

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

Mayara Sabino Leite de Oliveira Duarte

**Análise das bases da especificidade de interação dos fatores de iniciação da  
tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major***

Recife

2023

Mayara Sabino Leite de Oliveira Duarte

**Análise das bases da especificidade de interação dos fatores de iniciação da tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia em saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biociências e Biotecnologia

Orientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis

Coorientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadora: Dra. Camila Cavalcanti Xavier

Recife

2023

Título do trabalho em inglês: ANALYSIS OF THE BASES OF INTERACTION SPECIFICITY OF EIF4G AND EIF4E TRANSLATION INITIATION FACTORS OF *Leishmania major*.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

D128a Duarte, Mayara Sabino Leite de Oliveira.  
Análise das bases da especificidade de interação dos fatores de iniciaçãoda tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major* / Mayara Sabino Leite de Oliveira Duarte. -- 2023.83 p. : il.color.

Orientador: Christian Robson de Souza Reis.

Coorientadores: Camila Cavalcanti Xavier e Osvaldo Pompílio de Melo Neto.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2023.

Bibliografia: f. 69-73.

1. Fator de Iniciação 4F em Eucariotos. 2. *Leishmania major*. 3. Tradução. I.  
Título.

CDU 616.993.161

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

Mayara Sabino Leite de Oliveira Duarte

**Análise das bases da especificidade de interação dos fatores de iniciação da tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Biociências e Biotecnologia em saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biociências e Biotecnologia

Aprovado em: 25 de novembro de 2022

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra Clarice Neuenschwander Lins de Moraes  
Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

*Dedico este trabalho a minha avó Berna*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ser o meu farol.

Aos meus pais e meu irmão Douglas, por serem meu alicerce, suporte, educação e cuidado.

Aos meus avós: Lia, Reinor, Armando, e em especial minha vovó Berna que nos deixou pouco antes do início dessa trajetória. Dedico a ela toda minha vitória.

A minha família, em especial meus tios, Bruno, Val, Nilda, Ana, Nalda e Pona, por serem mais do que tios, e sempre me apoiarem.

Agradeço à todos os meus primos pela irmandade, em especial: Afonso, Breno, Yanna, Maria, Heitor, Marcela, Danilo e Camila

Agradeço à minha base em Recife: Janaina, Salazar, Eduarda, Luíza e Clara.

Ao meu orientador Christian, que nunca mediu esforços para ajudar, que foi o orientador mais humano que conheci. Pela amizade, apoio, paciência, orientação, oportunidade e por todo o conhecimento. Serei eternamente grata.

Aos meus co-orientadores Dra Camila e Dr Osvaldo que tiraram sempre minhas dúvidas, me instruíram e apoiaram em todo meu caminho.

Aos meus amigos de laboratório por todo o amor, amizade e companheirismo. Eles que sempre me ajudaram com dicas, ensinamentos e momentos de descontração nos intervalos dos experimentos e durante eles, em especial: Rafinha, Ada, Gustavo, Adriana, Guilherme, Deyvisson, Andrei, Hemilly e Stephanny .

Agradeço a minha terapeuta Ryvia, por todo o suporte durante todos esses anos e amizade.

Agradeço a minha melhor amiga, Benielly por quase duas décadas de amizade e companheirismo. Agradeço a meu anjo da guarda, Renata, que foi meu alicerce dessa jornada desde o início. Obrigada!

Agradeço a todo o departamento de Microbiologia em especial: Carol Pereira, a melhor e mais prestativa secretária; aos técnicos, em especial: Cláudio e Bruna.

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

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma ou deram apoio para que esse trabalho fosse realizado.

*“Eu vo-lo digo: é preciso ter  
um caos dentro de si para  
dar à luz uma estrela cintilante”  
**Friedrich Nietzsche***

## RESUMO

DUARTE, Mayara Sabino Leite de Oliveira. Análise das bases da especificidade de interação dos fatores de iniciação da tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major*. 2023. Dissertação (Mestrado em biociências e biotecnologia) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

A família *Trypanosomatidae* é composta de protozoários flagelados, e alguns deles compõem um grave problema de saúde pública mundial, como as leishmanioses. Os tripanosomatídeos possuem algumas peculiaridades, como o controle da expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais, como a tradução. A iniciação da tradução começa com a formação do complexo EIF4F, que tem como função permitir o reconhecimento entre a subunidade menor ribossomal e o mRNA. O complexo EIF4F é constituído pelas subunidades EIF4E, EIF4A, e EIF4G. Em tripanosomatídeos, foram descritos dois complexos do tipo EIF4F:1- EIF4E3/EIF4G4/EIF4A1 e 2- EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1. As interações entre EIF4E/EIF4G destes dois complexos foram previamente estudadas, sendo definidos que a região N-terminal das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 possuem os motivos chaves de interação com as proteínas EIF4E4 e EIF4E3 respectivamente. entretanto, ainda não se conhecem as bases da especificidade destas interações. Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi aprofundar o estudo das interações do complexo EIF4F e identificar que aminoácidos da região N-terminal dos homólogos EIF4G poderiam ser determinantes para a ligação específica aos parceiros EIF4E. Inicialmente, foi realizado um alinhamento dos aminoácidos da região N-terminal das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 de *Leishmania major* para escolha das mutações a serem realizadas. Em seguida foram realizadas mutagêneses sítio dirigida nos genes codificantes EIF4G3 e EIF4G4 selvagens. Os genes mutantes foram expressos em fusão com a proteína GST e purificadas por cromatografia de afinidade. Para obtenção das proteínas fusionadas a histidinas, os genes EIF4E3 e EIF4E4, foram linearizados, transcritos e traduzidos para a realização em ensaios de pull down com as proteínas fusionadas a GST. Dados preliminares deste trabalho indicaram que apenas o *LmEIF4G4* MUT 2 (W32Y/T33L/A34E/I35P), demonstrou um desligamento da interação com parceiro *LmEIF4E3* em ensaios de pull down. Os mutantes do EIF4G3 foram analisados também quanto a sua capacidade de ligação aos parceiros EIF4E4 em análises de bioinformática. Os ensaios de predição tridimensional e de dinâmica molecular dos complexos selvagens e mutantes revelaram que independente das mutações, a interação nos complexos se manteve, corroborando com o resultado das interações *in vitro*. Serão necessários novos experimentos de pull down, análises de bioinformática para esclarecer como as proteínas EIF4G se ligam especificamente aos EIF4Es. Os resultados obtidos neste trabalho foram os primeiros passos para o estabelecimento das bases de especificidade da interação EIF4G/EIF4E e poderão fornecer informações fundamentais de possíveis alvos quimioterápicos e desenvolvimento de moléculas inibidoras para controle destes patógenos.

Palavras chaves: fator de iniciação 4F em eucariotos; *leishmania major*; tradução

## ABSTRACT

DUARTE, Mayara Sabino Leite de Oliveira Duarte. Analysis of the bases of interaction specificity of the translation initiation factors EIF4G and EIF4E of *Leishmania major*. 2023 Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology)- Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

The Trypanosomatidae family is composed of flagellated protozoa, and some of them constitute a serious public health problem worldwide, such as leishmaniasis. Trypanosomatids have some peculiarities, such as the control of gene expression by post-transcriptional mechanisms, such as translation. The initiation of translation begins with the formation of the EIF4F complex, whose function is to allow recognition between the ribosomal minor subunit and the mRNA. The EIF4F complex is made up of EIF4E, EIF4A, and EIF4G subunits. In trypanosomatids, two EIF4F-like complexes have been described: 1-EIF4E3/EIF4G4/EIF4A1 and 2-EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1. The interactions between EIF4E/EIF4G of these two complexes were previously studied, being defined that the N-terminal region of EIF4G3 and EIF4G4 proteins have the key motifs of interaction with EIF4E4 and EIF4E3 proteins respectively. However, the bases of the specificity of these interactions are still unknown. Given the above, the purpose of this work was to deepen the study of the interactions of the EIF4F complex and identify which amino acids in the N-terminal region of the EIF4G homologs could be determinant for the specific binding to the EIF4E partners. Initially, an amino acid alignment of the N-terminal region of the EIF4G3 and EIF4G4 proteins from *Leishmania major* was performed to choose the mutations to be performed. Then, site-directed mutagenesis was performed on wild-type EIF4G3 and EIF4G4 coding genes. Mutant genes were expressed in fusion with the GST protein and purified by affinity chromatography. To obtain proteins fused to histidines, the EIF4E3 and EIF4E4 genes were linearized, transcribed and translated to perform pull down assays with proteins fused to GST. Preliminary data from this work indicated that only LmEIFG4 MUT 2 (W32Y/T33L/A34E/I35P) demonstrated a shutdown of LmEIF4E3 partner interaction in pull down assays. The EIF4G3 mutants were also analyzed for their ability to bind to EIF4E4 partners in bioinformatics analyses. The three-dimensional prediction and molecular dynamics tests of the wild-type and mutant complexes revealed that regardless of the mutations, the interaction in the complexes was maintained, corroborating with the outcome of in vitro interactions. Further pull down experiments, bioinformatics analyzes will be needed to clarify how EIF4G proteins specifically bind to EIF4Es. The results obtained in this work were the first steps towards establishing the basis for the specificity of the EIF4G/EIF4E interaction and may provide fundamental information on possible chemotherapeutic targets and the development of inhibitor molecules to control these pathogens.

Key words: eukaryotic initiation factor-4F; *leishmania major*; translating.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas clínicas da leishmaniose .....	23
Figura 2- Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> .....	26
Figura 3 - Mecanismos de trans splicing em Tripanosomatídeos.....	27
Figura 4 - Complexo EIF4F .....	28
Figura 5 - Iniciação da tradução em eucariontes.....	29
Figura 6 - Estrutura tridimensional da proteína EIF4E em <i>S. cerevisiae</i> .....	30
Figura 7 - Esquema do EIF4G e os principais sítios de ligação a outras proteínas ...	31
Figura 8 - Esquema representativo de complexos do tipo EIF4F envolvidos na tradução dos tripanosomatídeos .....	32
Figura 9 - Protótipo dos homólogos EIF4G3 E EIF4G4 de <i>L.major</i> em comparação com o EIF4G1 em humanos.....	33
Figura 10 - Representação esquemática dos resíduos da região canônica em <i>L. major</i> envolvidos na interação EIF4G4/EIF4E3 E EIF4E4/EIF4G3.....	34
Figura 11 - Fluxograma experimental.....	38
Figura 12 - Tabela de mutantes das proteínas LmEIF4G3 e LmEIF4G4 obtidos nesta dissertação .....	41
Figura 13 - Alinhamento da região N-terminal das proteínas <i>LmEIF4G3</i> e <i>LmEIF4G4</i> e suas respectivas mutações .....	48
Figura 14 - Modelagens do complexo EIF4G3-EIF4E4.....	49
Figura 15 - Alinhamento dos complexos EIF4G3 ancorados ao seu parceiro EIF4Es .....	50
Figura 16 - Valores de RMSD em Angstrom entre os modelos de EIF4G3 nos respectivos complexos .....	51
Figura 17 - Variação de RMSD dos complexos EIF4G/EIF4E .....	52
Figura 18 - Grau de Flutuação em Angstrom dos aminoácidos mutados nos diferentes complexos estudados.....	52
Figura 19 - Produtos das reações das mutagêneses dos genes <i>LmEIF4G3</i> e <i>LmEIF4G4</i> .....	58

Figura 20 - Minipreparações de DNA plasmidial obtidos após reação de mutagênese sítio-dirigida .....	59
Figura 21 - Confirmação das mutações obtidas para o gene <i>LmEIF4G3</i> contendo resíduos conservados do gene <i>LmEIF4G4</i> .....	60
Figura 22 - Confirmação das mutações obtidas para o gene <i>LmEIF4G4</i> contendo resíduos conservados do gene <i>LmEIF4G3</i> .....	61
Figura 23 - Indução dos mutantes <i>LmEIF4G3</i> e <i>LmEIF4G4</i> .....	62
Figura 24 - Purificação das proteínas GST- <i>LmEIF4G3</i> e seus mutantes.....	63
Figura 25 - Purificação das proteínas GST- <i>LmEIF4G4</i> e seus mutantes.....	64
Figura 26 - Gel de agarose das linearizações dos genes EIF4E3 e EIF4E4 no plasmídeo pET21d .....	65
Figura 27 - RNAs mensageiros <i>LmEIF4E3</i> e <i>LmEIF4E4</i> produzidos por transcrição <i>in vitro</i> .....	66
Figura 28 - Produção das proteínas EIF4E4 e EIF4E3 em sistema de reticulócito de coelho.....	67
Figura 29 - Ensaio de interação das proteínas EIF4G4 WT e mutantes com seu parceiro EIF4E3 .....	68
Figura 30 - Ensaio de interação das proteínas EIF4G3 WT e mutantes com seu parceiro EIF4E4 .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Aminoácido

DNA - Ácido desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

eIF – Fator de iniciação da tradução eucariótico

gDNA - DNA genômico

GTP-Guanosina trifosfato

GST–Glutathione S Transferase

kDa - kiloDalton

LC - Leishmaniose cutânea

LV - Leishmaniose visceral

Met - Metionina

mL - Mililitro

mM - Milimolar

mRNA - RNA mensageiro

ns - nano segundo

OPAS - Organização Pan-americana da saúde

OMS - Organização Mundial da saúde

PABP - Proteína de ligação à caudapoli-A

pb - pares de base

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pol - Polimerase

pré-mRNA - Pré-RNA mensageiro

RNA – Ácido ribonucleico

rg- raio de giração

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

tRNA – RNA transportador

µg - Microgramas

$\mu\text{L}$  - Microlitros

WT – Tipo selvagem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE TRYPANOSOMATIDAE .....	22
2.2 GÊNERO LEISHMANIA E LEISHMANIOSES.....	22
2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES .....	24
2.4 CICLO BIOLÓGICO .....	24
2.5 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS .....	26
2.6 SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM EUCARIOTOS.....	27
2.7 INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS .....	28
2.9 EIF4G: O ANCORADOR DO COMPLEXO EIF4F .....	30
2.10 COMPLEXOS EIF4E3/EIF4G4 E EIF4E4/EIF4G3.....	31
2.11 EIF4E3 e EIF4E4.....	32
2.12 EIF4G3 E EIF4G4 .....	33
2.13 USO DE MOLÉCULAS PARA INIBIR A LIGAÇÃO EIF4G e EIF4E .....	34
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>36</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>37</b>
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>38</b>
5.1 MODELAGEM <i>IN SILICO</i> .....	38
5.2 DINÂMICA MOLECULAR.....	39
5.3 MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA .....	40
5.3.1 REAÇÃO DE MUTAGÊNESE .....	42
5.4 SEQUENCIAMENTO DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS MUTANTES .....	42
5.6 TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS EIF4E3 E EIF4E4 .....	44
5.7 ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA .....	45
5.8 WESTERN BLOT .....	45
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
6.1 ALINHAMENTO N-TERMINAL PROTEÍNAS EIF4G E DEFINIÇÃO DOS MUTANTES.....	47
6.2 ANÁLISES DAS INTERAÇÕES EIF4G/EIF4E POR BIOINFORMÁTICA.....	48
6.2.1 OBTENÇÃO DOS MUTANTES .....	57
6.2.1 Confirmação dos mutantes.....	59

6.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EIF4G3 E EIF4G4 .....	62
6.4 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS EIF4E3 E EIF4E4.....	65
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>8 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO .....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados, alguns deles são conhecidos por causarem doenças humanas e veterinárias como as leishmanioses, doença do sono e doença de Chagas. Estes protozoários apresentam um ciclo de vida complexo, com formas morfológicas distintas nos hospedeiros, além de outras peculiaridades moleculares, como a transcrição policistrônica e o trans-splicing levando a uma regulação da expressão gênica própria, que acontece principalmente por mecanismos pós-transcricionais, através do processamento, transporte e controle da estabilidade e tradução dos mRNAs em proteínas.

A síntese de proteínas ou tradução é um importante e complexo processo imprescindível para a sobrevivência dos seres vivos. Esse processo é basicamente dividido em quatro etapas principais, são elas: Iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A etapa de iniciação é crucial, e é nesta etapa que ocorre a participação de várias proteínas conhecidas como fatores de iniciação eucarióticos (eIFs). Na iniciação da tradução é formado complexo EIF4F, formado pelas subunidades, EIF4E (proteína que se liga ao cap dos mRNAs na sua extremidade 5'), o EIF4A (RNA helicase) e o EIF4G (Proteína ancorada do complexo EIF4F, que se liga ao 4E e 4A). O papel principal do complexo EIF4F é reconhecer a extremidade 5' do mRNA e mediar a associação da mesma com a subunidade 40S ribossomal a outros fatores.

Em tripanosomatídeos foram identificados dois complexos do tipo eIF4F dos quais participam as proteínas o EIF4G3 e EIF4G4 que demonstraram interagir com as proteínas EIF4E4 e EIF4E3 respectivamente, são eles: EIF4G3/EIF4E4/PABP1/EIF4A1 e EIF4G4/EIF4E3/EIF4A1/PABP2. Ambos os complexos participam da tradução, entretanto são necessários mais estudos para identificar melhor as funções de cada proteína participante neste mecanismo. Embora similares e que já tenha sido descrito os sítios de ligação da interação entre as proteínas *LmEIF4G3/LmEIF4E4* e *LmEIF4G4/LmEIF4E3*, até o momento não se conhecem as bases da especificidade destas interações em tripanosomatídeos.

Diante deste cenário, a proposta deste trabalho foi entender como ocorre a interação entre essas proteínas, identificando quais os possíveis resíduos na região

N-terminal dos homólogos EIF4G que poderiam ajudar na escolha aos seus parceiros EIF4E por pull down e por dinâmica molecular. As mutações propostas para as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 se baseiam na troca mútua dos aminoácidos entre ambas as proteínas nas mesmas posições identificadas no alinhamento de suas regiões N-terminal. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o *LmG4 mut 2* (W32Y/T33L/A34E/I35P) teve o potencial de inibir a interação EIF4G4/EIF4E3 nos ensaios de *pull down*, apontando que esses resíduos ou o conjunto deles são essenciais na interação. Quando aos mutantes do EIF4E4/EIF4G3, não foram identificadas modificações na análise por pull down e nem alterações substanciais via dinâmica molecular, demonstrando que os resíduos substituídos não foram capazes de inibir a interação EIF4E4/EIF4G3

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE TRYPANOSOMATIDAE

Na família Trypanosomatidae são encontradas espécies de organismos unicelulares flagelados da ordem Kinetoplastida, com destaque para os gêneros Trypanosoma e Leishmania causadores de doenças de relevância médica e veterinária conhecidas como tripanossomíases e leishmanioses que constituem um grave problema sócio-econômico de impacto mundial (FLOHÉ, 2012, SOUSA et al., 2018).

### 2.2 GÊNERO LEISHMANIA E LEISHMANIOSES

As leishmanioses se apresentam sob duas formas clínicas: A Leishmaniose Tegumentar (LT) que possui as variações em Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucocutânea (LM) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), acometendo pele e mucosa, e a forma mais grave, a Leishmaniose visceral (LV) (Figura 1). Atualmente, as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo, acometendo quase dois milhões de pessoas, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). A LV é a forma mais severa e pode ser fatal, se não tratada. Em 2020, o Brasil foi o país que mais teve notificações de leishmaniose tegumentar, seguido de Colômbia e Peru, em relação a LV, a taxa de mortalidade ainda permanece elevada no Brasil quando comparada a outros países endêmicos para esta doença (OPAS BRASIL, 2019).

Figura 1- Formas clínicas das Leishmanioses



Fonte: Adaptado de Anversa et al. 2018



Fonte: Silveira, et al. 2016

Nota: (A) Lesão única característica da leishmaniose cutânea localizada. (B) Diferentes lesões na face do paciente indicado pelas setas, característica de leishmaniose cutânea disseminada. (C) Múltiplas lesões na face e no braço de uma criança, característica de leishmaniose cutânea difusa. (D) Representa lesão em mucosa nasal, típica de leishmaniose mucocutânea. Acima a LV representada por criança com hepatoesplenomegalia

O gênero *Leishmania* é representado por cerca de 30 espécies, das quais no Brasil, apenas a *Leishmania infantum* é responsável por provocar a LV e sete espécies são agentes etiológicos da LT, são elas: *Leishmania* (Viannia) braziliensis, *Leishmania* (Viannia) guyanensis, *Leishmania* (Viannia) lainsoni, *Leishmania* (Viannia) naiffi, *Leishmania* (Viannia) lindenberg, *Leishmania* (Viannia) shawi e *Leishmania* (Leishmania) amazonensis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). As leishmanioses são transmitidas ao homem pela picada de dípteros da subfamília Phlebotominae e as manifestações clínicas da doença podem variar desde lesões na pele até o acometimento das vísceras, essa variabilidade dependerá de vários fatores, dentre eles, a espécie infectante (STEVERDING, 2017).

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

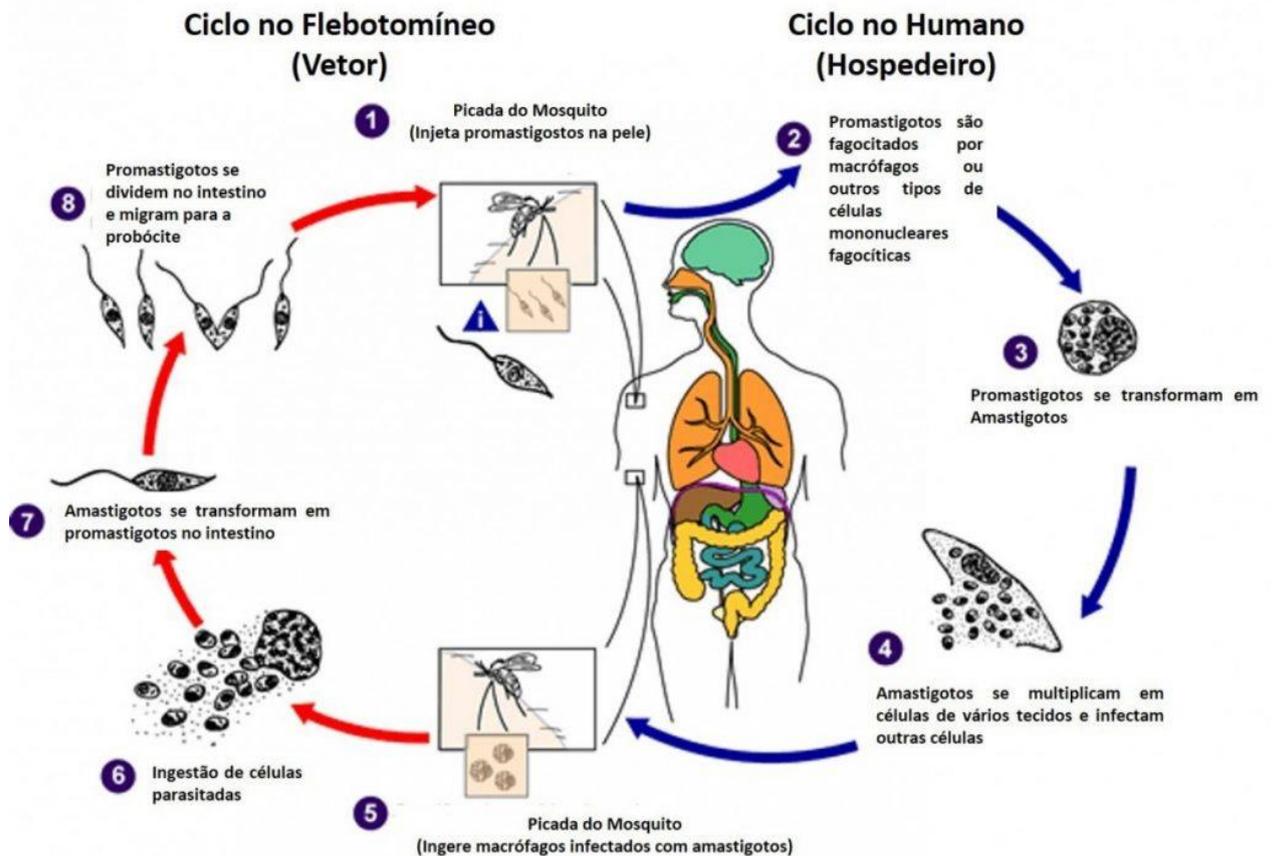
Nos últimos 20 anos, foram notificados à Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) 1.067.759 casos de Leishmaniose Tegumentar, com média de 53.387 por ano. Em 2020, 16.432 casos de LT foram notificados no Brasil. Segundo o sistema de informação regional das leishmanioses nas américas (PAHO, 2020), do total de casos notificados o grupo mais afetado segue sendo os homens entre 20 e 50 anos. Já a LV é endêmica em 13 países das Américas, onde foram registrados 67.922 novos casos desde 2001 a 2020, com uma média de 3.400 casos por ano. Nos últimos anos, tem sido observado uma tendência crescente no número de casos de LV no Brasil. Dos 1933 casos de LV notificados no Brasil em 2020, três municípios apresentaram maior destaque são eles: Fortaleza (Estado do Ceará), Belo Horizonte (Minas Gerais) e São Luís (Maranhão), Muitos dos casos de LV relatados no Brasil ocorrem em pacientes que apresentam co-infecção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que pode aumentar a gravidade da LV (OPAS 2021).

### 2.4 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico da *Leishmania* é complexo e tem início quando mosquitos infectados inoculam as formas promastigotas no hospedeiro vertebrado, através de endocitose, os parasitas são fagocitados por macrófagos, gerando fagossomos aos quais se fundem com vesículas lisossomais, formando os fagolisossomos, e as form

a promastigotas se diferenciam em amastigotas. Após sucessivos ciclos de replicação por divisão binária, os amastigotas lisam as células do hospedeiro e infectam outros macrófagos do mesmo tecido ou de tecidos diferentes. A finalização do ciclo se dá quando o inseto ingere as formas amastigotas durante o respasto sanguíneo (KATO et al., 2010; KAYE E SCOTT, 2011; BROOKS, 2014; ANVERSA et al, 2018).

No intestino médio do inseto ocorrem mudanças bioquímicas e morfológicas como, diminuição da temperatura e aumento do pH, que permitem o desenvolvimento do parasita no vetor invertebrado. Assim, os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicos, que também passam a se reproduzir por sucessivos ciclos de divisão binária. O último estágio, denominado metaciclogênese, ocorre quando as formas prociclícas se transformam em formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes). (Figura 2) (BATES, 2007; BESTEIRO et al., 2007)

Figura 2- Ciclo biológico da *Leishmania*

Fonte: Centers of Disease control and prevention.

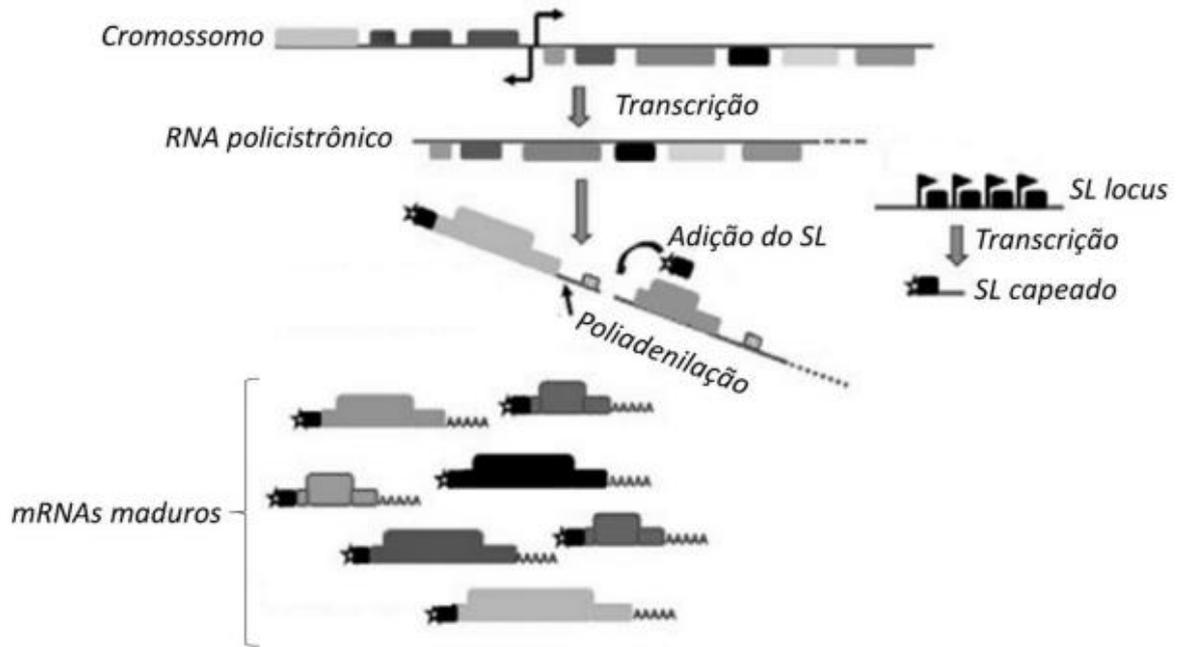
Nota: A leishmaniose se dá inicialmente através da picada do inseto com as formas infectantes promastigotas (1). As formas promastigotas são englobadas por células fagocíticas, como macrófagos (2). No interior do macrófago, os promastigotas se transformam em amastigotas, e continua a se multiplicar (3). As formas amastigotas rompem a membrana celular e passa a infectar outras células (4). O vetor pica e ingere macrófagos com amastigotas (5) e (6). As formas amastigotas se transformam na forma infectante, promastigota no intestino do inseto (7), que posteriormente segue até a probócite do inseto e infecta outro hospedeiro (8).

## 2.5 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

A família Trypanosomatidae divergiu muito cedo da linhagem eucariótica primitiva, cerca de 200 a 500 milhões de anos, e apesar disto, estas espécies apresentam várias características biológicas específicas, como por exemplo, uma grande conservação no número e na organização dos seus genes (PAPADOPOULOU, 2007). Este grupo de protozoários possui algumas peculiaridades como: a disposição e transcrição de genes em grandes unidades policistrônicas, devido a escassez da RNA polimerase II; o processamento dos transcritos para formação dos mRNAs citoplasmáticos por processo de *trans-splicing* diferente dos demais eucariotos que processam o seu RNA através do *Cis-splicing*

(Figura 3) e controle da expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais, como a síntese de proteínas ou tradução. (CHOI; EL-SAYED, 2012; JACKSON, 2015; PASTRO et al, 2017; CLAYTON, 2019).

Figura 3 - Mecanismos de trans splicing em Tripanosomatídeos



Fonte: adaptado Araújo, Texeira, 2011

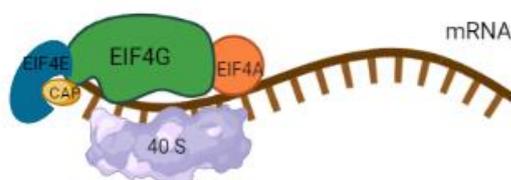
Nota: O processo de trans splicing em tripanosomatídeos ocorre através de blocos policistrônicos (pré mRNAs). Esses mRNAs policistrônicos são transcritos e posteriormente é adicionado uma sequência líder de 39 nucleotídeos, (SP) na extremidade 5'. Há também a adição da cauda poli -A na extremidade 3', originando os mRNAs maduros

## 2.6 SÍNTESE DE PROTEÍNAS EM EUKARIOTOS

A tradução de proteínas, ou síntese proteica, é um processo complexo e um dos mais conservados ao longo da evolução sendo vital para a sobrevivência de todos os seres vivos. A tradução pode ser dividida em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A etapa de iniciação se dá através da interação de vários fatores de iniciação da tradução (eIFs- **eukariotic Initiation Factors**), (figura 4), formando complexos e, dentre eles, dois são cruciais nesta etapa: o complexo de pré-iniciação 43S (43S PIC - *preinitiation complex*), composto por Met-tRNA juntamente com os fatores EIF4A1/EIF2/EIF3/EIF5 e a subunidade ribossomal 40S, e o complexo EIF4F composto pelos fatores

EIF4G/EIF4E/EIF4A (MOHAMMAD et al, 2021). O complexo 43S se associa ao complexo EIF4F, formando o complexo 48 S, e escaneia o mRNA até encontrar o códon de iniciação da tradução AUG. A etapa de alongamento se inicia com o reconhecimento do códon inicial e o recrutamento da subunidade maior ribossomal (60 S). A partir desse momento, se inicia a elongação da cadeia polipeptídica formando as ligações peptídicas entre os aminoácidos, com translocação para o códon seguinte do mRNA, seguindo o sentido 5'-3'. A terminação acontece com o reconhecimento do códon de parada (UAA/UAG/UGA) e a liberação das proteínas envolvidas, através dos fatores ERF1, em conjunto com a GTPase e ERF3. Por fim, a reciclagem dos ribossomos ocorre quando há a dissociação das subunidades ribossomais 40S e 60S, que poderão ser novamente ser reutilizadas em novas sequências de tradução (ZINOIEV E SHAPIRA, 2012 DEVER E GREEN, 2012; AYLLET E BAN, 2017).

Figura 4 - Complexo EIF4F



Fonte: Elaborado pelo autor.

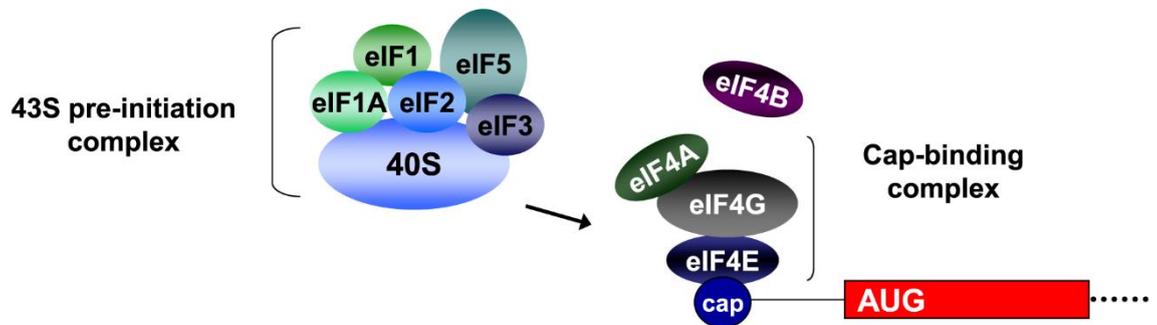
Nota: Complexo EIF4F formado pelas subunidades EIF4G, EIF4A e o EIF4E ligado ao cap do mRNA juntamente com a subunidade menor ribossomal.

## 2.7 INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS

Devido a sua complexidade e essencialidade, a etapa da iniciação da tradução, em especial o complexo EIF4F, tem sido cada vez mais alvo de estudos para compreensão da expressão gênica, assim como utilizado como alvo de drogas em eucariotos. Ele é composto pelas subunidades EIF4A (RNA helicase) que tem como função clivar estruturas secundárias do mRNA, a EIF4E ( proteína que se liga ao cap dos mRNAs) e a proteína EIF4G ( proteína ancoradora do complexo, que interage com as proteínas EIF4E e EIF4A. O complexo EIF4F tem como função mediar a

associação do mRNA, especificamente pela subunidade EIF4E se ligando ao cap do mRNA, interagindo com a proteína EIF4G juntamente com fatores do complexo de PIC 43S e a subunidade menor ribossomal, para a formação do complexo 48S. Nessa etapa participa também a proteína acessória PABP (proteína de ligação à cauda poli-A), que tem a função de circularizar o mRNA, potencializando o processo de tradução. (WEISS, 2021; DEVER E GREEN, 2012; BROWNING E SERRES, 2015) (Figura 5). Apesar de todo o conhecimento sobre esse processo, muitas delas ainda não são bem esclarecidas, como por exemplo, a interação entre as proteínas EIF4E/EIF4G, sendo necessário o estudo mais aprofundado das mesmas.

Figura 5 - Iniciação da tradução em eucariontes



Fonte: Fitzgerald e Semler, 2011 adaptado

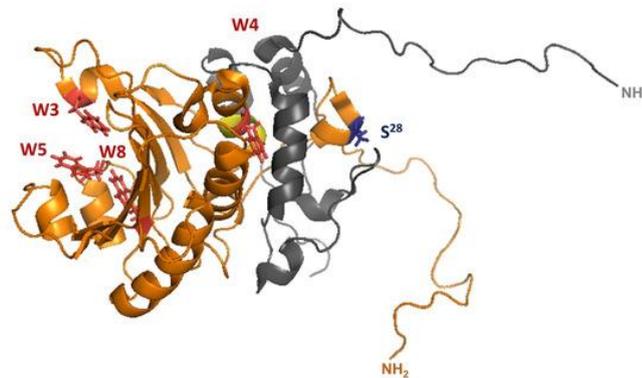
Nota: Formação do complexo PIC 43S com os fatores EIF1A EIF1 EIF5 EIF2 E EIF3 juntamente com a subunidade 40 S, seguido do complexo EIF4F com suas subunidades, EIF4A, EIF4G e EIF4E ligado ao cap do mRNA através do star códon AUG.

## 2.8 EIF4E: PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO CAP

A proteína EIF4E é uma proteína de 25,1 kDa, conservada em vários organismos, que reconhece o cap  $m^7$  presente na região 5' do mRNA através da porção C-terminal. Na parte côncava a proteína EIF4E possui uma estrutura formada por 8 folhas  $\beta$  antiparalelas, apoiadas por 3  $\alpha$ -hélices longas que forma uma estrutura semelhante a uma luva, e na parte convexa é formado por 3  $\alpha$ -hélices curtas. A interação com cap se dá através da sua região hidrofóbica contendo 8 resíduos conservados (W1-W8) visto em todas as espécies eucarióticas descritas até o momento, onde podemos observar mais detalhadamente na figura (6) (PAPADOULOS et al., 2014 KASCHITZA E ALTMANN, 2020). O EIF4E se localiza

em locais onde são encontrados os ribossomos, bem como em granulos heterogêneos de partículas citoplasmática e no núcleo, isso justifica a atuação dele da tradução. Além de recrutar os mRNA's através do cap para o processo de síntese proteica, a proteína EIF4E estabiliza o mRNA e também exporta RNA's do núcleo para o citoplasma, essas atividades afetam o controle da expressão gênica em mamíferos e sua atividade oncogênica (BORDEN, 2016; OLIVEIRA 2019). A interação entre as proteínas EIF4G/EIF4E pode ser inibida por uma família de proteínas denominadas 4E-BPs, estas competem com o mesmo sítio de ligação ao EIF4G, interrompendo o processo de tradução (GRUNER et al., 2016 YAN LI et al, 2021).

Figura 6 - Estrutura tridimensional da proteína EIF4E em *S. cerevisiae*



Fonte: Kaschitza e Altmann, 2020.

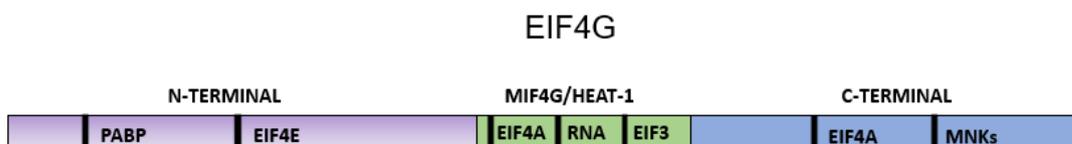
Nota: A estrutura representa o EIF4E (em ouro) em complexo com a estrutura cap (m7GDP) e um peptídeo do EIF4G (em cinza) demonstrando os resíduos conservados na região de ligação ao cap (W5/W8/W3) e na porção convexa, o resíduo de interação ao EIF4G (W4).

## 2.9 EIF4G: O ANCORADOR DO COMPLEXO EIF4F

A proteína ancoradora do complexo, EIF4G tem aproximadamente 175 kDa em mamíferos e é extremamente crucial na etapa inicial da tradução, interagindo com as subunidades EIF4E, EIF4A e a proteína acessória PABP que tem função de circularizar o mRNA, potencializando o processo de síntese proteica. A estrutura do EIF4G em mamíferos pode ser dividida em 3 segmentos: a região N-terminal (porção onde interage seu parceiro EIF4E, a PABP e o mRNA) a região central que contém o domínio MIF4G/HEAT-1 (porção onde ocorre a interação com o EIF4A e o fator de iniciação EIF3) e a região C-terminal que possui os domínios MA3 e W2 também envolvido na interação com o EIF4A, e ligação com proteínas quinases MNKs. (ANDREOU e LOSTERMIER, 2014; SONENBERG E HINNEBUSCH, 2009; MOURA

et al, 2015). Na sua região N-terminal se encontra um motivo canônico conservado de reconhecimento ao EIF4E, YXXXXLφ, onde X representa qualquer aminoácido e φ qualquer resíduo hidrofóbico (geralmente leucina, metionina ou fenilalanina), além de um motivo de ligação à PABP. (MERRICK, 2015; TORIBIO et al, 2019.) (Figura 7).

Figura 7- Esquema do EIF4G e os principais sítios de ligação a outras proteínas



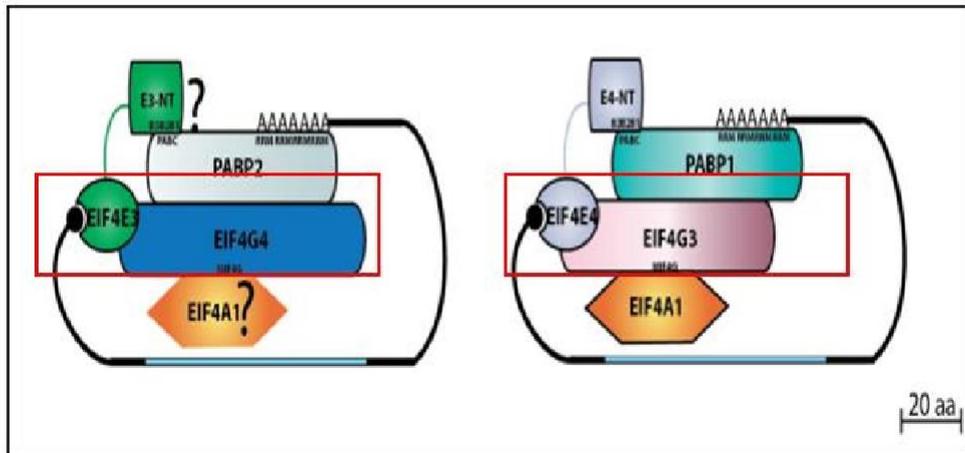
Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: O EIF4G possui na sua região N-terminal com os sítios de ligação à PABP e EIF4E. Na região central MIF4G/HEAT-1 desta proteína encontra-se a região de ligação ao EIF4A, além de uma região de ligação a RNA (RRM) e do sítio de ligação ao EIF3. Já na sua porção C-terminal se encontram segundo sítio de ligação ao EIF4A e o sítio de ligação da proteína Mnk1 (quinases).

## 2.10 COMPLEXOS EIF4E3/EIF4G4 E EIF4E4/EIF4G3

Dois complexos do tipo EIF4F foram identificados diretamente na síntese proteica, são eles: o complexo EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 revisado em (FREIRE *et al.*, 2017; de MELO NETO *et al.*, 2016). Em (MOURA et al, 2015) foram avaliados quatro homólogos do EIF4E frente ao EIF4G3 e EIF4G4 fusionadas a GST em *L. major*, e foi observado que a subunidade EIF4G3 interage especificamente com o EIF4E4 e a proteína EIF4G4 com a proteína EIF4E3. Apesar dessa especificidade foi visto em *L. major* que essa interação ocorre em resíduos divergentes e posições distintas na porção N-terminal da proteína EIF4G4 e EIF4G3. A interação canônica EIF4G4/EIF4E3 ocorre da posição 141 a 187 AA, e a interação EIF4G3/EIF4E4 acontece dos 263 ao 302 AA. Como foi visto, essa interação é específica, entretanto não se sabe até o momento o que determina a especificidade destas interações. A figura 8 ilustra de forma esquemática os homólogos de subunidades dos dois complexos do tipo EIF4F descritos em tripanosomatídeos envolvidos na tradução.

Figura 8 - Esquema representativo de complexos do tipo EIF4F envolvidos na tradução dos tripanosomatídeos



Fonte: Adaptado de Freire et al., 2017

Nota: Esquema representativo dos dois complexos implicados na tradução do tipo EIF4F. À direita formado pelos homólogos EIF4G3, EIF4E4, EIF4A1 e PABP1, destacando em vermelho a interação do EIF4G4/EIF4E3 e à esquerda formado pelas proteínas EIF4G4, EIF4E3, e PABP2 destacando também a interação entre EIF4G3/EIF4E4.

## 2.11 EIF4E3 e EIF4E4

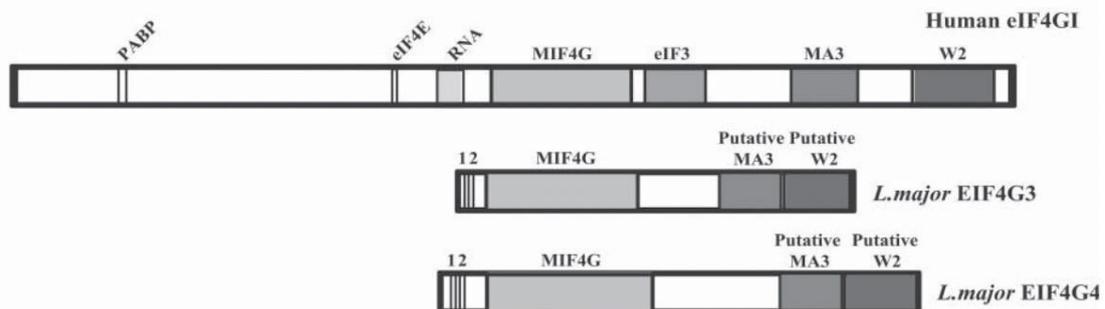
Em tripanosomatídeos foram descritos seis homólogos do fator de iniciação EIF4E, destes apenas o EIF4E3 e EIF4E4 estão implicados diretamente na síntese proteica. Recentemente foi observado que o EIF4E5 pode estar também envolvido, porém essa atividade ainda não foi elucidada. (DE MELO et al., 2020, 2021). As proteínas EIF4E3 e EIF4E4 são abundantes, citoplasmáticas e compartilham similaridade com o EIF4E de humanos, como por exemplo, a extensa região N-terminal, não observadas nos outros homólogos. Essas proteínas fazem parte dos dois complexos envolvidos na síntese proteica, são eles: EIF4G4/EIF4E3/PABP 2 e 3 e EIF4G3/EIF4E4/EIF4A1/PABP1 (FREIRE et al., 2017; DE MELO et al., 2016). Estudos realizados com RNAi em EIF4E3 apresentou inibição na proliferação celular sanguínea e procíclica, já com o EIF4E4 houve inibição da proliferação das células sanguíneas (FREIRE et al., 2011). Outra pesquisa mais recente, onde foi produzida a estrutura cristalográfica da proteína PABP1/EIF4E4 em *Leishmania*, mostrou que a porção N-terminal atua fortemente na estrutura do complexo de iniciação da tradução,

sendo estabelecido um modelo onde a proteína EIF4E4 substituiria a proteína mantenedoura do complexo EIF4G do complexo EIF4F. (RODRIGUES et al., 2018).

## 2.12 EIF4G3 E EIF4G4

Os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 apresentam similaridades entre si na organização dos seus domínios quando comparado ao EIF4G1 de humanos. Ambos apresentam uma região N-terminal curta com os motivos de ligação a PABP e EIF4E, equivalente ao EIF4G1, uma região central denominada MIF4G ou HEAT-1, com as regiões de interação a RNA helicase EIF4A, o fator EIF3 e para o RNA. Na região C-terminal eles também compartilham as regiões putativas MA3 e W2, onde ocorre a ligação também do EIF4A e as quinases, como podemos observar na Figura 9.

Figura 9 - Protótipo dos homólogos EIF4G3 E EIF4G4 de *L.major* em comparação com o EIF4G1 em humanos



Fonte: Adaptado de MOURA et al., 2015

Nota: Esquema representativo demonstrando as semelhanças entre as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 com o EIF4G1. Na esquerda podemos observar a região N-terminal curta dos homólogos com as regiões de ligação a PABP e EIF4E. Na região central, é indicado o domínio MIF4G e na porção C-terminal é observado a equivalência dos domínios MA3 e W2. Como dito anteriormente, estas interações ocorrem através de motivos semelhantes, porém em posições distintas correspondentes nos dois homólogos de EIF4G (Figura 9) (MOURA et al., 2015).

Figura 10 - Representação esquemática dos resíduos da região canônica em *L. major* envolvidos na interação EIF4G4/EIF4E3 E EIF4E4/EIF4G3



Fonte: Adaptado de MOURA et al., 2015

Nota: O esquema da esquerda resume as interações canônicas descritas em humanos, com base na estrutura cristalina, contendo o motivo de ligação de consenso (YXXXXLF). Os esquemas apresentam as interações canônicas EIF4E/EIF4G humano e as prováveis interações dos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 de *Leishmania major* (que se estendem também aos tripanosomatídeos).

As proteínas EIF4G3 e EIF4G4 têm características semelhantes nem significativas fora do domínio MIF4G que não são conservadas em outros homólogos como: EIF4G1, EIF4G2 e EIF4G5. Até o momento, EIF4G3 e EIF4G4 demonstraram formar complexos semelhantes a EIF4F, por meio de interações com a subunidade EIF4A (EIF4AI) e 2 homólogos de EIF4E ( EIF4E3 e EIF4E4), tanto em *T. brucei* quanto em *Leishmania sp.*

### 2.13 USO DE MOLÉCULAS PARA INIBIR A LIGAÇÃO EIF4G e EIF4E

A síntese de proteína tem sido cada vez mais alvo de ação de fármacos, dentre estes podemos citar alguns antibióticos que atuam impedindo o crescimento bacteriano ou inibindo a tradução, como por exemplo, os aminoglicosídeos, a tetraciclina e o clorafenicol (SOUZA, DIAS E ALVIM, 2022).

Além destes, existem inibidores que atuam pontualmente no complexo EIF4F, etapa limitante da tradução no intuito de interferir sua atividade, incluindo: a interrupção da interação entre o EIF4E e EIF4G; o bloqueio da interação do EIF4E ao cap do RNA mensageiro e também a inibição do EIF4A. Como os ribossomos são cruciais no processo inicial da síntese proteica, impedir a biogênese dos mesmos, tem sido uma estratégia em potencial para a atuação drogas.

Estudos recentes tem sido desenvolvido inibindo a interação EIF4G/EIF4E para o tratamento do câncer, utilizando uma molécula específica (4EGI-1) que compete com o sítio de interação do EIF4E através de um mecanismo alostérico, reduzindo a eficiência da tradução e consequentemente atuando contra diversas linhagens de células cancerígenas. (PAPADOULOS et al, 2017; LEHMAN et al., 2021).

No transtorno do espectro autista foi visto que há um aumento dos fatores EIF4G/EIF4E e uma síntese proteica líquida exacerbada. Foi realizado um estudo utilizando também a molécula 4EGI-1 tendo alvo a interação 4G/4E, algumas GTPases (Rac 1) e a regulação da actina em resposta à atividade sináptica, e foi observado que , quando houve a administração da molécula 4EGI-1, houve uma inibição da associação 4G/4E, deixando o EIF4E livre que compete a GTPase restaurando o equilíbrio entre essas vias de sinalização. (SANTINI, et al, 2018).

Recentemente foi produzido um novo inibidor i4EG-BiP que diferentemente da 4EGI-1 que se liga a superfície do EIF4E, ele tem um sitio de ligação interno diminuindo a interação 4G/4E resultando a inibição das linhagens de células cancerígenas (FISCHER, et al, 2021). Também foi identificado um inibidor do fator EIF4A, o rocaglamide ou (Roc A) que atua capturando o EIF4A no mRNA, bloqueando a varredura dos ribossomos resultando a interrupção da tradução. (IWASKI et al, 2019)

Sabendo da importância da interação dos fatores EIF4G/EIF4E, e como eles afetam inibindo a síntese de proteína, sendo alvo de fármacos em humanos faz-se necessário a elucidação da interação específica dos complexos EIF4G4/EIF4E3 e EIF4G3/EIF4E4, que já foi demonstrado estarem envolvidas com iniciação de tripanosomatídeos, e o conhecimento gerado podem ser utilizados para o desenvolvimento de inibidores capazes de bloquear estas interações de forma racional na busca de novos fármacos para o tratamento das doenças causadas por estes protozoários.

### 3 JUSTIFICATIVA

As tripanossomíases e as leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas, cuja prevenção e/ou tratamento ainda apresentam dificuldades. As drogas disponíveis para o tratamento das leishmanioses apresentam vários obstáculos, podendo acarretar a morte ou o comprometimento de funções vitais dos pacientes em tratamento. Devido a essencialidade de todos os seres vivos, a tradução constitui um dos principais sítios de ação de fármacos em outros modelos eucariotos, mas especificamente a iniciação da tradução, e em especial o complexo EIF4F, composto pelas subunidades EIF4A/EIF4E/EIF4G, é responsável por uma das primeiras etapas do processo. Em estudo recente em humanos, foi visto que a inibição da interação do EIF4E/EIF4G, exibiu atividade contra várias linhagens de células cancerígenas. Embora, saibamos os sítios de ligação na interação entre as proteínas *LmEIF4G3/LmEIF4E4* e *LmEIF4G4/LmEIF4E3*, até o momento, não se sabe as bases da especificidade destas interações em tripanossomatídeos. Sabendo da essencialidade da interação entre essas proteínas no processo de sobrevivência celular em diversos eucariotos, a proposta deste estudo é obter mutantes em resíduos das proteínas *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* em *Leishmania*, com o intuito de interrompê-las, permutando resíduos chaves na região de interação entre elas e avaliar a capacidade das mesmas se ligarem às proteínas parceiras *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4*. Os resultados obtidos esclareceram detalhes dos resíduos envolvidos na interação, além de que, este trabalho pode contribuir na identificação de alvos moleculares na iniciação da tradução destes protozoários para o desenvolvimento de novos antiparasitários para o tratamento das doenças causadas por estes protozoários.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as bases da especificidade de interação responsáveis pela interação dos fatores de iniciação da tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Identificar na região N-terminal das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 de *Leishmania major* motivos protéicos que possam estar relacionados a ligação específica às proteínas EIF4E4 e EIF4E3.

4.2.2 Obter mutantes das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 nos motivos protéicos que possam estar relacionados a ligação específica às proteínas EIF4E4 e EIF4E3.

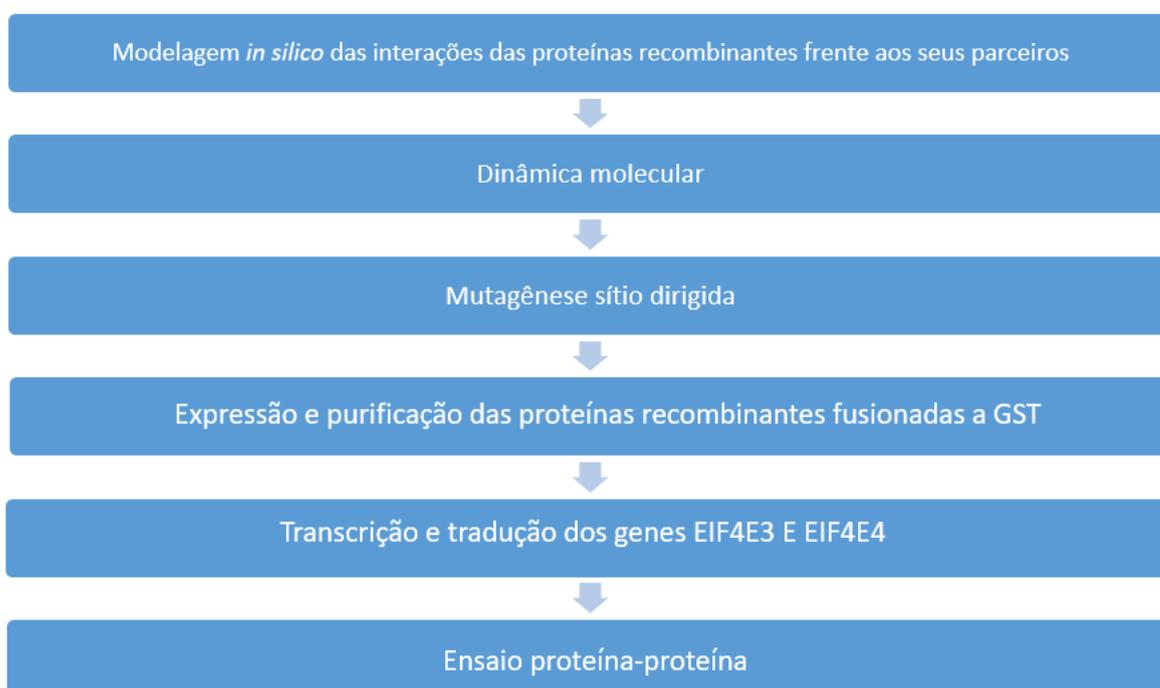
4.2.3 Avaliar a capacidade de interação dos mutantes EIF4Gs às proteínas EIF4Es de *Leishmania major* por ensaios de interação proteína-proteína *in vitro*.

4.2.4 Avaliar a capacidade de interação dos mutantes EIF4Gs às proteínas EIF4Es de *Leishmania major* por análises de bioinformática

## 5 METODOLOGIA

Diferentes técnicas e abordagens foram aplicadas nesse projeto para avaliar as bases da especificidade das interações EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3. Abaixo está descrito o fluxograma experimental para cumprimento dos objetivos propostos na figura 11.

Figura 11 - Fluxograma experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Fluxograma com resumo das metodologias utilizadas no trabalho

### 5.1 MODELAGEM *IN SILICO*

Para o referido estudo, as sequências de aminoácidos das proteínas EIF4G3 (Trytrip ID: *LmF.16.1600*) e EIF4G4 (Trytrip ID: *LmF.36.6060*) e seus parceiros EIF4E4 (Trytrip ID: *LmF.30.0450*) e EIF4E3 (Trytrip ID: *LmF.28.2500*) foram obtidos a partir da base de dados TritypDB. Antes da modelagem *in silico*, foi realizado um alinhamento de sequencial pelo Bioedit, identificando os motivos conservado entre elas, e os potenciais resíduos chaves na interação entre elas (figura 11). A fim de

realizar a análise e comparação do padrão de interação intermolecular entre os complexos de EIF3G3-EIF3E4 e EIF3G4-EIF3E3 selvagens e os mutantes de interesse no estudo, foram realizados ensaios de modelagem molecular dos complexos protéicos, por meio da ferramenta AlphaFold2 multimer (<https://colab.research.google.com/>) (EVANS, et al 2021). O ensaio de modelagem foi realizado utilizando as estruturas das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 dos resíduos 1 a 40 mutadas modeladas como ligantes (que apresentam os sítios de ligação aos parceiros EIF4E - Moura et al., 2015) e o EIF4E4 dos resíduos 255 a 439 e EIF4E3 dos resíduos 138 a 349, como receptor (que são definidos como a região de homologia as proteínas EIF4E de outros organismos que possuem o sítio de ligação ao EIF4G – (FREIRE et al 2017). O servidor AlphaFold 2 (AF2) é capaz de prever a estrutura dos domínios de proteínas com precisão combinando métodos experimentais. Tanto o método quanto um banco de dados de 365.198 modelos de proteínas foram lançados. (TUNYASUVUNAKOOL et al., 2021).

## 5.2 DINAMICA MOLECULAR

A estabilidade de interação entre os complexos proteicos preditos computacionalmente foi avaliada por meio do software YASARA Dynamics, uma ferramenta de simulação dinâmica molecular (KARPLUS; MCCAMMON, 2002; KRIEGER et al., 2004; KRIEGER; VRIEND, 2015). Essa simulação oferece um modelo inicial das interações moleculares entre ligante e receptor e fornece um meio rápido para gerar hipóteses do modo de reconhecimento e interações moleculares. As simulações de dinâmica molecular são subsequentemente usadas para incorporar flexibilidade conformacional em ambos os complexos e permite avaliar se as interações principais persistem, no contexto do campo de força da mecânica molecular atomística completa ao longo do tempo com base nas interações intermoleculares do sistema.

A execução da dinâmica molecular por meio do *software* foi realizada sob o campo de força AMBER14. Primeiramente os complexos recém preditos em 3D foram refinados pelo próprio *software*, favorecendo que os modelos se aproximassem mais precisamente com sua estrutura nativa, modificando unidades secundárias e reestruturando cadeias laterais. Em seguida, os complexos foram inseridos em uma

célula de simulação cubóide, e em seguida solvatados (densidade: 0,997 g/L-1), tendo em seguida sua energia minimizada. Após esses procedimentos, os procedimentos de dinâmica molecular foram iniciados, sendo mantidos durante um período de 20 ns, a uma temperatura de 300K. Por fim, a avaliação da estabilidade, flutuação e compactação dos mutantes *Lm G3 MUT 1*, *Lm G3 MUT 2*, *Lm G3 MUT 3* e *Lm G4 DEL*, *Lm G4 MUT 1*, *Lm G4 MUT 2* e *Lm G4 MUT 3*, foram realizadas, levando em consideração seus valores de desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF) e raio de giração.

### 5.3 MUTAGÊNESE SÍTIO DIRIGIDA

Os genes *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* clonados no vetor pGEX4T3, disponível anteriormente por (XAVIER, 2019), foram submetidos a reações de mutagênese sítio-dirigida utilizando o Kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene®) de acordo com as instruções do fabricante e os primers que permitiram obter os diferentes mutantes utilizados neste trabalho. Por uma questão de facilitação, decidimos nomear as sequências a serem obtidas de acordo com a tabela 1.

Figura 12 - Tabela de mutantes das proteínas LmEIF4G3 e LmEIF4G4 obtidos nesta dissertação

<i>Lm</i> G3 MUT 1	Glutamato	6	Alanina
	Serina	10	Alanina
	Valina	11	Fenilalanina
<i>Lm</i> G3 MUT 2	<b>AA original</b>	<b>Posição da mutação</b>	<b>AA modificado</b>
	Tirosina	15	Triptofano
	Leucina	16	Treonina
	Glutamato	17	Alanina
	Prolina	18	Isoleucina
<i>Lm</i> G3 MUT 3	<b>AA original</b>	<b>Posição da mutação</b>	<b>AA modificado</b>
	Tirosina	20	Glutamato
	Glicina	22	Asparagina
	Glutamato	27	Arginina
<i>Lm</i> G4 DELEÇÃO	<b>AA original</b>	<b>Posição da deleção</b>	
	MFLNLRGIVPQKEEKVKNQ	1 ao 17	
<i>Lm</i> G4 MUT 1	<b>AA original</b>	<b>Posição da mutação</b>	<b>AA modificado</b>
	Metionina	20	Fenilalanina
	Alanina	23	Glutamato
	Alanina	27	Serina
	Fenilalanina	28	Valina
<i>Lm</i> G4 MUT 2	<b>AA original</b>	<b>Posição da mutação</b>	<b>AA modificado</b>
	Triptofano	32	Tirosina
	Treonina	33	Leucina
	Alanina	34	Glutamato
	Isoleucina	35	Prolina
<i>Lm</i> G4 MUT 2	<b>AA original</b>	<b>Posição da mutação</b>	<b>AA modificado</b>
	Glutamato	37	Tirosina
	Asparagina	39	Glicina
	Arginina	44	Glutamato
	Leucina	47	Arginina

### 5.3.1 REAÇÃO DE MUTAGÊNESE

Inicialmente os oligonucleotídeos liofilizados, sintetizados em um total de 25 nmol, foram dissolvidos em água deionizada para uma concentração de estoque de 1 µg/µl. Após a confirmação da concentração e integridade em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Life Technologies), estes oligonucleotídeos foram diluídos para a concentração de uso de 25 ng/µl. As quantificações foram ainda confirmadas por espectrofotometria. A mutagênese sítio-dirigida foi realizada numa reação contendo: 5 µL de tampão de reação 10X concentrado, 5 µL de plasmídeo (6 ng/µl - 30 ng), 5 µL do oligonucleotídeo 1 (25 ng/µL - 125 ng), 5 µL do oligonucleotídeo 2 (25 ng/µl - 125 ng), 1 µL de dNTPs (Stratagene®), 28 µL de água deionizada e 1 µL de DNA polimerase PfuUltra HF (2.5 U/µL). As condições utilizadas na reação de PCR foram: 95°C por 1 minuto, 95°C por 50 segundos, 60 °C por 50 segundos, 68° por 8 minutos e 68 ° por 7 minutos (16 ciclos) . Após a reação, 10 µL de cada amplificação foram resolvidos em gel de agarose 1%, contendo SYBR® Safe DNA gel stain, e visualizados em transiluminador UV. Em seguida, as reações foram digeridas com 1 µL da enzima Dpn I (10U/µL) a 37 °C/1h, que digere os plasmídeos não-mutagenizados. Bactérias XL1-Blue eletrocompetentes, previamente preparadas em nosso laboratório, foram transformadas com 2 µL das reações de mutagênese (tratadas com Dpn I) através de um choque elétrico de 2kV.

Após a descarga elétrica, as bactérias foram inoculadas em 1 ml de meio SOC por 1 hora (para recuperação) e semeadas em placas contendo LB sólido com ampicilina (100 µg/ml), a 37° C por 18 horas. Alguns clones transformantes, oriundos da mutagênese, foram inoculados em 2ml de meio LB contendo ampicilina, crescidos a 37°C por 18 horas e submetidos à minipreparações de DNA utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System. Os plasmídeos resultantes, obtidos foram quantificados e sequenciados, para a confirmação das mutações inseridas.

### 5.4 SEQUENCIAMENTO DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS MUTANTES

As minipreparações oriundos dos clones transformantes foram *LmEIF4G3*, *LmEIF4G4* no pGEX4T3 foram inicialmente sequenciados no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) pelo método de Sanger. Os resultados liberados pelo sequenciamento foram analisados nos programas do

pacote DNASTAR (Lasergene) e foram comparadas a sequência dos genes *LmEIF4G3* WT e *LmEIF4G4* WT clonadas no vetor pGEX4T3 (MOURA et al., 2015).

## 5.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EIF4G3 E EIF4G4

Para a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a proteína Glutathione S-transferase (GST) o vetor de expressão procariótico pGEX4T3, contendo os genes EIF4G3 e EIF4G4 de *Leishmania major* selvagens e mutantes foram transformados em cepas de células quimiocompetentes BL21 star (Invitrogen®) de *E. coli* por choque térmico. As placas de Petri contendo meio Agar LB (Luria-Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 ug/ $\mu$ L) foram utilizadas para transformar cepa BL21 star. As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 ug/ $\mu$ L) e foram crescidas a 37°C sob agitação de 180 rotações por minuto (rpm) e posteriormente será analisada qual condição será ideal para o crescimento (37°C e 30°C por 3 horas ou 18°C Over night) Para a expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 10 mL das culturas crescidas foram inoculadas em 500 mL de meio LB com antibiótico e crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600 nm) até atingir uma densidade óptica (D.O) entre 0,5 ou 0,8 dependendo da proteína a ser expressa. Em seguida foi adicionado o indutor de síntese de proteínas, IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosídeo - Sigma-Aldrich®), na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C. Posteriormente, as células foram lisadas por ultrasonicação pelo equipamento ecosonic com 6 pulsos de 30 segundos e intercalando com o repouso de 1 minuto. Posteriormente o lisado foi centrifugado a 4°C a 20.000g por 30 minutos para a etapa de purificação. A construção dos mutantes EIF4G4 e EIF4G3 de *L. major* foi utilizada para transformação de *Escherichia coli* linhagem BL21 star (Invitrogen). Após crescimento, em uma densidade óptica de 0,5, foi feita a indução da expressão da proteínas recombinante com IPTG ( $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo de isopropílico) em uma concentração de 0,5 mM por 3 horas a 37°C em meio LB. As células foram coletadas por centrifugação e lisadas por sonicação, com seis ciclos de 30 segundos de sonicação por 30 segundos de repouso, sob amplitude de 40% em gelo e água, em aparelho sonicador MSE

Soniprep 150. As proteínas superexpressas foram purificadas utilizando-se de colunas de afinidade e colunas catiônicas em sistema automatizado de purificação FPLC AKTA UV-900 em tampão A (50mM Tris-HCl, 300mM NaCl e Imidazol a 20mM) e para a eluição linear, em coletor automático P-950, usando tampão B (tampão A com KCl 1M). Após eluição das frações contendo as proteínas, as frações contendo a proteína de interesse foram analisadas em SDS-PAGE e então reunidas e dialisadas em tampão A com 20% de glicerol.

## 5.6 TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO DAS PROTEÍNAS EIF4E3 E EIF4E4

Para a obtenção dos parceiros EIF4E3 e EIF4E4 foi realizado transcrição e tradução *in vitro*, visto que são proteínas insolúveis e já houveram tentativas de conseguir obtê-las em sistema procarioto, porém sem sucesso. Sendo assim, foram utilizadas construções EIF4E3 e EIF4E4 clonadas no vetor pET21d. Para a reação foram utilizados 3 microgramas de DNA linearizado na região 3' com a enzima Hpa I, posicionado imediatamente após o fim do gene no plasmídeo pET21d, e a enzima T7 RNA polimerase (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de transcrição foram realizadas em um volume final de 50 uL na presença de tampão de transcrição (40 mM Tris pH8,0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), rNTPs (4 mM de ATP, CTP e UTP, cada; 0,4 mM de GTP; (GE Healthcare®), 0,5 mM de m<sup>7</sup>-GTP (New England Biolabs®), 10 mM DTT, 30 U de inibidor de RNase (Promega®), 10 U de T7 RNA polimerase (Promega®) e água deionizada, tratada com DEPC. A reação foi incubada por duas horas a 37°C e após os 30 minutos iniciais e adicionada de GTP para uma concentração final de 1 mM. Após mais 30 minutos de reação foi adicionado 2,5 U de T7 RNA polimerase. Ao término das reações de transcrição, 1 uL de cada transcrito sintetizado foi analisado em gel de agarose 1% corado com Syber® Safe (Invitrogen®). Os mRNAs sintéticos obtidos foram precipitados com 0,3 M NaCl e 2,5 volumes de etanol 100 % e o sedimento ressuspensionado em água deionizada tratada com DEPC. Para a tradução *in vitro*, alíquotas de 0,1, 0,2 e 1 uL dos RNAs purificados foram traduzidos em lisado de reticulócito de coelho (RRL) suplementado com metionina e cisteína de acordo com as recomendações do fabricante (Promega®). As reações de tradução foram realizadas na temperatura de 30°C, durante 90 minutos. Após a tradução, as alíquotas de 5 uL de cada amostra foram acrescidas de tampão de amostra para gel SDS-PAGE 15%, e submetidas à

migração por eletroforese e transferidas para membranas de nitrocelulose para realização de western-blot com anticorpo anti-histidinas.

## 5.7 ENSAIO DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Para os ensaios de interação proteína-proteína, a resina Glutathione-Sefarose 4B (GE Biosciences®) foi previamente equilibrada com o tampão de ligação BB3 (100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Hepes pH 7.2, 0,2% NP-40, 5% glicerol). Em seguida a resina foi bloqueada utilizando o tampão BB3 acrescido de 10 µg/mL de BSA para evitar ligações inespecíficas. Para cada ensaio, aproximadamente 10 µL de cada resina bloqueada foi incubada com 2 µg de proteína recombinante purificada, em um volume final de 200 µL (em tampão BB3), durante 1 hora sob agitação, a 4°C. As resinas foram lavadas duas vezes com tampão BB3 incubadas com 5 µL de proteínas produzidas em reticulócito de coelho (no volume final de 200 µL de tampão BB3), durante 2 horas sob agitação a 4°C. Após três lavagens com 500 µL de tampão BB3, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 40 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e 10 µL de cada amostra foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 15%, seguido de western-blot com anti-histidinas. Como controles negativos foram utilizadas a proteína GST, a proteína EIF4E3-His (controle para interação com EIF4G3) e a proteína EIF4E4-His (controle para a interação com a proteína EIF4G4).

## 5.8 WESTERN BLOT

Para a revelação do ensaio por pull down, foi realizado o ensaio de western blot onde as amostras foram migradas em gel SDS-PAGE 20% e transferidos para membrana de PVDF (100 mA por 1h e 30 minutos). A membrana foi então bloqueada com solução de TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5), leite desnatado 5% e Tween-20 a 0,05% em temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-E3 e anti-E4 na concentração de 1:3000 com a solução de bloqueio com diluições dos anticorpos utilizados. Após três lavagens de 10 minutos em solução de TBS/Tween-20 a 0,05%, houve uma segunda incubação, desta vez com o segundo anticorpo secundário anti-coelho na proporção de 1:10000 conjugado a peroxidase em diluições semelhantes às do primeiro anticorpo na solução de bloqueio, por uma hora. Esta incubação foi seguida de três lavagens de 10 minutos. Os anticorpos secundários, conjugados a 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. A reação pode ser detectada através do equipamento iBright Imaging Systems (Thermo Fischer Scientific) com exposições, que variaram entre 10 segundos e 5 minutos, de acordo com a intensidade das reações.com anticorpo utilizado.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ALINHAMENTO N-TERMINAL PROTEÍNAS EIF4G E DEFINIÇÃO DOS MUTANTES

Para definição dos mutantes, foi realizado um alinhamento da região N-terminal das proteínas *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* (figura 13) que permitiu identificar aminoácidos de grupo funcional distintos (asteriscos coloridos) na duas proteínas que poderiam estar envolvidos nas especificidades das interações com as proteínas *LmEIF4Es* parceiras. Após esta análise, foram selecionados aminoácidos na proteína *LmEIF4G3*, nas posições mostradas, para serem substituídos por aminoácidos da proteína *LmEIF4G4* e vice-versa. O conjunto de mutantes obtidos está representado na figura 13

Com base nessas análises, desenhamos uma estratégia para obtenção de sete diferentes mutantes, dos quais três foram para a proteína *LmEIF4G3*: *LmG3 mut1* (F3M/E6A/S10A/V11F), *LmG3 mut2* (Y15W/L16T/E17A/P18I), *LmG3 mut3* (Y20E/G22N/E27R/R30L) e quatro foram obtidos para a proteína *LmEIF4G4*: *LmG4DEL1-17*, *LmG4 mut1* (M20F/A23E/A27S/F28V), *LmG4 mut2* (W32Y/T33L/A34E/I35P), *LmG4mut3* (E37Y/N39G/R44E/L47R) (Figura 13).

Os resultados estão organizados em duas seções: 1- Análise das interações EIF4G/EIF4E por bioinformática e 2-Análise das interações EIF4G/EIF4E por *pull-down*.

Figura 13 - Alinhamento da região N-terminal das proteínas *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* e suas respectivas mutações



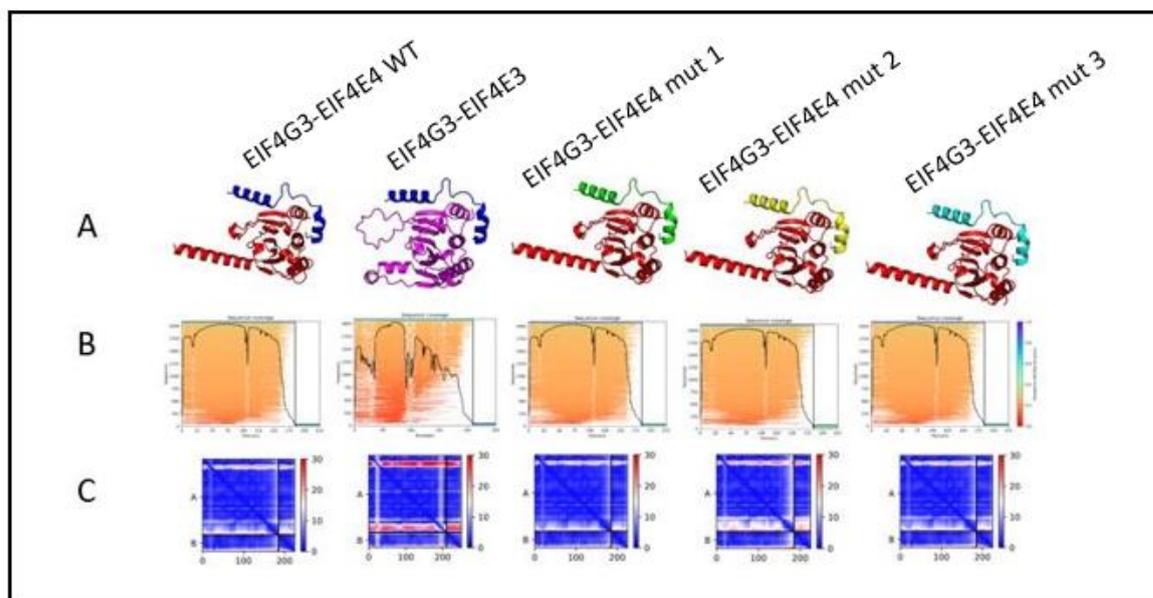
Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: O alinhamento representa as regiões que foram mutadas a partir dos genes selvagens *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* no vetor pGEX4T3. Os mutantes obtidos para o *LmEIF4G3*: *LmG3* mut1 (F3M/E6A/S10A/V11F), *LmG3* mut2 (Y15W/L16T/E17A/P18I), *LmG3* mut3 (Y20E/G22N/E27R/R30L). Já os mutantes para o *LmEIF4G4*: *LmG4* mut1 (M20F/A23E/A27S/F28V), *LmG4* mut2 (W32Y/T33L/A34E/I35P), *LmG4* mut3 (E37Y/N39G/R44E/L47R).

## 6.2 ANÁLISES DAS INTERAÇÕES EIF4G/EIF4E POR BIOINFORMÁTICA.

Para dar início às análises de bioinformática dos mutantes dos *LmEIF4G3* (região N-terminal) foram obtidos modelos de estruturas das duas proteínas. Inicialmente, o objetivo foi investigar o papel da interação do complexo EIF4G3/EIF4E, que já foi melhor caracterizado na porção N-terminal das proteínas EIF4G3 e sua interação com o parceiro EIF4E4, assim como avaliar se as mutações induzidas geram mudanças significativas na estrutura frente ao modelo tipo selvagem da proteína alvo. Inicialmente obtivemos um modelo estrutural das duas proteínas ressaltando os locais de permuta de aminoácidos de mesmas cores nas proteínas alvos do estudo (figura13). A simulação de dinâmica molecular foi realizada para os 5 dockings do estudo: *LmG3* WT-E4 WT, *LmG3* WT-E3 WT, *LmG3* mut 1/E4 *LmG3* MUT2/E4e *LmG3* MUT 3/E 4 utilizando o software Yasara Dynamics. Os parâmetros refletem no ponto de vista prático. O pLDDT é um parametro que avalia a qualidade e confiabilidade da predição, onde o máximo de confiabilidade é 1, e os valores dos complexos preditos ficaram quase em 0,9, o que significa que os modelos apresentam uma alta probabilidade de representar com acurácia o natural (Figura 14).

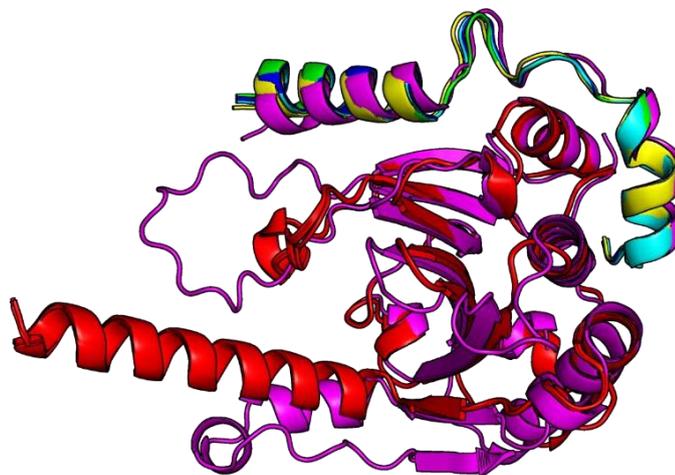
Figura 14 - Modelagens do complexo EIF4G3-EIF4E4



Nota: Acima podemos observar os modelos tridimensionais dos complexos estudados. Na primeira linha (A) de figuras demonstrando os modelos tridimensionais, seguido pelos gráficos de alinhamentos múltiplos de seqüências advindas de modelos tridimensionais homólogos, os quais foram usados para realização da predição estrutural do complexo, na segunda linha (B), e os gráficos de PAE (erro de alinhamento previsto) na terceira linha indicando os possíveis erros por resíduo dentro da estrutura tridimensional (C).

Posteriormente foi feita uma análise de sobreposição das estruturas tridimensionais das proteínas G3-E4, G3-E3, G3 MUT 1, G3 MUT 2 e G3 MUT 3 em suas respectivas posições de ancoragem, revelando similaridades entre as posições de ancoragem dos diferentes modelos tridimensionais (Figura 15). Ao comparar com o G3-E4, quando comparado com a estrutura original G3-E3 foi visto que houve um aumento maior do RMSD, sendo esse de 1,321 Å, seguido pelo complexo G3 MUT 1 com 0,234 Å e pelo complexo G3 MUT 2 com 0,294 e G3MUT 3 com 0,121

Figura 15 - Alinhamento dos complexos EIF4G3 ancorados ao seu parceiro EIF4Es



Nota: Na figura acima estão sendo representados os modelos tridimensionais sobrepostos e preditos pela ferramenta alphafold estruturalmente. Em vermelho é demonstrado a proteína EIF4E4, em lilás a proteína EIF4E3, em azul marinho a EIFG3 WT, em verde a proteína EIF4G3 Mut 1, em amarelo o EIF4G3 Mut 2 e na cor lilás o mutante EIF4G3 mut 3.

Como dito anteriormente os valores de RMSD foram analisados com o objetivo de averiguar e comparar a estabilidade entre os complexos. Abaixo podemos observar a tabela com os respectivos valores do RMSD das interações. O que observamos foi que todas as interações semantiveram estáveis durante todo o curso dos 20 ns de dinâmica como demonstrado na figura 16, através dos valores de RMSD abaixo de 1 Å .

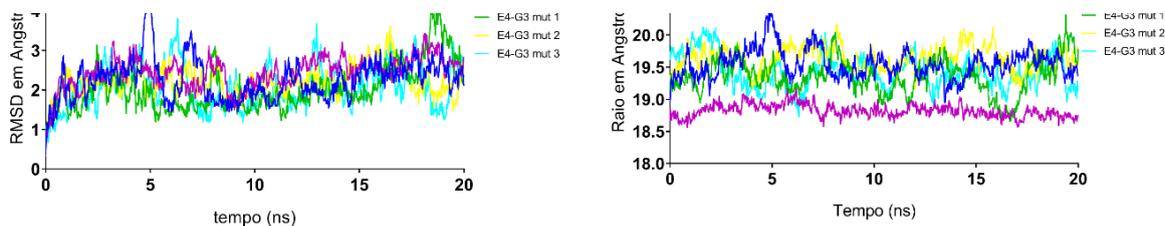
Figura 16 - Valores de RMSD em Angstrom entre os modelos de EIF4G3 nos respectivos complexos

	G3 WT	Mut 1	Mut 2	Mut 3
G3-E4		0,234	0,294	0,121
Mut 1	0,234		0,356	0,296
Mut 2	0,294	0,356		0,230
Mut 3	0,121	0,296	0,230	

Nota: Valores de RMSD refletindo o grau de estabilidade da ligação entre os complexos G3-E4, onde os baixos níveis de RMSDs refletem uma maior estabilidade de ligação em todos modelos analisados.

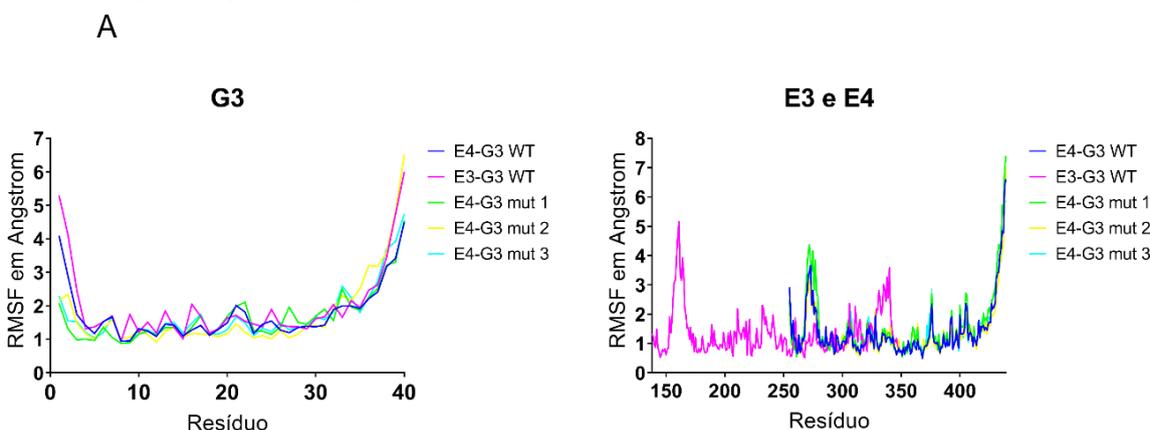
Também foi avaliado o raio de giração dos complexos com o intuito de ilustrar o grau de compactação da proteína em torno de seus eixos, fornecendo uma visão das dimensões gerais da proteína (figura 17). Os valores médios de  $R_g$  para os complexos G3-E4, G3-E3, G3 MUT 1, G3 MUT 2 e G3 MUT 3 foram de 19,553 Å, 18,794 Å, 19,353 Å e 19,632 Å e 19,431 Å respectivamente. Ao analisar a variação de  $R_g$  ao longo dos 20 ns de simulação, é possível observar que o grau de compactação dos complexos receptor-ligante tendeu a se manter estáveis, ou seja, não houve variação entre as interações destes complexos, no caso dos mutantes. Com relação ao controle negativo, G3-E3 observamos um perfil de flutuação diferente dos demais, no qual acreditamos que isso se deu pela diferença de estrutura das proteínas EIF4E3 e EIF4E4. Já com relação a raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF), concluímos que o *LmG3* mut 1 teve mais variação quando comparado ao G3-E4, demonstrando que essa mutação tem o potencial de desestabilizar a interação. Quanto aos mutantes 2 e 3 não teve muita variação. Foram também observadas oscilações, mas que se estabilizaram rapidamente, como no pico azul referente ao G3/E4 WT.

Figura 17 - Variação de RMSD dos complexos EIF4G/EIF4E



Nota: Desvio quadrático médio (RMSD) dos complexos EIF4E-EIF4G, demonstrando caráter similar de flutuação. E na direita o raio de giração (RG) em Angstrom demonstrando o grau de compactação das respectivas interações

Figura 18 - Grau de Flutuação em Angstrom dos aminoácidos mutados nos diferentes complexos estudados



B

- eIF4E4 WT<sub>(255-439aa)</sub> – eIF4G3 WT<sub>(1-40aa)</sub> – MQFTVEQIRSVRN~~N~~YLEPPYPGFSLDEVVRRRRRLTQTKLV
- eIF4E3 WT<sub>(138-349aa)</sub> – eIF4G3 WT<sub>(1-40aa)</sub> – MQFTVEQIRSVRN~~N~~YLEPPYPGFSLDEVVRRRRRLTQTKLV
- eIF4E4 WT<sub>(255-439aa)</sub> – eIF4G3 mut 1<sub>(1-40aa)</sub> – MQFTVEQIRSVRN~~N~~YLEPPY**EP**NFSLD**RVV**LRRRLTQTKLV
- eIF4E4 WT<sub>(255-439aa)</sub> – eIF4G3 mut 2<sub>(1-40aa)</sub> – MQFTVEQIRSVRN~~N~~**WTA**IPYPGFSLDEVVRRRRRLTQTKLV
- eIF4E4 WT<sub>(255-439aa)</sub> – eIF4G3 mut 3<sub>(1-40aa)</sub> – MQ**M**TV**A**QIR**A**FRN~~N~~YLEPPYPGFSLDEVVRRRRRLTQTKLV

Tabela 4. Grau de flutuação em Angstrom dos aminoácidos mutados nos diferentes complexos estudados

	3 aa	6 aa	10 aa	11 aa	15 aa	16 aa	17 aa	18 aa	20 aa	22 aa	27 aa	30 aa
<b>G3-E4</b>	1,743	1,525	1,317	1,085	1,102	1,277	1,416	1,121	1,492	1,815	1,196	1,375
<b>G3-E3</b>	2,465	1,521	1,218	1,191	1,016	2,048	1,683	1,191	1,633	1,539	1,385	1,618
<b>Mut 1</b>	0,988	1,361	1,16	1,131	1,102	1,356	1,7	1,162	<b>1,686</b>	<b>2,108</b>	<b>1,963</b>	<b>1,689</b>
<b>Mut 2</b>	1,489	1,326	1,29	0,92	<b>1,07</b>	<b>1,179</b>	<b>1,162</b>	<b>1,138</b>	1,161	1,215	1,045	1,404
<b>Mut 3</b>	<b>1,525</b>	<b>1,192</b>	<b>1,284</b>	<b>0,92</b>	1,189	1,49	1,748	1,178	1,286	1,494	1,291	1,669

Nota: Acima temos o gráfico apresentando o raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF) em angstrom de todos os resíduos presentes nas proteínas estudadas do complexo, apresentados

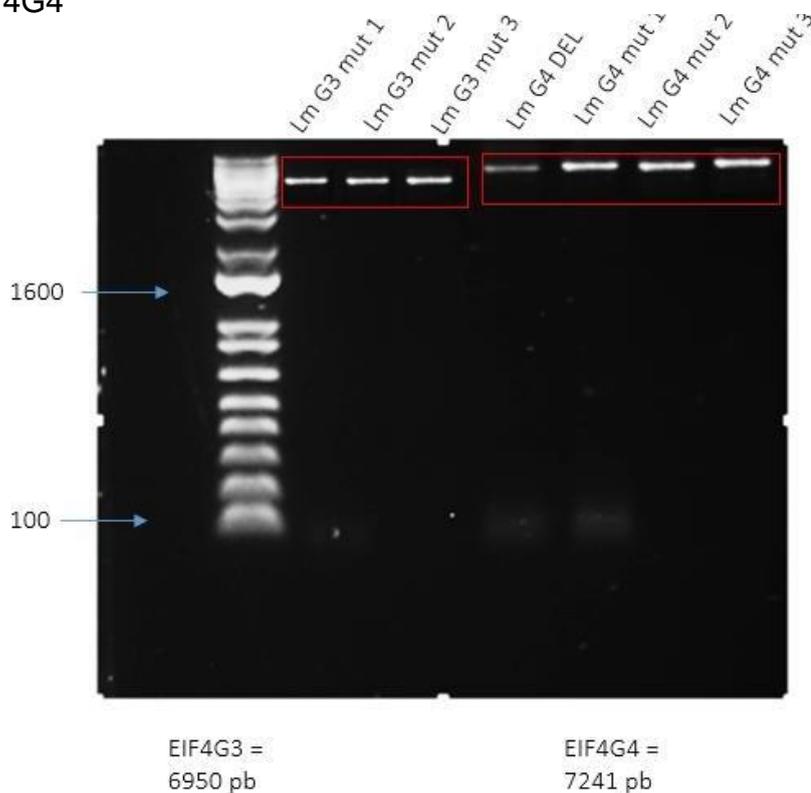
separadamente sendo (A) a flutuação dos resíduos do G e (B) sendo a flutuação dos resíduos dos E. Na figura B podemos observar mais as regiões de oscilação do RMSF.

Na figura 18A podemos observar os valores de RMSF por resíduo das proteínas EIF4G3 WT e EIF4G3 mutantes. É visto flutuações no início da dinâmica e no final, o que é normal, pois nesse momento ainda está havendo a estabilização e finalização de toda a dinâmica. Ao lado temos os valores dos RMSF por resíduos da interação G3-E4, e verificamos oscilações importantes do controle nativo e os respectivos mutantes. Entre os resíduos 250 e 300, onde houve as permutas dos resíduos notamos uma oscilação maior do mutante G3 mut 1 em comparação aos demais, como também no final da dinâmica. Essas variações corroboram com os achados anteriores da dinâmica, demonstrando que o mutante G3 mut 1 pode ter algum potencial de desligamento da interação. Já na figura (B) é demonstrado a tabela com a flutuação dos aminoácidos mutados, onde é visto a maior variação no G3 mut 1, quando comparado ao controle nativo, enquanto os resíduos dos outros mutantes não tiveram oscilações tão importantes.

## 6.2 OBTENÇÃO DOS MUTANTES

Buscando caracterizar melhor as interações do EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3 feitas reações de mutagênese sítio dirigida, modificando aminoácidos conservados na região de interação do *LmEIF4G3* a fim de mimetizar a proteína *LmEIF4G4* (Figura 19) e vice versa. Na Figura 17 estão representados os DNAs plasmidiais extraídos dos 3 mutantes referentes à proteína EIF4G3 como também a deleção da região N-terminal do EIF4G4 e seus respectivos mutantes.

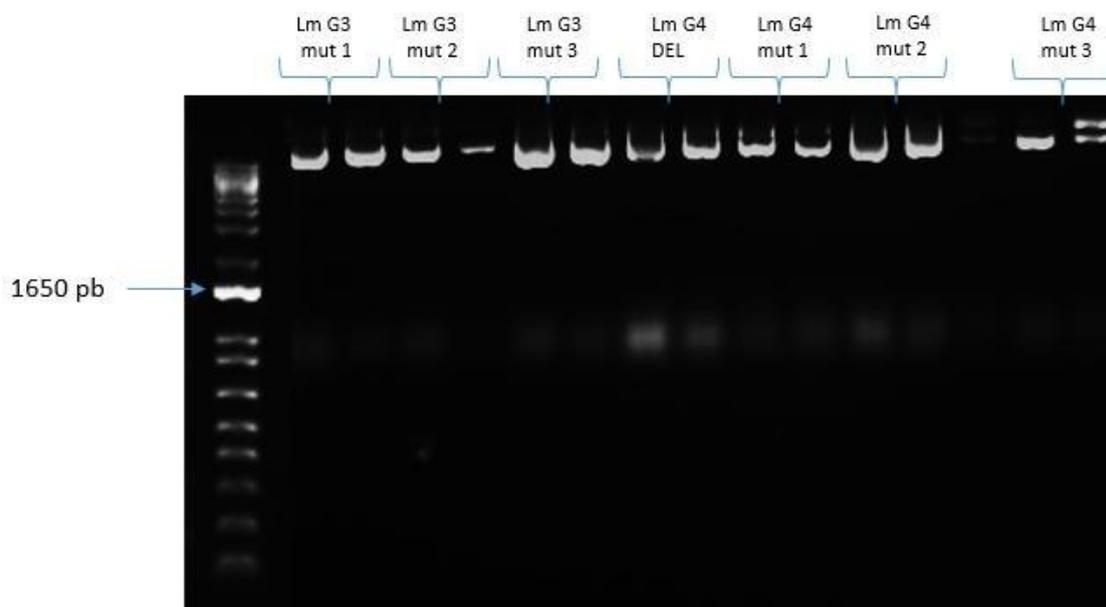
Figura 19 - Produtos das reações das mutagêneses dos genes *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4*



Nota: Reações das mutagêneses em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA gel stain (ThermoFisher) correspondente com o plasmídeo pGEX4T3-GST-Tev (5675 bp) e os respectivos genes EIF4G3 (1908 pb) e EIF4G4 (2298 pb) sendo possível observar as bandas amplificadas de cada mutante no tamanho correspondido. Marcador correspondente a o 1kb ladder(Invitrogen®).

Em seguida, após etapas da reação de mutagênese, foram obtidos clones transformantes que foram crescidos e extraídos através de minipreparações de DNA por lise alcalina que estão apresentados na figura 20.

Figura 20 - Minipreparações de DNA plasmidial obtidos após reação de mutagênese sítio-dirigida

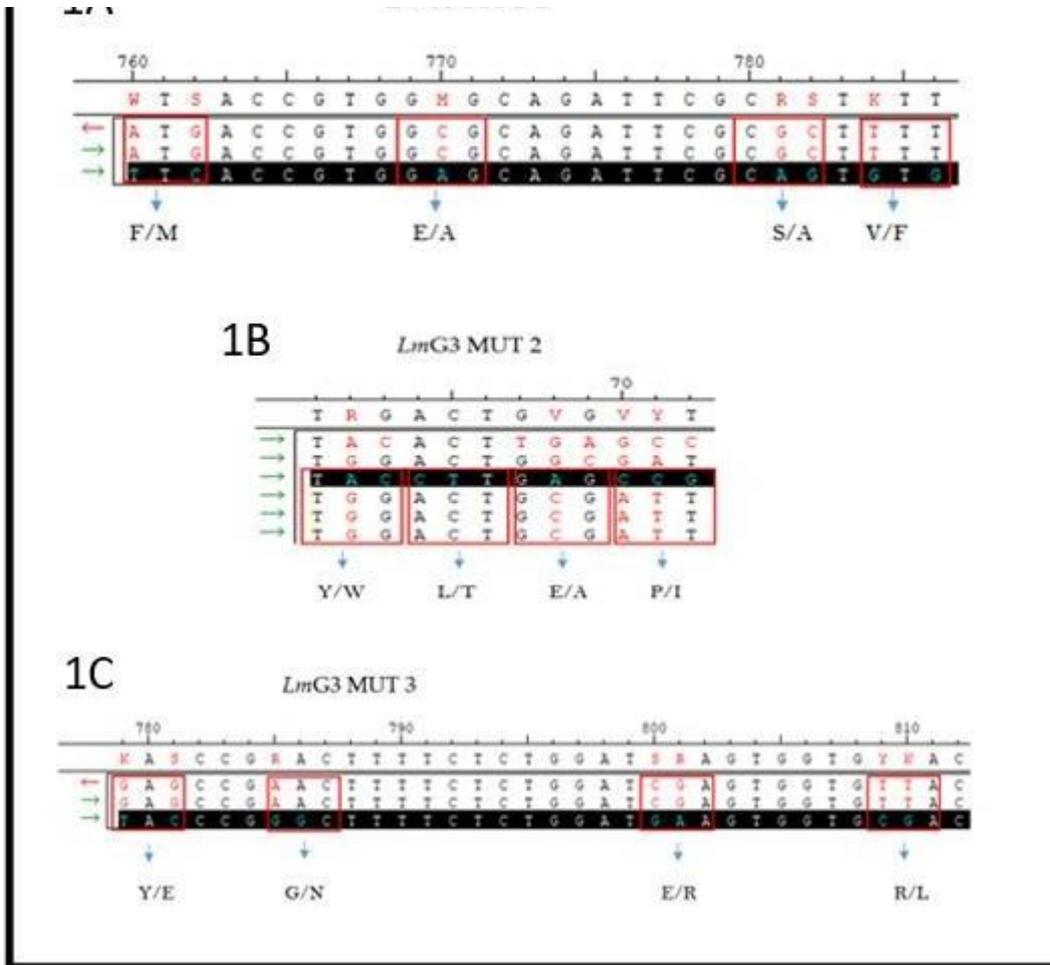


Nota: Para cada uma das mutações testadas foram obtidos 2 clones e os DNAs plasmidiais obtidos foram migrados e separados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe DNA gel.

### 6.2.1 Confirmação dos mutantes

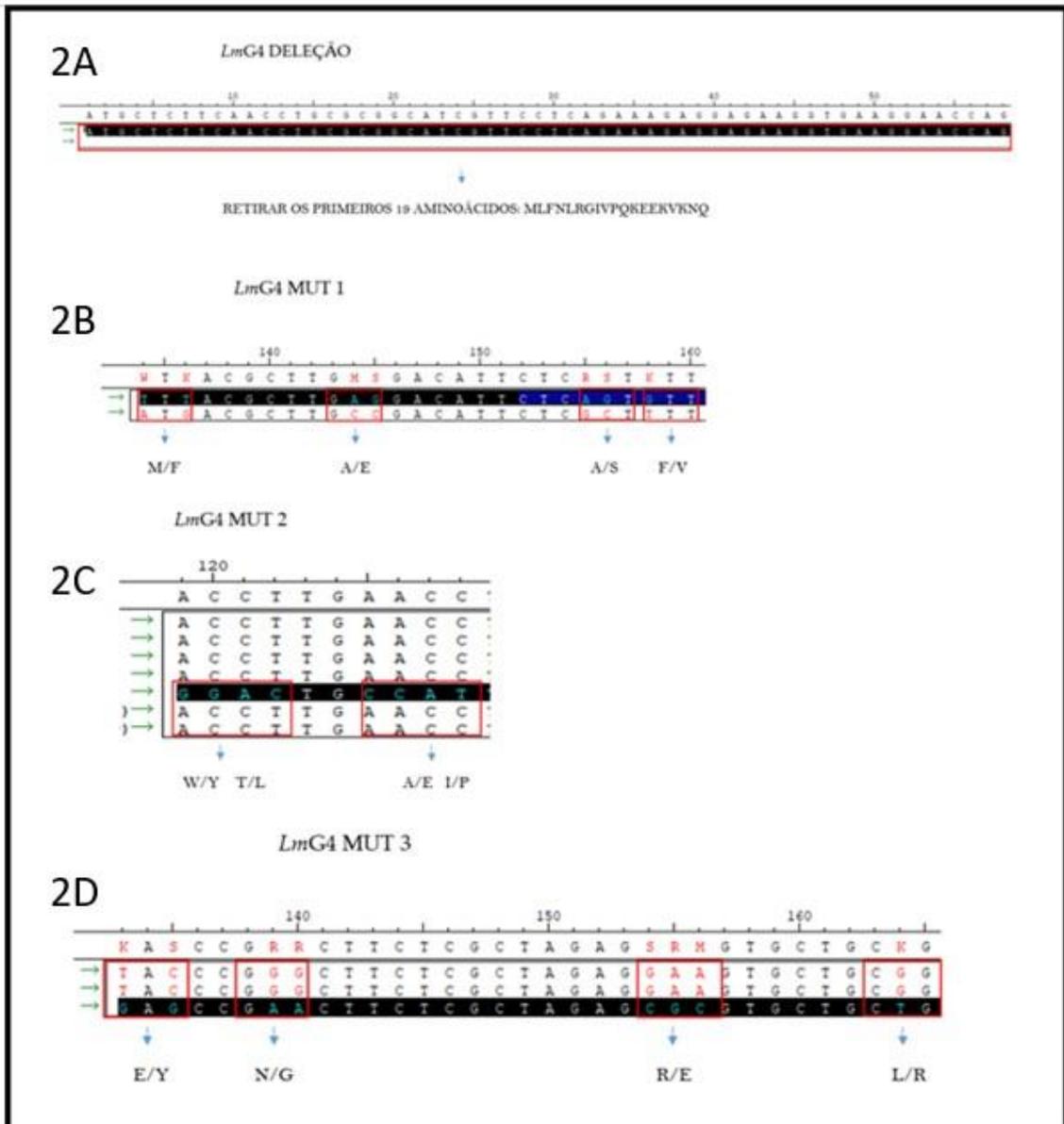
Para a confirmação de interesse, os DNAs plasmidiais foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de *Sanger* para *screening* dos clones que possuíam as mutações de interesse que estão confirmadas nas análises de sequências da figura 21 para o gene *LmEIF4G3* e da figura 22 para o gene *LmEIF4G4*.

Figura 21 - Confirmação das mutações obtidas para o gene *LmEIF4G3* contendo resíduos conservados do gene *LmEIF4G4*



Nota: Acima podemos observar a confirmação dos mutantes com os aminoácidos conservados do EIF4G4 no EIFG3. Essas análises foram feitas pelo programa SeqMan, onde foi alinhado as sequências de DNA do gene nativo e dos respectivos mutantes, que posteriormente foram traduzidas. Na imagem (1A) a confirmação do mutante *LmG3 mut 1* com a troca dos aa (F3M/E6A/S10A/V11F), na imagem (1B) a confirmação do mutante *LmG3 mut 2* (Y15W/L16T/E17A/P18I) e na imagem (1C) a confirmação do mutante *LmG3 mut 3* (Y20E/G22N/E27R/R30L) encontrados ao longo da sequência.

Figura 22 - Confirmação das mutações obtidas para o gene *LmEIF4G4* contendo resíduos conservados do gene *LmEIF4G3*

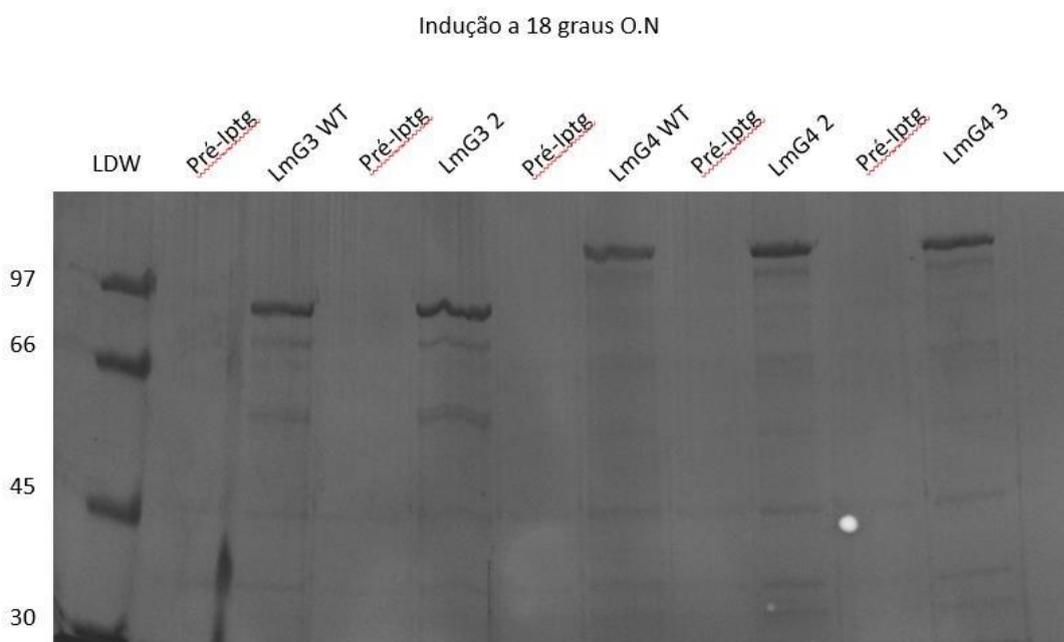


Nota: Acima temos a confirmação dos clones mutados com os aminoácidos conservados do EIF4G3 no EIF4G4. Na imagem (2A) é constatado a deleção dos aa 1 ao 17 da porção N- terminal da proteína EIF4G4. Na imagem 2B, temos a confirmação do mutante *Lm G4* mut 1 (M20F/A23E/A27S/F28V). Na imagem (2C) a confirmação do mutante *Lm G4* mut 2 (W32Y/T33L/A34E/I35P), e por fim na imagem (2C) o mutante *Lm G4* mut 3 com a mutação(E37Y/N39G/R44E/L47R) encontrados ao longo da sequência

### 6.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EIF4G3 E EIF4G4

As proteínas mutantes fusionadas a GST foram expressas em diferentes condições de temperatura e tempo de indução. A condição mais eficaz para expressão de proteínas GST-*LmEIF4G3* e GST-*LmEIF4G4* nativas, assim como os mutantes GST-*LmEIF4G4* mut1 e mut2 foi na temperatura de 18° C durante 16 horas, conforme demonstrado na (figura 23). As proteínas apresentaram após fracionamento em gel SDS-PAGE 15% o tamanho de 97.5 kDA e 111.1 kDA

Figura 23 - Indução dos mutantes *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4*

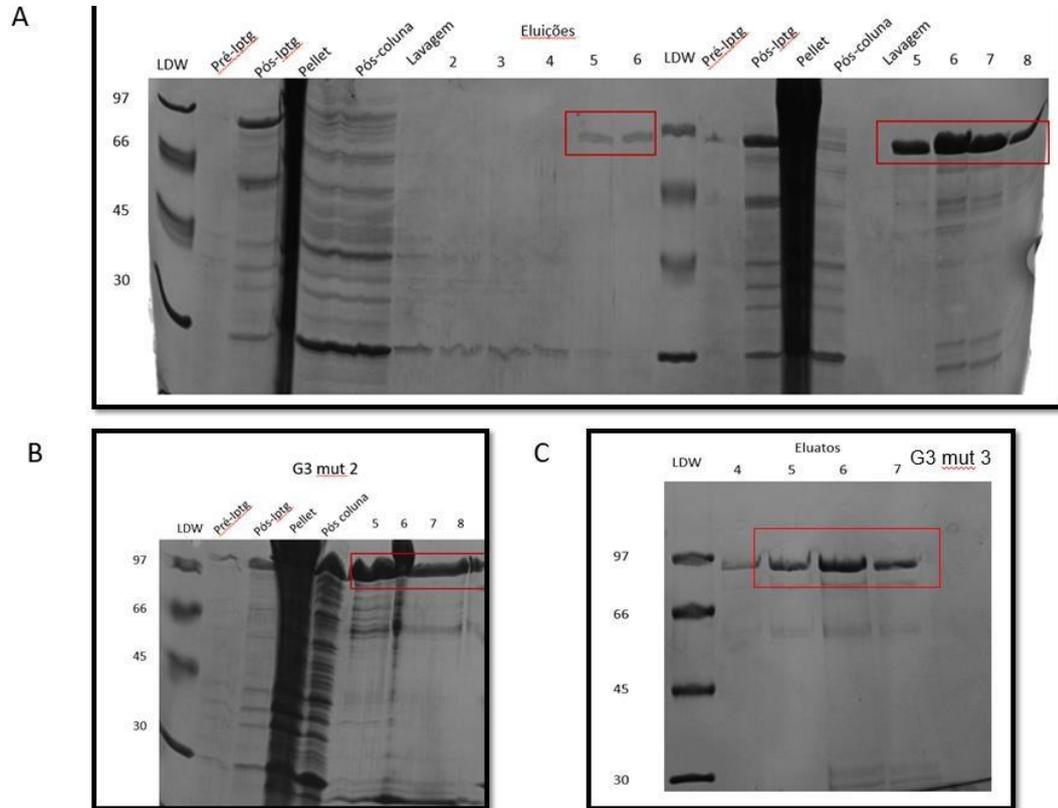


Nota: Gel representativo das proteínas utilizadas no estudo, para verificar a condição ideal de expressão. gel SDS 15% demonstrando a as induções em larga escala das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 na condição de 18° C por 16 horas. Na figura podem ser visualizadas as proteínas GST-*LmEIF4G3* e GST-*LmEIF4G4* selvagens, assim como os mutantes GST-*LmEIF4G4* mut1e mut2, após fracionamento em gel SDS-PAGE 15% com o tamanho de 97.5 kDA e 111.1 kDArespectivamente.

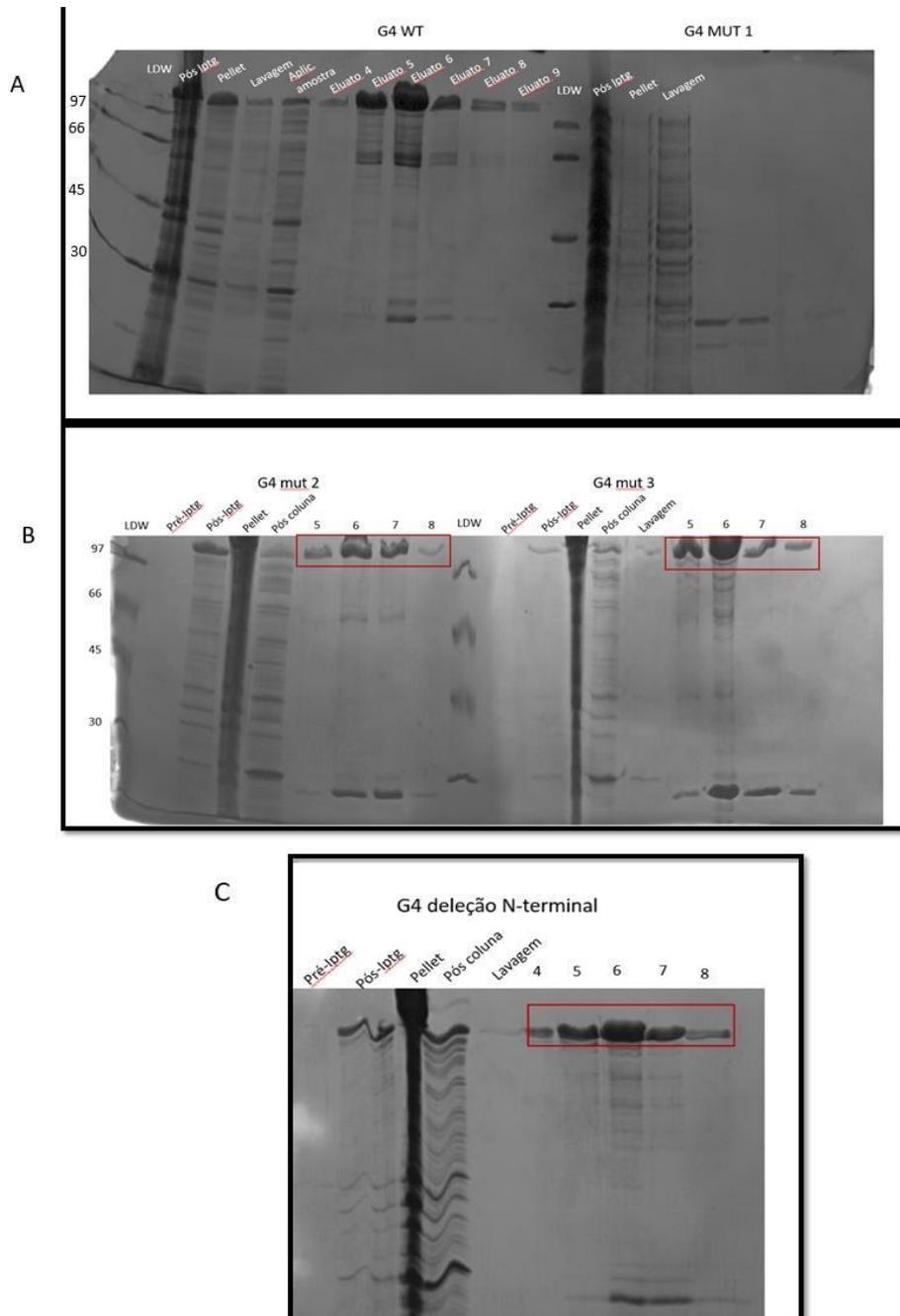
Uma vez que a condição de expressão foi caracterizada, as proteínas que tiveram as mutações confirmadas foram expressas e purificadas por cromatografia de afinidade utilizando o cromatógrafo Akta Pure. As as purificações das proteínas selvagens e mutantes são apresentadas na figura 23 (GST-*LmEIF4G3*) e na figura 24 (GST-*LmEIF4G4*) que foram fracionadas em SDS-PAGE 15% e coradas com coomassie blue R250. Os eluatos de todas as proteínas purificadas foram

visualizados e indicam um bom rendimento e qualidade para as próximas etapas do trabalho.

Figura 24 - Purificação das proteínas GST-*LmEIF4G3* e seus mutantes



Nota: Gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie os eluatos purificados. As amostras da eluições foram utilizadas para o ensaio de interação estão indicadas nos quadros vermelhos. As bandas do marcador de peso molecular estão expressas em kilodaltons (kDa) a esquerda. A figura 22 (A) corresponde a purificação do EIFG3 WT eo G3 MUT 1, a figura 22 (B) corresponde a purificação do G3 MUT 3 e na figura (C) a purificação do mutante G3 MUT 3.

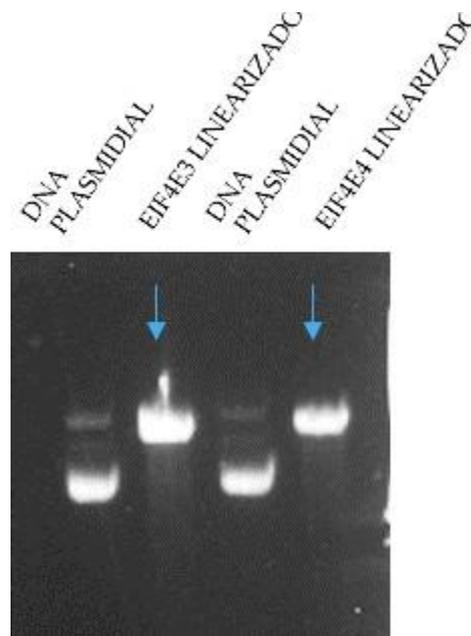
Figura 25 - Purificação das proteínas GST-*LmEIF4G4* e seus mutantes

Nota: É possível observar acima, gel SDS-PAGE 15% corado com azul de Coomassie os eluatos purificados. As amostras da eluições foram utilizadas para o ensaio de interação estão indicadas nos quadros vermelhos. As bandas do marcador de peso molecular estão expressas em kilodaltons (KDa) a esquerda. A figura 23 (A) corresponde a purificação do EIFG4 WT e o G4 MUT 1, a figura B corresponde a purificação do G4 MUT 2 e G4 MUT 3 e na figura (C) a purificação do mutante G4 DEL.

#### 6.4 PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS EIF4E3 E EIF4E4

Outro passo importante foi a tradução *in vitro* das proteínas parceiras EIF4E3 e EIF4E4. Inicialmente as construções dos genes de EIF4Es no pET21d, já disponíveis do laboratório, foram corretamente linearizadas ajustando dos genes com as enzimas de restrição Not I e verificadas em eletroforese de agarose 1% (Figura 26).

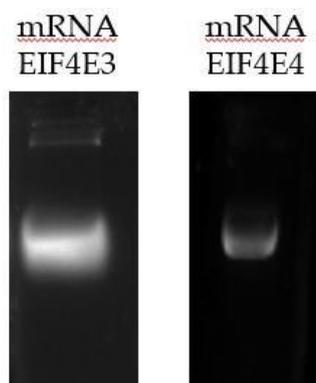
Figura 26 - Gel de agarose das linearizações dos genes EIF4E3 e EIF4E4 no plasmídeo pET21d



Nota: Gel de agarose corado a 1% corado com Syber Safe da linearização com a enzima Hpa I dos genes EIF4E3 e EIF4E4.

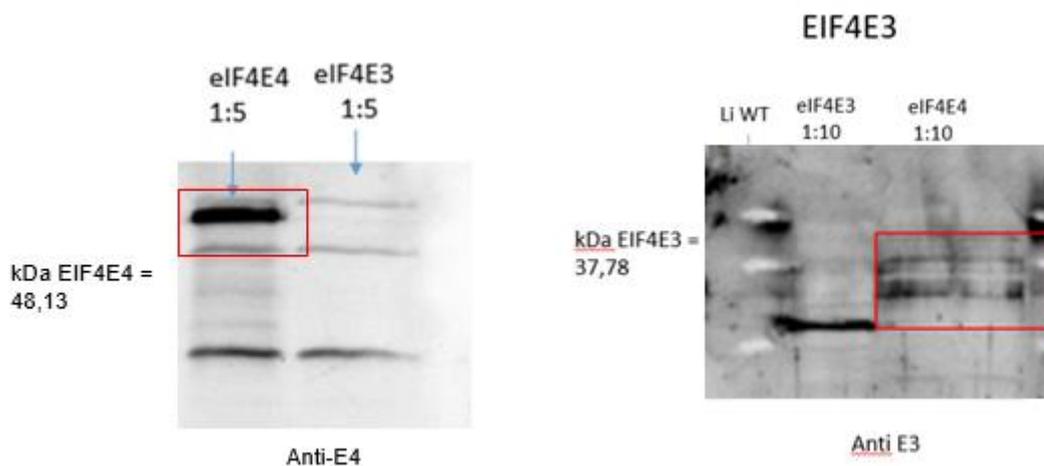
Amostras do plasmídeo foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando bandas correspondentes ao DNA plasmidial circular utilizada como controle e uma segunda correspondendo a linearização dos genes EIF4E3 e EIF4E4 dos genes após clivagem com as enzimas de restrição Hpa I. Em seguida foi realizada a transcrição *in vitro* para a obtenção dos RNAs mensageiros que mostrados na figura 26, que foram traduzidos em sistema de tradução de reticulócito de coelhos, observado na figura 27. No caso das proteínas EIF4Es utilizadas nesse trabalho, a revelação da proteína foi realizada por western-blot, como podemos ver na figura abaixo.

Figura 27 - RNAs mensageiros *LmEIF4E3* e *LmEIF4E4* produzidos por transcrição *in vitro*



Nota: Gel de agarose representativo da eletroforese dos RNAs mensageiros obtido da transcrição *in vitro* dos genes EIF4E4 e EIF4E3. O marcador utilizado foi o 1kb plus.

Figura 28 - Produção das proteínas EIF4E4 e EIF4E3 em sistema de reticulócito de coelho

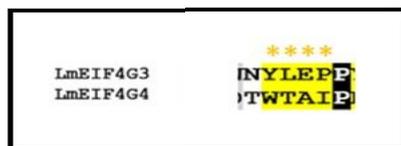
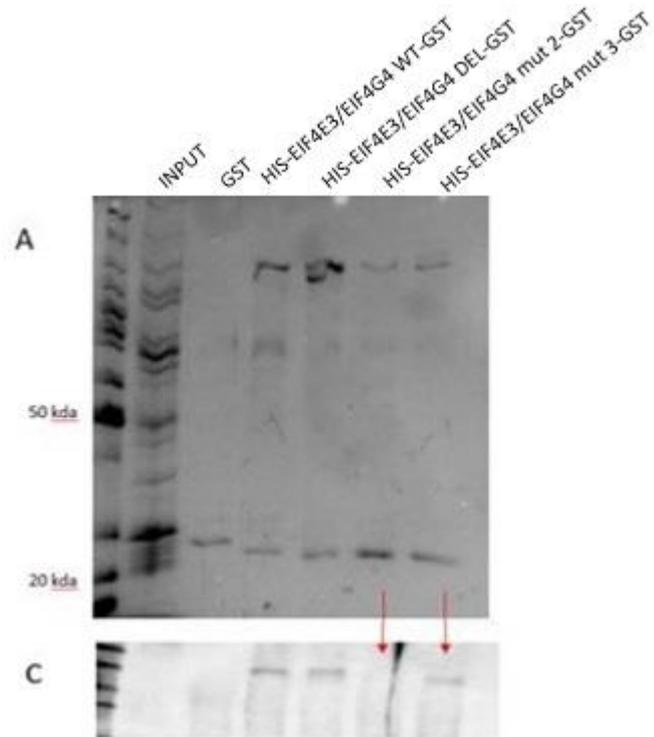


Nota: *Western Blot* demonstrando as traduções em larga escala obtidas para as proteínas EIF4E3 e EIF4E4 relevados com anticorpos primários anti-E3 e anti-E4, na proporção de 1:3000 e como anticorpos secundário anti-coelho na proporção de 1:10000

## 6.5 AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE OS MUTANTES DO EIF4G E AS PROTEÍNAS EIF4E

Para realização da validação das interações, realizamos ensaios de interação entre as proteínas GST-*LmEIF4G4* selvagem (e mutantes) e a proteína *LmEIF4E3*. Como pode ser visto na figura 27, houve ligação da proteína recombinante GST-*LmEIF4G4* selvagem, G4 mut3 e G4 deleção com a proteína *LmEIF4E3*, entretanto a ligação entre os pares de proteínas não foi verificado quanto utilizado o mutante G4 2. Vale ressaltar que o sinal do input não foi visto, por essa razão, o esse resultado precisa ser refeito, bem como o ensaio será reavaliado posteriormente com mais minucia, mas se confirmar o resultado do mutante *LmG4 mut2* (W32Y/T33L/A34E/I35P) evidencia que essa região desliga a interação com o parceiro *LmEIF4E3* e pode ser uma região chave para especificidade desta interação.

Figura 29 - Ensaio de interação das proteínas EIF4G4 WT e mutantes com seu parceiro EIF4E3

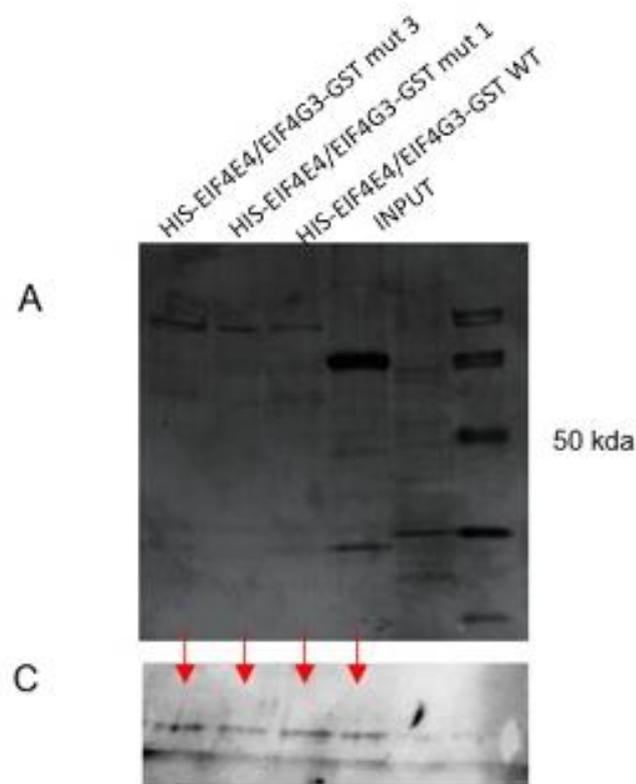


Nota: Ensaio de interação do EIF4G4 e os mutantes com o EIF4E3 de *L. major*. Na figura A podemos observar o *input* da tradução original juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE 15% e corado com azul de Coomassie acima do gel SDS-PAGE e a figura B representa o western blot mostrando que a interação entre as proteínas *LmG4* WT e *LmE3* se mantém com mesma intensidade, porém quando observamos o mutante G4 mut 2 podemos perceber que na figura C pode ter havido um desligamento na interação. As bandas do marcador de peso molecular estão expressas em kilodaltons (kDa) a esquerda. Abaixo temos o alinhamento dos resíduos que foram modificados em EIF4G315YLEP18 pelos resíduos EIF4G4 32WTAI35 (e vice versa) de *L. major*. A mutação na proteína *LmEIF4G4* pode estar envolvido na ligação específica com a proteína EIF4E3, uma vez que desliga a interação entre as proteínas avaliadas.

Entretanto, no resultado da figura 28, foi possível observar que as proteínas recombinantes EIF4G3 mut 1,2 e 3 não deixaram de interagir com seu parceiro EIF4E4, acreditando que as bases que foram modificadas não são específicas e essenciais na interação EIF4G3/EIF4E4. Este resultado corrobora com o resultado

da dinâmica molecular, fazendo necessário uma análise mais precisa desta interação, a fim de descobrir de fato, quais são as bases que fazem com que essas interações ocorram de forma tão específica.

Figura 30 - Ensaio de interação das proteínas EIF4G3 WT e mutantes com seu parceiro EIF4E4



Nota: Ensaio de interação do EIF4G3 e os mutantes com o EIF4E4 de *L. major*. Na figura A podemos observar o *input* da tradução original juntamente com as proteínas recombinantes fracionadas em SDS-PAGE 15% e corado com azul de Coomassie acima do gel SDS-PAGE encontra-se a proporção em A figura C representa o western blot mostrando que a interação entre as proteínas *LmG3* WT e *LmE4* se mantém com mesma intensidade. As bandas do marcador de peso molecular estão expressas em kilodaltons (kDa) a esquerda.

## 7 DISCUSSÃO

Entender o processo de síntese proteica e a regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos, mas especificamente em *Leishmania sp*, é de suma importância para compreender aspectos relacionados a sobrevivência destes nos microbiambientes nos diferentes hospedeiros, assim como identificar alvos para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes, como por exemplo, a iniciação da tradução e o complexo EIF4F (QUERIDO, et al, 2020).

Foi identificado que a interação entre EIF4G e EIF4E se dá através de um motivo canônico similar ao descrito a outros eucariotos YXXXXL $\phi$  (MOURA,2015). Entretanto, acreditamos que as bases da especificidade das interações específicas EIF4E3/EIF4G4 e EIF4E4/EIF4G3 não podem ser explicadas apenas pela ligação entre os resíduos canônicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar quais resíduos não-canônicos estão envolvidos nas interações EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 e com eles poderiam determinar essa especificidade. Sendo assim, foi substituído resíduos chaves em ambas as proteínas G3 e G4 em nossos ensaios de *pull-down*, onde foi observado que dos mutantes envolvidos da região (NC), aparentemente apenas o *LmG4* mut 2 desligou a interação, demonstrando que as mutações W32Y/T33L/A34E/I35P, em conjunto ou individualmente, são essenciais na interação entre o G4/E3. Em contrapartida, a retirada da cauda N-terminal dos MLFNLRGIVPQKEEKVKN presente no EIF4G4 e ausente no EIF4G3 e as mutações do *LmG4* mut3 não aboliram a interação com a proteína EIF4E3, indicando que essas regiões não parecem estar envolvidas na interação proposta.

Uma das características que distinguem os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 é a cauda N-terminal encontrada em EIF4G4 e ausente em EIF4G3. Inicialmente, foi levantado a hipótese de que essa cauda pudesse estar relacionada com a interação específica entre G4/E3. Porém foi observado que a deleção dessa porção não influenciou diretamente *in vitro* a interação frente ao seu parceiro, o que levanta a hipótese de que essa região esteja relacionada a outra função. Foi demonstrado anteriormente que a depleção do EIF4G4 (e o EIF4E3 em menor grau) apresentou alterações morfológicas importantes *in vivo*, podendo estar relacionado à uma série de processos associados a divisão e homeostase celular (BEZERRA et al, 2022). Sendo assim, é importante uma investigação minuciosa dessa porção também *in vivo* no intuito de compreender sua função, até então não elucidada.

Estudos prévios em plantas, demonstraram que a ligação de um peptídeo EIF4G se liga às superfícies dorsal e lateral de EIF4E, interagindo através dos domínios Canônico(C) e Não Canônico (NC) de forma semelhante aos metazoários EIF4Gs (MIRAS, et al., 2017), contrapondo originalmente o modelo de ligação em leveduras- EIF4E-EIF4G (GRUNER et al.,2016; GROSS ET AL., 2003), que sugeriram que a região de ligação e o motivo (NC) não faziam contato com a superfície lateral de EIF4E. Entretanto, no presente trabalho, não foram identificados resíduos equivalentes não-canônicos na sequências dos EIF4G3 e EIF4G4 de plantas, comparado aos resíduos modificados nesse trabalho em *L.major*, indicando que os resíduos (NC) podem ser diferentes devido a distância evolutiva destes protozoários frente a plantas e metazoários, o que precisa ser melhor esclarecido a partir de análises estruturais *in silico* e/ou experimentos para determinação da estrutura da ligação EIF4G/EIF4E.

As mutações propostas para as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 se baseiam na troca mútua dos aminoácidos entre ambas as proteínas nas mesmas posições identificadas no alinhamento de suas regiões N-terminal. A ideia inicial do projeto seria utilizar as proteínas mutantes, nos ensaios de interação com os parceiros EIF4E3 e EIF4E4 (em interações individuais). De forma mais clara, as proteínas EIF4G3 selvagem e mutantes, por exemplo, deveriam ser avaliadas quando a capacidade de interação com as proteínas EIF4E4 (parceiro real) e contra a proteína EIF4E3 (parceiro eventual em função das mutações obtidas). De maneira similar, foi realizada a investigação para a proteína EIF4G4 e as proteínas EIF4Es.

Foi realizado inicialmente uma análise de dinâmica molecular (DM) do complexo EIF4G3/EIF4E4. O RMSD de todos os modelos não apresentaram diferenças significativas frente ao modelo selvagem, exceto o *Lm* G3 mut 1 (F3M/E6A/S10A/V11F), que apresentou dois picos isolados, um no início e um no final da DM. Quando comparado com o estudo de Abdalla et al, 2021, onde foi analisado os níveis de RMSD em mutações da proteína *Spike* de SARS-Cov-2 frente a interação com a proteína ECA 2 (Enzima Conversora de Angiotensionogênio 2) humana, foi visto que as altas variações nos picos de RMSD acima de 25 Å demonstram que os resíduos modificados talvez fossem essenciais na interação. As oscilações decorreram desde o início da DM, enquanto em nossos estudos, as variações não passaram de 5 Å durante os 20 ns de DM. (ABADALLA M. et al, 2021).

Essa oscilação nesse trabalho, pode ter ocorrido por duas razões: devido ao tempo de análise, visto que na literatura é recomendado utilizar valores acima de 80 ns. (CUNHA, 2019; TOUSIGNANT, PELLETIER, 2004), ou por variações decorrentes da dinâmica que ocorrem naturalmente, como vimos utilizando a proteína EIF4G3 WT. Essa dúvida provavelmente será esclarecida quando novas predições forem realizadas utilizando o tempo recomendado na literatura, caso os picos mantivessem o mesmo padrão da análise inicial de 20 ns, pode significar que as mutações de fato, não têm impacto nas interações EIF4G/EIF4E, o que pode corroborar os dados obtidos no ensaio de pull-down. Já quando analisamos a compactação estrutural (representada pelo Raio de giração - Rg) dos mutantes e WT, das proteínas EIF4G3 afim de observar o grau de compactação entre as estruturas, observamos que todas se mantiveram estáveis com um Rg em torno de 20 Å. Quando comparado a compactação de estrutura na literatura, podemos constatar que cada estrutura tem uma estabilidade e compactação diferente, como em Lon et al, 2021 onde, o Rg das proteínas estudadas se mantiveram estáveis, porém com um valor em torno de 5 Å (LON, et al, 2021)

Com relação aos dados do RSMF da dinâmica molecular, foi observado que no geral, majoritariamente as flutuações nos mutantes do *LmEIF4G3* analisados se mantiveram < 2 Å, com exceção ao mutante *LmG3 mut 1* e WT, que apresentaram um pico de flutuação durante a análise, entre os resíduos 250 e 300, perto de 5 Å como também no fim da dinâmica. O pico entre os resíduos 250 e 300 na proteína EIF4E4 é compatível com a região modificada do seu parceiro EIF4G3. Quando comparado na literatura, podemos observar que, alterações em aminoácidos essenciais pode ter oscilações mais discrepantes, como em Abadalla et al, onde a menor variação de RSMF entre os mutantes estudados foi de 17 Å, e essas mutações com esse grau de flutuação conferiram a uma maior resistência contra vacinas (ABADALLA et al, 2021) Os resíduos mutagenizados neste trabalho, envolvidos na interação, tiveram um aumento de flutuação no mutante *LmG3 mut 1* dos resíduos 20 a 30 aa comparado ao G3/E4 WT, e a diminuição de variação na região canônica do aa 3 ao 11, indicando que talvez, esta mutação (F3M/E6A/S10A/V11F), leva a uma maior estabilidade no início do interação.

Embora o RSMF forneça uma informação importante, podendo possibilitar quais os resíduos específicos colaboram com a maior ou menor ênfase em termos

de estabilidade proteica, esse parâmetro talvez não seja suficiente, fazendo necessário a utilização de um indicador que avalie a integridade das estruturas secundárias, como as (RSVmf), hélices, folhas e loops (COSTA, 2018). Apesar das flutuações, esses parâmetros corroboraram com o estudo *in vitro*, demonstrando que não houve alterações significativas na interação dos mutantes do *LmEIF4G3*, semelhante a proteína selvagem, a proteína EIF4E4. Neste contexto, estes dados parecem indicar que essas mutações podem não ser relacionadas a especificidade de ligação. (FIGUEIREDO, 2013 ;MOCHIUTTI, 2019).

Em paralelo a DM, também foi realizado o alinhamento para a identificação dos potenciais resíduos envolvidos, para o ensaio *in vitro*. Os resíduos não-canônicos (NC) da região N-terminal das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 não são conservados entre as espécies, porém a hidrobicidade dentro desses resíduos no motivo NC é conservado em plantas, e também foi observado no alinhamento realizado nesse estudo em *L.major*. Podemos citar alguns resíduos demonstrado na (figura 11) como: a fenilalanina, a alanina, a valina e prolina em G3 e a metionina, fenilalanina, e a isoleucina em G4 respectivamente. Acredita-se que essa hidrobicidade está relacionada a estrutura do complexo EIF4G-EIF4E , onde a hélice canônica está ligada à superfície dorsal do EIF4E se estendendo até a face lateral, visto em GRUNER, et al 2016. (MIRAS, et al 2017).

Neste trabalho, analisamos a interação EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3 *in vitro*, e como perspectiva é importante também avaliar as interações EIF4G3/EIF4E3 e EIF4G4/EIF4E3 com os mutantes disponíveis, assim como talvez obter novos mutantes nas mesmas regiões trocando os aminoácidos por resíduos de Alanina (aminoácido neutro). Dessa forma, com esse painel mais completo poderemos investigar mais profundamente a especificidade das interações EIF4G/EIF4E em *Leishmania major*, entendendo como as proteínas são selecionadas para formar os complexos.

Em suma, é importante conhecer e elucidar quais resíduos ou o conjunto deles que de fato é essencial nas interações EIF4G/EIF4E em *Leishmania major* e nos tripanosomatídeos, estabelecendo semelhanças e diferenças em relação ao modelo de interação das proteínas humanas. Este conhecimento permitirá identificar alvos específicos que podem ter inferência de drogas bloqueando a tradução destes protozoários, no curso da infecção do hospedeiro, constituindo novas e fundamentais

alternativas terapêuticas já que as doenças negligenciadas causadas pelos tripanosomatídeos apresentam poucas opções de tratamento.

## 8 CONCLUSÕES

- No geral, as mutações nas proteínas *LmEIF4G3* (F3M/E6A/S10A/V11F e *LmG3* mut 3 (Y20E/G22N/E27R/R30L) bem como mutações na proteína *LmEIF4G4* incluindo a deleção de 17 aminoácidos iniciais da porção N- terminal e o mutante *LmG4* mut 3 (E37Y/N39G/R44E/L47R) não demonstraram *in vitro* alterações na capacidade de interação aos seus parceiros EIF4E.
- Nas análises de bioinformática apenas o *LmEIF4G3* mut 1 F3M/E6A/S10A/V11F apresentou alterações na interação com seu parceiro EIF4E4, que precisará ser reavaliada posteriormente com o tempo maior de Dinâmica Molecular.
- A mutação na proteína *LmEIF4G4* mut 2 W32Y/T33L/A34E/I35P parece reduzir a interação com a proteína *LmEIF4E3* *in vitro*;

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, C.E., e LORSCH, J.R. . A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 19, 568–576, 2012.
- ABADALLA M. et al, 2021. Estudo dinâmico molecular do SARS-CoV-2 com várias mutações da proteína S e seu efeito nas propriedades termodinâmicas. *Comput Biol Med.* 2021.
- ASSIS. Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em *Leishmania infantum*. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. Recife, 2015.
- AYLLET E BAN. Eukaryotic aspects of translation initiation brought into focus. *Biological Sciences*, 2017.
- ANVERSA L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista da associação médica brasileira*, 2018.
- BROWNING, K.S., e BAILEY-SERRES, J. . Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arabidopsis*. Book, 2015.
- BROOKS, Geo. F. et al. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 26 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar. Brasília, 2017.
- CUNHA. Caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução EIF4E de *trypanosoma cruzi*. Curitiba, 2018.
- COSTA, M.F. Docking, Dinâmica Molecular e Redes Neurais Artificiais na busca por flavonoides anti-RSV. Tese de doutorado. São José do rio preto, 2018.

DA COSTA LIMA T.D. *et al.* . Functional characterization of three *Leishmania* PABP homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryotic Cell.* , v.9, p.1484 - 1494, 2010.

DE MELO NETO, O.P. *et al.* . The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA.Biol.* 12, 1209–1221, 2015

DE MELO NETO, O.P. *et al.* . Unique and conserved features of the protein synthesis apparatus in trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania* ) species. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*. Springer International Publishing, pp. 435–475, 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.*, Philadelphia, v. 6, p. 739-755, 2018.

DUTRA. Clonagem e expressão da eIF4E de *Echinococcus granulosus*: utilização na purificação de mRNAs. Porto alegre, 2016.

DEVER, T.E., e GREEN, R. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb.Perspect.Biol.* 4, 2012.

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

GRUNER *et al.*, The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interfaceto Regulate Translation Initiation. , *Molecular Cell.* 64, 467–479, 2016.

FISCHER P.D. Um inibidor de bifênol de eIF4E direcionado a um sítio de ligação interno permite o design de degradadores PROTAC permeáveis às células. Elsevier, 2021

HINNEBUSCH, A.G.. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu.Rev.Biochem.* 83, 779–812, 2014

HOLLINGSWORTH E DROR. Molecular Dynamics Simulation for AI. Neuron 99, Setembro, 2018.

INGOLIA T. *et al.* The Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. Molecular cell. 73, 1–11. 2018

IWASAKI, S *et al.* The translation inhibitor rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA. Molecular cell, v. 73, n. 4, p. 738-748, 2019.

JACKSON, R.J., HELLEN, C.U., e PESTOVA, T. . The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat.Rev.Mol.Cell Biol. 11, 113–127.2010

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasites & vectors, v. 10 ,2017.

KASCHITZA E ALTMANN. eIF4E e Interatores de Eucariotos Unicelulares. Int. J. Mol. Ciência, 2020.

KONICEK, B. W. *et al.* Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. Cancer Res. Mar 1;71(5):1849-57.2011

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

KIHARA, D.; CHEN, H.; YANG, Y. Quality Assessment of Protein Structure Models Current Protein & Peptide Science, v. 10, n. 3, p. 216–228, 1 jun. 2009.

LINDQVIST I *et al.* Selective Pharmacological Targeting of a DEAD Box RNA Helicase. PLoS One. 2008

LAND E HUMILDE. YASARA: Uma ferramenta para obter orientação estrutural em investigações biocatalíticas. Métodos Mol bio, 2018.

LEHMAN et al. Translation Initiation Machinery as a Tumor Selective Target for Radiosensitization. *Int. J. Mol. ciência* 2021.

LON J R. Estudo de simulação de dinâmica molecular revela efeitos de mutações-chave na estrutura da proteína spike no SARS-CoV-2. *Biorxiv*.2021.

LUDMILA ASSIS ARRUDA. Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em *Leishmania infantum*. Recife 2015.

MARINTCHEV, A., e WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Rev.Biophys.* 37, 197–284. 2004

MERRICK, W. C. eIF4F: A Retrospective. *J Biol Chem*, v. 290, n. 40, p. 24091-9, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília, 2017.

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

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

MOCHIUTTI *et al.* Implementação do campo de força clayff no gromacs: uma aplicação em estrutura de caulinita. *Química nova*. Pará, 2019.

MOHAMMAD *et al.*, eIF4G é retido em ribossomos que se alongam e terminam em ORFs curtos a montante para controlar a reinicialização em levedura. *Res de Ácidos Nucleicos*, 2021.

OPASBRASIL. Doenças negligenciadas. Disponível em:

<<[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_joomlabook&view=topic&id=37&Itemid=232](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=37&Itemid=232). Acesso em: set, 2019.

OPAS. LEISHMANIOSES Informe epidemiológico das Américas. Núm. 10, dezembro de 2021.

OLIVEIRA et al., Estudos estruturais do complexo eIF4E-VPg revelam uma competição direta pelo RNA caped: Implicações para a tradução. PNAS, 2019

PAPADOULOS, E. *et al.* Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G. Pnas plus. v.3, p.187-195, 2014.

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

PELLETIER J. e CHU, J. Therapeutic Opportunities in Eukaryotic Translation. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018.

QUERIDO, B et al. Structure of a human 48S translational initiation complex. Science, 2020.

SOARES, R.O de S. Dinâmica Molecular de Proteínas: estabilidade e renaturação térmica. São paulo, 2009.

SANTINI, et al. Reducing eIF4E-eIF4G interactions restores the balance between protein synthesis and actin dynamics in fragile X syndrome model mice. Sci Signal. 2017

SONENBERG, N., e HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. Cell 136, 731–745. 2009

SOUSA J; RAMALHO, W e MELO, M. Demographic and clinical characterization of human visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil between 2006 and 2015. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v 51, 2018.

SOUZA, DIAS E ALVIM. Bacterial resistance to antibiotics. Revista JRG, 2022

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

SONENBERG, Nahum; DEVER, Thomas E. Eukaryotic translation initiation 98 factors and regulators. Current opinion in structural biology, v. 13, n. 1, p. 56-63, 2003.

WOESS et al.,. Avaliando uma abordagem de terapia direcionada ao câncer mediada por *trans*-splicing de RNA in vitro e em um modelo de xenoinxerto para câncer de pele associado à epidermólise bolhosa. Int. J. Mol. Ciência, 2021.

TAVARES et al. A new recombinant F1 antigen as a cost and time-effective tool for plague diagnosis. J Microbiol Methods, 2020.

TORIBIO et al. Uma nova proteína de interação eIF4E que forma complexos de iniciação de tradução não canônica. Nat Plants, 2019.

VALASEK, L.S., e SHIVAYA VALASEK, L. . “Ribozomin”--translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). Curr. Protein Pept. Sci. 13, 305–330.2012

YAN LI. Regulação da transição materna para embrionária de mamíferos pelo fator de iniciação da tradução eucariótica 4E. Development, 2021.

ZHANG, Y. et al. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nature Methods, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2021.

## APÊNDICE A – ARTIGO

ARTIGO NO FORMATO DA REVISTA ACERVO SAÚDE



### **ANÁLISE DAS BASES DA ESPECIFICIDADE DE INTERAÇÃO DOS FATORES DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4G E EIF4E DE *Leishmania major***

Analysis of the bases of the specificity of interaction of the EIF4G and EIF4E translation initiation factors of *Leishmania major*

Análisis de las bases de la especificidad de interacción de los factores de iniciación de la traducción EIF4G y EIF4E de *Leishmania major*

Mayara Sabino Leite de Oliveira Duarte<sup>1\*</sup>, Andrei Felix Mendes<sup>1</sup>, Osvaldo Pompílio de Melo Neto<sup>1</sup>, Camila Cavalcanti Xavier<sup>1</sup>, Christian Robson de Souza Reis<sup>1</sup>.

---

#### RESUMO

**Objetivo:** Investigar as bases da especificidade da interação responsáveis pela interação dos fatores de iniciação da tradução EIF4G e EIF4E de *Leishmania major*. **Métodos:** Os mutantes dos genes EIF4G3 e EIF4G4 foram realizados através de mutagênese sítio dirigida. Posteriormente foi feito a expressão e purificação das proteínas recombinantes, como também a transcrição e tradução in vitro das proteínas parceiras EIF4E3 e EIF4E4. Para finalizar foi feito o ensaio de interação proteína-proteína por pull down e o ensaio de modelagem *in silico*. **Resultados:** Dados preliminares deste trabalho indicaram que as mutações no geral não afetaram a capacidade de interação entre as proteínas LmEIF4E3 e LmEIF4G4 com exceção do LmEIF4G4 MUT 2, onde foi observado um desligamento da interação. Com relação a interação LmEIF4E4 e LmEIF4G3 esse padrão se manteve,

---

<sup>1</sup> Instituto Aggeu Magalhães (IAM) Recife-PE. Email: mayarasabinoleite@gmail.com

demonstrando que não houve desligamento entre as proteínas. Os ensaios de predição tridimensional e de dinâmica molecular dos complexos de interação E4-G3 selvagens e mutantes revelaram que independente das mutações, a interação nos complexos se manteve, corroborando com o resultado *in vitro*. **Conclusão:** A mutação na proteína LmEIF4G4 W32Y/T33L/A34E/I35P apresentou efeito na ligação a proteína LmEIF3E3. As mutações na proteína LmEIF4G3 demonstraram que *in silico* e *in vitro* não houveram diferenças significativas na ligação

Palavras-chave: eIF4F, Tradução, e *Leishmania major*

---

### ABSTRACT

**Objective:** To investigate the basis of interaction specificity responsible for the interaction of translation initiation factors EIF4G and EIF4E from *Leishmania major*. **Methods:** Mutants of the EIF4G3 and EIF4G4 genes were performed by site-directed mutagenesis. Subsequently, the expression and purification of the recombinant proteins was carried out, as well as the *in vitro* transcription and translation of the partner proteins EIF4E3 and EIF4E4. Finally, the pull down protein-protein interaction assay and the *in silico* modeling assay were performed. **Results:** Preliminary data from this work indicated that the mutations in general did not affect the capacity of interaction between LmEIF4E3 and LmEIF4G4 proteins, with the exception of LmEIFG4 MUT 2, where a shutdown of the interaction was observed. Regarding the LmEIF4E4 and LmEIF4G3 interaction, this pattern was maintained, demonstrating that there was no disconnection between the proteins. The three-dimensional prediction and molecular dynamics assays of the wild and mutant E4-G3 interaction complexes revealed that, regardless of the mutations, the interaction in the complexes was maintained, corroborating the *in vitro* result. **Conclusion:** The mutation in the LmEIF4G4 W32Y/T33L/A34E/I35P protein had an effect on the binding to the LmEIF3E3 protein. Mutations in the LmEIF4G3 protein demonstrated that *in silico* and *in vitro* there were no significant differences in binding.

Keywords: eIF4F, Translation, and *Leishmania major*

### RESUMEN

**Objetivo:** Investigar la base de la especificidad de la interacción responsable de la interacción de los factores de iniciación de la traducción EIF4G y EIF4E de *Leishmania major*. **Métodos:** Los mutantes de los genes EIF4G3 y EIF4G4 se realizaron mediante mutagénesis dirigida al sitio. Posteriormente se llevó a cabo la expresión y purificación de las proteínas recombinantes, así como la transcripción y traducción *in vitro* de las proteínas asociadas EIF4E3 y EIF4E4. Finalmente, se realizaron el ensayo de interacción proteína-proteína desplegable y el ensayo de modelado *in silico*. **Resultados:** Los datos preliminares de este trabajo indicaron que las mutaciones en general no afectaron la capacidad de interacción entre las proteínas LmEIF4E3 y LmEIF4G4, a excepción de LmEIFG4 MUT 2, donde se observó un cierre de la interacción. En cuanto a la interacción LmEIF4E4 y LmEIF4G3, este patrón se mantuvo, demostrando que no hubo desconexión entre las proteínas. La predicción tridimensional y los ensayos de dinámica molecular de los complejos de interacción E4-G3 salvaje y mutante revelaron que, independientemente de las mutaciones, la interacción en los complejos se mantuvo, corroborando el resultado *in vitro*. **Conclusión:** La mutación en la proteína LmEIF4G4 W32Y/T33L/A34E/I35P tuvo efecto en la unión a la proteína LmEIF3E3. Las mutaciones en la proteína LmEIF4G3 demostraron que *in silico* e *in vitro* no hubo diferencias significativas en la unión.

Palabras clave: eIF4F, traducción y *Leishmania major*

---

## INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados conhecidos por causarem doenças humanas e veterinárias como a leishmaniose, a tripanossomíase humana africana (doença do sono), doença de Chagas e cujos agentes etiológicos são espécies do gênero *Leishmania*. Estes protozoários apresentam um ciclo de vida complexo, com formas morfológicas distintas nos hospedeiros, além de outras peculiaridades moleculares, como a transcrição policistrônica e o trans-splicing que acarreta numa regulação da expressão gênica própria, que acontece principalmente por mecanismos pós-transcricionais, através do processamento, transporte e controle da estabilidade e tradução dos mRNAs em proteínas.

A síntese de proteínas ou tradução é um importante e complexo processo imprescindível para a sobrevivência dos seres vivos. Esse processo é basicamente dividido em três etapas principais, são elas: Iniciação, alongamento e terminação. A etapa de iniciação é crucial e nela participam várias proteínas conhecidas como fatores de iniciação da tradução eucarióticos (eIFs do inglês *Eukariotic Initiation Factors*). Na iniciação da tradução é formado o complexo EIF4F, constituído pelas subunidades, eIF4E (proteína que se liga ao cap dos mRNAs na sua extremidade 5'), o EIF4A (RNA helicase) e o EIF4G (Proteína ancorada do complexo EIF4F, que se liga ao 4E e 4A). O papel principal do complexo EIF4F é reconhecer a extremidade 5' do mRNA e mediar a associação da mesma com a subunidade 40S ribossomal e a outros fatores.

Em tripanosomatídeos foram identificados dois complexos do tipo eIF4F dos quais participam as proteínas o EIF4G3 e EIF4G4 que demonstraram interagir com as proteínas EIF4E4 e EIF4E3 respectivamente, além dos homólogos do EIF4G interagirem também com a proteína EIF4A1. Ambos os complexos participam da tradução, entretanto o complexo que utiliza a proteína EIF4G teria um papel majoritário no processo geral de tradução. As proteínas EIF4G3 e EIF4G4 apresentam uma similaridade em termos de organização de seus domínios com uma região N-terminal curta, o domínio central EIF4G e uma região C-terminal contendo os domínios MA3 e W2. A região N-terminal contém um motivo similar de ligação a proteína EIF4E descrita em outros eucariotos (YXXXXL $\phi$ , sendo o X qualquer aminoácido e o  $\phi$  qualquer resíduo hidrofóbico, podendo ser preferencialmente Leucina, Metionina e Fenilalanina). Embora já tenha sido descrito os sítios de ligação da interação entre as proteínas *LmEIF4G3/LmEIF4E4* e *LmEIF4G4/LmEIF4E3*, até o momento não se conhecem as bases da especificidade destas interações em tripanosomatídeos.

Diante deste cenário, a proposta deste trabalho foi aprofundar o estudo das interações do complexo EIF4F e identificar que aminoácidos da região N-terminal dos homólogos EIF4G poderiam de forma acessória ajudar nas ligações a seus parceiros EIF4E. Os resultados obtidos neste trabalho irão contribuir para a compreensão das bases de especificidade da interação EIF4G/EIF4E e poderão fornecer informações fundamentais de possíveis alvos quimioterápicos e desenvolvimento de moléculas inibidoras para controle destes patógenos.

## MÉTODOS

### Reação da mutagênese.

Os genes *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4* clonados no vetor pGEX4T3, disponível no laboratório (MOURA et al., 2015), foram submetidos a reações de mutagênese sítio dirigida modificando resíduos que podem estar envolvidos nas interações as proteínas EIF4E (possíveis resíduos não-canônicos) presente nessa região, utilizando o Kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene®) de

acordo com as instruções do fabricante que permitiram obter os diferentes mutantes utilizados neste trabalho. Inicialmente, foi realizado um alinhamento da região N-terminal das proteínas EIF4G3 EIF4G4 de *L. major*

### **Expressão e purificação**

As construções plasmidiais foram usadas na transformação de *Escherichia coli* cepa BL21 star (Invitrogen®) para expressão das proteínas fusionadas a proteína GST ou a uma cauda de seis histidinas. Em seguida, as células foram lisadas por ultrasonicação e as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade utilizando a resina Glutathiona Sefarose 4B (GE Healthcare®) ou Ni-NTA Agarose (Quiagen®). Etapas de purificação posteriores à afinidade (troca iônica e exclusão por tamanho) foram realizadas para a obtenção de grau de pureza adequado aos experimentos.

### **Transcrição e Tradução *in vitro***

Para a transcrição *in vitro* foram utilizadas construções EIF4E3 e EIF4E4 clonadas no vetor pET21d. Para a reação foram utilizados 3 ug de DNA linearizado na região 3' com a enzima Hpa I, posicionado imediatamente após o fim do gene, e a enzima T7 RNA polimerase (Promega®) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de transcrição foram realizadas em um volume final de 50 uL na presença de tampão de transcrição (40 mM Tris pH8,0, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), rNTPs (4 mM de ATP, CTP e UTP, cada; 0,4 mM de GTP; (GE Healthcare®), 0,5 mM de m<sup>7</sup>-GTP (New England Biolabs®), 10 mM DTT, 30 U de inibidor de RNase (Promega®), 10 U de T7 RNA polimerase (Promega®) e água deionizada, tratada com DEPC. A reação foi incubada por duas horas a 37°C e após os 30 minutos iniciais e adicionada de GTP para uma concentração final de 1 mM. Após mais 30 minutos de reação foi adicionado 2,5 U de T7 RNA polimerase. Ao término das reações de transcrição, 1 uL de cada transcrito sintetizado foi analisado em gel de agarose 1% corado com Syber® Safe (Invitrogen®). Os mRNAs sintéticos obtidos foram precipitados com 0,3 M NaCl e 2,5 volumes de etanol 100 % e o sedimento ressuspenso em água deionizada tratada com DEPC. Para a tradução *in vitro*, alíquotas de 0,1, 0,2 e 1 uL dos RNAs purificados foram traduzidos em lisado de reticulócito de coelho (RRL) suplementado com metionina e cisteína de acordo com as recomendações do fabricante (Promega®). As reações de tradução foram realizadas na temperatura de 30°C, durante 90 minutos. Após a tradução, as alíquotas de 5 uL de cada amostra foram acrescidas de tampão de amostra para gel SDS-PAGE 15%, e submetidas à migração por eletroforese e transferidas para membranas de nitrocelulose para realização de western-blot com anticorpo anti-E3 e anti-E4.

### **Ensaio de interação proteína-proteína**

Para os ensaios de interação proteína-proteína, a resina Glutathiona-Sefarose 4B (GE Biosciences®) foi previamente equilibrada com o tampão de ligação BB3 (100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Hepes pH 7.2, 0,2% NP-40, 5% glicerol). Em seguida a resina foi bloqueada utilizando o tampão BB3 acrescido de 10 ug/mL de BSA para evitar ligações inespecíficas. Para cada ensaio, aproximadamente 10 uL de cada resina bloqueada foi incubada com 2 ug de proteína recombinante

em um volume final de 200  $\mu$ L (em tampão BB3), durante 1 hora sob agitação, a 4°C. As resinas foram lavadas duas vezes com tampão BB3 e incubadas com 5  $\mu$ L de proteínas marcadas radiotivamente (no volume final de 200  $\mu$ L de tampão BB3), durante 2 horas sob agitação a 4°C. Após três lavagens com 500  $\mu$ L de tampão BB3, as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 40  $\mu$ L de tampão de amostra para SDS-PAGE e 10  $\mu$ L de cada amostra serão submetidas à eletroforese **em gel 15%**.

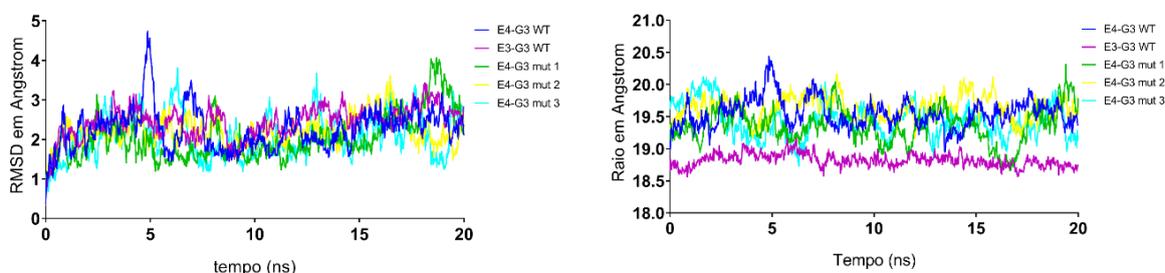
### Análise *in silico*

Para permite avaliar se as interações EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3 persistem foi realizado dinâmica molecular por meio do software YASARA realizada sob o campo de força AMBER14. Primeiramente os complexos recém preditos serão refinados. Em seguida, os complexos serão inseridos em uma célula de simulação cubóide, e em seguida solvatados (densidade: 0,997 g/L-1), tendo em seguida sua energia minimizada. Após esses procedimentos, os procedimentos de dinâmica molecular serão iniciados, sendo mantidos durante um período de 100 ns, a uma temperatura de 300K. Por fim, a avaliação da a estabilidade, flutuação e compactação dos obtidos, serão realizadas, levando em consideração seus valores de termos de valores de desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF) e raio de giração

## RESULTADOS

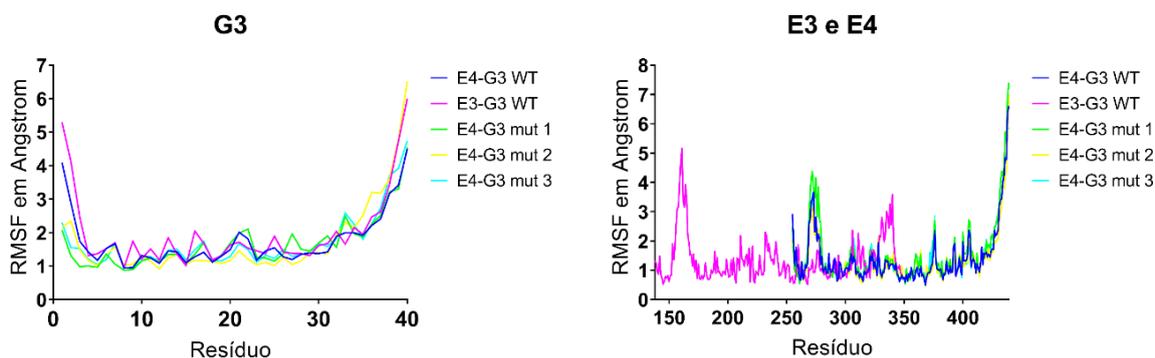
Os resultados foram divididos em dois blocos: Ensaio *in silico* e *in vitro*

(Figura 1).Variação de RMSD dos complexos



Os valores de RMSD foram analisados com o objetivo de averiguar e comparar a estabilidade entre os complexos, abaixo podemos observar a tabela com os respectivos valores do RMSD das interações. O que observamos foi que todas as interações se mantiveram estáveis durante todo o curso dos 20 ns de dinâmica como demonstrado acima. Também foi avaliado o raio de giração dos complexos com o intuito de ilustrar o grau de compactação da proteína em torno de seus eixos, fornecendo uma visão das dimensões gerais da proteína. Os valores médios de Rg para os complexos G3-E4, G3-E3, LmG3 MUT 1, LmG3MUT 2 e LmG3 MUT 3 foram de 19,553 Å, 18,794 Å, 19,353 Å e 19,632 Å e 19,431 Å respectivamente.

(Figura 2) Grau de Flutuação em Angstrom dos aminoácidos mutados nos diferentes complexos

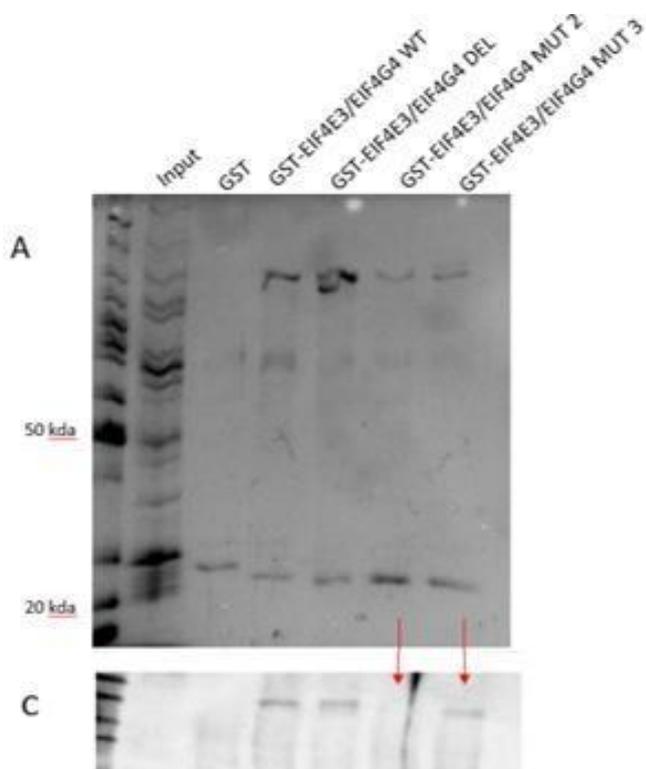


(Tabela 1) Regiões de oscilação do RSMF dos mutantes da proteína EIF4G3

	3 aa	6 aa	10 aa	11 aa	15 aa	16 aa	17 aa	18 aa	20 aa	22 aa	27 aa	30 aa
<b>G3-E4</b>	1,743	1,525	1,317	1,085	1,102	1,277	1,416	1,121	1,492	1,815	1,196	1,375
<b>G3-E3</b>	2,465	1,521	1,218	1,191	1,016	2,048	1,683	1,191	1,633	1,539	1,385	1,618
<b>Mut 1</b>	0,988	1,361	1,16	1,131	1,102	1,356	1,7	1,162	<b>1,686</b>	<b>2,108</b>	<b>1,963</b>	<b>1,689</b>
<b>Mut 2</b>	1,489	1,326	1,29	0,92	<b>1,07</b>	<b>1,179</b>	<b>1,162</b>	<b>1,138</b>	1,161	1,215	1,045	1,404
<b>Mut 3</b>	<b>1,525</b>	<b>1,192</b>	<b>1,284</b>	<b>0,92</b>	1,189	1,49	1,748	1,178	1,286	1,494	1,291	1,669

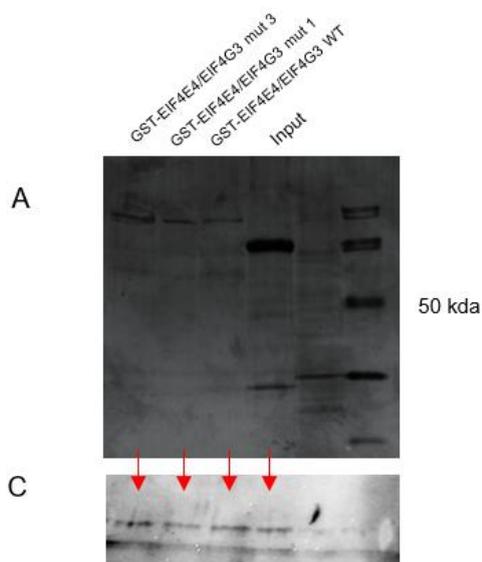
Ao analisar a variação de Rg ao longo dos 20 ns de simulação, é possível observar que o grau de compactação dos complexos receptor-ligante tendeu a se manter estáveis, ou seja, não houve variação entre as interações destes complexos, no caso dos mutantes. Já com relação a raiz quadrada da flutuação quadrática média (RMSF). Concluímos que o *LmG3* mut 1 teve mais variação quando comparado ao G3-E4, demonstrando que essa mutação desestabiliza a interação. Quanto aos os mutantes 2 e 3 não teve muita variação. Para realização da validação das interações, realizamos ensaios de interação entre as proteínas GST-*LmEIF4G4* selvagem (e mutantes) e a proteína *LmEIF4E3*. Como pode ser visto na figura abaixo, houve ligação da proteína recombinante GST- *LmEIF4G4* selvagem, G4 mut3 e G4 deleção com a proteína *LmEIF4E3*, entretanto a ligação entre os pares de proteínas não foi verificado quanto utilizado o mutante G4 2. O ensaio será reavaliado posteriormente com mais minucia, mas se confirmar o resultado do mutante *LmG4*mut2 W32Y/T33L/A34E/I35P evidencia que essa região desliga a interação com o parceiro *LmEIF4E3* e pode ser uma região chave para especificidade desta interação.

(Figura 3) Ensaio de interação das proteínas EIF4G4/EIF4E3.



Entretanto, no resultado da figura 4, foi possível observar que as proteínas recombinantes EIF4G3 mut 1,2 e 3 não deixaram de interagir com seu parceiro EIF4E4, podendo-se acreditar que as bases que foram modificadas não são específicas e essenciais na interação EIF4G3/EIF4E4. Este resultado corrobora com o resultado da dinâmica molecular, fazendo necessário uma análise mais precisa desta interação, a fim de descobrir de fato, quais são as bases que fazem com que essas interações ocorram de forma tão específica das proteínas EIF4G4 WT e mutantes com seu parceiro EIF4E3.

(Figura 4) Ensaio de interação das proteínas EIF4G3 WT e mutantes com seu parceiro EIF4E4



Inicialmente, foi analisada a dinâmica molecular dos respectivos mutantes frente a interação entre as proteínas. Os modelos foram obtidos no tempo de 20 nanosegundos o RMSD de todos os modelos não apresentaram diferenças significativas frente ao modelo selvagem, exceto o *Lm* G3 MUT 1 (F3M/E6A/S10A/V11F), que apresentou dois picos isolados no início e no final da (DM). Essa oscilação pode ter ocorrido devido ao tempo de análise, visto que na literatura é recomendado utilizar-se valores acima de 80 ns (CUNHA, 2019; TOUSIGNANT, PELLETIER, 2004). Se novos modelos fossem obtidos durante a análise recomendada pela literatura, e mantivessem o mesmo padrão da análise inicial de 20 ns, poderia significar que as mutações de fato não teriam impacto nas interações entre ambas proteínas, o que pode corroborar com os dados obtidos no ensaio *in vitro* em laboratório.

Com relação aos dados do RSMF da dinâmica molecular, foi observado que no geral, majoritariamente as flutuações nos mutantes do *Lm*EIF4G3 analisados se mantiveram  $< 2 \text{ \AA}$ , entretanto o mutante *Lm*G3 mut 1 e WT, apresentaram um pico de flutuação durante a análise, entre os resíduos 250 e 300, como também no fim da dinâmica. Esse pico entre os resíduos 250 e 300 é compatível com a região de interação entre o G3/E4. Os resíduos mutagenizados envolvidos na interação, tiveram um aumento de flutuação no mutante *Lm*G3 mut 1 dos resíduos 20 a 30 aa comparado ao G3/E4 WT, e a diminuição de variação na região canônica do aa 3 ao 11, indicando que talvez, esta mutação (F3M/E6A/S10A/V11F), leva a uma maior estabilidade no início do interação. Esses parâmetros corroboram com o estudo *in vitro*, onde apesar das flutuações, não houve alterações na interação dos mutantes do *Lm*EIF4G3, semelhante a proteína selvagem, a proteína EIF4E4. Neste contexto, estes dados parecem indicar que essas mutações podem não ser relacionadas a especificidade de ligação (FIGUEIREDO, 2013 ;MOCHIUTTI, 2019).

EIF4G3/EIF4E4. apenas a interação EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3 e como perspectiva é importante também avaliar as interações EIF4G3/EIF4E3 e EIF4G4/EIF4E3 com os mutantes disponíveis, assim como talvez obter novos mutantes nas mesmas regiões trocando os aminoácidos por resíduos de Alanina. Dessa forma, com esse painel mais completo poderemos investigar mais profundamente a especificidade das interações EIF4G/EIF4E em *Leishmania major*, entendendo como as proteínas são selecionadas para formar os complexos.

Um ponto de destaque no mecanismo de síntese proteica e alvo desse estudo é o complexo EIF4G/EIF4E, responsável é uma etapa de controle chave na tradução eucariótica, alvo de drogas em desenvolvimento em outros modelos eucarióticos. A caracterização das interações G4/E3 e G3/E4, podem levar a estratégias de tratamento mais específicas. Sendo assim, a caracterização funcional destas interações se faz necessária não só para uma melhor compreensão do papel que as respectivas proteínas desempenham no metabolismo celular do parasita, bem como para o desenvolvimento de novas abordagens de controle do parasita e de pequenas moléculas que possam atuar como inibidores específicos de sua tradução.

De uma forma geral, estes estudos auxiliaram na investigação das bases presentes nestes complexos, o que sugere que a mutação *LmG4* MUT 2 parece ser a única que modifica resíduos não canônicos importantes para a interação específica do complexo EIF4E4/EIF4G3. Porém, é importante conhecer e elucidar qual os resíduos ou o conjunto deles é de fato essencial nesta interação. Além de que, os resultados obtidos neste trabalho contribuirão na identificação de alvos moleculares na iniciação da tradução destes protozoários podendo permitir o desenvolvimento de antiparasitários.

Foram identificadas interações entre o EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4, através de um motivo canônico similar ao descrito a outros eucariotos YXXXXL $\phi$  (MOURA, 2015). Entretanto as bases da especificidade destas interações não podem ser explicadas apenas pela ligação entre os resíduos canônicos e a proteína parceira EIF4E. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi identificar quais resíduos não-canônicos estão envolvidos nas interações EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 e como eles poderiam determinar essa especificidade. Alguns resultados obtidos em nossos ensaios de pull-down apontam, para o complexo EIF4G4/EIF4E3, que dos três mutantes envolvidos, ao que tudo indica o *LmG4* MUT 2 desligou a interação, demonstrando que as mutações W32Y/T33L/A34E/I35P, em conjunto ou individualmente, são essenciais na interação entre o G4/E3. Em contrapartida, a retirada da cauda N-terminal dos MLFNLRGIVPQKEEKVKN do EIF4G4 e as mutações do *LmG4* MUT 3 não aboliram a interação com a proteína EIF4E3, indicando que essas regiões não parecem estar envolvidas na interação proposta.

Estudos prévios em plantas, demonstraram que a ligação de um peptídeo eIF4G se liga às superfícies dorsal e lateral de eIF4E, interagindo através dos domínios Canônico (C) e Não Canônico (NC) de forma semelhante aos metazoários EIF4Gs (MIRAS, et al., 2017), contrapondo originalmente o modelo de ligação em leveduras- eIF4E-eIF4G (GRUNER et al., 2016; GROSS ET AL., 2003), que sugeriram que a região de ligação e o motivo (NC) não faziam contato com a superfície lateral de EIF4E. Entretanto no presente trabalho, não foram identificados resíduos equivalentes não canônicos na sequência dos EIF4G3 e EIF4G4 de *L. major* indicando que os resíduos não canônicos podem ser diferentes devido a distância evolutiva destes protozoários frente a plantas e metazoários, o que

precisa ser melhor esclarecido a partir de análises estruturais *in silico* e/ou experimentos para determinação da estrutura da ligação EIF4E3/EIF4G4. O segundo complexo abordado neste trabalho foi formado pelas proteínas.

## CONCLUSÃO

A mutação na proteína *LmEIF4G4* W32Y/T33L/A34E/I35P apresentou efeito na ligação a proteína *LmEIF3E3*, demonstrando que os resíduos ou o conjunto deles é específico na ligação EIF4G4/EIF4E3. Já as mutações na proteína *LmEIF4G3* não afetaram sua capacidade de interação com a proteína *LmEIF4E4* *in silico* e *in vitro*, entretanto é necessário novos ensaios para confirmação final.

## FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado por recursos do Instituto Aggeu Magalhães (IAM) - Fiocruz/PE.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, C.E., e LORSCH, J.R. . A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nat.Struct.Mol.Biol.** 19, 568–576, 2012.
- AITKEN, C.E., e LORSCH, J.R. . A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nat.Struct.Mol.Biol.** 19, 568–576, 2012.
- ASSIS. **Caracterização do complexo de iniciação da tradução eIF3 e investigação de sua associação a complexos do tipo eIF4F em Leishmania infantum.** Recife, 2015
- BROWNING, K.S., e BAILEY-SERRES, J. . Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. **Arabidopsis.Book.** 13, 0176, 2015.
- CUNHA. **Caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução EIF4E de trypanosoma cruzi.** Curitiba, 2018.
- DA COSTA LIMA T.D. *et al.* . Functional characterization of three *Leishmania* PABP homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryotic Cell.** , v.9, p.1484 - 1494, 2010
- DE MELO NETO, O.P. *et al.* . The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. **RNA.Biol.** 12, 1209–1221, 2015
- DE MELO NETO, O.P. *et al.* . Unique and conserved features of the protein synthesis apparatus in trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania* ) species. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation.* **Springer International Publishing**, pp. 435–475, 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.**, Philadelphia, v. 6, p. 739-755, 2018.
- DUTRA. **Clonagem e expressão da eIF4E de Echinococcus granulosus: utilização na purificação de mRNAs.** Porto alegre, 2016.

- KONICEK, B. W. *et al.* (2011). Therapeutic inhibition of MAP kinase interacting kinase blocks eukaryotic initiation factor 4E phosphorylation and suppresses outgrowth of experimental lung metastases. **Cancer Res.** Mar 1;71(5):1849-57.
- JACKSON, Richard J.; HELLEN, Christopher UT; PESTOVA, Tatyana V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 113, 2010.
- KIHARA, D.; CHEN, H.; YANG, Y. Quality Assessment of Protein Structure Models. **Current Protein & Peptide Science**, v. 10, n. 3, p. 216–228, 1 jun. 2009.
- LINDQVIST I *et al.* . Selective Pharmacological Targeting of a DEAD Box RNA Helicase. **PLoS One**, 2008 DEVER, T.E., e GREEN, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.** 4, a013706.
- FREIRE, E. *et al.* The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other **Trypanosomatids**. **Pathogens, Basel**, v. 6, n. 4, p. 55, 2017.
- GRUNER *et al.*, 2016. The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. , **Molecular Cell**. 64, 467–479, 2016.
- HINNEBUSCH, A.G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annu. Rev. Biochem.** 83, 779–812.
- HOLLINGSWORTH E DROR. Molecular Dynamics Simulation for AI. **Neuron** 99, Setembro, 2018
- INGOLIA T. *et al.* (2018). The Translation Inhibitor Rocaglamide Targets a Bimolecular Cavity between eIF4A and Polypurine RNA. **Molecular cell**. 73, 1–11.
- JACKSON, R.J., HELLEN, C.U., e PESTOVA, T. V (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 11, 113–127.
- KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & vectors**, v. 10 ,2017.