

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Deyvisson Wesley Gualberto Bezerra

Caracterização das interações entre homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) e proteínas de ligação a mRNAs implicadas na regulação da tradução em tripanosomatídeos

**RECIFE
2023**

Deyvisson Wesley Gualberto Bezerra

Caracterização das interações entre homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) e proteínas de ligação a mRNAs implicadas na regulação da tradução em tripanosomatídeos

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Dra. Camila Cavalcanti Xavier

RECIFE

2023

Título do trabalho em inglês: Characterization of interactions between poly-A binding protein (PABP) homologues and mRNA binding proteins implicated in the regulation of translation in trypanosomatids.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação de Amparo a Ciência e Tecnológico Estado de Pernambuco. (FACEPE) - Código de Financiamento 001.

B574

Bezerra, Deyvisson Wesley Gualberto.

Caracterização das interações entre homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) e proteínas de ligação a mRNAs implicadas na regulação da tradução em tripanosomatídeos / Deyvisson Wesley Gualberto Bezerra. -- 2022.

75 p. : il.color.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Coorientadora: Camila Cavalcanti Xavier.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2022.

Bibliografia: f. 69-75.

1. Domínios e motivos de interação entre proteínas. 2. Proteínas de ligação a Poli(A). 3. Regulação da expressão gênica. I. Título.

CDU 614

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Deyvisson Wesley Gualberto Bezerra

Caracterização das interações entre homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) e proteínas de ligação a mRNAs implicadas na regulação da tradução em tripanosomatídeos

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2022

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo (Examinadora interna)
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Larissa Melo do Nascimento (Examinadora externa)
CSL Behring Innovation

*Dedico este trabalho à minha noiva,
familiares e amigos que sempre estiveram
presentes.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, que me deu a oportunidade de realizar um sonho e acreditou na minha capacidade para fazer parte de um grande projeto. Admiro a pessoa que você é e o orientador incrível que tem sido ao me ajudar sempre que preciso.

À minha coorientadora Dra. Camila Cavalcanti Xavier que se fez indispensável nessa jornada com todo seu apoio, atenção e paciência.

À minha professora Dra. Tamara de Carli da Costa Lima, que permitiu meu primeiro contato com a pesquisa, me apresentando ao grupo de pesquisa que me acolheu.

À minha noiva Cindy, que esteve presente durante todo esse processo, sendo meu porto-seguro e facilitando essa caminhada árdua. Obrigado por evoluir ao meu lado e me apoiar sempre, espero estar presente em todas suas conquistas assim como você tem estado junto às minhas, eu te amo!

Aos meus pais Sônia e Arnaldo, irmãos Alysson e Anderson, que embora distantes, buscam sempre estar presentes, demonstrando apoio e orgulho por cada conquista minha, amo vocês!

À minha Tia Sandra e Vó Zefinha, que sempre acreditaram no meu potencial e estão sempre felizes por cada passo dado por mim.

Ao grupo de pesquisa BiomolTrip, conseguindo deixar menos difícil a tarefa de fazer pesquisa em meio a uma pandemia.

Ao grupo Tropa de Elite coordenado pelo Dr. Christian Robson de Souza Reis por todo conhecimento compartilhado e auxílios em momentos difíceis.

À minha amiga e parceira de laboratório Giovana Barbosa, por compartilhar conhecimentos, experimentos e angústias que pudemos enfrentar durante esses 2 anos, fazendo ciência de uma forma descontraída.

Aos meus amigos, Luan, Thiago e Eddy que estiveram presentes dando apoio, confiando na minha capacidade e sempre me lembrando de que sou capaz de fazer aquilo que me disponho a realizar.

À minha sogra Cecita, por todo apoio após uma mudança de estilo de vida em meio a uma pandemia.

A todos os colegas de laboratório e funcionários do Instituto Aggeu Magalhães

que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos membros da minha banca que aceitaram o convite e foram de grande importância com suas contribuições.

Ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde por garantir uma qualificação acadêmica de excelência.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por fornecer o espaço de alta qualidade para o desenvolvimento deste trabalho.

À FACEPE e CNPq por fornecer o apoio financeiro.

*“Se eu soubesse antes o que sei agora,
erraria tudo exatamente igual.”*

Engenheiros do Hawaii (2002).

RESUMO

BEZERRA, Deyvisson Wesley Gualberto. Caracterização das interações entre homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) e proteínas de ligação a mRNAs implicadas na regulação da tradução em tripanosomatídeos. 2022. Dissertação (Mestrado em biociências e biotecnologia em saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Nas células eucarióticas, proteínas de ligação ao poli-A (PABPs) e proteínas de ligação a RNA (RBPs) se associam a mRNAs e a outras proteínas para formar complexos de ribonucleoproteínas (mRNPs) que determinam o destino dos transcritos alvos na célula. Os tripanosomatídeos, protozoários parasitas de importância médica, possuem particularidades quanto à sua regulação gênica que ocorre majoritariamente de forma pós-transcricional, onde as PABPs parecem ter um papel chave. De fato, diferentes propriedades estão associadas aos três homólogos de PABP de tripanosomatídeos e que parecem estar ligadas a ações distintas junto aos mRNAs, destacando a migração das PABP2 e PABP3 para o núcleo quando submetidas a estresse transcricional, algo que não é visto para a PABP1. Essas proteínas, seu impacto na tradução e outros processos associados ao metabolismo dos mRNAs, assim como sua relação com diferentes populações de mRNAs, vêm sendo investigadas nestes protozoários, visando identificar diferenças e semelhanças funcionais entre si e com PABPs de outros organismos mais bem estudados. Este trabalho objetivou contribuir na caracterização da PABP2 e das suas interações com proteínas parceiras de *Leishmania infantum*, permitindo observar novos aspectos da sua função junto a mRNAs alvos. Para isso, foram obtidas linhagens de *L. infantum* expressando mutantes da PABP2 após deleção de uma cópia do seu gene nativo (SKO). Foi então avaliada a viabilidade celular da *L. infantum* expressando estes mutantes. As diferentes linhagens geradas na condição SKO foram usadas na obtenção de lisados citoplasmáticos para a realização de imunoprecipitação (IP). As IPs, em triplicatas, foram submetidas a análise de espectrometria de massas. Os resultados dessa análise permitiram identificar grupos de proteínas parceiras associados a tradução, transcrição, transporte de proteínas e fosforilação permitindo identificar o impacto na sua associação provocada pelas mutações introduzidas na PABP2 de *L. infantum*. Com a análise dos dados dos parceiros proteicos, foi possível identificar em detalhes regiões responsáveis por interações com proteínas pertencentes a complexos envolvidos em diferentes processos ligados ao metabolismo dos seus mRNAs e controle da expressão gênica. Sendo assim, os resultados deste trabalho contribuíram no entendimento de diferentes interações e suas especificidades permitindo um desenvolvimento futuro de drogas alvo específicas.

Palavras-chave: domínios e motivos de interação entre proteínas; proteína de ligação a poli-A; regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

BEZERRA, Deyvisson Wesley Gualberto. Characterization of interactions between poly-A binding protein (PABP) homologues and mRNA binding proteins implicated in the regulation of translation in trypanosomatids. 2022. Dissertation (Mastery in biosciences and biotechnology in health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

In eukaryotic cells, poly-A binding proteins (PABPs) and RNA binding proteins (RBPs) associate with mRNAs and other proteins to form complexes of ribonucleoproteins (mRNPs) that determine the fate of target transcripts in the cell. Trypanosomatids, parasitic protozoa of medical importance, have particularities regarding their gene regulation that occurs mostly post-transcriptionally, where PABPs seem to have a key role. In fact, different properties are associated with the three PABP homologues of trypanosomatids and that appear to be linked to distinct actions on mRNAs, highlighting the migration of PABP2 and PABP3 to the nucleus when subjected to transcriptional stress, something that is not seen for PABP1. These proteins, their impact on translation and other processes associated with the metabolism of mRNAs, as well as their relationship with different populations of mRNAs, have been investigated in these protozoa, in order to identify functional differences and similarities between them and with PABPs from other better-studied organisms. This work aimed to contribute to the characterization of PABP2 and its interactions with *Leishmania infantum* partner proteins, allowing the observation of new aspects of its function with target mRNAs. For this, strains of *L. infantum* expressing PABP2 mutants were obtained after deletion of one (SKO) copy of its native gene. The cell viability of *L. infantum* expressing these mutants was then evaluated. The different strains generated in the SKO condition were used to obtain cytoplasmic lysates for immunoprecipitation (IP). The IPs, in triplicate, were submitted to mass spectrometry analysis. The results of this analysis allowed us to identify groups of partner proteins associated with translation, transcription, protein transport and phosphorylation, allowing us to identify the impact on their association caused by mutations introduced in PABP2 of *L. infantum*. With the analysis of data from protein partners, it was possible to identify in detail regions responsible for interactions with proteins belonging to complexes involved in different processes linked to the metabolism of their mRNAs and control of gene expression. Thus, the results of this work contributed to the understanding of different interactions and their specificities, allowing a future development of specific target drugs.

Keywords: protein interaction domains and motifs; Poly(A)-binding protein; Gene expression regulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Principais espécies de <i>Leishmania</i> e suas características geográficas...	20
Figura 1 - Morfologia celular presente no ciclo de vida da <i>Leishmania amazonenses</i>	21
Figura 2 - Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	22
Figura 3 - Casos de leishmaniose cutânea e mucosa	23
Figura 4 - Casos de leishmaniose visceral	24
Figura 5 - Representação da transcrição e maturação do mRNA em tripanosomatídeos	25
Figura 6 - Estrutura da proteína de ligação à cauda poli-A	27
Figura 7 - Identificação de proteínas co-purificadas com os homólogos de PABP em <i>L.infantum</i>	29
Figura 8 - Representação de complexos eIF4F na iniciação da tradução em tripanosomatídeos	33
Figura 9 - Motivos mutagenizados ao longo da sequência proteica de ~584aa da PABP2 de <i>L. infantum</i>	43
Figura 10 - Digestão das construções selvagens e mutantes do gene da PABP2 em pSP-BT1-YNeoalR	44
Figura 11 - Alinhamento do sequenciamento das construções mutantes comparadas com a sequência do gene selvagem	45
Figura 12 - Extrato total expressando proteínas mutantes em linhagens SKO de PABP2 de <i>L. infantum</i> com anti-HA	46
Figura 13 - Extrato total expressando proteínas mutantes em linhagens SKO de PABP2 de <i>L. infantum</i> soro anti-PABP2	47
Figura 14 - Lisados celulares das proteínas recombinantes expressas em células de <i>L. infantum</i>	48
Figura 15 - Ensaio de imunoprecipitação das proteínas recombinantes da PABP2 de <i>L. infantum</i>	48
Figura 16 - Validação dos ensaios de imunoprecipitação entre a PABP2 e o eIF4E	49
Figura 17 - Validação dos ensaios de imunoprecipitação entre a PABP2 e o eIF4G	49
Quadro 2 - Principais proteínas co-precipitadas com a SKO-PABP2-HA em <i>L. infantum</i>	51
Quadro 3 - Relação de proteínas que diminuíram o grau de co-purificação com os mutantes da PABP2 em <i>L. infantum</i> com razão >1,5	52

Figura 18 - Razões de enriquecimento comparativa para as RBPs que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em <i>L. infantum</i>	54
Figura 19 - Razões de enriquecimento comparativa para os eIFs que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em <i>L. infantum</i>	55
Figura 20 - Razões de enriquecimento comparativa para as proteínas ribossomais da subunidade 40S que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em <i>L. infantum</i>	56
Figura 21 - Razões de enriquecimento comparativa para as proteínas de transporte celular que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em <i>L. infantum</i>	57
Figura 22 - Razões de enriquecimento comparativa para proteínas diversas que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em <i>L. infantum</i>	58
Figura 23 - Modelagem da sequência da PABP2 de <i>L. infantum</i>	59
Figura 24 - Modelagem dos domínios RRRMs e porção C-terminal da PABP2 de <i>L. infantum</i>	60
Figura 25 - Alinhamento entre a linhagem selvagem da PABP2 com as sequências contendo as respectivas mutações estudadas em <i>L. infantum</i>	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AAA	Alanina-alanina-alanina
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
DKO	<i>Double knockout</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRBD	<i>Doubled RNA-Binding Domain</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
Fen	Fenilalanina
FRS	Fenilalanina-arginina-serina
gDNA	DNA genômico
Gly	Glicina
Gln	Glutamina
GTP	Guanosina trifosfato
His	Histidina
HSK	Histidina-serina-lisina
IAK	Isoleucina-alanina-lisina
IP	Imunoprecipitação
IR	<i>Intragenic region</i>
kDa	kiloDalton
LC	Leishmaniose cutânea
Lis	Lisina
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
m7G	7-metilguanosina
Met	Metionina
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MS	<i>Mass spectrometry</i>

OPAS	Organização Pan-americana da saúde
OMS	Organização Mundial da saúde
PABP	<i>Poli-A Binding Protein</i>
PABPC	Proteína de ligação à cauda poli-A citoplasmática
PABPN	Proteína de ligação à cauda poli-A nuclear
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Pol	Polimerase
PUF	Pumílio
RBP	<i>RNA Binding Protein</i>
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i>
RQN	Arginina-glutamina-asparagina
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RYQ	Arginina-tirosina-glutamina
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Ser	Serina
SFB	Soro fetal bovino
SKO	<i>Single knockout</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TGM	Treonina-glicina-metionina
The	Treonina
tRNA	RNA transportador
tRNAi	RNA transportador iniciador
Tyr	Tirosina
μF	Microfarads
μg	Microgramas
μL	Microlitros
UTR	<i>Untranslated region</i>
WT	<i>Wild Type</i>
YAR	Tirosina-alanina-arginina
ZFD	<i>Zinc finger Domain</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 TRIPANOSOMATÍDEOS	19
2.2 GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	20
2.2.1 Ciclo biológico	21
2.2.2 Epidemiologia	22
2.3 PARTICULARIDADES DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSOMATÍDEOS	24
2.3.1 Transcrição e maturação do mRNA	25
2.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA (RBPs)	26
2.4.1 Proteínas de ligação à cauda poli-A (PABPs)	26
2.4.2 PABPs de tripanosomatídeos	28
2.5 SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM EUCARIOTOS	29
2.5.1 Iniciação da tradução	30
2.5.2 Complexo eIF4F	31
2.5.3 Aspectos da iniciação da tradução de tripanosomatídeos	32
2.5.4 Regulação da expressão gênica	33
2.6 CONTEXTO ATUAL DO ESTUDO	34
3 OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 CULTIVO CELULAR E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DE <i>L. INFANTUM</i>	37
4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL E REALIZAÇÃO DO <i>WESTERN-BLOT</i>	38
4.3 PREPARO DE LISADOS CITOPLASMÁTICOS DE <i>L. INFANTUM</i> E IMUNOPRECIPITAÇÃO	39

4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	40
4.5 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	40
4.6 ANÁLISES IN SILICO	41
5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
6 RESULTADOS	43
6.1 AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES REALIZADAS NO GENE DA PABP2 EM TRABALHOS ANTERIORES	43
6.1.1 Confirmação da presença dos insertos nas construções plasmidiais	43
6.2 ENSAIOS DE TRANSFEÇÃO	45
6.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES	46
6.3.1 Ensaio de imunoprecipitação	47
6.4 ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	49
6.4.1 Análise comparativa entre a PABP2 marcada com HA e a <i>L. infantum</i>	49
6.4.2 Análise comparativa entre as proteínas mutantes e a PABP2 marcados com HA	52
6.5 MODELAGEM IN-SILICO DA PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	58
7 DISCUSSÃO	62
7.1 AVALIAÇÃO DE RBPs ASSOCIADAS A PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	62
7.2 AVALIAÇÃO DE EIFS ASSOCIADOS A PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	64
7.3 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS DA SUBUNIDADE 40S RIBOSSOMAL ASSOCIADAS A PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	64
7.4 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE ASSOCIADAS A PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	65
7.5 AVALIAÇÃO DE OUTRAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS A PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	65
7.6 AVALIAÇÃO DAS MODELAGENS IN-SILICO DA PABP2 DE <i>L. INFANTUM</i>	66
8 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A família *Trypanosomatidae* tem como gêneros de maior importância os *Trypanosoma* e *Leishmania*, uma vez que são responsáveis por enfermidades de grande impacto na saúde pública, como a doença de Chagas (causada pelo *Trypanosoma cruzi*), doença do sono (causada pelo *Trypanosoma brucei*) e as várias formas de leishmaniose (causada pelas espécies de *Leishmania*). Estas são doenças onde atualmente os tratamentos utilizados são de alta toxicidade para o paciente, muitas vezes ocasionando na sua paralisação ou abandono do tratamento por parte do paciente devido às complicações geradas pelos medicamentos disponíveis.

Do ponto de vista de sua biologia molecular, os genes codificantes de proteínas dos tripanosomatídeos estão agrupados em unidades transcricionais que a partir de um único elemento promotor são co-transcritas em pré-mRNAs policistrônicos, responsáveis por gerar mRNAs monocistrônicos através dos processos de *trans-splicing* e poliadenilação. Essa forma peculiar de processamento do RNA gera múltiplos mRNAs que são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento parasitário. A forma como essa regulação é realizada se deve ao fato de haver uma ausência de promotores típicos para a RNA polimerase II, sendo assim proposto que o controle da expressão gênica dos tripanosomatídeos ocorra majoritariamente a nível pós-transcricional. Esse controle envolve diferentes processos associados ao metabolismo dos mRNAs, como regulação do processamento, transporte, tempo de meia-vida e tradução em proteínas. Esses processos envolvem a ação de proteínas de ligação ao RNA (RBPs), que entre estas se destacam as proteínas de ligação à cauda poli-A (PABP).

A PABP é a RBP mais abundante, encontrada associada às extremidades 3' de poli-A presentes na grande maioria dos mRNAs eucarióticos. Talvez seu papel mais relevante, e com certeza o mais bem caracterizado, seja na síntese proteica, garantindo a estabilidade e circularização do mRNA a ser traduzido. As PABPs servem ainda como uma ponte de ligação entre o mRNA e outras proteínas, participando assim da maioria, senão de todos os processos dependentes de mRNA na tradução. Durante o processo de tradução, proteínas com papel chave são os fatores de iniciação da tradução (eIFs). As PABPs sabidamente se associam com eIFs

selecionados, como o complexo eIF4F, formado a partir da interação entre duas subunidades principais: eIF4E, que se liga ao cap na extremidade 5' do mRNA e auxilia na sua associação com outras proteínas, atuando também no transporte do transcrito alvo; e eIF4G, que é capaz de circularizar o mRNA a partir da sua interação simultânea tanto com o eIF4E com a PABP, sendo esta propriedade crítica para a manutenção do mRNA, protegendo-o e controlando sua tradução. Outras funções menos caracterizadas das PABPs estão ligadas ao controle do transporte, processamento e degradação dos mRNAs.

Três homólogos de PABP foram descritos em tripanosomatídeos, com os dois últimos, as PABP2 e PABP3, apresentando parceiros proteicos e mRNAs alvos distintos da PABP1 e similares entre si. Como exemplo, enquanto foi observada uma associação clara entre a PABP1 e o complexo eIF4F baseado nas subunidades EIF4E4/EIF4G3, o mesmo não foi visto com as PABPs 2 e 3, sugerindo interações e funções distintas na tradução. Por outro lado, acredita-se na interação desses homólogos com outros complexos do tipo eIF4F encontrados em tripanosomatídeos. Da mesma forma, outros grupos de RBPs parceiras parecem se ligar diferencialmente a estes homólogos de PABP e que devem auxiliar sua ação na tradução e em sua regulação.

Estudos prévios identificaram ainda a presença da PABP2 em grânulos de estresse nutricional, possivelmente atuando na degradação de mRNAs, onde ao considerarmos populações semelhantes com a PABP3, pode-se inferir funções relativamente redundantes. Foi observado que as PABP2 e PABP3, embora naturalmente citoplasmáticas, apareciam migrando para o núcleo, quando submetidas à inibição transcricional, sugerindo uma ação de exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, algo que não foi visto para a PABP1. A PABP2 ainda possui uma especificidade diferencial no reconhecimento de mRNAs quando comparada a PABP1, devido a substituições de resíduos de aminoácidos críticos, ocasionando em associações distintas com proteínas parceiras e mRNAs.

Desta forma, há muito para ser descoberto sobre os papéis ao qual a PABP2 em *Leishmania* está associada, havendo uma necessidade de melhor definir quais outras proteínas de ligação ao RNA e demais parceiros proteicos estão agindo em conjunto com a PABP2. Nesse sentido, a melhor caracterização de interações específicas, através da avaliação de mutações inseridas em motivos relevantes em

sua sequência, permitirá uma melhor avaliação de funções relacionadas às PABPs dependentes da associação com proteínas com funções estabelecidas. Portanto, o presente estudo visa contribuir na caracterização das interações entre a PABP 2 e parceiros proteicos, avaliando sua contribuição na iniciação da tradução e outros processos em tripanosomatídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos são protozoários unicelulares e uniflagelados que divergiram de forma precoce na escala evolutiva se comparado aos demais eucariotos, tornando-os parasitas obrigatórios e garantindo mecanismos de expressão gênica diferentes, com particularidades celulares, moleculares e bioquímicas (OUELLETTE; PAPADOPOULOU, 2009). São organismos pertencentes a classe Kinetoplastida e ordem Trypanosomatida, na qual está inclusa a família Trypanosomatidae, onde os mais diversos gêneros parasitam plantas, vertebrados e invertebrados. Apresentam como principais gêneros de importância para a saúde pública a *Leishmania* e o *Trypanosoma*, responsáveis por doenças como as Leishmanioses, a doença do sono (*Trypanosoma brucei*) e a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) (STUART et al., 2008; CAVALIER-SMITH, 2016).

Os tripanosomatídeos são estruturalmente observados com a presença de um cinetoplasto, que comporta uma única mitocôndria carregando o DNA mitocondrial, além da presença de um flagelo que se organiza de acordo com a necessidade do parasito (CAVALCANTI; DE SOUZA, 2018; HALLIDAY et al., 2021). A posição destas organelas, assim como a do núcleo, permite classificar os tripanosomatídeos em diversas formas evolutivas a partir de sua diferenciação, tendo como principais: amastigota, tripomastigota, epimastigota, promastigota, coanomastigota e opistomastigota. As três primeiras formas podem ser observadas no gênero *Trypanosoma* e as formas amastigotas e promastigotas no gênero *Leishmania* (LOPES et al., 2010). Diferentes formas evolutivas podem ser encontradas em diferentes espécies parasitadas. Isso se deve ao fato da presença de vetores responsáveis pela disseminação do parasito, permitindo assim uma diferenciação através do seu ciclo de vida nos diversos ambientes no qual estes organismos se encontram. *Rhodnius spp.*, *Glossina morsitans* e o *Lutzomyia longipalpis* estão entre os principais insetos identificados, responsáveis pela transmissão da Doença de Chagas, Doença do Sono e as várias formas da Leishmaniose, respectivamente (CAVALLI; BOLOGNESI, 2009).

2.2 GÊNERO LEISHMANIA

Em cerca de 100 países afetados pela Leishmaniose, quase 400 milhões de pessoas possuem risco de contrair a doença, tornando a uma das doenças negligenciadas de maior distribuição no mundo, apresentando em torno de 700 mil a 1 milhão de novos casos por ano (WHO, 2021). O gênero *Leishmania* apresenta mais de 50 espécies, divididas em três subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (ESPINOSA et al., 2016). Vinte espécies são responsáveis por infectar humanos, sendo este o gênero de protozoários parasitos de humanos com maior taxa de espécies patogênicas (AKHOUNDI et al., 2016). O parasito tem se espalhado por todo o mundo, atingido os principais continentes. Na maioria das vezes causa a forma cutânea da Leishmaniose, associada a diferentes espécies de *Leishmania*, como: *L. major*, *L. mexicana*, *L. aethiopia*, *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. peruviana* (Quadro 1).

Quadro 1 - Principais espécies de *Leishmania* e suas características geográficas.

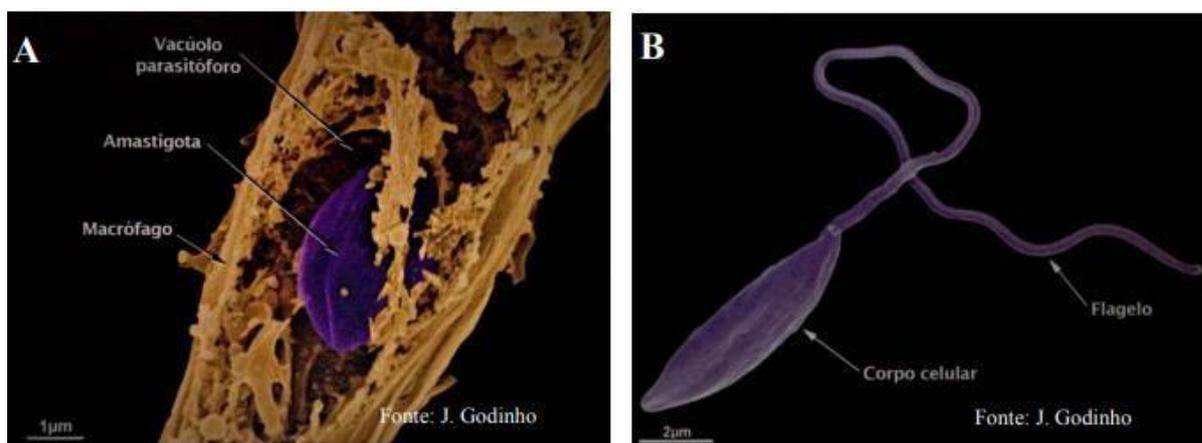
Espécies de <i>Leishmania</i>	Formas da doença em humanos	Distribuição geográfica	Reservatórios	Vetores
<i>Leishmania aethiopia</i>	Leishmaniose cutânea	Etiópia, Quênia	Damão-do-cabo	<i>Phlebotomus longipes</i> ; <i>P. pedifer</i>
<i>L. major</i>	Leishmaniose cutânea	África, Ásia	Roedores	<i>P. papatasi</i> ; <i>P. duboscqi</i>
<i>L. mexicana</i>	Leishmaniose cutânea	América central	Roedores	<i>Lutzomyia olmeca</i>
<i>L. amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea	América do sul (norte da Amazônia)	Roedores	<i>L. flaviscutellata</i>
<i>L. braziliensis</i>	Leishmaniose cutânea e mucocutânea	América do Sul	Roedores	<i>Psychodopygus</i> ; <i>Lutzomyia spp.</i>
<i>L. peruviana</i>	Leishmaniose cutânea	Peru, Argentina	Cachorro	<i>L. verrucarum</i> , <i>L. pvmenis</i>
<i>L. infantum</i>	Leishmaniose visceral e cutânea	Ásia, América do Sul e central, Sudeste europeu e noroeste africano	Cachorro, gato, raposa	<i>P. pcmiciosufi</i> , <i>P. ariasi</i>
<i>L. donovani</i>	Leishmaniose visceral	Etiópia, Sudão, Quênia, Índia, China, Burma, Bangladesh	Humano, roedores, caninos	<i>Phlebotomus argentipes</i> , <i>P. orientalis</i> , <i>P. martini</i>

Fonte: Adaptado de ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017.

As espécies de *Leishmania* possuem um ciclo de vida heteroxênico, realizando sua diferenciação e infecção através da colonização de dois hospedeiros, tanto nos macrófagos do hospedeiro mamífero, como no intestino dos vetores flebotomíneos. Sua transmissão ocorre a partir de mais de 30 espécies de flebotomíneos agrupados em diversos gêneros: *Lutzomyia*, *Warileya* e *Brumptomyia*, representantes do Novo Mundo (Américas); e *Phlebotomus*, *Chinius* e *Sergentomya* representando o Velho Mundo (Ásia, África e Europa). Os gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* são os principais vetores da Leishmaniose (DVORAK et al., 2018; SERAFIM et al., 2021).

Durante seu ciclo evolutivo, as espécies de *Leishmania* possuem duas formas adaptativas principais, encontradas a depender do ambiente ao qual estão inseridas. A forma amastigota está presente nos hospedeiros mamíferos. É intracelular com seu flagelo pouco aparente, por estar interiorizado na bolsa flagelar, e possui aspecto mais arredondado. Quando captada pelo vetor, diferencia-se em uma forma extracelular e de formato mais alongado, a forma promastigota, com flagelo surgindo da região anterior do parasito (Figura 1) (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

Figura 1 - Morfologia celular presente no ciclo de vida da *Leishmania amazonenses*.



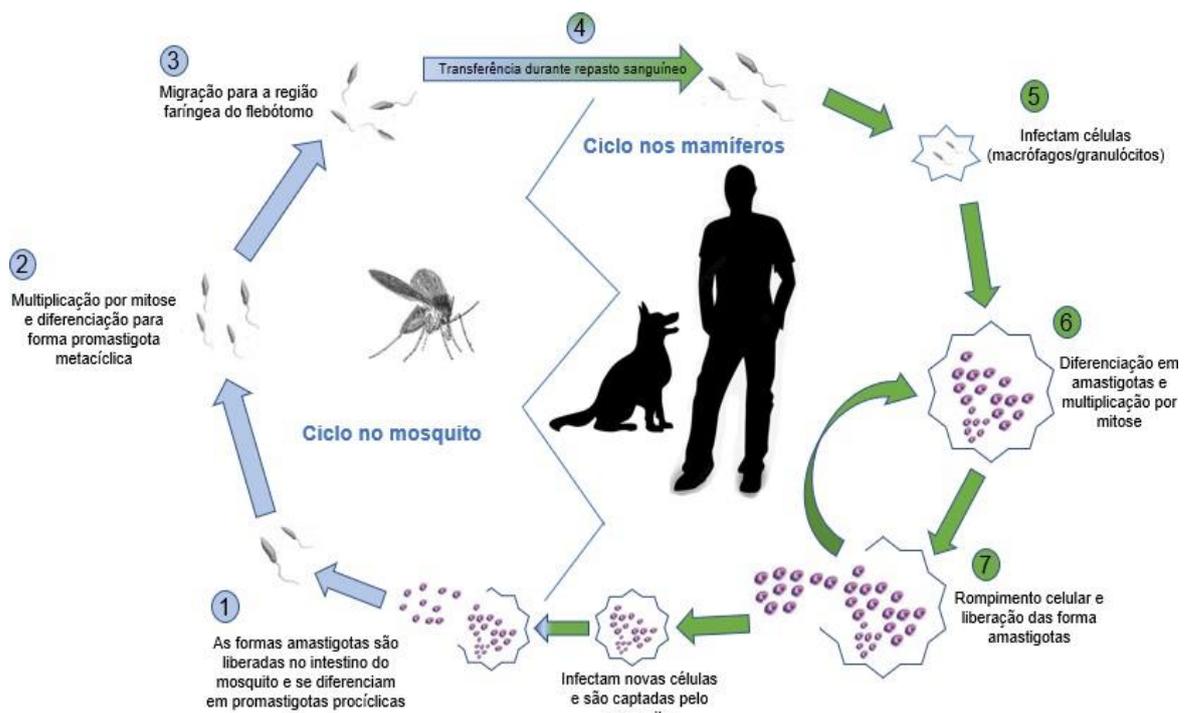
A) Forma amastigota no interior de um macrófago. B) Forma promastigota de *L. amazonensis*.
Fonte: Adaptado de Teixeira et al. (2013).

2.2.1 Ciclo biológico

A fase do ciclo de vida da de *Leishmania* dentro do flebotomíneo é primordial para o desenvolvimento do parasita, permitindo a transmissão das várias formas da leishmaniose entre os vários hospedeiros. Essa transmissão ocorre através do repasto sanguíneo, onde as amastigotas se diferenciam no intestino médio do inseto

vetor em promastigotas e em seguida nas formas infectivas, promastigotas metacíclicas. São então inoculadas no hospedeiro mamífero, invadindo os macrófagos e retornando para sua forma amastigota, permitindo a multiplicação por mitose. Ao ser introduzida no vetor, através do repasto sanguíneo, o ciclo de vida se reinicia (Figura 2) (SERAFIM, 2021).

Figura 2 - Ciclo biológico da *Leishmania sp.*



Demonstração de como ocorre a transmissão do parasita e sua diferenciação nas duas formas evolutivas.

Fonte: Elaborado pelo autor.

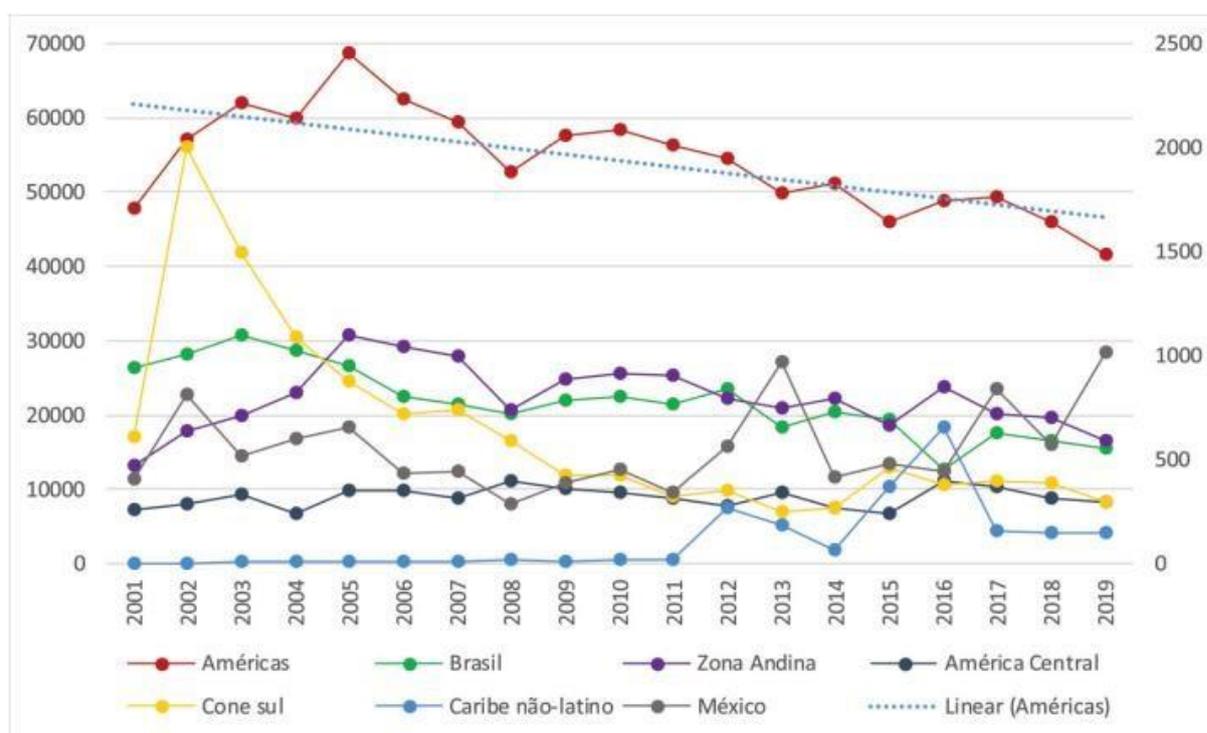
Dentro dos macrófagos, o parasito se encontra em um ambiente completamente diferente do vetor, com alterações de pH, temperatura e oxigênio. Dessa forma há uma necessidade de diferenciação para adaptação do parasito ao ambiente e garantir sua sobrevivência (BESTEIRO et al., 2007). Enquanto nos macrófagos, as formas amastigotas se dividem e ao serem liberadas podem atingir outros tecidos e órgãos no hospedeiro (STUART et al., 2008).

2.2.2 Epidemiologia

A Leishmaniose é endêmica em mais de 50 países com números alarmantes de pessoas em áreas de risco para infecção. Os principais países em número de casos

registrados de Leishmaniose cutânea (LC), Leishmaniose mucosa (LM) e Leishmaniose visceral (LV) são: Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia Irã, Quênia, Paquistão, Peru, Síria e Sudão. As LC e LM afetam a pele e mucosas das vias aéreas, causando lesões, que podem se tornar úlceras cicatrizando em algumas semanas (OPAS, 2020; OMS 2020). No ano de 2019, foram notificados 41.617 casos nas Américas de Leishmaniose cutânea e mucosa, menor número de casos no século XXI, sendo o Brasil com maior número (15.484). Esse número é decrescente se comparado a anos anteriores, onde em 2015 haviam sido registrados cerca de 46.000 casos (Figura 3).

Figura 3 - Casos de leishmaniose cutânea e mucosa.



Número de casos na região das Américas e sub-regiões entre os anos de 2001-2019. Eixo x a esquerda represente o número de casos na região das Américas e no Brasil, enquanto a direita são os números referentes aos demais países mencionados.

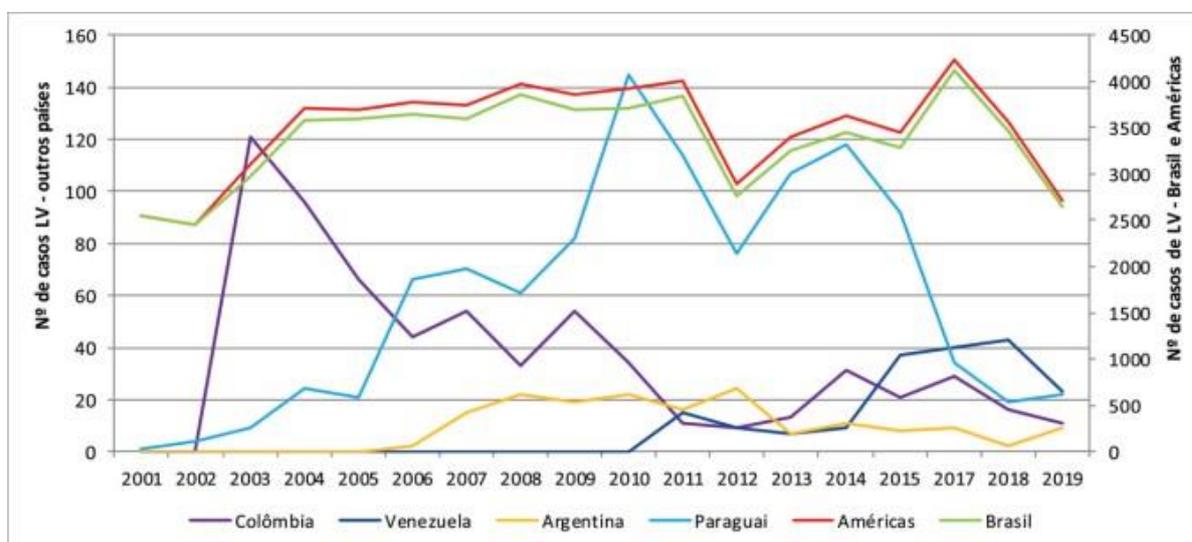
Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde (2020).

A LV possui endemicidade em 13 países das Américas, tendo sido registrados em 2019 o menor número de casos desde o ano de 2011, devido à redução no número de casos no Brasil, o país responsável por mais de 97% desses casos. Em 2019 houve 2.529 casos registrados no Brasil, redução de mais de 900 casos comparados ao ano de 2018 (Figura 4). A LV afeta principalmente crianças menores de cinco anos, podendo estar associada com condições imunossupressoras, desnutrição e várias

comorbidades, atingido o corpo de forma sistêmica (OPAS, 2020; WHO, 2020).

Mesmo após diversos estudos sobre as espécies do gênero *Leishmania*, os medicamentos atualmente utilizados no tratamento contra a Leishmaniose possuem um alto grau de toxicidade para os pacientes, atingindo o fígado, coração e rins (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Deste modo, os estudos seguem buscando alternativas para substituir os antimoniais pentavalentes em uso atualmente, buscando uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes, despertando cada vez mais interesse da comunidade científica.

Figura 4 - Casos de leishmaniose visceral.



Países com maior número de casos na região das Américas entre os anos de 2001-2019. Eixo x a esquerda represente o número de casos na região das Américas e no Brasil, enquanto a direita são os números referentes aos demais países mencionados.

Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde (2020).

2.3 PARTICULARIDADES DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSOMATÍDEOS

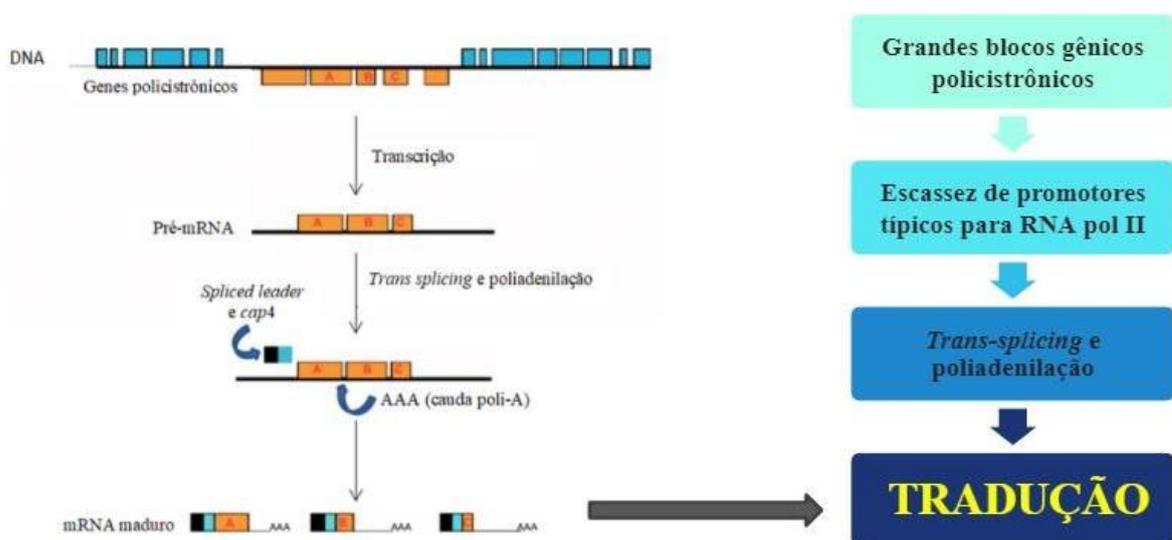
Uma das maiores dificuldades para o controle de espécies patogênicas de *Leishmania* e de outros tripanosomatídeos é o fato de sua biologia possuir particularidades que os diferem de outros eucariotos, dessa forma dificultando a utilização de moléculas que possam agir sobre processos já caracterizados em outros patógenos eucarióticos, como outros protozoários ou fungos, de modo a substituir os atuais medicamentos utilizados. Ao mesmo tempo, sua alta taxa de adaptação aos mais variados vetores e hospedeiros, de modo a ocasionar diferentes doenças, exige uma maquinaria de expressão e regulação gênica complexa que ainda está sendo

caracterizada (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

2.3.1 Transcrição e maturação do mRNA

Os genes codificantes de proteínas dos tripanosomatídeos estão agrupados em unidades transcrpcionais que a partir de um único elemento promotor são co-transcritas em extensos pré-mRNAs policistrônicos, responsáveis por gerar RNA mensageiros (mRNAs) monocistrônicos através dos processos de *trans-splicing* e poliadenilação. Essa forma peculiar de processamento do RNA gera múltiplos mRNAs que são diferencialmente regulados em etapas seguintes durante o desenvolvimento parasitário (Figura 5) (LIANG et al, 2003; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Estes eventos se devem ao fato de haver uma ausência de promotores típicos para a RNA polimerase II e o processo de transcrição pode envolver um único sítio capaz de realizar a transcrição de diversos genes, como foi inicialmente observado em *L. major*, onde cerca de 80 genes foram descritos como tendo sua transcrição controlada por apenas uma região promotora, de forma constitutiva e bidirecional (MYLER, 1999). Sendo assim, foi proposto que o controle da expressão gênica dos tripanosomatídeos ocorra majoritariamente a nível pós-transcricional. Esse controle envolve então diferentes processos associados ao metabolismo dos mRNAs, como processamento, transporte, tradução em proteínas e controle de sua meia-vida (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; CLAYTON, 2014).

Figura 5 - Representação da transcrição e maturação do mRNA em tripanosomatídeos



Os blocos gênicos policistrônicos são transcritos e então processados por *trans-splicing* e poliadenilação, dando origem a vários mRNAs maduros monocistrônicos utilizados no processo de

síntese proteica.

Fonte: Adaptado de Jager *et al.* (2007).

2.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA (RBPs)

As RBPs (*RNA Binding proteins*) possuem um papel chave na regulação da expressão gênica em eucariotos, devido ao fato de atuarem majoritariamente em eventos pós-transcricionais. Dessa forma, esse grupo de proteínas atua controlando a estabilidade dos transcritos através da associação com mRNAs e outras proteínas para formar complexos de ribonucleoproteínas (mRNPs) que determinam o destino dos transcritos alvos na célula (GLISOVIC *et al.*, 2008; ALVES *et al.* 2010).

As interações realizadas pelas RBPs ocorrem através de diversos domínios, tendo como mais relevantes, os motivos de reconhecimento ao RNA, RRM (do inglês *RNA Recognition Motif*), domínios *Zinc Fingers* (ZFDs), Pumílio (PUF) e ALBA, comumente encontrados em tripanosomatídeos (ROMAGNOLI *et al.*, 2020). As RBPs contendo RRM podem ainda ser classificadas de acordo com o número destes domínios, podendo ser denominada de DRBD (*Doubled RNA Binding Domain*) quando possuem dois RRM e TRRM (*Triple RNA Recognition Motifs*) quando há a presença de três RRM. Proteínas contendo domínios RRM já foram observadas nos principais gêneros de tripanosomatídeos, identificando um alto grau de ortologia entre elas nos três principais organismos estudados, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *T. cruzi* (GAUDENZI *et al.*, 2005).

De modo geral, RBPs que possuem maior especificidade com seus alvos, tendem a ter funções biológicas mais explícitas e correlacionadas com sua interação, podendo agir regulando o RNA em sua função e localização nuclear, tendo ação direta na forma como os RNAs irão atuar durante sua meia vida, da mesma forma já foi observado RNAs se ligando à RBP para controlar sua função e destino (SINGH *et al.*, 2015). As RBPs também atuam realizando interações na iniciação da tradução, de modo a permitir através de suas associações com mRNAs e outras proteínas, que ocorra o processo de síntese proteica. Seu papel é essencial para garantir o controle da estabilidade, modificações necessárias, processamento do mRNA e interações que regulem a expressão gênica nos mais diversos organismos (HENTZE *et al.*, 2018).

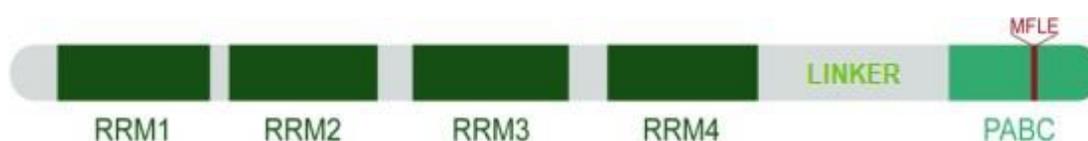
2.4.1 Proteínas de ligação à cauda poli-A (PABPs)

Entre todas as proteínas de ligação ao RNA, as PABPs (*Poly-A Binding*

proteins) se destacam por estarem presentes na maioria dos processos dependente de mRNA. As PABPs são responsáveis pelo reconhecimento da cauda de poliadenosinas presente na extremidade 3' dos mRNAs eucarióticos. Estas proteínas são divididas em duas classes: PABPs nucleares (PABPNs) e PABPs citoplasmáticas (PABPCs ou simplesmente PABPs), de acordo com sua localização subcelular. As duas classes desempenham funções distintas, permitindo uma maior regulação dos transcritos alvos da célula, e ambas possuem domínios RRM, assim como a maioria das RBPs (ELISEEVA et al., 2013).

As PABPs citoplasmáticas são proteínas exclusivamente eucarióticas que se destacam por serem as mais abundantes RBPs conhecidas. São predominantemente citoplasmáticas, mas podem ser encontradas no núcleo, e participam da maioria, senão de todos os processos associados ao metabolismo dos mRNAs, como processamento, transporte, regulação da estabilidade e tradução. A grande maioria das PABPs conhecidas apresentam uma estrutura comum caracterizada por: uma região N-terminal composta por quatro domínios de ligação a RNA do tipo RRM, com diferentes funções no reconhecimento de moléculas de RNA e de outras proteínas; uma região *linker* intermediária altamente variável, com função pouco definida; e uma região C-terminal caracterizada por um domínio do tipo MLLE, também responsável por mediar interações com outras proteínas (Figura 6) (ELISEEVA, 2013).

Figura 6 - Estrutura da proteína de ligação à cauda poli-A



Estruturalmente dividida em uma porção N-terminal, contendo quatro domínios RRM's posicionados em *tandem* e uma porção C-terminal onde está localizada a região *linker* e a região PABC contendo um domínio do tipo MLLE.

Fonte: Adaptado de Santos Filho (2020).

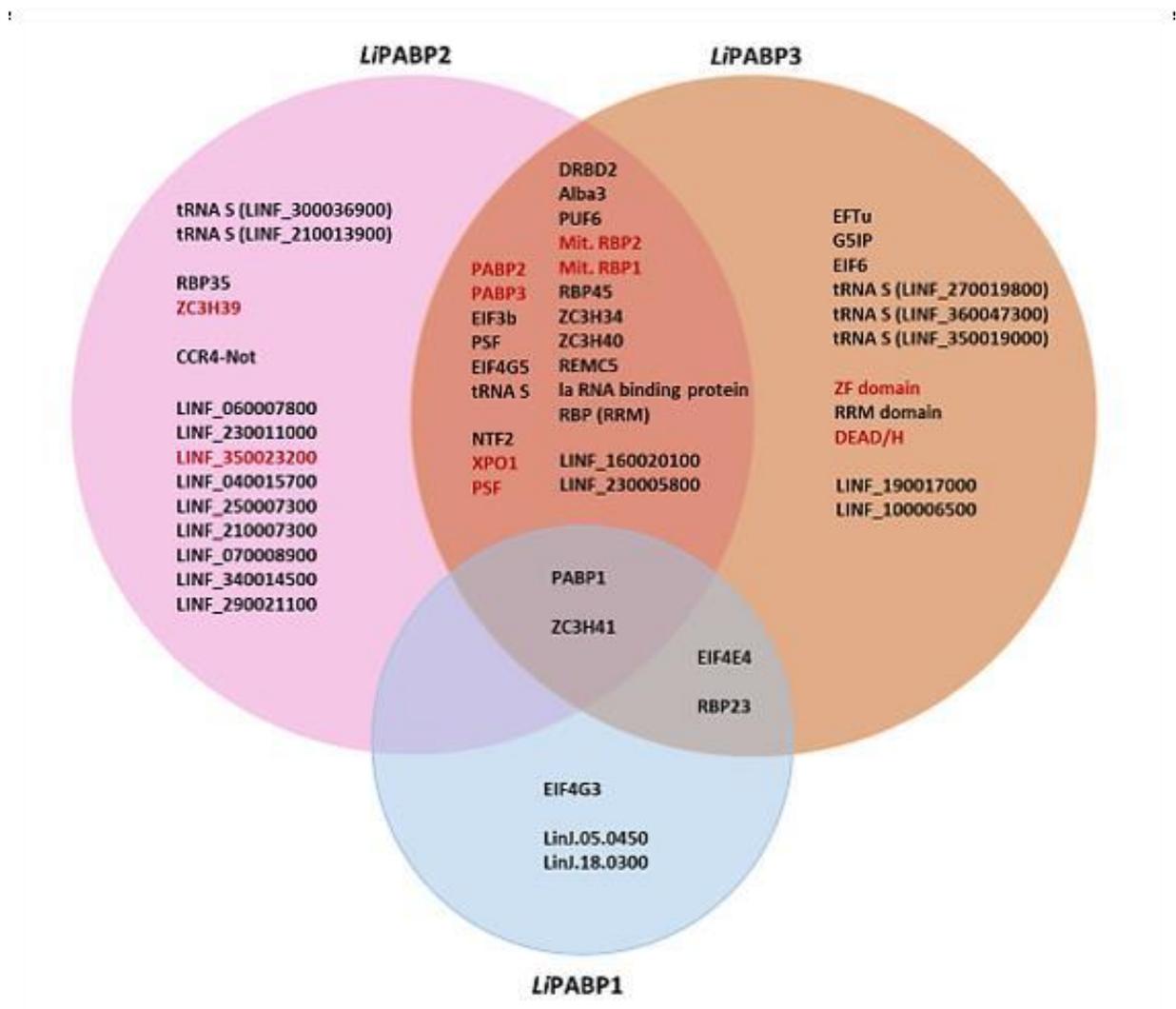
A partir da sua caracterização inicial em homólogos de PABP, foi evidenciado através de ensaios de cristalografia que os domínios RRM's são compostos por quatro folhas- β , apoiadas por duas α -hélices formando uma estrutura terciária, onde sua conformação ainda traz uma conservação que permite a ligação com o RNA (LOERCH; KIELKOPF, 2016).

2.4.2 PABPs de tripanosomatídeos

Em tripanosomatídeos foram identificados três homólogos de PABP, sendo a PABP1 inicialmente descrita em *Leishmania*, a PABP2 originalmente descrita em *T. cruzi* e *T. brucei* e a PABP3, a última a ser descoberta em *Leishmania* (DA COSTA LIMA et al., 2010). Estes três homólogos de PABP parecem estar presentes na grande maioria dos tripanosomatídeos e organismos relacionados, mas o gene codificante da PABP3 foi perdido na maioria das espécies do gênero *Trypanosoma* (KRAMER; CARRINGTON, 2011). Em *Leishmania* os três homólogos de PABP são expressos de forma simultânea como proteínas abundantes e citoplasmáticas, com as PABP2 e PABP3 co-precipitando juntas e se ligando aos mesmos mRNAs, distintos daqueles ligantes da PABP1 (ASSIS et al., 2021). As PABP1 e PABP3 parecem se ligar ao poli-A de forma diferente da PABP2, que por sua vez apresenta modificações únicas em motivos sabidamente envolvidos no reconhecimento específico deste poli-A. Há uma essencialidade dos homólogos de PABP1 e PABP2 para a viabilidade celular, assim como ambas possuem participação no processo de tradução, sendo encontradas diretamente associadas aos polissomos (DA COSTA LIMA et al., 2010; KRAMER et al., 2013).

Em *Leishmania*, as PABP2 e PABP3, embora naturalmente citoplasmáticas, aparecem migrando para o núcleo quando se inibe a transcrição e em *T. brucei* a PABP2 também migra para o núcleo quando se inibe o processamento dos mRNAs. Estes resultados sugerem uma atuação destes homólogos de PABP também no processamento e transporte dos mRNAs. Ainda em *T. brucei* foi observado uma migração diferencial dos homólogos de PABP para grânulos citoplasmáticos induzidos pela exposição a estresse e diferentes compostos, enfatizando diferenças funcionais de cada proteína associadas a diferentes processos (DA COSTA LIMA et al., 2010; KRAMER et al., 2013). Dados de espectrometria de massas identificaram um perfil aparentemente mais específico de co-precipitação da PABP1 com seus parceiros proteicos em *Leishmania*, assim como uma ausência dos seus homólogos PABP2 e PABP3 (DE MELO NETO et al., 2018). Estes por sua vez, em *Leishmania* e em *T. brucei*, mostraram um perfil distinto de proteínas co-precipitadas, em comparação com a PABP1, sendo identificados grupos mais diversos co-precipitando entre si (Figura 7) (ZOLTNER et al., 2018; SANTOS FILHO, Tese de Doutorado, 2020).

Figura 7 - Identificação de proteínas co-purificadas com os homólogos de PABP em *L. infantum*.



No diagrama de Venn podemos observar proteínas co-purificando com alto enriquecimento (em vermelho), proteínas estas relacionadas à possíveis funções das PABPs, como ligação ao mRNA e transporte núcleo-citoplasma, estas por sua vez, mais relacionados aos homólogos de PABP2 e PABP3.

Fonte: Santos Filho (2021).

2.5 SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM EUCARIOTOS

A tradução é um processo complexo e imprescindível para sobrevivência dos seres vivos, uma vez que é etapa essencial para a manutenção e crescimento celular, proliferação e desenvolvimento das células. O controle da expressão gênica durante o processo de tradução é responsável por alterações reversíveis e espaciais nas concentrações celulares das proteínas (GINGRAS et al., 1999; JACKSON et al., 2010). A síntese de proteínas ocorre nos ribossomos e envolve uma grande variedade

de moléculas de RNA e proteínas que atuam nas mais diversas etapas deste processo. Inicialmente, uma molécula de RNA mensageiro é sintetizada a partir de uma das cadeias do DNA codificante para a proteína. No citoplasma, moléculas de cada um dos aminoácidos que entram na composição das proteínas unem-se a seus respectivos RNA transportadores. As subunidades ribossômicas que promovem a síntese associam-se com proteínas auxiliadoras no processo e desta forma, a síntese de proteínas propriamente dita, tem início quando todos os componentes se reúnem para formar um ribossomo funcional. Cada ribossomo percorre então a molécula de mRNA traduzindo a sequência de códons em uma sequência de aminoácidos (SOUZA, 2012; JACKSON et al., 2010).

A tradução pode ser dividida em quatro etapas principais: a iniciação, o alongamento, a terminação e a reciclagem dos ribossomos. Na iniciação, as subunidades ribossômicas, ligadas ao tRNA iniciador são reunidas sobre o códon AUG de iniciação no mRNA. Já na etapa de alongamento, a cadeia polipeptídica é formada através da formação de ligações peptídicas entre os aminoácidos que vão sendo trazidos para o ribossomo pelos tRNAs. Estes, através dos seus anticódons, reconhecem os códons específicos do mRNA à medida que o ribossomo vai se deslocando sob este. A etapa de terminação, ocorre com a chegada do ribossomo ao códon de parada e então ocorre a liberação da proteína. E, por fim, no processo de reciclagem, as subunidades ribossomais são dissociadas e o mRNA e os tRNAs são liberados para iniciarem um novo ciclo de tradução. A síntese completa de uma proteína ocorre em média de 20 a 60 segundos, e o mesmo mRNA pode ser traduzido por inúmeros ribossomos simultaneamente, através de uma distância entre si de aproximadamente 80 nucleotídeos. (LOPES e ROSSO,2007; JACKSON et al., 2010; YÁNGUEZ E NIETO, 2011).

2.5.1 Iniciação da tradução

A etapa de iniciação da tradução possui um alto grau de complexidade, exigindo a presença de um vasto número de proteínas atuando em conjunto para garantir o controle dos processos ao qual estão envolvidas junto ao mRNA. Fatores de iniciação da tradução (eIFs de *eukaryotic Initiation Factors*), proteínas de ligação ao mRNA e o próprio mRNA associam entre si na formação de diferentes complexos para unir as subunidades ribossomais junto aos mRNAs, no códon AUG, para a produção de

proteínas (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009).

O controle da tradução é realizado majoritariamente durante a iniciação, através do controle da montagem das subunidades ribossomais e reconhecimento do códon AUG, através do pareamento com o anticódon carregado pelo tRNA iniciador (Met-tRNA_i). Para que ocorra a formação dos complexos, é necessário a presença de inúmeros eIFs, onde inicialmente o fator eIF2 se associa ao Met-tRNA_i, formando o complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA_i), possibilitando a interação com o fator eIF3, de modo a promover a formação do complexo de pré-iniciação 43S a partir da ligação com a subunidade ribossomal 40S. Este complexo 43S necessita do auxílio do complexo eIF4F, facilitando a ligação do mRNA com o ribossomo. O eIF4F também facilita a movimentação da subunidade 40S e fatores assessórios ao longo da região 5' UTR do mRNA até o códon de iniciação AUG, para a formação do complexo 48S. Nesse ponto o tRNA_i reconhece o códon de iniciação através do pareamento com o anticódon correspondente. Por fim, o complexo ribossomal 48S resultante libera os fatores de iniciação, sinalizando para a subunidade ribossomal 60S que é recrutada formando o ribossomo 80S. Este realiza então a leitura da sequência do mRNA, recrutando aminoácidos que serão unidos para a formação da cadeia polipeptídica (JACKSON et al., 2010; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009; GINGRAS et al., 1999; DEVER; GREEN, 2012; DEVER et al., 2018).

2.5.2 Complexo eIF4F

Os fatores de iniciação da tradução são agrupados através das classes ao qual pertencem, sendo seis descritas atualmente na literatura, eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5, eIF6, relacionados a funções distintas no processo de tradução eucariótico (MERRICK; PAVITT 2018). O grupo de fatores eIF4 são os responsáveis pelo reconhecimento da extremidade 5' dos mRNAs, mediando sua ligação com a subunidade ribossomal 40S e possibilitando se iniciar a tradução posteriormente (HINNEBUSCH, 2014). Em mamíferos, esta classe apresenta cinco componentes: eIF4E responsável pela ligação à estrutura de *cap* 7-metilguanossina (m7G) do mRNA, podendo atuar no transporte do mRNA além da tradução (SONENBERG, 2008); eIF4G, que intermedia as interações ocorridas nos complexos formados durante a iniciação da tradução, sendo que sua interação com a PABP permite a circularização do mRNA na tradução e a tradução preferencial de mRNAs com cauda poli-A (ROSS-

KASCHITZA; ALTMANN, 2020); eIF4A, uma RNA helicase do tipo *DEAD-box*, responsável por rearranjar estruturalmente as moléculas de RNA (SÉNÉCHAL et al., 2021); eIF4B, acessório ao eIF4A auxiliando em sua atividade e interações (BEGLINGER, 2020); e eIF4H, auxiliando nas interações dos complexos formados na iniciação da tradução (ZHANG et al., 2020).

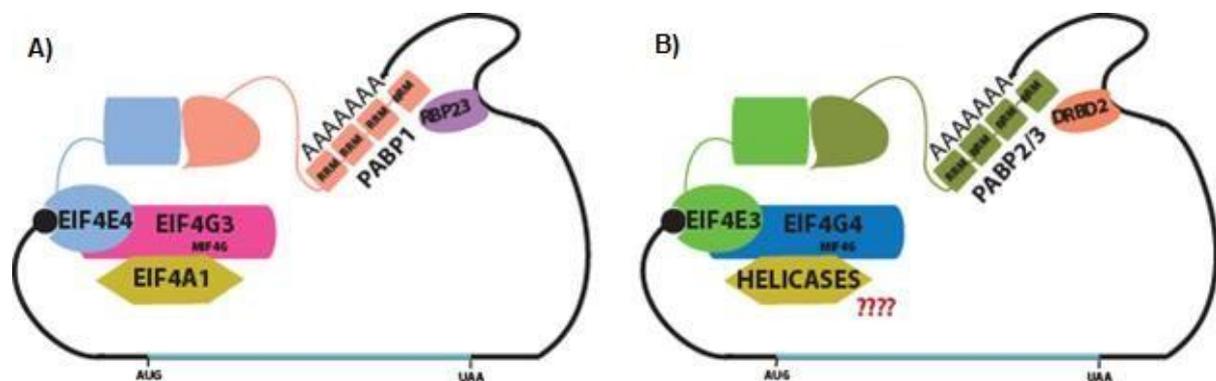
A classe 4 dos fatores de iniciação da tradução conta com a formação de um complexo essencial para o reconhecimento da molécula de RNA, o complexo eIF4F, composto pelas subunidades eIF4E, eIF4G e eIF4A. Juntas estas subunidades são responsáveis por interações críticas, como a associação com o complexo eIF3, através da atuação da subunidade eIF4G (MERRICK; PAVITT 2018). Uma outra associação essencial realizada pelo eIF4F, é com a PABP, dessa forma permitindo circularizar o mRNA, facilitando sua tradução e a reciclagem dos ribossomos (MERRICK, 2015). As interações mediadas pelo eIF4G e o eIF4E, através de diferentes homólogos, atuam de formas diferentes e permitem um maior controle da regulação gênica na iniciação da tradução (GRUNER, et al., 2016). Desta forma os fatores de iniciação pertencentes ao complexo eIF4F interagem de forma direta ou indireta com outras proteínas, de modo a garantir a circularização do mRNA, sinalizando para as subunidades ribossomais e controlando a estabilidade dos transcritos alvos (JACKSON et al., 2010).

2.5.3 Aspectos da iniciação da tradução de tripanosomatídeos

Em tripanosomatídeos, foram identificados seis homólogos de eIF4E (EIF4E1 a EIF4E6) (FREIRE et al., 2014; YOFFE et al., 2006; DHALIA et al., 2005; YOFFE et al., 2004), cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5) (YOFFE et al., 2009; YOFFE et al., 2006; DHALIA et al., 2005) e dois homólogos de eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII) (DHALIA et al., 2006; DHALIA et al., 2005). Nestes organismos, múltiplos complexos do tipo eIF4F foram identificados, baseados em diferentes homólogos de eIF4E e eIF4G que podem ou não incluir o EIF4AI. Dois destes complexos são melhor caracterizados e atuam diretamente na tradução, sendo baseados nas subunidades EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 (FREIRE et al., 2017). Foi observada uma associação específica entre o complexo EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI com a PABP1 (Figura 8), sendo que estes parecem ter uma interação preferencial com um subconjunto específico de mRNAs, aqueles codificantes de proteínas ribossomais (ZOLTNER et

al., 2018; ASSIS et al., 2021). Nesse contexto há uma interação única e direta entre a PABP1 e o EIF4E4, algo não observado em outros organismos, além de uma interação mais fraca entre a PABP1 e o eIF4G3. Outro fato relevante é a fosforilação simultânea da PABP1 e EIF4E4 e que pode estar ligada a regulação da sua função de acordo com o ciclo celular (DE MELO NETO et al., 2016; DE MELO NETO et al., 2018). Já a PABP2 mostrou uma forte interação com o EIF4E3, algo que não se repetiu quando comparado com a PABP1 (XAVIER, Dissertação de Mestrado, 2015).

Figura 8 - Representação de complexos eIF4F na iniciação da tradução em tripanosomatídeos.



A figura resume os diferentes conjuntos de resultados obtidos em *Leishmania* e *T. brucei* que representam uma pequena fração das proteínas co-precipitadas com os homólogos de PABP. **A)** No caso da PABP1, apresenta-se associada aos fatores EIF4E4, EIF4G3 e EIF4A1, além de RBPs que auxiliam no processo de iniciação da tradução, com destaque à RBP23, **B)** Já as PABP2 e PABP3 se associam a um painel bem mais diversos de mRNAs, possivelmente interagindo com os fatores EIF4E3, EIF4G4 e um grupo de RBPs diferentes da PABP1, destacando a DRBD2.

Fonte: Adaptado de Assis et al. (2021).

2.5.4 Regulação da expressão gênica

Proteínas atuantes no processo de iniciação da tradução podem ter uma enorme participação nesse controle da expressão gênica. Dentre estas destacam-se os fatores de iniciação da tradução e as RBPs com destaque para as PABPs. Todas são de alta relevância no processo de síntese proteica, auxiliando no controle da regulação da expressão gênica, como já descrito através de características funcionais atuantes no início da tradução e que precisam ser melhor definidas. Há ainda uma necessidade de um maior entendimento sobre o controle da estabilidade e degradação dos mRNAs, assim como quais proteínas estão atuando nesse processo, de modo a caracterizar melhor seu funcionamento, permitindo entender de forma mais

clara esses alvos e como atuam nesse controle (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; DE MELO NETO et al., 2016).

2.6 CONTEXTO ATUAL DO ESTUDO

Devido às particularidades apresentadas em relação à biologia molecular dos tripanosomatídeos, torna-se fundamental o estudo e entendimento dos eventos pós-transcricionais na regulação de seus genes. Desta forma, este estudo teve início na necessidade de informações mais incisivas sobre a PABP2 de tripanosomatídeos, visto que pouco foi caracterizado sobre esta proteína, principalmente quando comparada a PABP1. Embora houvesse uma descrição quanto às interações realizadas entre as PABPs e os fatores de iniciação da tradução, pouco se sabia sobre proteínas parceiras, como RBPs, relacionadas e o grau de interação e co-precipitação entre elas. Através de resultados de espectrometria de massas foram identificados grupos de mRNAs e proteínas que não estariam relacionados com a PABP1, mas aparentando uma maior similaridade nas populações entre as PABPs 2 e 3 (ZOLTNER et al., 2018; ASSIS et al., 2021; SANTOS FILHO, Tese de Doutorado, 2020).

Havia também uma necessidade de entender os sítios de ligação responsável pelas interações mais importantes. Com isso trabalhos anteriores identificaram resíduos de aminoácidos importantes na PABP2 que seriam responsáveis por interações com fatores de iniciação e RBPs de grande importância na iniciação da tradução, dispostos ao longo da sequência da proteína, desde o RRM1 até a domínio MLLE na região PABC.

Com base no que foi exposto surgiu assim o interesse de se utilizar os mutantes já gerados de PABP2 para melhor caracterizar as interações proteicas associadas à esta proteína. Ao buscar essas respostas, o presente estudo busca então caracterizar de forma mais precisa os parceiros proteicos, como proteínas envolvidas no processamento, transporte e degradação de mRNAs e enzimas regulatórias relacionadas a PABP2, assim como identificar possíveis motivos responsáveis pela interação com essas proteínas e fatores de iniciação da tradução. Desta forma com a necessidade de se conhecer mais sobre a tradução em tripanosomatídeos e buscar entender as funções dos homólogos de PABP e suas interações com o complexo eIF4F, este trabalho possibilitará uma melhor caracterização de aspectos relevantes da biologia molecular dos tripanosomatídeos, garantindo um maior entendimento

sobre mecanismos envolvidos no processo de regulação gênica desses organismos. Os resultados obtidos podem dar alicerce ao desenvolvimento de pequenas moléculas com capacidade de inibir interações importantes identificadas e, conseqüentemente, bloquear a síntese proteica ou eventos importantes do metabolismo de mRNAs desses parasitas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar interações das PABP2 de *Leishmania infantum* com proteínas parceiras, investigando o papel de mutações em diferentes motivos na PABP2 nas interações identificadas e avaliando novos aspectos da iniciação da tradução em tripanosomatídeos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Comparar *in vivo* as interações da PABP2 nativa de *Leishmania infantum* com proteínas parceiras, avaliando o perfil de parceiros identificados com o de resultados prévios descritos para *L. infantum* e *Trypanosoma brucei*.
- 2- Avaliar o impacto de mutações sobre motivos selecionados ao longo da sequência da PABP2 na sua capacidade de realizar interações proteicas *in vivo*.
- 3- Predizer *in silico* da estrutura dos domínios RRM da PABP 2, mapeando os resíduos identificados como importantes para mediar sua interação com diferentes proteínas parceiras, como proteínas de ligação a RNA e fatores de tradução.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR E TRANSFECCÃO DE CÉLULAS DE *L. INFANTUM*

Células de *Leishmania infantum* (cepa: JPCM5) com nocaute de cópia única (SKO - *Single knockout*) para o gene da PABP2 (LINF_350047100) com marcador de resistência à Higromicina, foram mantidas em crescimento logarítmico através de repasses em meio Schneider pH 7,2 com suplementação de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 0,1% Penicilina e Estreptomicina (Sigma-Aldrich) tendo seu crescimento em estufa BOD a 26°C. Estas células, obtidas em trabalhos anteriores (SANTOS FILHO, Tese de Doutorado, 2020), foram transfectadas, com DNA episomal, onde a partir de sua recuperação, o acompanhamento de seu crescimento permitiu a avaliação das linhagens por motilidade, morfologia, densidade celular e viabilidade, realizando repasses a cada 2 ou 3 dias de 1×10^6 de células por mL.

Para realização da transfecção a técnica consistiu na utilização de formas promastigotas de *Leishmania infantum* em fase exponencial, onde $2,5 \times 10^8$ de células foram centrifugadas a 1000g por 5 minutos através de tubos cônicos de 50mL. O sedimento gerado pela centrifugação teve seu sobrenadante removido para a sua ressuspensão em 5mL de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 6 mM glicose e pH 7,05). Em seguida foi feito o descarte e o sedimento ressuspendido em 450 μL de tampão HEPES-NaCl que foi então transferido para cubetas de 0,2 mm contendo 2 μg a 5 μg de DNA contendo também marcador de resistência à Neomicina, enquanto no controle negativo foram repassados apenas o parasita à cubeta. As cubetas foram incubadas no gelo durante 5 minutos para que o conteúdo celular em tampão HEPES-NaCl fosse transferido, em seguida passaram pelo processo de eletroporação no equipamento Gene Pulser Xcell™ system (BioRad), onde foram submetidas individualmente a um pulso de 450 volts e capacitância de 500 μF . O conteúdo de células eletroporadas foi em seguida transferido para garrafas de cultura de 50mL com 5 mL de meio Schneider (Sigma) pH 7.2 e deixados na B.O.D à 26°C por 24 horas para a recuperação. Após essas 24 horas, uma pré-seleção foi realizada adicionando metade da concentração final dos antibióticos adequados, com uma quantidade adicional de 5 mL de meio Schneider às garrafas. Por fim, a seleção final acontece após 24h da pré-seleção, onde é feito a passagem de 1mL da pré-seleção em 9mL de meio Schneider com uso dos

antibióticos em suas concentrações finais, contendo higromicina (0,08mg/mL) e neomicina G418 (0,08 mg/mL). Mantendo as culturas incubadas em B.O.D à 26°C por aproximadamente 15 dias ou até apresentarem crescimento celular que permitisse novos repasses celulares, com observações constantes. A partir da obtenção de um bom crescimento celular (2×10^7 células/mL) foram realizados inóculos para realizar o congelamento dessas linhagens.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL E REALIZAÇÃO DO WESTERN-BLOT

Com intuito de obter os extratos proteicos das diferentes linhagens, foi inicialmente realizada uma expansão celular tendo de início 1×10^6 células por mL de meio, sendo incubadas durante cerca de 48 a 72 horas em estufa BOD 26°C, permitindo que as células pudessem atingir o crescimento exponencial de 2×10^7 células/mL. Cerca de 2×10^8 células foram então centrifugadas por 1000 g durante 5 minutos e posteriormente lavadas em tampão fosfato salino (PBS) à 4°C. Após uma nova centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para gel de SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 µL/mL de 2-mercaptoetanol, pH 6,8) para concentração final de 5×10^5 células/µL, onde 10 µL foram aplicados por poço, resultando em um total de 5×10^6 por poço do gel.

Após a separação das proteínas dos extratos em SDS PAGE 15 %, foi realizada a transferência das mesmas para membrana de *PVDF Immobilion-P* (Merck Millipore). A membrana foi então bloqueada durante uma hora em solução de leite 5% contendo TBS-Tween 20 (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) a temperatura ambiente. Foi feita então a incubação de anticorpos primários anti-Hemaglutinina (Abcam) em proporção de 1:3000, em solução de leite 5% em TBS-Tween-20 durante a noite. Em seguida foram realizadas três lavagens em TBS-Tween-20 por 10 minutos cada, permitindo assim a incubação dos anticorpos secundários (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase) (Jackson) em proporção de 1:10000 em solução de leite 5% em TBS-Tween 20 por mais uma hora, seguida de mais três lavagens com TBS-Tween 20 por 10 minutos cada lavagem. Desta forma, os anticorpos conjugados à peroxidase, permitiram a revelação das bandas reconhecidas por meio de uma reação de quimiluminescência com a adição do *Immobilon Forte Western HRP Substrate* (Merck Millipore) durante 2 minutos, o que permitiu a observação da reação através do equipamento *iBright Imaging Systems* (Thermo Fischer Scientific) com exposições,

que variaram entre 10 segundos e 3 minutos, de acordo com a intensidade das reações.

4.3 PREPARO DE LISADOS CITOPLASMÁTICOS DE *L. INFANTUM* E IMUNOPRECIPITAÇÃO

As diferentes linhagens de *L. infantum* expressando as construções da PABP2 fusionadas ao epítipo marcador HA foram expandidas em triplicata com densidade inicial de 1×10^6 por mL em 30 mL, tendo atingido seu crescimento exponencial entre 48 e 72 horas. Após contagem das células, 1×10^8 foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos, com descarte do sobrenadante e seu sedimento lavado com 1 mL de PBS a 10% do cOmplete™, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche®). Após nova centrifugação, os sedimentos foram lavados em PBS (4°C) e ressuspensos em 800 µL de tampão de lise (20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 75 mM CH₃CO₂K, 4 mM C₄H₆MgO₄, 2 mM de DTT) também suplementado com inibidor de protease (Roche®)]. A obtenção dos lisados citoplasmáticos se deu através da técnica de lise por cavitação utilizando uma bomba de ruptura celular por compressão em nitrogênio gasoso (ParrInstruments®), sendo feita após o material ser incubado à 4°C por 30 minutos. As amostras lisadas foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL, centrifugadas a 12000 g durante 10 minutos, permitindo fazer alíquotas e armazenar à -80°C.

Os ensaios de imunoprecipitação (IP) também foram executados em triplicata com a utilização de microesferas magnéticas anti-HA (Pierce™®). Foram utilizadas as alíquotas obtidas durante o processo de lise celular por cavitação, onde neste ensaio, 250 µL das amostras dos lisados foram incubados com 5 µL das microesferas, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. A incubação ocorreu durante 45 minutos à 4°C e em seguida a solução foi precipitada em estante magnética e o sobrenadante foi alíquotado como depletado. A resina contendo as microesferas, foi lavada três vezes com PBS (4°C) e ressuspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE, onde foram utilizados 10 µL para confirmação por *western blot*, enquanto 30 µL foram armazenados em -80°C.

Para avaliação dos peptídeos co-purificados na imunoprecipitação com as proteínas de estudo, foram utilizados 30µL das amostras obtidas na IP, sendo separados por eletroforese em gel SDS-PAGE a 15% até que o conteúdo deixasse a fase do gel de empacotamento (*stacking*). Desta forma, foi realizada a coloração com

azul de Coomassie Blue 250-R durante 15 minutos sendo descorado, permitindo a excisão das bandas com bisturi de fibra cirúrgica, sendo armazenadas em cerca de 500 μ L de água deionizada ultrapura.

4.4 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

O material das IPs marcadas com epítipo HA foi encaminhado para a análise por espectrometria de massas no núcleo de plataformas de proteômica de Espectrometria de Massa do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR. Nesse local, as amostras passaram por tripsinização e seus polipeptídeos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de espectrometria de massas (LC-MS/MS) no aparelho Thermo Scientific Easy-nLC 1000 Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) acoplado ao espectrômetro LTQ-Orbitrap XL ETD (Thermo Fischer Scientific).

4.5 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para confirmar a especificidade dos ensaios de IP, para cada polipeptídeo, a razão entre a intensidade gerada a partir das IPs usando os extratos que expressam a PABP2 marcada com HA e a intensidade do IP de controle usando um extrato de células não transfectadas foi primeiro determinada. Os logaritmos com base 2 dos valores produzidos foram então calculados para três experimentos independentes realizados com diferentes extratos citoplasmáticos e apenas os polipeptídeos cuja razão média foi $> 1,5$ foram considerados. Os polipeptídeos identificados foram comparados entre os extratos que expressam a PABP2 marcada com HA com células de *L. infantum wild type* (WT) e então classificados com os valores de classificação mais altos de acordo com cada categoria de proteínas encontradas (Adaptado de ASSIS, 2021). Para análise dos mutantes, foi utilizada a maior intensidade obtida da PABP2 dentre as proteínas avaliadas, para ser utilizada como numerador para divisão de todas as intensidades, fazendo com que se obtenha o fator de normalização para padronizar todas as amostras que foi utilizado para multiplicar todos os valores de intensidade obtidos. Após isso, foi obtida a média das intensidades das triplicatas, em seguida sendo feito o cálculo da razão das médias entre da intensidade da proteína selvagem sobre a média de intensidade dos mutantes, permanecendo apenas as razões média $>1,5$, classificados com os valores de classificação mais altos.

4.6 ANÁLISES *IN SILICO*

As sequências da PABP2 implicada no processo de tradução e metabolismo dos mRNAs foram analisadas em busca de possíveis sítios de interação através de alinhamento global no *software* MAFFT (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). As predições das estruturas das proteínas foram realizadas pelo *software* AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>). Após realização das predições e obtenção das modelagens das sequências a serem estudadas, foi realizada um processo de refinamento através dos *softwares* ModRefiner (<https://zhanggroup.org/ModRefiner/>) e GalaxyRefine2 (<https://galaxy.seoklab.org/>) para melhor qualidade das modelagens. Em seguida, as modelagens refinadas foram submetidas a um controle de qualidade no *software* PROCHECK, para identificação de resíduos favoráveis e não favoráveis obtidos, tendo valores acima de 90% de resíduos favoráveis considerado como o ideal para sequência dos experimentos. Com a confirmação das modelagens em níveis favoráveis, foi utilizado o *software* PyMOL (<https://pymol.org/ep>) para realização dos alinhamentos entre as sequências contendo as mutações e as sequências da PABP2 WT, permitindo gerar um valor em RMSD que corresponde a diferença estrutural e atômica entre as sequências comparadas.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

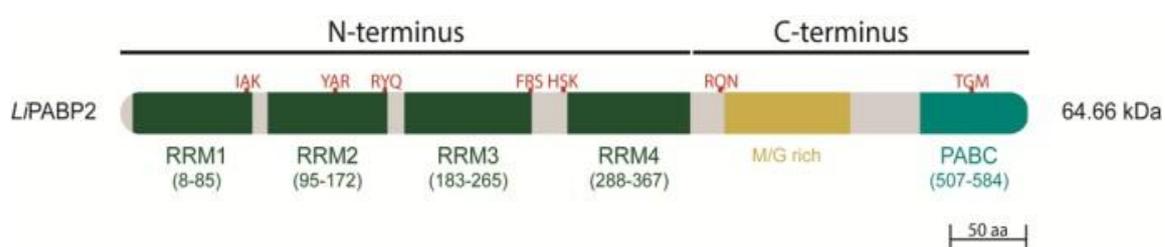
Não houve manipulação de animais experimentais durante a realização deste projeto. Todos os anticorpos empregados já estavam disponíveis ou eram anticorpos comerciais.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DAS MUTAÇÕES REALIZADAS NO GENE DA PABP2 EM TRABALHOS ANTERIORES

Buscando caracterizar melhor as interações realizadas pelos homólogos de PABP, de forma a identificar motivos responsáveis por associação com proteínas parceiras relevantes para o funcionamento dessas PABPs, foram obtidas construções plasmidiais geradas em trabalhos anteriores, que permitiam a expressão da PABP2 fusionada ao epítipo HA em *L. infantum*. Essas construções possuíam trincas selecionadas de aminoácidos mutagenizadas (substituídas por três resíduos de alanina) localizadas em regiões avaliadas como de possível importância na interação com proteínas parceiras das PABPs: Ile-Ala-Lis (80IAK82), encontrada no RRM1; Tyr-Ala-Arg (137YAR139) e Arg-Tyr-Gln (169RYQ171), dispostas no RRM2; Phe-Arg-Ser (263FRS265), no RRM3; His-Ser-Lis (284HSK286), vista no RRM4; Arg-Gln-Asn (385RQN387), presente na região *linker* e The-Gly-Met (547TGM549) observada na região PABC (Figura 9) (MERLO, Tese de Doutorado, 2018; SANTOS FILHO, Tese de Doutorado, 2020).

Figura 9 - Motivos mutagenizados ao longo da sequência proteica de ~584aa da PABP2 de *L. infantum*.



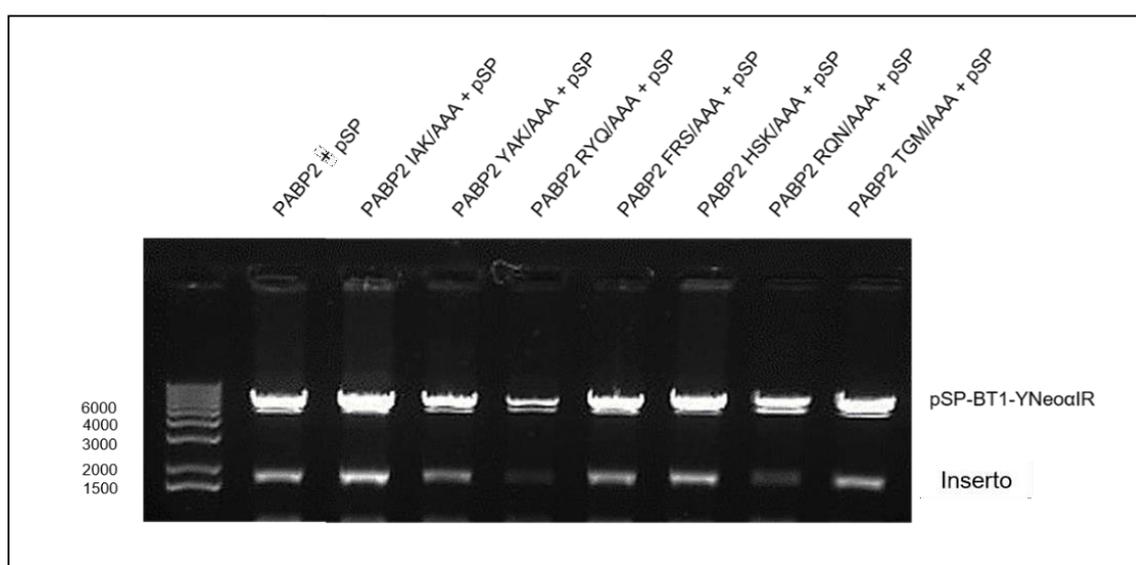
Trincas de aminoácidos (em vermelho) encontradas na sequência da PABP2 que poderiam estar relacionados com interações importantes na iniciação da tradução.
Fonte: Santos Filho (2021).

6.1.1 Confirmação da presença dos insertos nas construções plasmidiais

Em um primeiro momento, após obtenção das construções plasmidiais, foi realizada a confirmação da sua integridade através de eletroforese em gel de agarose. Em seguida foi realizada uma digestão das construções para verificar a presença da

PABP e do vetor de expressão pSP-BT1-YNeo α IR, com aproximadamente 2 μ g de DNA, utilizando as enzimas BamHI e HindIII (Figura 10).

Figura 10 - Digestão das construções selvagens e mutantes do gene da PABP2 em pSP-BT1-YNeo α IR.



Através da separação em gel de eletroforese, foi possível identificar o vetor de expressão apresentando cerca de 6500pb e a PABP2 no tamanho esperado de 1758pb.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após confirmar que não houve degradação nas construções plasmidiais e identificar os dois homólogos de PABP, assim como a presença do vetor de expressão, o material foi enviado para plataforma de sequenciamento, para comprovar a inserção das mutações, estas tendo sido confirmadas com sucesso (Figura 11).

Figura 11 - Alinhamento do sequenciamento das construções mutantes comparadas com a sequência do gene selvagem.

A)	PABP2 IAK-PABP2	DAEKALDQAGSKLGSRYLR IAKI QRDPSKRRSGVNNILVKKLPKSVDTYALKEMFSKFG DAEKALDQAGSKLGSRYLR AAA IQRDPSKRRSGVNNILVKKLPKSVDTYALKEMFSKFG *****
B)	PABP2 YAR-PABP2	LTAIGLACDEKGESRGYAR IS FEREE SAVDAVREMDGMEMDGOAIVVERYQAQHRDELLK LTAIGLACDEKGESRG AAA ISFEREE SAVDAVREMDGMEMDGOAIVVERYQAQHRDELLK *****
C)	PABP2 RYQ-PABP2	LTAIGLACDEKGESRGYAR IS FEREE SAVDAVREMDGMEMDGOAIV VE RYQAQHRDELLK LTAIGLACDEKGESRGYAR IS FEREE SAVDAVREMDGMEMDGOAIV VE RYQAQHRDELLK *****
D)	PABP2 FRS-PABP2	VEELNGKECEISKAGSPLDVSR FRS REERQRDRERQRRERAQQHNSKYPNLYVKGFD DTVT VEELNGKECEISKAGSPLDVSR AAA REERQRDRERQRRERAQQHNSKYPNLYVKGFD DTVT *****
E)	PABP2 HSK-PABP2	VEELNGKECEISKAGSPLDVSR FRS REERQRDRERQRRERAQQHNSKYPNLYVKGFD DTVT VEELNGKECEISKAGSPLDVSR FRS REERQRDRERQRRERAQQ AAA YPNLYVKGFD DTVT *****
F)	PABP2 RQN-PABP2	FVTYALRKDARRQN LEERS KQFRVRQNPMPGGPGMGAMPPIGFMPQMFNNVNMFPMNPRV FVTYALRKDAR AAA LEERSKQFRVRQNPMPGGPGMGAMPPIGFMPQMFNNVNMFPMNPRV *****
G)	PABP2 TGM-PABP2	SVAAKITGMLLEMDNSEILNMLDSPTMLDSKIAEAQDVLNRHMSV SVAAKI AAA LEMDNSEILNMLDSPTMLDSKIAEAQDVLNRHMSV *****

Observa-se a troca da trinca de aminoácidos por três alaninas dentro das caixas em vermelho, nas posições correspondentes, **A)** 80IAK/AAA82, **B)** 137YAR/AAA139, **C)** 169RYQ/AAA171, **D)** 263FRS/AAA265, **E)** 284HSK/AAA286, **F)** 385RQN/AAA387, **G)** 547TGM/AAA549.

Fonte: Elaborado pelo autor.

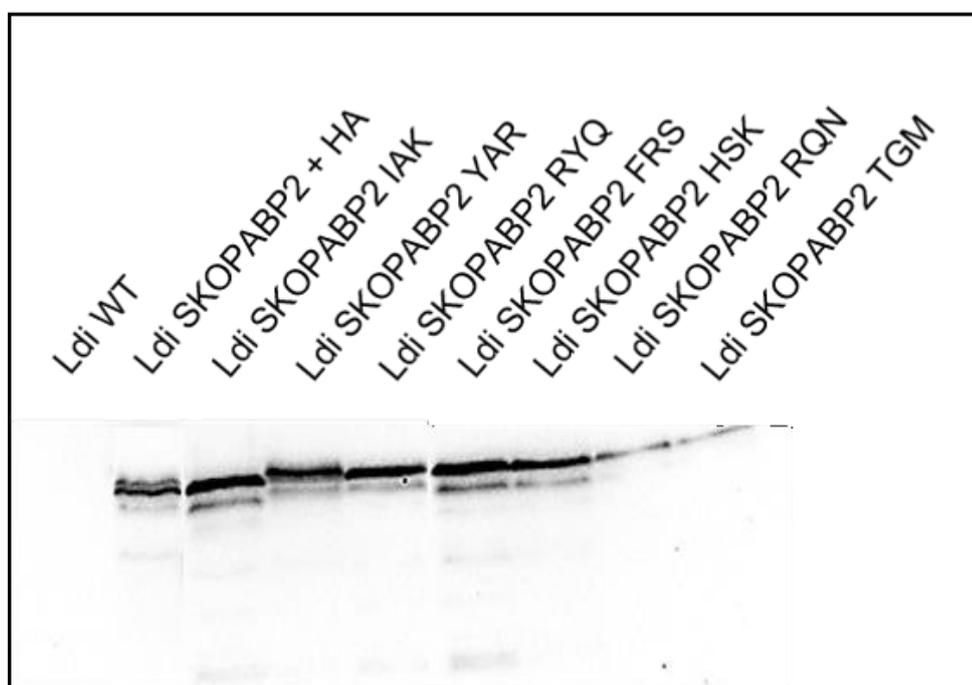
6.2 ENSAIOS DE TRANSFECCÃO

Trabalhos anteriores observaram a essencialidade do gene da PABP2 para a sobrevivência de células de *L. infantum* através da deleção das duas cópias do gene da PABP2, desta forma foi também realizado a deleção de uma única cópia do gene da PABP2 para posteriormente avaliar a capacidade de complementação de proteínas mutantes (MERLO, Tese de Doutorado, 2018). A partir dessas linhagens, foi realizada transfeccões em células de *L. infantum* no intuito de adicionar as mutações previamente citadas à sequência da PABP2 nas linhagens com deleção de uma cópia do gene da PABP2, assim como integrar o marcador de resistência à Neomicina e o epítipo HA que nos permite confirmar a eficácia da transfeccão e servir como alvo nos ensaios posteriores. Essas transfeccões foram realizadas no intuito de avaliar *in vivo* as interações realizadas por cada motivo mutado.

6.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MUTANTES

Para avaliar a expressão das proteínas mutantes, foram realizados extratos celulares totais das células de *L. infantum* contendo a proteína WT e os mutantes, sendo observados através de ensaios de *western blot*. Desta forma, puderam ser identificadas bandas coerentes com o tamanho predito para a PABP2 de 64 kiloDaltons (kDa), através da incubação com anticorpo anti-HA (Figura 12).

Figura 12 - Extrato total expressando proteínas mutantes em linhagens SKO de PABP2 de *L. infantum* com anti-HA.

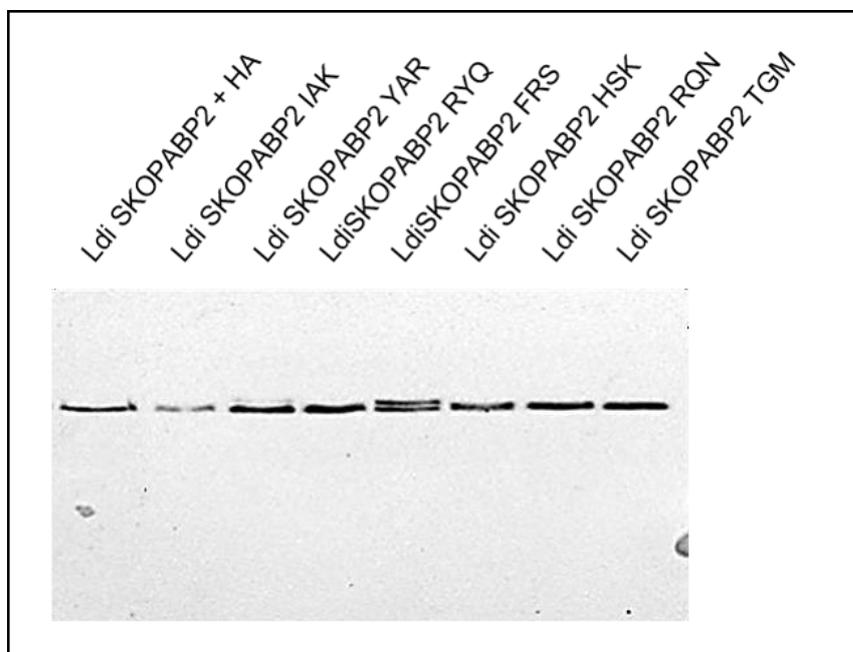


Através da revelação dos ensaios de *western blot* com anticorpo anti-HA, foi evidenciado a expressão das bandas de 64kDa correspondendo à altura da banda da PABP2.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ainda no intuito de confirmar a expressão da PABP2 pelas células de *L. infantum* foi realizado um outro ensaio de *western blot* utilizando os extratos totais incubados com soro anti-PABP2 (Figura 13). O ensaio permitiu confirmar a expressão da PABP2.

Figura 13 - Extrato total expressando proteínas mutantes em linhagens SKO de PABP2 de *L. infantum* soro anti-PABP2



A imagem revela a expressão da proteína PABP2 em todas as linhagens SKO, com bandas de tamanho de 64kDa referentes à altura da PABP2 confirmando sua expressão.

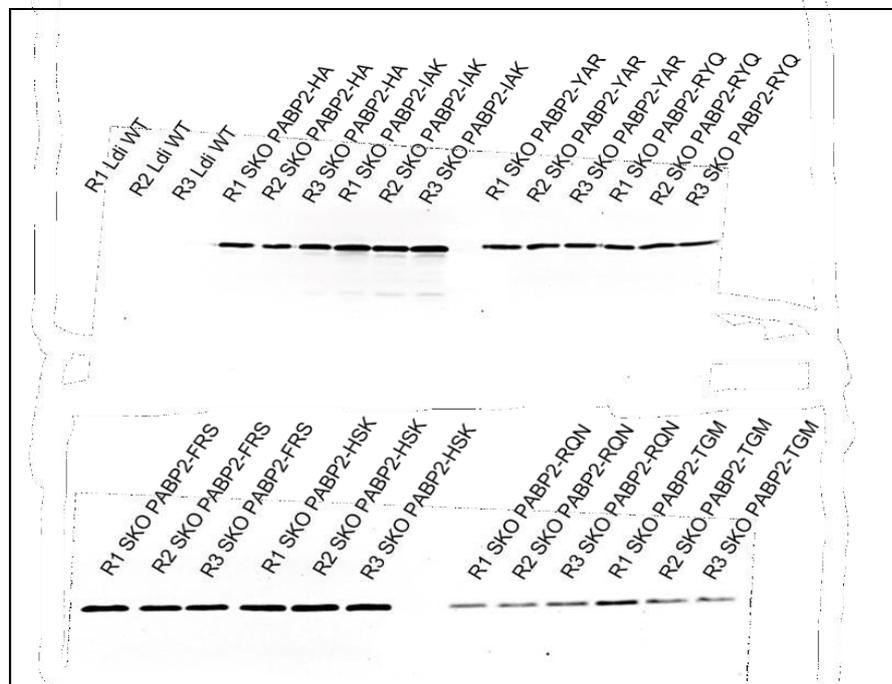
Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3.1 Ensaio de imunoprecipitação

Ao confirmar a expressão das construções selvagens e mutantes da PABP2, foram realizados lisados celulares em triplicata através do processo de cavitação. Em seguida, foram obtidas alíquotas de cada lisado que foram submetidas ao ensaio de *western blot* para confirmação da presença e integridade das proteínas recombinantes fusionadas ao epítipo HA (Figura 14).

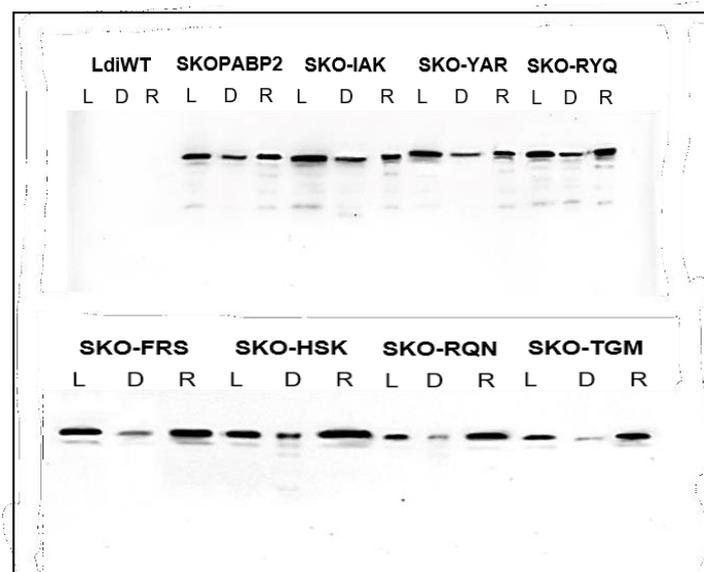
Com a confirmação da expressão e presença das proteínas recombinantes nos lisados, foi possível utilizar as amostras dos lisados celulares para os ensaios de imunoprecipitação, também em triplicata. Desta forma, através do uso de microesferas magnéticas anti-HA, foi possível identificar a presença das proteínas recombinantes a partir do ensaio de imunoprecipitação (Figura 15).

Figura 14 - Lisados celulares das proteínas recombinantes expressas em células de *L. infantum*.



Western blot realizado sendo possível observar a presença das proteínas recombinantes fusionadas ao epítipo HA, por incubação com anti-HA. R1= Réplica 1; R2= Réplica 2; R3= Réplica 3.
Fonte: Elaborado pelo autor.

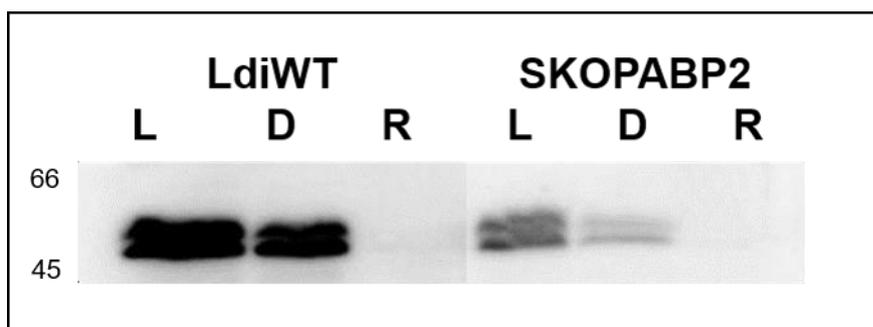
Figura 15 - Ensaio de imunoprecipitação das proteínas recombinantes da PABP2 de *L. infantum*.



Western blot realizado para separação das linhagens selvagens e mutantes de PABP2 incubadas com anti-HA, permitindo a visualização através de quimioluminescência. L= Lisado; D= Depletado; R= Resina obtida após ensaio de imunoprecipitação.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Para validação das IPs, foram realizados *western-blot*s com fatores de tradução selecionados e com disponibilidade de anticorpos no laboratório, para confirmar que não havia ligação inespecífica com as microesferas magnéticas anti-HA (Figura 16 e Figura 17).

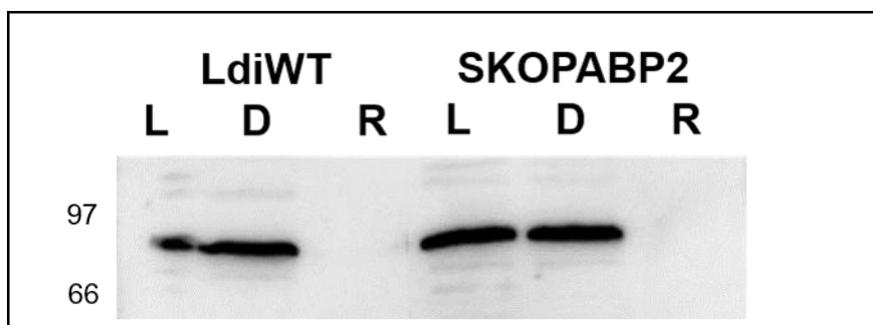
Figura 16 - Validação dos ensaios de imunoprecipitação entre a PABP2 e o eIF4E4.



É possível observar a presença do fator de iniciação E4 (~50kDa) no lisado (L) e depletado (D), mas ausência na resina (R), demonstrando que não houve ligação inespecífica com as microesferas magnéticas anti-HA.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Validação dos ensaios de imunoprecipitação entre a PABP2 e o eIF4G4.



O *western blot* realizado permitiu identificar a presença do fator de iniciação G4 (~85kDa) no lisado (L) e depletado (D), mas ausência na resina (R), demonstrando que não houve ligação inespecífica com as microesferas magnéticas anti-HA.

Fonte: Elaborado pelo autor.

6.4 ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

6.4.1 Análise comparativa entre a PABP2 marcada com HA e a *L. infantum*

Após realização e obtenção das réplicas através dos ensaios de imunoprecipitação e suas respectivas validações, alíquotas foram submetidas à separação em gel de poliacrilamida, sendo realizado a excisão das bandas correspondentes às proteínas recombinantes e enviadas para colaboradores na

plataforma de espectrometria de massas no Instituto Carlos Chagas no Paraná.

Uma primeira análise foi realizada a partir dos dados da espectrometria, permitindo identificar as principais proteínas que estariam co-precipitando com a SKO-PABP2-HA (Quadro 2).

Embora já houvesse dados de espectrometria de massas da PABP2, realizado em trabalhos anteriores do grupo, novos dados obtidos da proteína selvagem eram necessários para comparação com os mutantes, o que nos permitiu a identificação de proteínas parceiras altamente relevantes e que não foram encontradas em resultados anteriores, que inferem funções designadas à PABP2. A co-precipitação com proteínas atuantes em transporte do mRNA, como as Importinas β 1 e α , a NTF2 que atua no transporte nuclear, e a DRBD2 que pode estar associada ao controle de qualidade e exportação do mRNA, corroboram com achados que indicam a atuação da PABP2 citoplasmática, também no núcleo celular. Embora suas razões tenham sido baixas quando comparada ao controle negativo, mostraram altos níveis de intensidade de co-precipitação com a PABP2, inferindo uma possível interação específica entre essas proteínas.

Diversos fatores de iniciação da tradução foram encontrados, em sua maioria subunidades pertencentes ao complexo eIF3, além da helicase EIF4A1, inferindo sua importância no processo da tradução e na formação dos complexos responsáveis por dar início à tradução. Também foi observada uma maior intensidade de co-precipitação da PABP2 com a PABP3, comparado com a PABP1 sugerindo ainda mais a relação de proteínas parceiras semelhantes entre a PABP2 e a PABP3 e funções relativamente compartilhadas. A aparição dos homólogos de PABP mesmo que com um alto grau de enriquecimento, demonstra a importância deles nas interações responsáveis por iniciar o processo de tradução em *Leishmania*.

Outros grupos de proteínas co-precipitaram com a PABP2, algumas possuindo domínio RRM, como as RBPs 1 e 2 mitocondrial, uma proteína apenas conhecida como RBP e outra com três domínios RRM, a TRRM1. Duas proteínas com motivo pumílio se destacaram com alto grau de enriquecimento ao não ser visualizada no controle negativo, foi o caso da PUF2 e PUF6, e uma variedade de proteínas com domínio *zinc finger*, ZC3H31, ZC3H34, ZC3H39, ZC3H40 e ZC3H41.

Quadro 2 - Principais proteínas co-precipitadas com a SKO-PABP2-HA em *L. infantum*.

Nome	TriTrypDB ID	Média de intensidade	Razão>1,5
RBP (RRM)	LINF_180010900	6,27E+07	Infinito
ZC3H31**	LINF_360013000	4,65E+07	Infinito
PUF 2**	LINF_180019600	7,53E+07	Infinito
PUF 6	LINF_330019100	6,73E+07	Infinito
ZC3H40	LINF_190007900	4,26E+07	48,04
ZC3H39	LINF_190007800	8,92E+07	30,82
EIF3E**	LINF_280029900	3,74E+07	21,78
PABP2	LINF_350047100	1,49E+10	10,46
ZC3H34	LINF_310005700	7,52E+07	10,06
REMC5	LINF_310012100	3,35E+07	9,03
Sm-D2**	LINF_330042000	3,35E+07	7,30
EIF3I**	LINF_360047700	2,01E+08	5,19
ZC3H41	LINF_270019700	2,45E+09	4,92
NTF2	LINF_210009700	9,90E+08	4,79
EIF3B	LINF_170020200	5,97E+07	4,74
PABP3	LINF_250005800	1,03E+09	4,49
EIF3C**	LINF_360081900	9,24E+07	4,24
RBP42**	LINF_300036500	1,25E+08	4,08
EIF3L	LINF_360007700	1,26E+08	4,04
RBP1 Mitocondrial	LINF_270017500	4,62E+08	3,78
TRRM1	LINF_270028100	1,55E+08	3,47
RBP2 Mitocondrial	LINF_090018500	5,93E+08	3,39
UBP2**	LINF_250010200	1,18E+08	3,20
DRBD2	LINF_350027200	1,38E+09	2,62
PABP1	LINF_350055900	5,31E+08	2,31
EIF4AI**	LINF_320009100	6,95E+09	2,29
Importina β 1**	LINF_340010100	4,37E+07	1,84
Importina α **	LINF_300016800	7,65E+07	1,61

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: * O quadro consta com 28 proteínas de um total de 194, selecionadas de forma arbitrária dentre as que foram vistas co-precipitando com a SKO-PABP2-HA obtidas em triplicata pelos ensaios de imunoprecipitação. Foi utilizado uma razão maior que 1,5 vezes em relação ao controle negativo, identificando apenas as médias de intensidade 1000 vezes menor que a mais alta. ** Proteínas que não foram encontradas a partir da espectrometria de massas realizada por Santos Filho, 2020.

6.4.2 Análise comparativa entre as proteínas mutantes e a PABP2 marcados com HA

Uma segunda análise foi realizada a partir dos dados de espectrometria de massas, agora analisando os mutantes da PABP2, visando identificar proteínas que deixaram de co-precipitar com a PABP2 devido às mutações inseridas. Desta forma, através do uso do banco de dados TriTryp foram identificadas proteínas atuantes na tradução, transcrição, transporte, com atividade catalítica, proteínas relacionadas ao desenvolvimento do flagelo, proteínas ribossomais, quinases e fosfatases, além de proteínas com funções ainda não descritas na literatura, dadas como hipotéticas (Quadro 3).

Quadro 3 – Relação de proteínas que diminuíram o grau de co-purificação com os mutantes da PABP2 em *L. infantum* com razão >1,5

	IAK	YAR	RYQ	FRS	HSK	RQN	TGM
Tradução	44	5	1	4	13	5	20
Transcrição	13	0	0	0	0	4	3
Transporte e flagelo	16	0	0	2	5	6	5
Ribossomais	63	2	2	13	13	13	21
Quinases e fosfatases	17	4	0	6	6	6	9
Atividade catalítica	100	4	2	4	33	22	44
Hipotéticas	20	4	0	2	4	5	10
Outras	54	7	1	5	8	7	17
Total	327	26	6	36	82	68	129

Fonte: Elaborado pelo autor

A partir desses achados, foram analisadas as proteínas pertencentes a alguns desses grupos citados no quadro 2 e avaliadas as razões encontradas para cada mutante. Dessa forma, foram encontradas outras RBPs com ação na tradução e transcrição, que diminuíram seu grau de interação com a PABP através dos mutantes, com destaque para os demais homólogos de PABP, 1 e 3, proteínas com domínios *zinc finger*, ALBA, pumílio e RRM, além de algumas RBPs mitocondriais (Figura18).

Essas proteínas estão associadas à processos como a transcrição e tradução, atuando diretamente na regulação da expressão gênica dos tripanosomatídeos.

Assim como as RBPs, proteínas pertencentes ao grupo dos fatores de iniciação da tradução foram encontradas deixando de co-purificar com alguns dos mutantes, algumas referente ao complexo eIF3, como o EIF3B, EIF3C, EIF3E, EIF3I e EIF3L, assim como um dos complexos eIF4F de tripanosomatídeos, destacando o EIF4G4 responsável por mediar as interações na iniciação da tradução. Ainda se observou subunidades do complexo eIF2 além dos EIF5 e EIF6 (Figura 19).

Figura 18 - Razões de enriquecimento comparativa para as RBPs que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em *L. infantum*.

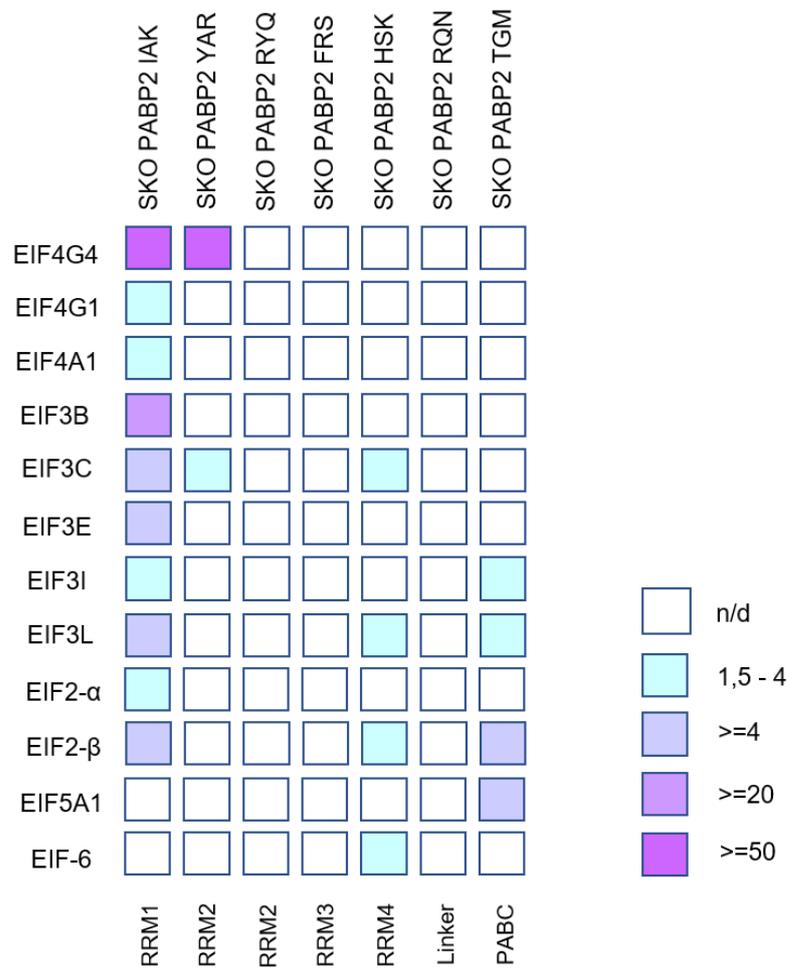


Análise comparativa dos dados obtidos por espectrometria de massas a partir das imunoprecipitações com os mutantes da PABP2. Identificando as RBPs que apresentaram queda de co-precipitação >1,5 na comparação com a proteína selvagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Cores mais intensas representam uma maior queda na co-precipitação das proteínas.

Figura 19 - Razões de enriquecimento comparativa para os eIFs que diminuiriam sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em *L. infantum*.



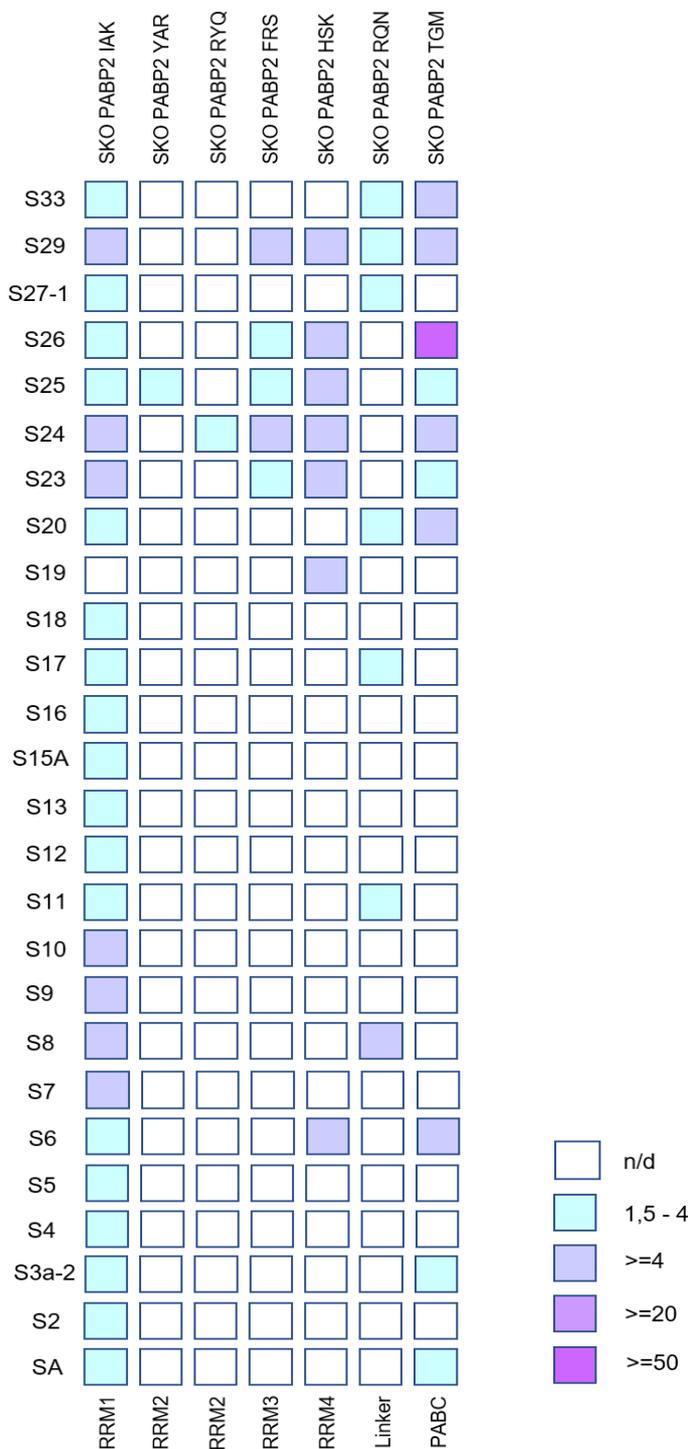
Análise comparativa dos dados obtidos por espectrometria de massas a partir das imunoprecipitações com os mutantes da PABP2. Identificando os fatores de iniciação da tradução que apresentaram queda de co-precipitação >1,5 na comparação com a proteína selvagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Cores mais intensas representam uma maior queda na co-precipitação das proteínas.

Outro grupo de proteínas que despertou a atenção, foram as ribossomais, com destaque para aquelas relacionadas a subunidade ribossomal 40S, que em sua maioria apareceu afetada pela mutação no motivo IAK e nos motivos relacionados ao RRM3, RRM4 e a porção C-terminal (Figura 20).

Figura 20 - Razões de enriquecimento comparativa para as proteínas ribossomais da subunidade 40S que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em *L. infantum*.



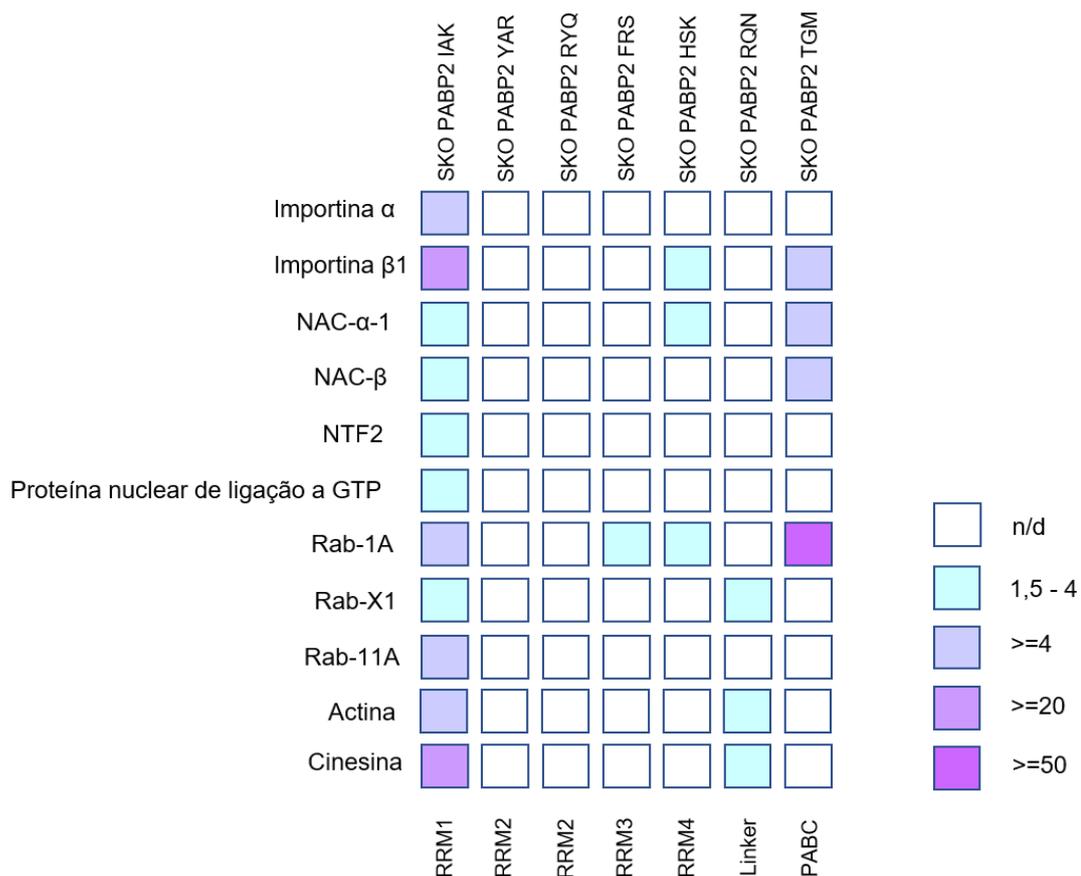
Análise comparativa dos dados obtidos por espectrometria de massas a partir das imunoprecipitações com os mutantes da PABP2. Identificando as proteínas ribossomais atreladas a subunidade ribossomal menor que apresentaram queda de co-precipitação >1,5 na comparação com a proteína selvagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Cores mais intensas representam uma maior queda na co-precipitação das proteínas.

Ainda puderam ser identificadas proteínas relacionadas ao transporte, uma vez que a PABP2 já foi vista no núcleo celular, ela poderia realizar funções de transporte entre o núcleo e o citoplasma celular. Dentre essas, destaca-se algumas importinas, a proteína NTF2 e uma proteína nuclear de ligação ao GTP, que atuam no transporte núcleo-citoplasma, proteínas da família Rab atuantes no transporte membranar, as NACs que são responsáveis por direcionar os polipeptídeos que emergem dos ribossomos e proteínas de transporte de microtúbulos, como a actina e cinesina (Figura 21).

Figura 21 - Razões de enriquecimento comparativa para as proteínas de transporte celular que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em *L. infantum*.



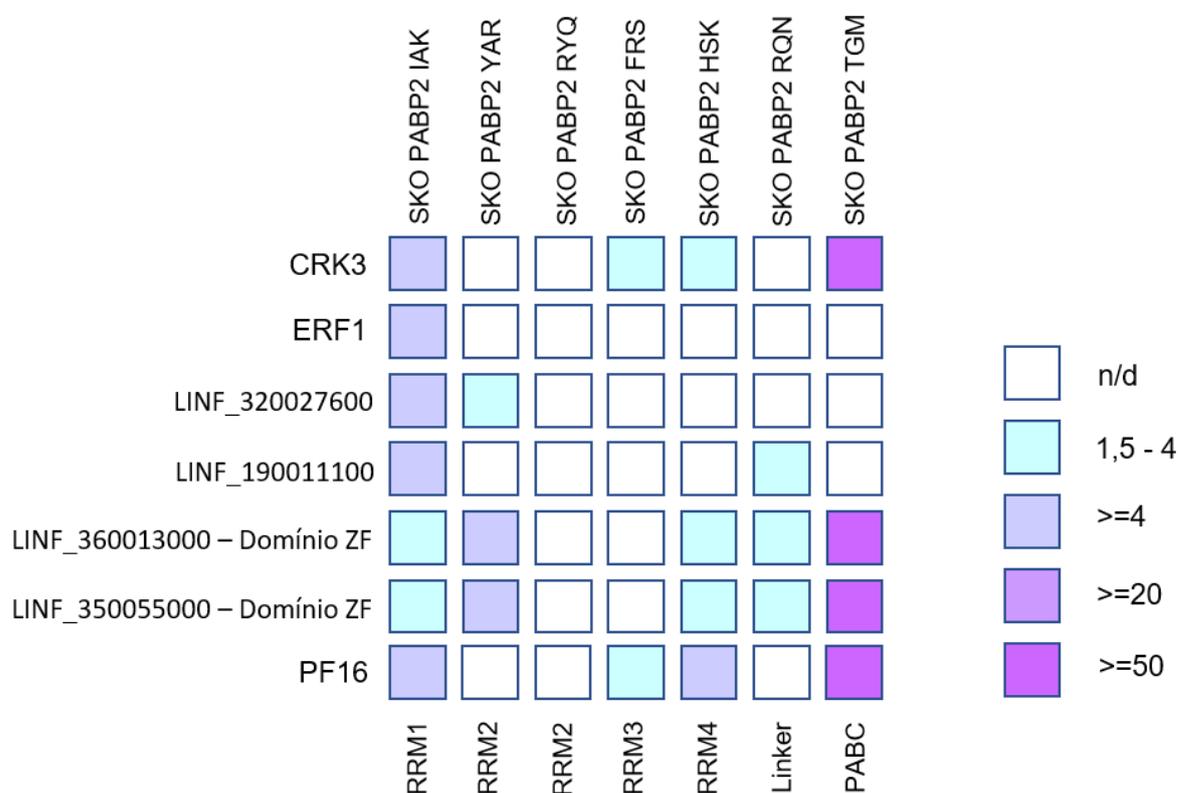
Análise comparativa dos dados obtidos por espectrometria de massas a partir das imunoprecipitações com os mutantes da PABP2. Identificando as proteínas com ação de transporte que apresentaram queda de co-precipitação $>1,5$ na comparação com a proteína selvagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Cores mais intensas representam uma maior queda na co-precipitação das proteínas.

Ao mesmo tempo, proteínas com ações mais diversas e algumas ainda não caracterizadas, chamaram a atenção por apresentar um grau de enriquecimento alto. Destacando a proteína CRK3 responsável pela fosforilação de proteínas, a ERF1 que atua no término da síntese proteica, a PF16 que é uma proteína flagelar e proteínas não descritas, sendo duas delas com domínio *zinc finger* e outras duas sem descrição aparente (Figura 22).

Figura 22 - Razões de enriquecimento comparativa para proteínas diversas que diminuíram sua interação com a PABP2 através de diversas mutações marcadas com HA em *L. infantum*.



Análise comparativa dos dados obtidos por espectrometria de massas a partir das imunoprecipitações com os mutantes da PABP2. Identificando proteínas que chamaram atenção com funções distintas das já apresentadas que apresentaram queda de co-precipitação $>1,5$ na comparação com a proteína selvagem.

Fonte: Elaborado pelo autor.

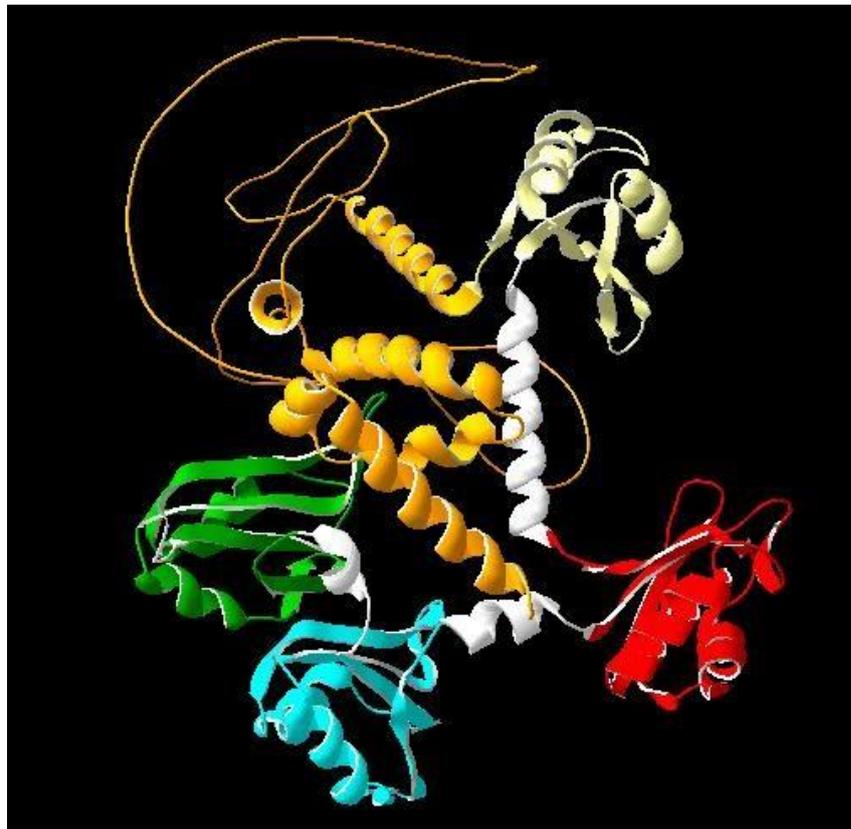
Nota: Cores mais intensas representam uma maior queda na co-precipitação das proteínas.

6.5 MODELAGEM *IN-SILICO* DA PABP2 DE *L. INFANTUM*

Através da utilização do *software* Alphafold, foram realizadas modelagens da PABP2 e suas frações contendo os RRM1 e 2, RRM3 e 4 além da região C-

terminal, contendo a região *linker* e a PABC, ainda foi utilizado o programa UCLA-DOE LAB – SAVES v.6.0 para medir a qualidade das predições, garantindo uma maior confiabilidade nos resultados obtidos. Ainda foram feitos refinamentos nas predições das sequências através dos *softwares* ModRefiner e GalaxyRefiner2 permitindo melhorar os resultados e tornar a modelagem mais correta. Desta forma puderam ser identificados parâmetros estruturais da proteína e como as mutações afetam cada região estruturalmente, trazendo de forma pioneira um modelo referente a PABP2 completa e seus domínios, onde inicialmente foi realizada a predição da sequência da PABP2 de *L. infantum* completa, identificando os domínios RRM1 e a porção C-terminal (Figura 23).

Figura 23 - Modelagem da sequência da PABP2 de *L. infantum*.

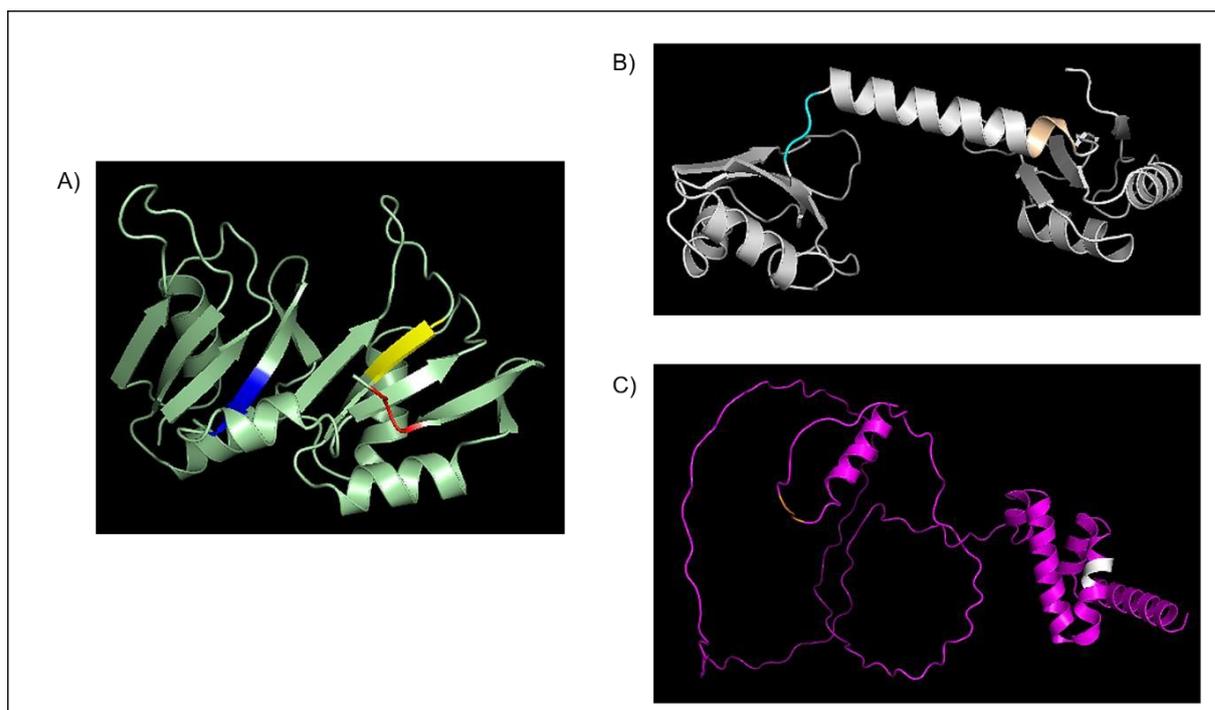


Representação da estrutura da PABP2 de *L. infantum*. Destacados o RRM1 em verde, RRM2 em azul claro, RRM3 em vermelho, RRM4 em amarelo e a porção C-terminal em laranja.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida foram realizadas predições separadas, dos RRM1 e 2, RRM3 e 4 e da porção C-terminal identificando os motivos mutados (Figura 24). A partir disso, foram realizados alinhamentos das sequências utilizando o *software* PyMOL, comparando os domínios da PABP2 WT com as sequências contendo cada mutação

e obtido um coeficiente (Tabela 2) que permite identificar quaisquer alterações conformacionais na estrutura que possa vir a permitir alterações funcionais ou mudanças nas interações realizadas pela proteína a partir desses motivos (Figura 25).

Figura 24 - Modelagem dos domínios RRMs e porção C-terminal da PABP2 de *L. infantum*.

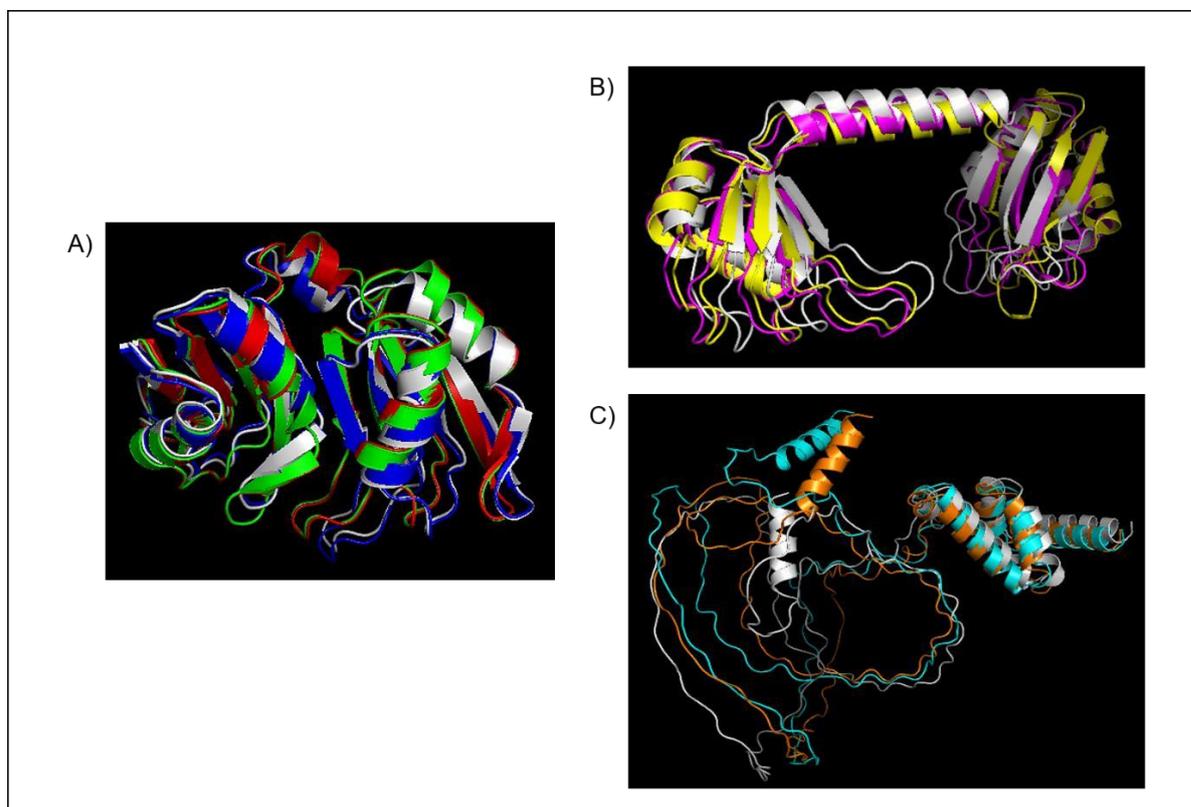


A) RMM 1 + 2 em verde, destacando as regiões contendo as mutações nesses domínios, 80IAK/AAA82 em azul escuro, 137YAR/AAA139 em amarelo e 169RYQ/AAA171 em vermelho. **B)** RRM 3 + 4 em cinza, destacando os motivos mutados 263FRS/AAA265 em azul claro e 284HSK/AAA286 em laranja claro. **C)** C-terminal em rosa, destacando os motivos mutados 385RQN/AAA387 em laranja e 547TGM/AAA549 em branco.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a obtenção do alinhamento no *software*, são obtidos valores que demonstram diferenças entre as sequências mutadas comparadas com a sequência original da proteína. A partir desses valores é possível identificar mudanças conformacionais na proteína a partir das mutações avaliadas, através do número de átomos e como estão estruturados na formação da proteína, tendo sido obtido o menor valor no mutante 169RYQ/AAA171 de 0.775Å e o maior valor no mutante 547TGM/AAA549 de 5.495Å (Tabela 1).

Figura 25 - Alinhamento entre a linhagem selvagem da PABP2 com as sequências contendo as respectivas mutações estudadas em *L. infantum*.



A) RRM 1 + 2 WT em cinza, RRM 1 + 2 com a mutação no IAK em vermelho, RRM 1 + 2 contendo a mutação no YAR em verde, RRM 1 + 2 com a mutação no RYQ em azul escuro. B) RRM 3 + 4 WT em cinza, RRM 3 + 4 contendo a mutação no motivo FRS em amarelo, RRM 3 + 4 contendo a mutação no HSK em rosa. C) C-terminal WT em cinza, C-terminal contendo a mutação no motivo RQN em azul claro, C-terminal com a mutação no TGM em laranja.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1 - Valores de RMSD e fator de qualidade das sequências contendo as mutações comparadas a sequência da PABP2 WT de *L. infantum*.

Regiões mutadas	Valor de RMSD*	Média do fator de qualidade
RRM 1 + 2 IAK/AAA	2.165Å	97,2%
RRM 1 + 2 YAR/AAA	2.124Å	98,6%
RRM 1 + 2 RYQ/AAA	0.775Å	97,9%
RRM 3 + 4 FRS/AAA	4.052Å	93,2%
RRM 3 + 4 HSK/AAA	2.669Å	92,2%
C-terminal RQN/AAA	5.198Å	86,7%
C-terminal TGM/AAA	5.495Å	86,3%

Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: *RMSD é o desvio quadrático médio das posições atômicas que permitem identificar alterações estruturais que diferem uma estrutura da outra, valores >1 significam diferenças significativas e <1 demonstra sequências semelhantes entre si.

7 DISCUSSÃO

Os tripanosomatídeos apresentam peculiaridades moleculares que os diferem dos demais eucariotos, o que permite que sua regulação gênica ocorra majoritariamente pós-transcricional através do controle da estabilidade e degradação dos mRNAs, assim como a iniciação da tradução (FREIRE et al., 2017). Uma das principais proteínas potencialmente responsáveis por garantir esse controle da regulação gênica, é a PABP, permitindo realizar interações que irão garantir a eficácia do processo de iniciação da tradução (DERRY et al., 2006). Entre seus homólogos, a PABP2 de tripanosomatídeos ainda não possui uma caracterização bem definida sobre suas interações e proteínas associadas, necessitando maiores estudos para melhor identificar possíveis funções que estariam relacionadas a PABP2.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar de forma mais ampla e precisa as interações ao qual o homólogo de PABP2 de *L. infantum* ligado ao epítipo HA, está relacionado, através das diversas mutações ao longo de sua sequência, permitindo avaliar a importância de cada região e grupos de proteínas correlacionados a elas através de análises por espectrometria de massas realizadas após ensaios de imunoprecipitação com microesferas magnéticas anti-HA. Assim, puderam ser identificados parceiros proteicos e resíduos importantes que podem mediar interações de grande importância no processo da iniciação da tradução e em outros processos associados ao metabolismo dos mRNAs em tripanosomatídeos.

7.1 AVALIAÇÃO DE RBPs ASSOCIADAS A PABP2 DE *L. INFANTUM*

Os experimentos realizados permitiram a identificação de uma grande variedade de RBPs que estariam associadas a PABP2, mas que a partir da mutação em resíduos importantes, reduziram seus níveis de interação, seja direta ou indiretamente. Proteínas com domínio *zinc finger* aparecem com sua interação reduzida com alguns dos motivos mutados, sendo estas descritas responsáveis por regular os níveis de degradação do mRNA (KRAMER; CARRINGTON, 2011), fazendo parte desse grupo temos a ZC3H41 presente com redução na co-precipitação, sendo esta proteína semelhante a uma helicase e de extrema importância no recrutamento das PABPs como observado em estudos realizados em *Trypanosoma* sp. (SINGH et al., 2014; KLEIN et al., 2015). Ainda é visto a ZC3H39 e ZC3H40 que já foram relatadas atuando na regulação da atividade mitocondrial em tripanosomatídeos, tendo essa atividade

possível através da formação de um dímero formado pelas duas proteínas (KRAMER et al., 2010; TRENAMAN et al., 2019). Através dos resultados encontrados, a ZC3H39 aparenta se desligar da interação com a PABP2, sem acontecer igual com a ZC3H40, quando avaliado os motivos RQN e TGM, o que também ocorre quando observado para a ZC3H40 que se desliga da interação de forma individual no motivo IAK, sem a presença de sua parceira proteica. Outras RBPs com atividade mitocondrial aparecem relacionadas ao motivo IAK, como as RBPs mitocondriais 1 e 2 e a REMC5.

As proteínas de domínio Pumílio exercem uma atividade de grande importância na regulação da expressão gênica nos eucariotos, duas proteínas foram identificadas durante os experimentos sendo a PUF2 bem relacionada com o motivo IAK no RRM1 e a PUF7 relacionada ao RRM1, RRM2 e região *linker*. Já foi identificada que a PUF7 apresenta uma localização nuclear, interagindo com outras proteínas nucleares exercendo a função de regular a maturação do RNA ribossomal (CLAYTON et al., 2010). Além da PUF7, outra RBP nuclear foi encontrada, embora esta ainda não esteja caracterizada, representada pelo código LINF_150021900. Juntas parecem se ligar a todos as regiões da PABP2, corroborando com outros estudos que demonstram a PABP2 com ação nuclear (DA COSTA LIMA et al., 2010; KRAMER et al., 2013).

Proteínas com domínio Alba participam de diversos eventos relacionados à regulação da expressão gênica através de diversas interações com proteínas ribossomais, fatores de iniciação e outras RBPs, desta forma possui uma alta relevância. Dentre essas proteínas destacam-se a ALBA1 e ALBA3 que formam um heterodímero, a ALBA3 ainda possui uma maior afinidade de interação com proteínas ribossomais atuando na iniciação da tradução (DA COSTA et al., 2017). Os resultados nos permitiram identificar ambas deixando de co-purificar com a PABP2 de maneira idêntica através do motivo IAK, que também apresentou uma redução da co-precipitação de 63 proteínas ribossomais, talvez trazendo uma relação entre essa interação, visto que a ALBA3 apresenta uma correlação com proteínas ribossomais. Esse conjunto de dados com relação às RBPs que interagem com a PABP2, ratifica sua importância para a regulação da expressão gênica e fortalece a ideia de que este homólogo participa de funções nucleares, além de nos fornecer dados importantes sobre outras RBPs atuando de formas distintas do que foi descrito na literatura.

7.2 AVALIAÇÃO DE EIFS ASSOCIADOS A PABP2 DE *L. INFANTUM*

Vale ressaltar a importância dos eIFs e seus diferentes complexos na iniciação da tradução, através das interações mediadas pelo EIF4G4, permitindo a ligação com o complexo eIF3 e a própria PABP2. O eIF4G atua com papel chave nas interações com outros complexos da iniciação da tradução e proteínas ribossomais, permitindo realizar as associações necessárias para regular o processo de iniciação da tradução (HINNEBUSCH, 2007; MERRICK, 2015). Na maioria dos eucariotos, o eIF4G é capaz de se ligar a PABP através dos RRM 1 e 2 (CHENG; GALLIE, 2007; KAHVEJIAN et al., 2015), no qual nossos resultados indicaram uma redução drástica na co-purificação do EIF4G4 com a PABP2 através dos motivos IAK e YAR, presentes nos RRM 1 e 2, respectivamente. A redução dos níveis de EIF4G4 ainda é confirmada através do grande número de proteínas ribossomais da subunidade 40S que deixaram de co-purificar com o motivo IAK, inferindo uma relação direta entre as interações do EIF4G4 com a PABP2 e proteínas ribossomais da subunidade 40S, todas responsáveis por atuar na iniciação da tradução. Junto ao EIF4G4, observou-se um decréscimo na presença do fator EIF4A1 e de subunidades dos complexos eIF3 e eIF2 no motivo IAK, que juntos aparentam estar envolvidos na regulação da iniciação da tradução (MERRICK, 2015).

7.3 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS DA SUBUNIDADE 40S RIBOSSOMAL ASSOCIADAS A PABP2 DE *L. INFANTUM*

As proteínas ribossomais são de extrema importância na formação de complexos que irão atuar na iniciação da tradução, permitindo a circularização do mRNA e a captação das subunidades ribossomais que permitirão traduzir o mRNA em proteína, sendo as proteínas ribossomais relacionadas à subunidade 40S responsáveis por interagir com os complexos eIF3 e eIF4 para a formação do complexo 48S. Estudos recentes com a subunidade menor 40S, permitiu identificar interações entre as proteínas ribossomais e a PABP através dos RRM 3-4 e região C-terminal (MACHIDA et al., 2018). Nossos resultados fortalecem essa ideia quando visto que um número elevado de proteínas ribossomais ligadas ao 40S sofreu uma queda na sua associação com a PABP2 quando observados os mutantes dos RRM 3 e 4 (FRS e HSK), assim como da região C-terminal (RQN e TGM). Os achados deste trabalho levantam a hipótese que estas regiões, de forma individual, interagem com diversas subunidades ribossomais demonstrando sua importância no processo de iniciação da

tradução e corroborando com resultados que indicam a relação de proteínas ribossomais com alguns fatores de iniciação da tradução.

7.4 AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS DE TRANSPORTE ASSOCIADAS A PABP2 DE *L. INFANTUM*

Já foi identificado a presença da PABP2 no núcleo quando submetida a estresse, de modo a inferir que essa RBP estaria associada a funções de transporte núcleo-citoplasma e outros processos de regulação realizados no núcleo (DA COSTA LIMA et al., 2010; KRAMER et al., 2013). Nosso trabalho trás de forma pioneira a identificação de proteínas relacionadas ao transporte, em sua maioria núcleo-citoplasma, que podem estar relacionadas à diferentes motivos na PABP2. Dentre elas, destaca-se as importinas que atuam no transporte de proteínas entre o citoplasma e o núcleo (LANGE, et al., 2007), assim como uma proteína com domínio de fator de transporte nuclear, a NTF2, que atua junto à filamentos de actina que também pôde ser identificado através da espectrometria de massas (IMPE et al., 2008). De forma geral, estas duas proteínas podem estar atuando regulando os processos de importação e exportação, através da interação com nucleoporinas (STEWART, 2000). Estes resultados permitem abrir possibilidades de identificação direta da relação entre essas proteínas encontradas com a PABP2, onde em sua maioria houve um alto nível de enriquecimento através do motivo IAK, tornando um potencial alvo de estudos para buscar entender melhor a migração da PABP2 para o núcleo, assim como sua atuação nestas condições.

7.5 AVALIAÇÃO DE OUTRAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS A PABP2 DE *L. INFANTUM*

Algumas proteínas chamaram atenção por serem vistas em um alto grau de enriquecimento, mesmo não apresentando funções descritas na literatura, como é o caso das proteínas LINF_360013000, LINF_350055000. Embora hipotéticas, acredita-se apresentarem domínios *zinc finger*, desta forma podendo estar atuando na regulação da expressão gênica, além de apresentarem estar associadas, visto que foram encontradas com um grau de enriquecimento muito próximo entre elas e reduzindo sua ligação com os mesmos motivos, tendo seu maior desligamento da interação com o domínio TGM. Outras duas proteínas hipotéticas, LINF_320027600 e

LINF_190011100, também apresentaram um grau de enriquecimento mais elevado comparado ao motivo IAK.

Uma proteína flagelar, PF16, foi observada em alguns dos mutantes (IAK/AAA, FRS/AAA, HSK/AAA e TGM/AAA), apresentando um enriquecimento alto, essa proteína é responsável pela regulação da estrutura flagelar e sua motilidade (STRASCHIL et al., 2010), visto que a formação flagelar é de extrema importância para o desenvolvimento e infecção do parasito da *L. infantum*, esse resultado pode subsidiar estudos atrelados à essa proteína de modo a controlar a ação do parasito.

A proteína ERF1 responsável pelo controle da terminação da tradução, apresentou um alto grau de enriquecimento encontrado junto ao motivo IAK, o que era esperado, visto que muitas proteínas relacionadas à tradução co-purificaram pouco com relação a esse mutante. Uma outra proteína, a CRK3 que possui função de fosforilação e é de grande importância na regulação do ciclo celular (DUNCAN et al., 2016), também apresentou uma forte perda de co-precipitação com os motivos IAK e TGM, podendo indicar regiões de fosforilação e responsáveis pelo ciclo celular da *L. infantum*, podendo tornar-se alvos para estudos visando avaliar as modificações e regulação do ciclo celular neste parasito.

7.6 AVALIAÇÃO DAS MODELAGENS *IN-SILICO* DA PABP2 DE *L. INFANTUM*

Todos os modelos obtidos foram refinados e apresentaram valores favoráveis nos parâmetros avaliados no *software* PROCHECK, para garantir o controle de qualidade das estruturas tridimensionais formadas computacionalmente, apresentando a grande maioria de resíduos favoráveis na análise e quase nulo de resíduos não favoráveis, o que caracteriza uma modelagem correta (LASKOWSKI et al., 2001). A partir da obtenção das modelagens e dos alinhamentos entre as sequências contendo as mutações em seus respectivos motivos e a PABP2 WT, foi possível identificar o valor em RMSD que se refere ao quanto a proteína alterou estruturalmente a partir da conformação dos átomos em relação a proteína selvagem (KIHARA et al., 2009).

Desta forma o motivo RYQ apresentou o menor índice de RMSD, com 0.775Å, enquanto as demais sequências apresentaram valores acima de 1Å. Considerando que valores de RMSD abaixo de 1Å, indicam maiores semelhança entre a sequência avaliada e a sequência original, corrobora com os resultados da espectrometria de massas, onde o motivo RYQ foi o que menos diminuiu os níveis de co-precipitação

com outras proteínas, mostrando que esse motivo não parece exercer importância para a PABP2. Enquanto os valores obtidos acima de 1Å demonstram uma diferença estrutural que pode afetar ligações entre os motivos avaliados, o que podemos observar nos outros seis motivos estudados (KIHARA et al., 2009).

Modelos onde apresentam um RMSD acima de 4Å são úteis para identificação de regiões que alterem bastante a conformação da proteína a ponto de alterar suas ligações peptídicas, o que podemos observar nos motivos FRS, RQN e TGM, onde após suas mutações foram capazes de diminuir co-precipitações com proteínas importantes para o desenvolvimento do parasito em questão, como a CRK3, PF16, PABP1, outras RBPs e alguns eIFs. Valores de RMSD entre 2 e 4Å também podem representar regiões responsáveis por diversas interações, como é o caso dos motivos IAK e HSK que após os resultados de espectrometria de massas reduziram a co-purificação da maior parte das proteínas encontradas no experimento (KIHARA et al., 2009).

Estudos recentes identificaram através de ensaios de *duplo-knockout* em motivos relacionados à PABP2, que o motivo TGM é essencial à viabilidade da *L. infantum*, (SANTOS FILHO, Tese de Doutorado, 2021), então quando avaliamos o RMSD desse motivo, identificou-se o maior valor na modificação estrutural dentre as regiões avaliadas, o que pode indicar a perda de interações essenciais para a sobrevivência do parasito e a importância do domínio MLLE onde está contido o motivo TGM, tornando-se um alvo promissor para possíveis moléculas com ação antiparasitária.

Os resultados obtidos com as modelagens e alinhamento *in-silico* corrobora com os resultados encontrados na espectrometria de massas e demonstra a importância dos motivos estudados para realizar ligações significativas para a função da PABP2 e sobrevivência da *L. infantum*.

8 CONCLUSÕES

- a) A PABP2 de *L. infantum* se associa com um grande grupo de proteínas relacionadas à tradução em tripanosomatídeos.
- b) Proteínas envolvidas no transporte núcleo-citoplasma parecem ter uma forte associação com a PABP2, somados a outros estudos, sugere-se que esta possa ter atividade tanto no citoplasma como no núcleo. Com isso, os motivos 80IAK82 e 547TGM549 surgem como os principais responsáveis pelas interações com essas proteínas, dentre os motivos estudados.
- c) Os motivos 80IAK82 e 137YAR139 possivelmente fazem parte de regiões responsáveis pela interação com o eIF4G4.
- d) Motivos presentes nos RRM3 e 4, assim como a região C-terminal parecem ser capazes de interagir com proteínas ribossômicas da subunidade 40S.
- e) Os motivos 80IAK82, 263FRS265, 284HSK286 e 547TGM549 se mostraram candidatos a mediar uma associação com a PF16, proteína de grande importância para o desenvolvimento flagelar e motilidade do parasito.
- f) De forma geral, os motivos 80IAK82 e 547TGM549 aparentam mediar grande parte das principais associações envolvendo a PABP2, dentre os motivos avaliados.
- g) A geração de modelos *in-silico* da PABP2 demonstrou a importância dos motivos estudados para a conformação da proteína e sua associação com parceiros proteicos.

REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.

ALEMAYEHU B, ALEMAYEHU M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Sci. J.**, v. 11 n. 4: 519, 2017.

ALVES, L. R. et. al. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 452, p 72-78, 2010.

ASSIS, L.A. et al. Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the Leishmania Poly(A) Binding Proteins reveals a direct association between PABP1, the RNA- binding protein RBP23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. **PLoS Neg. Trop. Dis.**, v. 15, n. 10, p. e0009899, 2021.

BEGLINGER K. Characterization of the Eukaryotic Initiation Factor 4B (eIF4B) [Tese de doutorado]. Califórnia: Universidade da Califórnia; 2020.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, ago. 2007.

BRASIL. Leishmaniose Visceral Canina, Um Manual para o clínico veterinário, WSPA, 2011. <http://www.wspabrasil.org/Images/Manual-Leishmaniose-WSPA-Brasil-2011_tcm28-24593.pdf>

CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. **Scanning**, p. 1-10, 2018. doi: 10.1155/2018/9603051.

CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, v. 56, p. 250-276, 2016.

CAVALLI A.; BOLOGNESI M.L. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **J. Med. Chem.**, v.52, n.23, p.7339-7359, 2009.

CHENG, S.; GALLIE, D. R. EIF4G, EIF4G, and EIF4B Bind the Poly(A)-Binding Protein Through Overlapping Sites Within the RNA Recognition Motif Domains. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 35, p. 25247-25258, 2007.

CLAYTON, C. E. E SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 156, p. 93-101, 2007.

CLAYTON, C. et al. The trypanosome Pumilio-domain protein PUF7 associates with a nuclear cyclophilin and is involved in ribosomal RNA maturation. **FEBS Letters**. v. 584, n. 6, p. 1156-1162, 2010.

CLAYTON, C. E. The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. **PLoS Pathog.**, v.9, p.9-12, 2013.

CLAYTON, C. E. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Bioch. Parasitol.**, v. 195, n.2, p. 96-106, 2014.

DA COSTA, K. S. et al. Structural and evolutionary analysis of *Leishmania Alba* proteins. **Molecular & Biochemical Parasitology.** v.217, p.23-31, 2017.

DA COSTA LIMA, T. D. et al. Functional Characterization of Three *Leishmania* Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. *American. Eukaryot Cell.* Oct., v. 9, n.10, p. 1484-94, 2010.

DE MELO NETO O.P. et al. Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) Species. In: **Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation.** Springer, Cham v.1, 2016.

DE MELO NETO O.P. et al. Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* poly(A)-binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. **RNA Biol.**, v.15, n.6, p.739-755, 2018.

DERRY M.C. et al., Regulation of Poly(A)-binding Protein through PABP-interacting Proteins. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** v.71, p.537-543, 2006.

DEVER T.E. et al., Translation Elongation and Recording in Eukaryotes. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, 2018

DEVER T.E.; Green R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 4 p. 1-16, 2018.

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

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

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

DUNCAN, S. M. Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 931-944, 2016.

DVORAK, V. et al. Parasite Biology: The Vectors. In: *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases.* p. 31-77, 2018.

ELISEEVA, I. A. et al. Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and

activity regulation. **Biochemistry**, v. 78, p. 1377-1391, 2013.

ESPINOSA, O. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.
doi:10.1017/S0031182016002092

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**, v. 20, p. 1272-1286, 2014.

FREIRE, E. R. et al. The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. **Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 55, 2017.

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

GAUDENZI, J. D. E. et al. RNA-Binding Domain Proteins in Kinetoplastids: a Comparative Analysis. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 12, p. 2106-2114, 2005.

GINGRAS, A. et al. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. 68, p. 913-963, 1999.

GLISOVIC, T. et al. {RNA}-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Lett**, v. 582, n. 14, p. 1977-1986, 2008.

GRUNER S. et al. The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. **Mol. Cell**. v. 64, n.3, p. 467-479, November 3, 2016.

HAILE, S; PAPADOPOULOU, B. Developmental Regulation of Gene Expression in Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.6, p. 569-577, 2007.

HALLIDAY, C. et al. Trypanosomatid Flagellar Pocket from structure to Function. **Trends in Parasitology**, Vol. 37, No. 4, p. 317-329, 2021.

HENTZE, M. W. et al. A brave new world of RNA-binding proteins. **Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 327-341, 2018.

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

IMPE, K. V. A New Role for Nuclear Transport Factor 2 and Ran: Nuclear Import of CapG. **Traffic**. v.9, n.5, p.695-707, 2008.

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.

KAHVEJIAN, A. et al. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. **GENES & DEVELOPMENT**. v.19 p.104-113, 2005.

KIHARA, D. et al. Quality Assessment of Protein Structure Models. **Current Protein and Peptide Science**, v. 10, p. 216-228, 2009.

KLEIN, C. Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with Initiation Factors and RNABinding Proteins. **PLOS One**, v. 10, n. 8, 2015.

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

KRAMER, S. et al. Differential Localization of the Two *T. brucei* Poly(A) Binding Proteins to the Nucleus and RNP Granules Suggests Binding to Distinct mRNA Pools. **PLoS ONE**, v.8, n.1, p. e54004, 2013.

LANGE, A. et al. Classical Nuclear Localization Signals: Definition, Function, and Interaction with Importin α^* . **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 8, p. 5101-5105, 2007.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: validation of protein structure coordinates, in International Tables of Crystallography. **Crystallography of Biological Macromolecules**, v. F, p. 722-725, 2001.

LIANG, X. *trans* and *cis* Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryot Cell**, v. 2, n.5, p. 830-840, 2003.

LOERCH, S.; KIELKOPF, C. L. Dividing and Conquering the RNA Recognition Motif Family: A Representative Case Based on hnRNP L. **J. Mol. Biol.**, v. 427, n. 19, p. 139 2997-3000, 2016.

LOPES S.; ROSSO S. *Biologia*. Volume único. 1ª Edição. São Paulo. Editora Saraiva, 2007.

LOPES, A. H. et al. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, n. 1, p. 30-59, 2010.

MACHIDA, K. et. al. Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. **Sci. Rep.** v. 8, n. 17435, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35753-1>

MERLO, K. C. Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania infantum*. [Tese de doutorado]. Recife: Instituto Aggeu Magalhães-IAM, 2018.

MERRICK, W. C. eIF4F: A retrospective. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 40, p. 24091-24099, 2015.

MERRICK, W. C.; PAVITT G. D. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 10: a033092, 2018

MYLER, P. J. et al. *Leishmania major* Friendlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 1-5, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. P. 22-26, Genebra, 2010.

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas. n. 9, Washington, D.C.: OPAS, 2020.

OUELLETTE, M. E PAPADOPOULOU, B. Coordinated gene expression by post-transcriptional regulons in African trypanosomes. **J. Biol.**, v. 8, n. 11, p. 100-110, 2009.

ROMAGNOLI B. A. A. et al. RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. **Front Cell Infect. Microbiol.**, v. 10, p1-17, 2020.

ROSS-KASCHITZA D.; Altmann M. eIF4E and interactors from unicellular eukaryotes. **Int. J. Mol. Sci.** v. 21, n. 6, 2020. doi: 10.3390/ijms21062170.

SANTOS FILHO, M. V. C. Identificação de parceiros protéicos e mRNAs alvos associados ao papel das proteínas de ligação ao poli-A no processo de tradução em *Leishmania infantum*. [Tese de doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE; 2020.

SÉNÉCHAL, P. *et al.* Assessing eukaryotic initiation factor 4F subunit essentiality by CRISPR-induced gene ablation in the mouse. **Cell. Mol. Life Sci.** 78, p6709-6719, 2021.

SERAFIM, T. D. et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021.

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

SINGH, G. et al. The clothes make the mRNA: past and present trends in mRNP fashion. **Annual review of biochemistry**, v. 84, p. 325-354, 2015.

SLADIC, R. et al. Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. **European Journal of Biochemistry**, Amsterdam, v. 271, n. 2, p. 450-457, 2004.

SONENBERG, N. E HINNEBUSCH, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. **Cell**, 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.

SOUZA, I. R. Síntese de Proteínas. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012. Acesso em 23 de setembro de 2021. Disponível em: https://moodle.ufsc.br/pluginfile.php/594098/mod_resource/content/1/S%C3%ADntese%20de%20prote%C3%ADnas.pdf

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

STRASCHIL, U. et al. The Armadillo Repeat Protein PF16 Is Essential for Flagellar Structure and Function in Plasmodium Male Gametes. **PLOS ONE** v. 5 n.9, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012901>

STUART K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** 118, p1301-1310, 2008.

TEIXEIRA, DE B. M. et al. Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

TRENAMAN, A. et al. A post-transcriptional respiratome regulon in trypanosomes. **Nucleic Acids Research.** v. 47, n. 13, p. 7063-7077, 2019.

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 Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 85-98, 2004.

WIPPEL, H. H. et al. Unveiling the partners of the DRBD2-mRNP complex, an RBP in *Trypanosoma cruzi* and ortholog to the yeast SR-protein Gbp2. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2021. - Leishmaniasis. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>.

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.* [Dissertação de Mestrado]. Recife: Instituto Aggeu Magalhães-IAM, 2015.

YÁNGUEZ E. et al. Functional impairment of eIF4A and eIF4G factors correlates with inhibition of influenza virus mRNA translation. **Virology**, 413(1), p93-102, 2011.

YOFFE, Y. et al. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 11, p. 1764-1775, 2004.

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

YOFFE, Y. et al. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p.

3243-3253, 2009.

ZHANG, S. et al. RNA binding motif protein 10 suppresses lung cancer progression by controlling alternative splicing of eukaryotic translation initiation factor 4H. **EBioMedicine**, v. 61, 2020.

ZOLTNER, M. et al. Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 12, p. 1-18, 2018.