadros pretos.

6.2.1 Produção das proteínas EIF4E4 selvagem e mutantes marcadas radioativamente

Os genes codificando o EIF4E4 de *L. infantum* (*LiEIF4E4*) selvagem e seus mutantes nos motivos Boxes (ABC, AB e C) e no possível sítio de ligação ao EIF4G3, nomeada MUT4G, clonados no vetor pGEMT-*Easy* já se encontravam disponíveis no laboratório. Entretanto para os ensaios de interação proteína-proteína foi necessária a sua subclonagem no vetor de expressão pET21a, utilizado para os experimentos de transcrição e tradução *in vitro* e produção das respectivas proteínas marcadas radioativamente. Para essas subclonagens, tanto o plasmídeo pET21a quanto as construções no pGEMT-*easy* foram digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, em seguida os fragmentos liberados (1359 pb) foram purificados para serem ligados ao vetor pET21a (5441 pb).

Com plasmídeo e insertos disponíveis, foi feita ligação, transformação e a partir dos clones selecionados foi realizada a extração do DNA plasmidial (minipreparações) das construções. Foi possível a confirmação das clonagens através da digestão das construções utilizando as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, com a liberação dos fragmentos nos tamanhos esperados de 1359 pb para o *LiEIF4E4* (Figura 20). As construções foram analisadas e confirmadas quanto a sua integridade por sequenciamento de DNA.

Figura 20 - Confirmação da subclonagem dos genes selvagens e mutantes do *LiEIF4E4* no plasmídeo pET21a

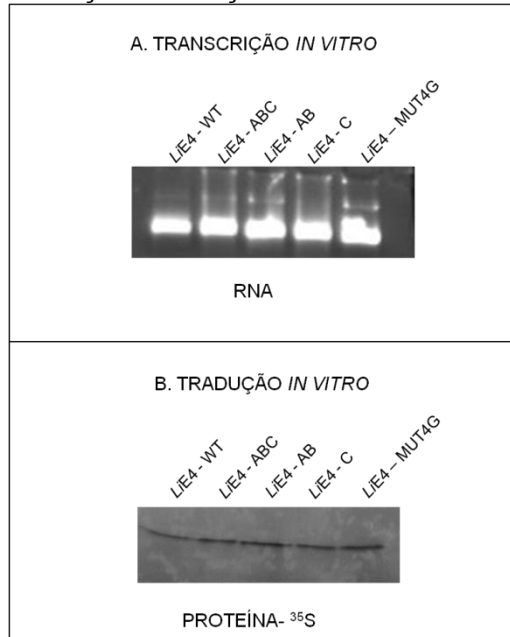


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Gel de agarose após eletroforese dos fragmentos de DNA resultantes da reação de subclonagem. Digestão enzimática das minipreparações com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III verificando a liberação do fragmento no tamanho esperado de 1359 pb para o gene EIF4E4 (linha vermelha) e 5441 pb, para o vetor plasmidial pET21a. O tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular estão mostrados a esquerda.

Em seguida, os genes mutantes e selvagem dos *L*EIF4E4 (Boxes ABC, AB, C e MUT4G) também foram transcritos para obtenção de proteínas radioativas por *tradução in vitro* e posterior análise de interação com a proteína *Li*PABP1 (Figura 21A e 21B).

Figura 21 - Transcrição e tradução *in vitro* de mutantes do *Li*EIF4E4



Fonte: Elaborado pelo autor.

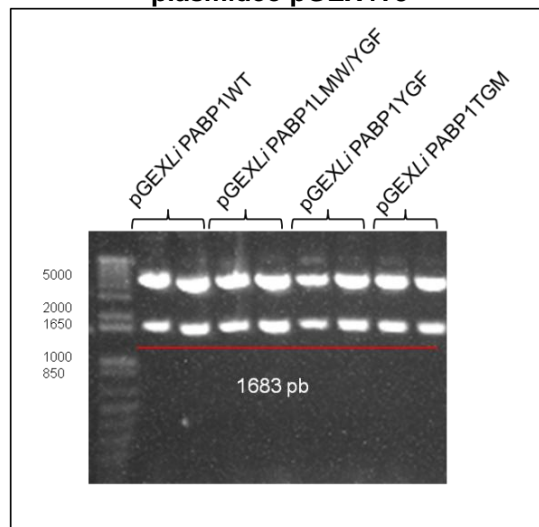
Nota: Figura 21A. Gel de agarose após eletroforese dos mRNAs provenientes da reação de transcrição *in vitro* dos genes do *Li*EIF4E4 selvagem e contendo mutações nos Boxes ABC, AB e C, além do mutante MUT4G, no plasmídeo pET21a. **Figura 21B.** Expressão dos mutantes das proteínas *Li*EIF4E4 que foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15%, submetidas a filme autoradiográfico que revela a presença de proteínas radioativas.

6.2.2 Expressão e purificação das proteínas PABP1 selvagem e mutantes fusionadas a GST

Nesta etapa, os genes codificando a PABP1 selvagem de *L. infantum* (*Li*PABP1), bem como os genes contendo mutações nas regiões dos RRM's da PABP1 (LMW/YGF e YGF) e no domínio PABC (TGM) também já se encontravam disponíveis no laboratório, porém clonados no vetor de clonagem pGEMT-*Easy*. Para a expressão das respectivas proteínas em *E. coli* fez-se necessário inicialmente a sua subclonagem no vetor de expressão pGEX4T3. Para isso, tanto o

plasmídeo pGEX4T3 quanto as construções no pGEMT-easy foram digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, em seguida os fragmentos liberados (1683 pb) foram purificados para serem ligados ao vetor (4968 pb). A subclonagem dos genes no vetor e a sua confirmação (Figura 22) foi realizada como descrito no tópico anterior.

Figura 22 - Confirmação da subclonagem dos genes selvagem e mutantes do *L*PABP1 no plasmídeo pGEX4T3

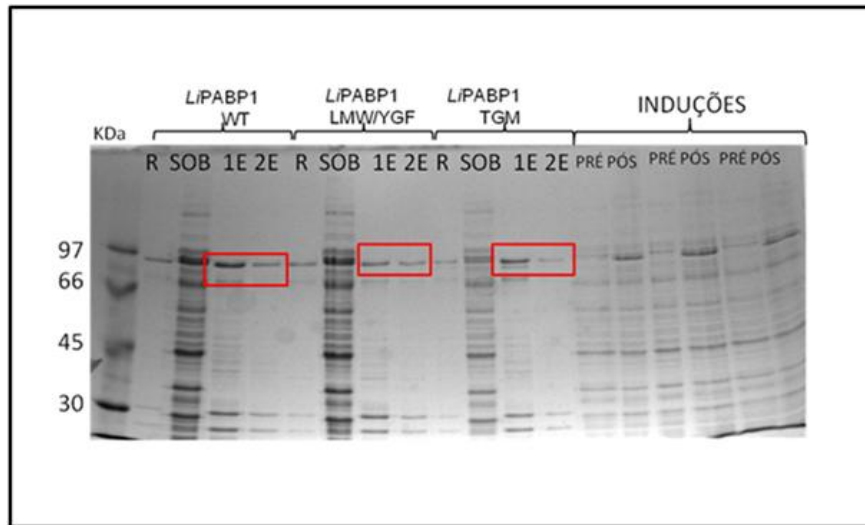


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Gel de agarose após eletroforese dos fragmentos de DNA resultantes da reação de subclonagem. Digestão enzimática das minipreparações com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III verificando a liberação do fragmento no tamanho esperado de 1683 pb para o gene da PABP1 (linha vermelha) e o vetor pGEX4T3 no tamanho de 4968 pb. O tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular estão mostrados a esquerda.

Após a confirmação das subclonagens, as construções obtidas da PABP1 (*L*PABP1WT ou selvagem, *L*PABP1LMW/YGF e *L*PABP1TGM) foram também utilizadas para a indução e purificação de proteínas recombinantes fusionadas a GST e análise por meio de migração em gel SDS-PAGE (Figura 23).

Figura 23 - Expressão e purificação da proteína *L*PABP1 selvagem (WT) e seus mutantes fusionados a GST



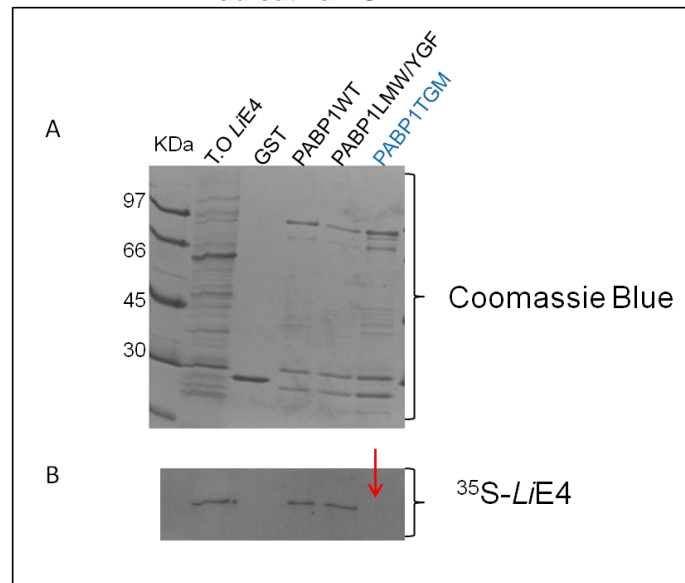
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Gel SDS-PAGE corado com azul de Coomassie mostrando a purificação das proteínas fusionadas a GST. As amostras das duas eluições estão indicadas nos quadros vermelhos. Para a indução das proteínas foi adicionado às culturas bacterianas IPTG (pós-IPTG) e como controle, foram crescidas culturas nas mesmas condições sem adição de IPTG (pré-IPTG). O tamanho das proteínas foi de aproximadamente 92 kDa. O tamanho dos marcadores de peso molecular estão expressos em kilodaltons (kDa) a esquerda.

6.2.3 Análise da interação entre mutantes da PABP1 e o homólogo EIF4E4 de *L. infantum*

Trabalhos prévios demonstraram interação entre EIF4E4 e a PABP1 nos tripanossomatídeos. Com o intuito de identificar qual o motivo da PABP1 envolvido na ligação ao EIF4E4, foi realizado o ensaio de *pull-down*, no qual as proteínas da *L*PABP1, fusionadas a GST (*L*PABP1WT, *L*PABP1LMW/YGF e *L*PABP1TGM) foram imobilizadas na resina Glutathiona Sefarose 4B e em seguida incubadas com a proteína *L*EIF4E4 selvagem marcada com ^{35}S (Figura 24A). Como pode ser visto na Figura 24B, a proteína mutante *L*PABP1TGM não consegue interagir com a proteína *L*EIF4E4.

Figura 24 - Análise da interação entre proteína a proteína GST-*L*PABP1 com a proteína radioativa ³⁵S-*L*EIF4E4



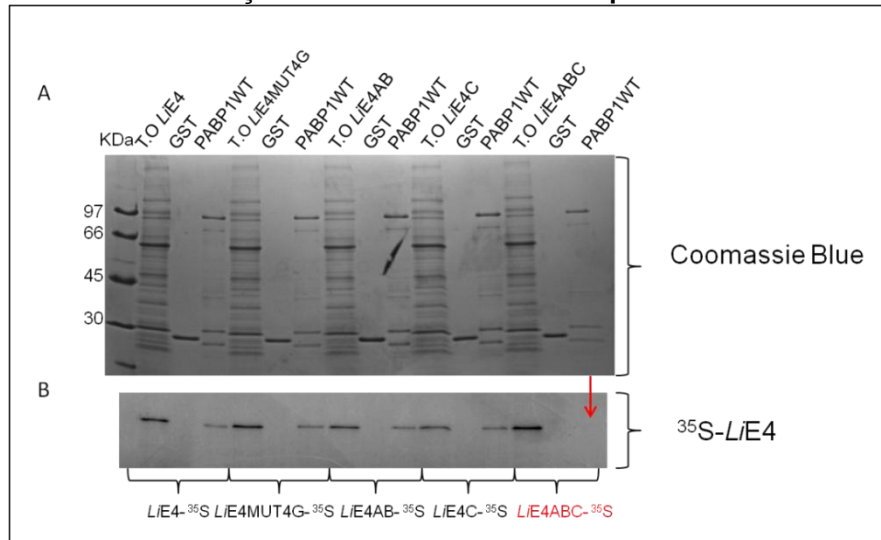
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As diferentes proteínas recombinantes *L*PABP1 fusionadas à GST (*L*PABP1WT, *L*PABP1LMW/YGF e *L*PABP1TGM), foram imobilizadas na resina Glutaciona Sefarose 4B e incubadas com a proteína *L*EIF4E4 marcada radioativamente. **Figura 24A.** Representa as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e corado com azul de Coomassie. **Figura 24B.** Representa a autoradiografia mostrando que a mutação TGM-AAA localizada na região C-terminal da proteína *L*PABP1 remove a ligação ao parceiro *L*EIF4E4 (seta vermelha).

6.2.4 Análise reversa da interação entre os mutantes do EIF4E4 e o homólogo PABP1 de *L.infantum*

Sabendo-se então em qual região da PABP1 se liga o EIF4E4, foram realizados ensaios de interação para mapear em que região do EIF4E4 estaria ligando-se a PABP1. Com esse intuito, a proteína recombinante *L*PABP1 fusionada a GST foi imobilizada na resina Glutaciona Sefarose 4B e em seguida incubada com mutantes da proteína EIF4E4 marcada com ³⁵S (*L*EIF4E4 selvagem e mutantes MUT4G, AB, C, ABC) (Figura 25A). Como pode ser visto na Figura 25B, a proteína *L*EIF4E4 contendo mutação nos três Boxes envolvidos na interação, aboliu a ligação a proteína *L*PABP1.

Figura 25 - Análise da interação entre a *Li*PABP1 com as proteínas mutantes do *Li*EIF4E4



Fonte: Elaborado pelo autor.

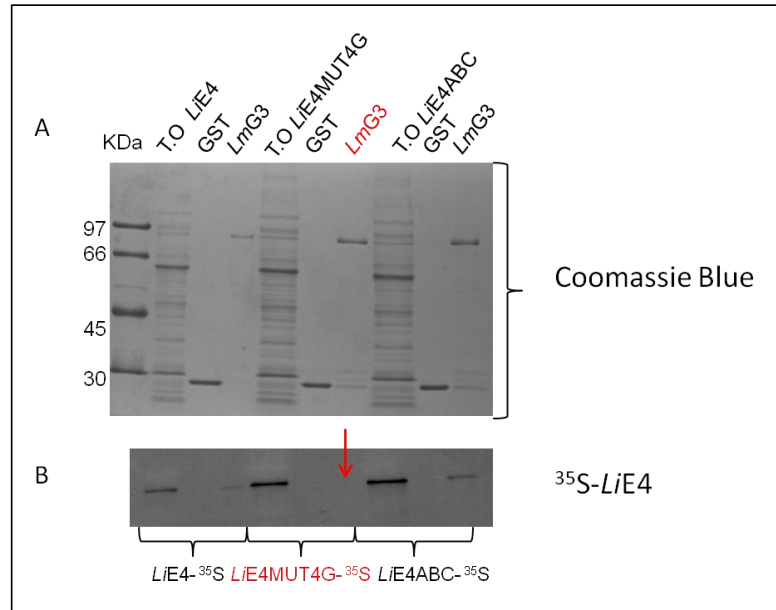
Nota: A proteína recombinante *Li*PABP1WT fusionada à GST foi imobilizada na resina Glutathiona Sefarose 4B e incubada com a proteína *Li*EIF4E4 selvagem (WT) e mutantes (MUT4G, 4AB, C, ABC) marcadas radioativamente. **Figura 25A.** Representa *input* das traduções originais juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e corado com azul de Coomassie. **Figura 25B.** Representa a autoradiografia mostrando que a mutação envolvendo os Boxes ABC do *Li*EIF4E4 (em vermelho) aboliu a ligação a proteína parceira *Li*PABP1 (seta vermelha).

6.2.5 Análise da interação entre o mutante no sítio de ligação ao 4G (W305A) do *Li*EIF4E4 e o homólogo *Lm*EIF4G3

Estudos prévios de bioinformática mostraram que o triptofano na posição 305 na sequência do EIF4E4 é um aminoácido conservado e um provável sítio de ligação ao EIF4G3. Com base nessa informação, foi inicialmente realizado o ensaio de *pull-down* com o intuito de confirmar o sítio de ligação do EIF4G3 nessa posição do EIF4E4. No presente trabalho a proteína *Li*EIF4E4 contendo a mutação W305A foi nomeada de MUT4G e a subclonagem do respectivo gene mutante bem como sua produção marcada radioativamente já foi descrita nos itens anteriores. Para avaliar o efeito dessa mutação na ligação do EIF4E4 ao EIF4G3 a proteína recombinante EIF4G3 de *L. major* (*Lm*EIF4G3) fusionada a GST foi imobilizada na resina Glutathiona Sefarose 4B e em seguida incubada com a proteína *Li*EIF4E4 selvagem (WT) e mutantes selecionados marcados com ^{35}S . Além do próprio mutante MUT4G o ensaio avaliou ainda o efeito do mutante ABC, que não liga a PABP1, na sua capacidade de ligação ao EIF4G3. Como pode ser visto na Figura 26, a proteína MUT4G contendo a mutação W305A não foi capaz de se ligar a

proteína *LmEIF4G3* embora a mesma proteína tenha mantido a sua capacidade de ligação a PABP1, como mostrado na Figura anterior. Já o mutante ABC, bem como a proteína selvagem, foi capaz de se ligar com eficiência ao homólogo do eIF4G3, confirmando que a mutação tripla nos Boxes ABC não altera o dobramento da proteína e o efeito que abole a sua ligação a PABP1 é específico.

Figura 26 - Análise da interação entre a proteína *LmEIF4G3* com o *LiEIF4E4* mutante



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: A proteína recombinante *LmEIF4G3* fusionada à GST foi imobilizada na resina Glutathione Sefarose 4B e incubada com a proteína *LiEIF4E4* selvagem (WT) e mutantes selecionados (MUT4G e ABC) marcados com ^{35}S . **Figura 26A.** Representa *input* das traduções originais juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e corado com azul de Coomassie. **Figura 26B.** Representa a autoradiografia mostrando que a mutação W305A no MUT4G (seta vermelha) aboliu a ligação ao homólogo *LmEIF4G3* (seta vermelha) mas que a mutação tripla ABC não interferiu nesta ligação.

6.3 Confirmação da interação entre o EIF4E3 e homólogos de PABP e definição dos motivos responsáveis por essa interação

A presença de regiões N-terminais não observadas em outros homólogos de eIF4E, bem como sua capacidade de interagir com homólogos de eIF4G relacionados, são propriedades que indicam modos de ação semelhantes para os EIF4E3 e EIF4E4 de tripanossomatídeos. Até o momento contudo, não está claro para o EIF4E3, ao contrário do EIF4E4, sua interação com homólogos de PABP *in vivo*. Neste trabalho, de forma comparativa com o que foi realizado com o EIF4E4,

partiu se então para avaliar a possibilidade de interação do EIF4E3 de *Leishmania* com homólogos de PABP *in vitro*. Dados preliminares de alinhamento múltiplo da região N-terminal do EIF4E3 de diferentes espécies já haviam identificados também três motivos distintos conservados (A, B e C), equivalentes aos motivos denominados de Boxes encontrados no EIF4E4 (Figura 27). Mutantes dirigidos a estes motivos já haviam sido produzidos dirigidos a proteína de *L. amazonensis* (LaEIF4E3) e neste trabalho investigou-se sua interação com a PABP2 de *Leishmania* tendo em vista que dados não publicados sugerem uma possível interação preferencial *in vivo* do EIF4E3 com esta proteína, em lugar da PABP1.

Figura 27 - Análise comparativa do EIF4E3 de *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*

	Box A ↓	11	28	33...36	Box B ↓↓	54
LaEIF4E3	MNPSAAAYIP	PKSDAKGEPKSSAAAVAKPPSIQLATP	LSAAAEFFVE	GGPKQMSATSTH		
LiEIF4E3	MNPSAAAYIP	PKSDAKGEPKSSAAAVVKPPSTQLVTP	LSAAAEFFVE	GGPKQASATSTH		
LmEIF4E3	MNPSAAAYIP	PKSDAKGDPKSSAAAVAKPPSTQPAATP	LSAAAEFFVE	GGPKQMSATSTH		
	65 66	74 75	78	87	97 99	103
LaEIF4E3	VDPKTATEDGKTT	VSPLETERPASSLP	NSAAAAGAAKREADENE	DSQLDWLPEA	PTDWSE	
LiEIF4E3	VDPKATTEDEGKTT	TAPPLMERPASSLP	SAAAAGAAKKEADENE	DSQLDWLPEA	PTDWSE	
LmEIF4E3	VDPKATTEDEKTT	TAPLLMECPASSLP	SAAAAGAAKKEADENE	DSQLDWLPEA	PTDWSE	
				160	163	
LaEIF4E3	SKLPKLF	GCNTAAKATSSA	IPLHASWDLYAD	HQGSNTASHSSPT	STMSFEPI	FVSNV
LiEIF4E3	SKLPKLF	GCNTAAKATSSA	IPLHASWDLYAD	HQGSNMANSSPT	STMSFEPI	FVSNV
LmEIF4E3	SKLPKLF	GCNTAAKATSSA	IPLHASWDLYAD	HQGSNMANSSPT	STMSFEPI	FVSNV
		198	210			
LaEIF4E3	GDVESFWRLWRYL	PAPSGLP	TVYTYSWFRKDIKPEWEHPRNKKGGT	ISIVV	FDRDRSGLS	
LiEIF4E3	GDVESFWRLWRYL	PAPSALP	TVYTYSWFRKDIKPEWEHPRNKKGGT	ISIVV	FDRDRSGLS	
LmEIF4E3	GDVESFWRLWRYL	PAPSALP	TVYTYSWFRKDIKPEWEHPRNKKGGT	ISIVV	FDRDRSGLS	
LaEIF4E3	DKQVLDDVFMAM	LVGAVGESFHEC	STTLNGIMLKVRSNKP	VTLQLWTAHSEV	GKLFKAFAN	
LiEIF4E3	DKQVLDDVFMAM	LVGAVGESFHEC	STTLNGIMLKVRSNKP	VTLQLWTAHSEV	GKLFKAFAN	
LmEIF4E3	DKQVLDDVFMAM	LVGAVGESFHEC	STTLNGIMLKVRSNKP	VTLQLWTAHSEV	GKLFKAFAN	
		310	314			
LaEIF4E3	SVRDTLSKI	IGAKALQKLEYYSHHQQAATNS	LAARMKGKTKI	SPDHTF		
LiEIF4E3	SVRDTLSKI	MGAKTLQKLEYYSHHQQAATNS	LAARMKGKTKI	SPDHTF		
LmEIF4E3	SVRDTLTKI	MGAKTLQKLEYYSHHQQAATNS	LAARMKGKTKI	SPDHTF		

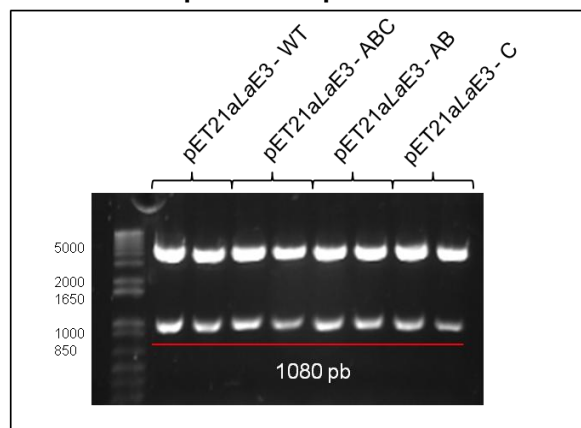
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Os três motivos distintos encontrados ao longo da sequência estão indicados (caixas A, B e C). As setas indicam os resíduos de aminoácidos conservados que foram mutados.

6.3.1 Produção das proteínas EIF4E3 selvagem e mutantes marcadas radioativamente

Quando do início do presente trabalho, os genes do homólogo EIF4E3 de *L. amazonensis* (*LaEIF4E3*) selvagem e contendo mutações direcionadas ao motivos denominados Boxes (ABC, AB e C), já estavam disponíveis no laboratório inseridos no vetor pGEMT-easy. Da mesma forma que para as construções com o EIF4E4, para sua utilização nos ensaios de interação proteína-proteína, foi necessário sua subclonagem no vetor de expressão pET21a. Para isso, tanto o plasmídeo pET21a quanto as construções no pGEMT-easy foram digeridas com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, em seguida os fragmentos liberados (1080 pb) foram purificados para serem ligados ao vetor pET21a (5441 pb). Após as etapas de subclonagem, foi realizada a extração do DNA plasmidial dos clones selecionados e confirmação destas através da digestão das construções utilizando as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, com a liberação dos fragmentos no tamanho esperado de 1080 pb (Figura 28). As construções foram analisadas e confirmadas quanto a sua integridade por sequenciamento de DNA.

Figura 28 - Confirmação da clonagem dos genes selvagens e mutantes do *LaEIF4E3* no plasmídeo pET21a

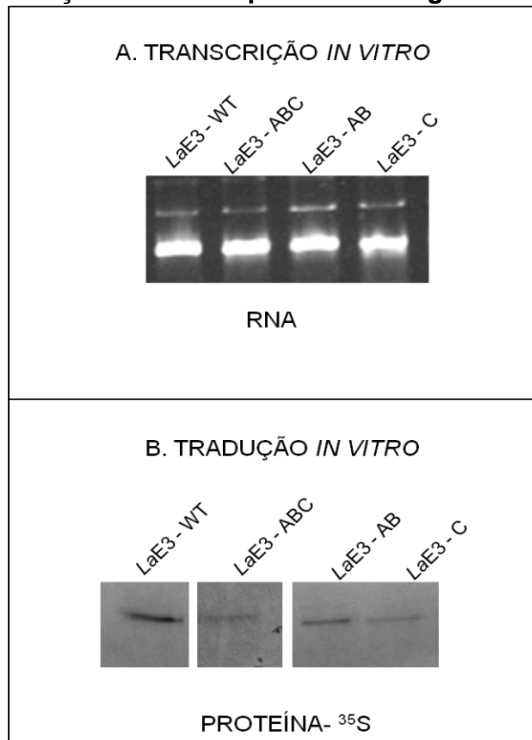


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Gel de agarose após eletroforese dos fragmentos de DNA resultantes da reação de subclonagem. Digestão enzimática das minipreparações com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III verificando a liberação do fragmento no tamanho esperado de 1080 pb para o gene *EIF4E3* (linha vermelha) e 5441 pb, para o vetor plasmidial pET21a. O tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular estão mostrados a esquerda.

Dando prosseguimento, também foram transcritos os genes mutantes e selvagem do homólogo *LaEIF4E3* (Boxes ABC, AB e C) para obtenção de proteínas radioativas por transcrição e tradução *in vitro* e posterior análise de interação com a proteína recombinante PABP2 de *Leishmania major* (Figura 29A e 29B).

Figura 29 - Transcrição e tradução *in vitro* da proteína selvagem e mutantes do *LaEIF4E3*



Fonte: Elaborado pelo autor.

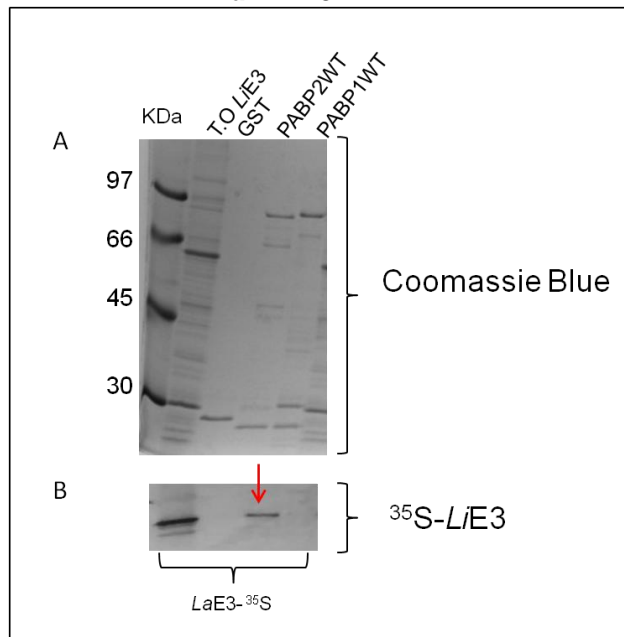
Nota: Figura 29A. Gel de agarose após eletroforese dos mRNAs provenientes da reação de transcrição *in vitro* dos genes do *LaEIF4E3* selvagem e contendo mutações nos Boxes ABC, AB e C, no plasmídeo pET21a. **Figura 29B.** Expressão dos mutantes das proteínas *LaEIF4E3* que foram fracionadas em gel SDS-PAGE, submetidas a filme autoradiográfico que revela a presença de proteínas radioativas.

6.3.2 Avaliação da interação entre os fatores EIF4E3 com os homólogos PABP1 e PABP2

Trabalhos recentes não publicados do grupo sugerem que a PABP2 pode está se ligando ao homólogo EIF4E3 e participando de um complexo do tipo EIF4F em *Trypanosoma Brucei*. Com o intuito de verificar se essa interação ocorre de maneira similar em *Leishmania*, foi realizado o ensaio de interação *in vitro*. Para isso a proteína recombinante PABP2 fusionada a GST foi imobilizada na resina

Glutathiona Sefarose 4B e em seguida incubada com a proteína EIF4E3 marcadas com ^{35}S nas condições previamente descritas. Além da interação do EIF4E3 com PABP2, também foi testada a interação do mesmo com a PABP1. Como pode ser visto na Figura 30, há uma interação forte entre o fator de iniciação da tradução EIF4E3 e a PABP2, enquanto que a interação com PABP1 praticamente não é visualizada.

Figura 30 - Análise da interação entre as proteínas *Lm*PABP2 e *Li*PABP1 com a proteína *La*EIF4E3



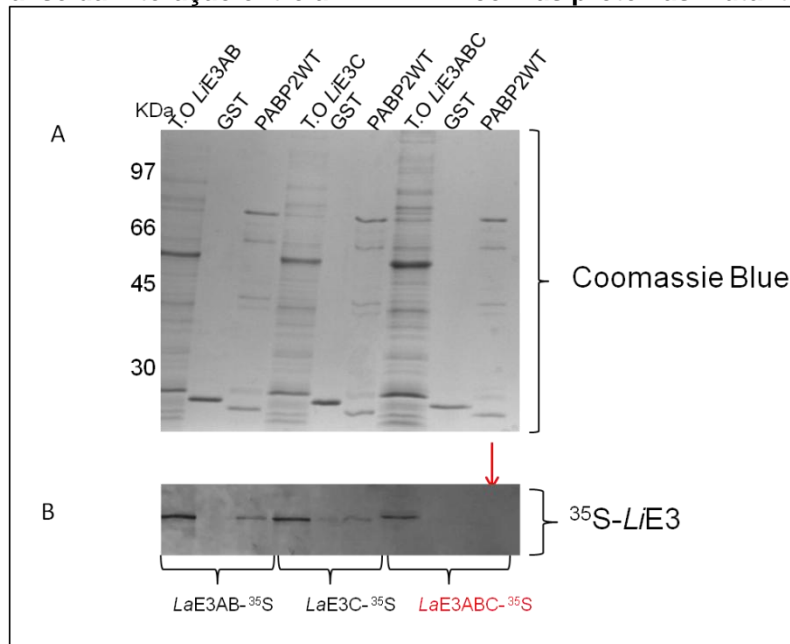
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As proteínas recombinantes *Lm*PABP2 e *Li*PABP1 fusionadas à GST foram imobilizadas na resina Glutathiona Sefarose 4B e incubadas com o *La*EIF4E3 marcada radioativamente. **Figura 30A.** Representa *input* da tradução original juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e corado com azul de Coomassie. **Figura 30B.** Representa a autoradiografia mostrando que o homólogo *Lm*PABP2 é capaz de interagir fortemente *in vitro* com o *La*EIF4E3 (seta vermelha) enquanto que na PABP1 quase não é possível observar o sinal.

6.3.3 Análise da interação entre os mutantes do *LaEIF4E3* e do homólogo *LmPABP2*

Baseado no resultado de interação anterior, onde foi visto que o homólogo EIF4E3 tem capacidade de ligação a PABP2, foi realizado o ensaio de *pull-down* com o intuito de avaliar o sítio de ligação nessa interação. Para isso a proteína recombinante PABP2 fusionada a GST foi imobilizada na resina Glutathiona Sefarose 4B e em seguida incubada com as construções do EIF4E3 marcadas com ^{35}S (*LaEIF4E3* - AB, C e ABC) nas condições previamente descritas. Como pode ser visto na Figura 31B, a mutação nos três Boxes previamente identificados levou a eliminação desta interação.

Figura 31 - Análise da interação entre a *LmPABP2* com as proteínas mutantes do *LaEIF4E3*



Fonte: Elaborado pelo autor.

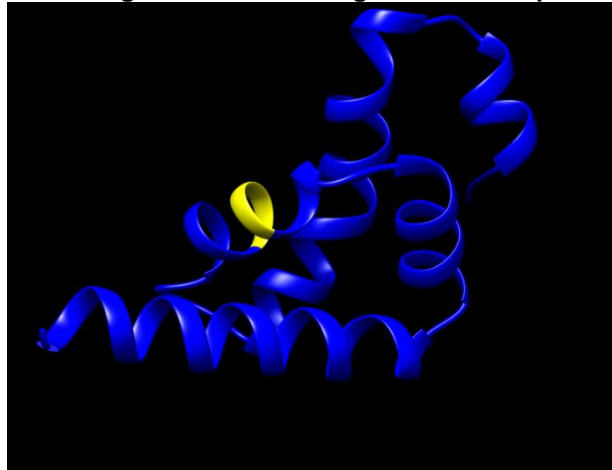
Nota: A proteína recombinante *LmPABP2* fusionada à GST foi imobilizada na resina Glutathiona Sefarose 4B e incubada com os mutantes do *LaEIF4E3* (AB, C e ABC) marcadas radioativamente.

Figura 31A. Representa *input* das traduções originais juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE e corado com azul de Coomassie. **Figura 31B.** Representa a autoradiografia mostrando que a mutação envolvendo os Boxes ABC do *LaEIF4E3* (em vermelho) aboliu a ligação.

6.4 Análise e modelagem *in silico* da interação das proteínas PABP1 e EIF4E4

Com base nos resultados obtidos *in vitro* dos ensaios de interação entre proteínas foram realizadas modelagens *in silico* da estrutura da proteína PABP1, utilizando como modelo a estrutura dessa proteína já definida de outros organismos. A primeira modelagem realizada foi da região PABC da PABP1, provável domínio de interação com proteínas, destacando a região da mutação do motivo TGM envolvido na interação com o EIF4E4 (Figura 32).

Figura 32 - Modelagem *in silico* da região PABC da proteína PABP1

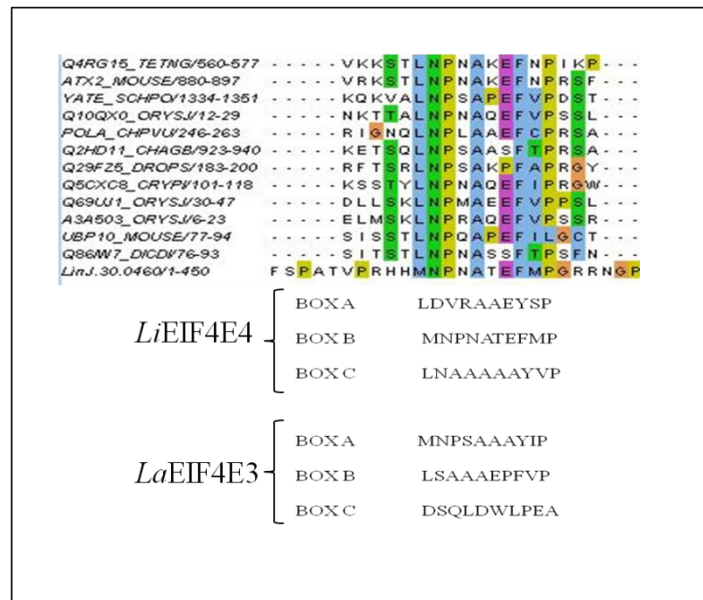


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Modelagem da região PABC da proteína PABP1 (em azul), onde é possível observar na estrutura a existência de alfa hélices. Em uma das alças está destacada a região da mutação dos resíduos TGM (em amarelo).

Além disso, foi realizada uma busca em banco de dados por domínios de diferentes eucariotos que são capazes de interagir com a PABC e foi encontrado um motivo bastante conservado denominado PAM2 (ALBRECHT; LENGAUER, 2004). Ao comparar a sequência desse motivo PAM2 com a sequência dos homólogos EIF4E4 e EIF4E3 de *Leishmania*, observou-se um alto grau de conservação principalmente com a região dos Boxes (Figura 33), sendo um indicativo de que as regiões mapeadas pelos ensaios *in vitro* de fato estão envolvida na interação PABP1/EIF4E4.

Figura 33 - Alinhamento *in silico* de domínios conservados que se ligam a PABC com o EIF4E4

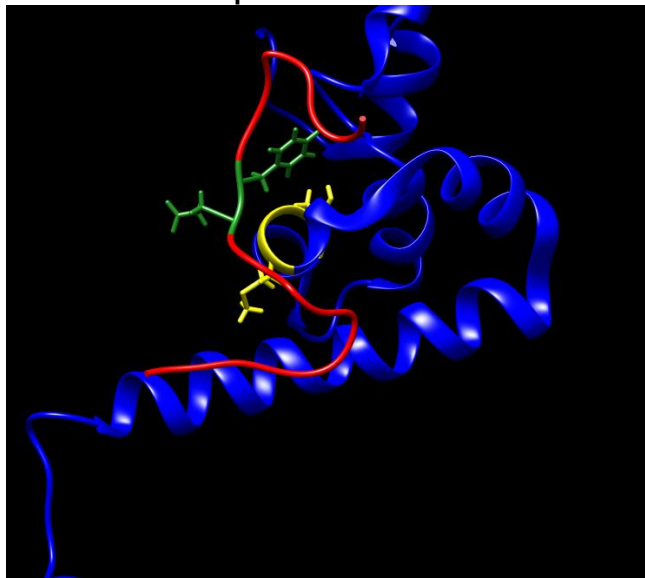


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Alinhamento de sequências do motivo de domínios de diferentes eucariotos capazes de interagir com a região (painel superior), PABC com a sequência do EIF4E4 e EIF4E3 de *Leishmania* (painel inferior). Foi possível observar a conservação da maioria dos aminoácidos localizados nas regiões dos Boxes (destacado em diferentes cores).

A partir dessa informação, foi realizada a modelagem da PABP1 de humano, inserindo o motivo conservado PAM2 previamente encontrado em vermelho, destacando a PABC contendo a mutação TGM em amarelo, além de realçar no domínio PAM2 os mesmos aminoácidos que foram mutados no Box B do EIF4E4 em verde. Ao analisar a estrutura modelada pode-se observar mais detalhadamente que há interação na região estudada (Figura 34).

Figura 34 - Análise e modelagem *in silico* da PABP1, destacando a mutação na PABC e o motivo PAM2 com a sequência conservada no EIF4E4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Modelagem da PABP1 de humano (em azul), destacando o resíduo TGM na PABC (em amarelo), o motivo conservado PAM2 capaz de interagir com a PABC (em vermelho), a região do domínio PAM2 referente aos aminoácidos EF do Box B do EIF4E4 (em verde).

7 DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos caracterizam-se por apresentarem peculiaridades em sua biologia molecular e na regulação de seus genes. Diferentemente dos demais eucariotos, o controle da expressão gênica nesses organismos ocorre pós-transcricionalmente, ou seja, a nível de estabilidade/degradação do mRNA e na iniciação da síntese proteica ou tradução (FERNANDEZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010). Este trabalho teve por objetivo avançar na caracterização de dois complexos do tipo eIF4F/PABP previamente identificados e que possivelmente estão envolvidos não só no processo de iniciação da tradução de uma forma mais global, mas também em etapas associadas ao seu controle. O primeiro destes complexos é o formado pelas subunidades EIF4G3, EIF4E4, EIF4AI e PABP1 e o outro formado pelas subunidades EIF4G4, EIF4E3, EIF4AI e PABP2. Buscou-se identificar quais motivos estariam envolvidos nessas interações previamente conhecidas, a partir de ensaios de interação entre as proteínas.

Em vários organismos foi demonstrado que o eIF4G reconhece o eIF4E através do motivo YXXXXLΦ (RHOADS, 2008) localizado na sua região N-terminal. Estudos mostraram em ensaios de duplo híbrido, que o EIF4G3 liga-se ao EIF4E4 através de sua região N-terminal e que o motivo YPGFSLD seria responsável por essa interação, visto que a mudança do Y, F, ou L por A, individualmente abolem a interação com o EIF4E4 (YOFFE *et al.*, 2009). Neste trabalho, foi visto que as mutações nos resíduos FSL de fato interrompem a interação do EIF4G3 com o EIF4E4 por alterar resíduos de aminoácidos chaves, de acordo com YOFFE *et al.*, 2009. Além disso, apesar do FSL do motivo YPG**F**SLD do EIF4G3 ser conservado no homólogo EIF4G4, foi visto que a mutação nos resíduos FSL do EIF4G4 não afeta a ligação ao parceiro EIF4E3. Uma explicação para isso seria o fato da não conservação do aminoácido Y no motivo mencionado anteriormente, indicando que essa região poderia estar envolvida indiretamente nessa interação (REIS, 2009). Outra possível explicação seria que motivos idênticos podem ser reconhecidos de maneiras diferentes, como é o caso dos motivos de ligação dos dois eIF4Gs de plantas que são diferencialmente reconhecidos pelos fatores eIF4E e eIFiso4E por mecanismos desconhecidos (GALLIE, 2002).

Uma análise detalhada das sequências do alinhamento dos ortólogos do EIF4G de *Leishmania* e *Trypanosoma* revelou um segundo motivo, M/F/YXXXXI/LL, que poderia desempenhar um papel comum nas ligações EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4G3. A mutação dos resíduos IL do *LmEIF4G4* remove a interação com o *LmEIF4E3* (REIS, Tese de doutorado, 2009), entretanto mutações individuais dos aminoácidos I e L separadamente, como observado neste trabalho, não são capazes de remover a ligação específica entre as proteínas analisadas. Por outro lado, a mutação dos resíduos individuais na proteína *LmEIF4G3* I ou R impede sua capacidade de se ligar ao *LmEIF4E4*. As proteínas EIF4G3 e EIF4G4 de *Trypanosoma brucei* contendo mutações, em ambos os resíduos, são incapazes de se ligarem *in vivo* com os seus parceiros confirmando os resultados obtidos por *pull down*, reforçando um modo comum de interação EIF4G/EIF4E entre os dois complexos (MOURA *et al.*, 2015). Sendo assim, as interações de ligação entre EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3, são mediadas por resíduos de aminoácidos posicionados em posições equivalentes em ambos os homólogos eIF4G. Resíduos vizinhos, como aqueles presentes no motivo FSL, comum a ambos os eIF4Gs mas crítico apenas para interação EIF4G3/EIF4E4, pode ter causado uma alteração no dobramento apenas da proteína EIF4G3 alterando sua ligação ao EIF4E4, todavia seria necessário uma melhor caracterização estrutural do mesmo para maiores conclusões.

A interação entre os homólogos de eIF4E e eIF4G, além de exigir motivos presentes na curta extremidade N-terminal dos homólogos de eIF4G que divergem do consenso descrito em outros eucariotos (o motivo YXXXXLΦ), parece também exigir o resíduo de triptofano conservado nos homólogos de eIF4E (equivalente ao W73 de mamíferos) (RHOADS, 2008). Sendo assim, no trabalho atual foram realizados ensaios de interação com a proteína *LmEIF4E4* mutada no resíduo W305A quanto a capacidade de interagir com o EIF4G3 e o resultado demonstrou que houve interrupção da ligação EIF4E4/EIF4G3.

Outra abordagem do trabalho teve como foco determinar em maior detalhes a interação de subunidades do complexo eIF4F com a proteína parceira PABP. A interação entre PABP e outros fatores de iniciação da tradução já está bem caracterizada em diversos organismos (KUHN; WAHLE, 2004). Diferentemente do que ocorre na maioria destes, entretanto, os fatores de iniciação da tradução que

formam o complexo EIF4F e a PABP nos tripanossomatídeos possuem um número elevado de homólogos de expressão simultânea, indicando uma grande complexidade na iniciação da sua síntese protéica. Em trabalhos anteriores realizado pelo grupo, foi possível determinar que *in vivo* apenas a PABP1 é capaz de se ligar ao EIF4G3, enquanto que as outras duas não possuíam capacidade de ligação (DA COSTA LIMA, 2012). Estudos recentes de duplo híbrido sugerem de forma oposta que, ao menos em *Leishmania*, a PABP1 não é capaz de interagir com o EIF4G3, e sim que sua ligação seria indireta através do EIF4E4 (ZINOVIEV *et al.*, 2011).

Sendo assim, foi proposto no trabalho atual mapear a região de ligação entre a PABP1 e o EIF4E4 até então nunca descrito na literatura. A região C-terminal da proteína, denominada PABC, foi selecionada, pois possui um motivo conservado que estaria envolvidos na interação. Ao mutar os resíduos TGM presente nesse motivo conservado da PABP1, houve interrupção na ligação ao EIF4E4. Para uma melhor caracterização dessa interação, foram identificadas três regiões bem conservadas denominadas de Boxes A, B e C na região N-terminal da proteína EIF4E4. Foi visto que ao mutar resíduos de aminoácidos presentes nos três Boxes ABC a interação entre EIF4E4 e PABP1 foi abolida. Dados recentes do grupo não publicados mostraram a capacidade de interação da PABP2 com o EIF4E3 em *T. brucei* a partir de ensaios *in vivo*. No trabalho atual, essa mesma interação foi confirmada *in vitro*. Além disso, foi possível identificar que a ligação ocorre na região dos Boxes ABC do EIF4E3 de maneira equivalente a interação EIF4E4/PABP1.

Em relação à interação PABP1/EIF4E4, os resultados foram confirmados por modelagem molecular das proteínas *in silico*. Ao modelar a PABP1 de humano e de outros eucariotos, observou-se que a região PABC é capaz de interagir com domínios que contém um motivo de ligação comum e conservado (ALBRECHT; LENGAUER, 2004). Verificou-se uma alta conservação deste motivo com a região dos Boxes, confirmando que a interação EIF4E4/PABP1 ocorre diretamente. Sendo assim, podemos afirmar a interação entre EIF4E4 e PABP1 é mais crítica para a função EIF4E4 que a interação com EIF4G3, além de ser essencial e suficiente para a função da proteína na iniciação da tradução em *Leishmania*.

Assim, este trabalho auxiliou na caracterização funcional dos fatores presentes em complexos do tipo eIF4F e PABP: EIF4E3, EIF4E4, EIF4G3, EIF4G4,

PABP1 e PABP2, dando continuidade ao esforço de caracterização das interações necessárias para o processo de síntese protéica nos tripanossomatídeos, identificando e validando novas interações que possam ser avaliadas como alvos para o desenvolvimento de agentes inibidores desse processos. Além disso, as evidências apresentadas destacam os aspectos exclusivos da biologia molecular básica desses microorganismos e como o seu estudo pode ter amplas implicações para a compreensão de processos equivalentes em outros eucariotos.

8 CONCLUSÕES

- a) Para o EIF4G3 as mutações nos resíduos vizinhos (I8A e R9A) afetaram a interação com o EIF4E4, bem como a mutação dos resíduos FSL;
- b) Para o EIF4G4 a mutação simultânea de resíduos equivalentes (IL25-26AA) ao EIF4G3 impediu a ligação ao parceiro EIF4E3;
- c) Foi visto que a mutação W305A no EIF4E4 aboliu a ligação ao EIF4G3;
- d) Na PABP1 a mutação localizada na porção C terminal (TGM-AAA) foi capaz de interromper a ligação ao EIF4E4;
- e) Foram identificados os motivos requeridos para a ligação da PABP1 e PABP2 na região N-terminal dos homólogos EIF4E4 e EIF4E3 respectivamente.

REFERÊNCIAS

AFONINA, E.; STAUBER R.; PAVLAKIS, G. N. The Human Poly(A)-Binding Protein 1 Shuttles Between the Nucleus and the Cytoplasm. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, p. 13015-13021, 1998.

ALBRECHT, M.; LENGAUER T. Survey on the PABC recognition motif PAM2. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v. 316, p. 129–138, 2004.

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

BARHOUMI, M. *et al.* Leishmania infantum LelF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. **FEBS J.**, Oxford, v. 273, p. 5086-5100, 2006.

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.**, London, v. 28, p. 1211-1220, 2000.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

BELLSOLELL, L. *et al.* Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. **Structure**, London, v. 14, n. 5, p. 913-23, 2006.

BLANCHARD, S. C.; COOPERMAN, B. S.; WILSON, D. N. Probing translation with small-molecule inhibitors. **Chem. Biol.**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 633-45, 2010.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect.**, Paris, v. 5, p. 1231-1240, 2003.

Centers of Disease Control and Prevention. Parasites. **Leishmaniasis**. Atlanta, 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> Acesso em: 10 de dez. 2014.

CHANG, T. *et al.* UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. **Genes Dev.**, New York, v. 18, p. 2010-2023, 2004.

CHANG, J. H. et al. Crystal structure of the eIF4A-PDCD4 complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 106, p. 3148-3153, 2009.

CHENG, S.; GALLIE, D. R. Competitive and Noncompetitive Binding of EIF4B, EIF4A, and the Poly(A) Binding Protein to Wheat Translation Initiation Factor EIFiso4G. **Biochemistry**, Washington, v. 49, p. 8251-8265, 2010.

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.**, Baltimore, v. 282, p. 25247-25258, 2007.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression in Trypanosomes and Leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 156, p. 93-101, 2007.

CUNNINGHAM, A. C. *et al.* Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol.**, Orlando, v. 72, p. 132-141, 2002.

DA COSTA LIMA, T. D. C. *et al.* Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryotic cell**, Washington, v. 101, p. 484-94, 2010.

DA COSTA LIMA, T. D. C. **Abordagens moleculares voltadas a caracterização funcional dos homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) em espécies de *Leishmania* sp.** 2012. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

DANESHBOD, Y. *et al.* Clinical, hisyopathologic and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v. 135, n. 4, p. 478-82, 2011.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther.**, Copenhagen, v. 22, p. 491–502, 2009.

DEO, R. C; SONENBERG, N.; BURLEY, S. K. X-Ray Structure of the Human Hyperplastic Discs Protein: an Ortholog of the C-Terminal Domain of Poly(A)-Binding Protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 98, p. 4414-4419, 2001.

DERRY, M. C. *et al.* Regulation of poly(A)-binding protein through PABP interacting proteins. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, New York, v. 7, p. 537-543, 2006.

DANIELS, J. P.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. Cell biology of the trypanosome genome. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 74, n. 4, p. 552-569, 2010.

DHALIA, R. *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*. Characterization of multiple eIF4F subunit homologues. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 23-41, 2005.

DHALIA, R. *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 34, p. 2495-2507, 2006.

DRAWBRIDGE, J.; GRAINGER, J. L.; WINKLER, M. M. Identification and Characterization of the Poly(A)-Binding Proteins From the Sea Urchin: a Quantitative Analysis. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 10, p. 3994-4006, 1990.

DUNN, E. *et al.* Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. **Genes Dev.**, New York, v. 19, p. 90-103, 2005.

EL-SAYED, N. M. *et al.* Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science.**, New York, v. 309, p. 404-409, 2005.

FERNANDEZ-MOYA, S. M.; ESTÉVEZ, A. M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdiscip. Rev. RNA.**, Hoboken, v. 1, n. 1, p. 34-46, 2010.

FISCHER, P. M. Cap in Hand: Targeting eIF4E. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 8, n.16, p.1-7, 2009.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnol. Adv.**, Oxford, v. 30, p. 294-301, 2012.

FREIRE, E. R. *et al.* The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 176, n. 1, p. 25-36, 2010.

FREIRE, E. R. *et al.* The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 176, p. 25-36, 2011.

FREIRE, E. R *et al.* eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, New York, v. 20, n. 8, p.1272-86, 2014.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Laboratório de Imunomodulação. **Leishmaniose cutânea**. Disponível em:
<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/ciclo_biol_gico.htm>.
Acesso em: 20 jan. 2015.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Laboratório de Imunomodulação. **Leishmaniose**. Disponível em:
<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/ciclo_biol_gico.htm>.
Acesso em: 20 jan. 2015.

GALLIE, D. R; BROWNING, K. S. eIF4G functionally differs from eIF4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 40, p. 36951-36960, 2001.

GHEDIN, E. *et al.* Gene Synteny and Evolution of Genome Architecture in Trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 134, p. 183-190, 2004.

GHEDIN, E. *et al.* Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 156, p. 93-101, 2007.

GHOORAH, A. W. *et al.* A spatial classification of 3D protein domain family interactions. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 42, p. D389-D395, 2014.

GINGER, M. L. Trypanosomatid biology and euglenozoan evolution: new insights and shifting paradigms revealed through genome sequencing. **Protist**, Jena, v. 156, p. 377-392, 2005.

INGRAS, A.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 68, p. 913-963, 1999.

GOODFELLOW, I.; ROBERTS, L. Eukaryotic initiation factor 4E. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Exeter, v. 40, p. 2675-2680, 2008.

GRIENSVEN, V. J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 26, p. 309-22, 2012.

GROSS, J. D. *et al.* Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. **Cell**, Cambridge, v. 115, p. 739-750, 2003.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 10, p. 569-577, 2007.

HASTING, K. E. SL trans-splicing: easy come or easy go? **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 240-7, 2005.

HINNEBUSCH, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annu Ver. Biochem.**, Palo Alto, v. 83, p. 779-812, 2014.

HOSODA, N.; LEJEUNE, F.; MAQUAT, L. Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v.26, p. 3085-3097, 2006.

IMATAKA, H.; SONENBERG, N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 17, p. 6940-6947, 1997.

IMATAKA, H.; GRADI, A.; SONENBERG, N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. **EMBO J.**, Eynsham, v. 17, p. 7480-7489, 1998.

IVENS, A. C. *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania Major*. **Science**, New York, v. 309, p. 436-442, 2005.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Mol. Biol. Evol.**, Chicago, v. 27, n. 1, p. 33-45, 2009.

JACKSON, R.; HELLEN, C.; PESTOVA, T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 11, p. 113-127, 2010.

JAGUS, R.; BACHVAROFF, T. R.; JOSHI, B. *et al.* Diversity of Eukaryotic Translational Initiation Factor eIF4E in Protists. **Comp. Funct. Genomic.**, Chichester, v. 2012, p.134-839, 2012.

JOSHI, B.; CAMERON, A.; JAGUS, R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 271, p. 2189-2203, 2004.

JOSHI, B.; LEE, K.; MAEDER, D. L.; JAGUS, R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. **BMC Evol. Biol.**, London, v. 5, p. 48, 2005.

KATO, H. *et al.* Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. **Int. J. Environ. Res. Public Health.**, Basel, v. 7, p. 814-826, 2010.

KISSINGER, J. C. A Tale of Three Genomes: The Kinetoplastids Have Arrived. **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, p. 240-243, 2006.

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

KONICEK, B. W. *et al.* Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. **Cancer Res.**, Chicago, v. 71, n. 5, p. 1849-1857, 2011.

KOZLOV, G.; GEHRING, K. Molecular Basis of ERF3 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, p. e10169, 2010.

KOZLOV, G. *et al.* Solution Structure of the Orphan PABC Domain From *Saccharomyces Cerevisiae* Poly(A)-Binding Protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, p. 22822-22828, 2002.

KOZLOV, G. *et al.* Structure and Function of the C-Terminal PABC Domain of Human Poly(A)-Binding Protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 98, p. 4409-4413, 2001.

KOZLOV, G. *et al.* Structural Basis of Ligand Recognition by PABC, a Highly Specific Peptide-Binding Domain Found in Poly(A)-Binding Protein and a HECT Ubiquitin Ligase. **EMBO J.**, Eynsham, v. 23, p. 272-281, 2004.

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

LACOMBLE, S. *et al.* A *Trypanosoma brucei* protein required for maintenance of the flagellum attachment zone and flagellar pocket ER domains. **Protist**, Jena, v. 163, p. 602-615, 2012.

LE, H. *et al.* The Wheat Poly(A)-Binding Protein Functionally Complements Pab1 in Yeast. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 243, p. 350-357, 1997.

LE, H.; BROWNING, K. S.; GALLIE, D. R. The Phosphorylation State of Poly(A)-Binding Protein Specifies Its Binding to Poly(A) RNA and Its Interaction With Eukaryotic Initiation Factor (EIF) 4F, EIFiso4F, and EIF4B. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, p. 17452-17462, 2000.

LEFEBVRE C. *et al.* Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 281, p. 22917-22932, 2006.

LEI, J. *et al.* Crystal Structure of the Middle Domain of Human Poly(A)-Binding Protein-Interacting Protein 1. **Biochem. Biophys. Res Commun.**, New York, v. 408, p. 680-685, 2011.

LIBERMAN, N. *et al.* The crystal structure of the C-terminal DAP5/p97 domain sheds light on the molecular basis for its processing by caspase cleavage. **J Mol. Biol.**, Baltimore, v. 383, p. 539-548, 2008.

LINDER, P. Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. **Biol. Cell**, Chichester, v. 95, p. 157-167, 2003.

LINDER, P.; JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping – The DEAD box RNA helicase family. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v. 12, n. 8, p. 505-516, 2011.

LINDQVIST, L. *et al.* Selective Pharmacological Targeting of a DEAD Box RNA Helicase. **PLoS One**, San Francisco v. 13, n. 2, p. e1583, 2008.

MADER, S. *et al.* The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 15, p. 4990-4999, 1995.

MARCOTRIGIANO, J. *et al.* Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. **Cell**, Cambridge, v. 89, p. 951-961, 1997.

MARINTCHEV, A.; WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Q. Rev. Biophys.**, London, v. 37, p. 197-284, 2004.

MARINTCHEV, A. *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 447-460, 2009.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. **J. Biomed. Biotechnol.**, Akron, v. 2010, p. 525-241, 2010.

MATSUO, H. *et al.* Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. **Nat. Struct. Biol.**, New York, v. 4, n. 9, p. 717-724, 1997.

MARCOTRIGIANO, J. *et al.* Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. **Mol. Cell**, Cambridge, v. 3, p. 707-716, 1999.

MELO, E. O. *et al.* Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, n. 47, p.46357-46368, 2003.

MOERKE, N. J. *et al.* Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. **Cell**, Cambridge, v. 128, p. 257-267, 2007.

MOURA, D. M. N. *et al.* Two trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with two distinct eIF4F complexes. **RNA Biol**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 305-319, 2015.

NEVES, D. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NIEDZWIECKA, A. *et al.* Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. **J Mol Biol.**, Baltimore, v. 319, n. 3, p. 615-635, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneve, 2014. (Fact sheet n. 375). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Genebra, 2010.

PARRA-PALAU, J. L. *et al.* Features in the N and C termini of the MAPK-interacting kinase Mnk1 mediate its nucleocytoplasmic shuttling. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, p. 44197-44204, 2003.

PARSYAB, A. *et al.* mRNA helicases: the tacticians of translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, London, v. 12, n. 4, p. 235-245, 2011.

PEACOCK, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, New York, v. 39, p. 839-847, 2007.

PESTOVA, T. V. *et al.* Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes PNAS. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 19, n. 13, p. 7029-7036, 2007.

POVELONES, M. L. *et al.* Beyond replication: Division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 196, n.1, p. 53-60, 2014.

PREUßER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **Int. J. Med. Microbiol.**, Jena, v. 302, n. 4-5, p. 221-224, 2012.

PRÈVÔT, D.; DARLIX, J.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biol. Cell**, Cambridge, v. 95, p. 141-156, 2003.

PYRONNET, S. *et al.* Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. **EMBO J.**, Eynsham, v. 18, p. 270-279, 1999.

REIS, C. R. S. **Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator EIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major*.** 2009. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009;

RHOADS, R. E. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 284, p. 16711-16715, 2009.

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

SCHEPER; G. C.; PROUD, C. G. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 269, p. 5350-5359, 2002.

SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. **Foundations of Parasitology.** 8. ed. Hardcover: McGraw-Hill, 2009.

SIDDIQUI, N. *et al.* Solution Structure of the C-Terminal Domain From Poly(A)-Binding Protein in Trypanosoma Cruzi: a Vegetal PABC Domain. **Protein Sci.**, New York, v. 12, p. 1925-1933, 2003.

SLADIC, R. *et al.* Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 271, p. 450-457, 2004.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. K. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniases. **Int. J. Parasitol.**, Oxford, v. 37, p. 1173-1186, 2007.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 731-745, 2009.

SONENBERG, N. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v. 86, p. 178-183, 2008.

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 118, p. 1301-1310, 2008.

SZÖÖR, B. Trypanosomatid protein phosphatases. **Mol. Biochem. Parasitol.**, Amsterdam, v. 173, v. 2, p. 53-63, 2010.

TARUN, S. Z. *et al.* Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. **EMBO J.**, Eynsham, v. 15, n. 24, p. 7168-7177, 1996.

TENSON, T.; MANKIN, A. Antibiotics and the ribosome. **Mol. Microbiol.** Oxford, v. 59, n. 6, p. 1664-1677, 2006.

TOMOO, K. *et al.* Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P (3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)- bound human full length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C terminal flexible region. **Biochem. J.**, London, v. 262, p. 539-544, 2002.

VALÁSEK, L. S. 'Ribozomin' Translational initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). **Curr. Protein Pept. Sci.**, Hilversum, v. 13, n. 4, p. 305-330, 2012.

VectorBase.Organisms. **Lutzomyia longipalpis**. Disponível em: <<https://www.vectorbase.org/organisms/lutzomyia-longipalpis>> Acesso em: 10 de jan. 2015.

VectorBase.Organisms. **Phlebotomus papatasi**. Disponível em: <<https://www.vectorbase.org/organisms/phlebotomus-papatasi>> Acesso em: 10 de jan. 2015.

WANG, X.; GRUMET, R. Identification and Characterization of Proteins That Interact With the Carboxy Terminus of Poly(A)-Binding Protein and Inhibit Translation in Vitro. **Plant. Mol. Biol.**, Boston, v. 54, p. 85-98, 2004.

WILSON, R. *et al.* Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 7, n. 4, p. e816, 2010.

XAVIER, C. C. **Identificação de domínios em um homólogo de iniciação da tradução EIF4G envolvidos na sua ligação a proteína de ligação à cauda poli-a em *Leishmania major***. 2013. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

YAN, Y. B. Deadenylation: enzymes, regulation, and functional implications. **Rev. RNA**, Hoboken, v. 5, n. 3, p. 421-443, 2014.

YOFFE, Y. *et al.* Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. **Eukaryot. Cell**, Cambridge, v. 5, p. 1969-1979, 2006.

YOFFE, Y. *et al.* Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.**, New York, v. 37, p. 3243-3253, 2004.

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

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comp. Funct. Genomics.**, Chichester, v. 2012, p. 813718, 2012.