

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**Larissa Mélo do Nascimento**

**Complexo eIF2 em *Leishmania* sp.: Expressão proteica,  
função biológica, interações moleculares e descrição de  
novo fator de iniciação da tradução**

**Recife  
2016**

**Larissa Mélo do Nascimento**

**Complexo eIF2 em *Leishmania* sp.: Expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de fator de iniciação da tradução**

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

**Orientador** : Osvaldo Pompílio do Melo Neto

**Co-orientadora**: Barbara Papadopoulou

**Recife**

**2016**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento, Larissa Mélo do

Complexo eIF2 em *Leishmania* sp.: expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de novo fator de iniciação da tradução / Larissa Mélo do Nascimento. – Recife: O Autor, 2016.

131 f.: il.

Orientadores: Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Barbara Papadopoulou  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2016.  
Inclui referências

1. Leishmaniose 2. Proteínas – Síntese 3. Regulação de expressão gênica I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio (orient.) II. Papadopoulou, Barbara (coorient.) III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-144

**Complexo eIF2 em *Leishmania* sp.: Expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de novo fator de iniciação da tradução**

**Aprovado em 06 / 09 / 16  
Banca Examinadora:**

---

**Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto**  
**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ**

---

**Dr<sup>a</sup>. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha**  
**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ**

---

**Dr<sup>a</sup>. Danielle Maria Nascimento Moura**  
**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ**

---

**Dr. Rafael Dhalia**  
**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ**

---

**Dr. Tercilio Calsa Junior**  
**Programa de Pós-Graduação em Genética -UFPE**

**Recife**

**2016**

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador Osvaldo Pompílio pelo constante incentivo, apoio, confiança, pelas preciosas discussões, conselhos e ensinamentos.

Agradeço a minha co-orientadora Barbara Papadopoulou pela grande receptividade, confiança e suporte.

Ao corpo técnico do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e a infra-estrutura oferecida FIOCRUZ/PE.

Igualmente agradeço ao apoio técnico e a infra-estrutura oferecida pelo Centre de Recherche en Infectologie/Université LAVAL.

Ao fomento do projeto concedido pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco /FACEPE e pelo Instituts de Recherche en Santé du Canada/IRSC.

À bolsa de doutorado concedida pelo Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES e a bolsa de doutorado sanduiche concedida pelo programa Ciências sem fronteiras do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq.

Agradeço aos colegas do grupo BiolMolTryp e aos demais colegas do CPqAM.

Aos colegas do corredor BP#12, especialmente e com amor àqueles que se tornaram meus irmões Zeinab, Hiva e a recém-chegada, Myska.

Sou eternamente grata ao meu maior incentivador Filipe, por todo amor dedicado, companheirismo e apoio incondicional. Você me faz mais forte.

Agradeço à Haydée, mamãe não teria “escrito o livrinho” sem o companheirismo, compreensão e amor. Obrigada Leonel, por ser o novo raio de luz em nossas vidas.

À minha família, em especial a minha mãe, meu pai, minha tia Eliane e vovó Amália por todo amor, apoio, confiança e orações.

À minha família Quebequar, Susie, Alexandre, Asafe e Josafá, o apoio incondicional tornou tudo mais seguro, tranquilo e feliz.

Ao amor e cuidado de Deus Pai, e à graça e paz de Seu filho Jesus Cristo.

“Ao cientista, portanto, sobretudo ao cientista cristão, corresponde a atitude de interrogar-se sobre o futuro da humanidade e da Terra; de construir um mundo humano para todas as pessoas e não para um grupo ou uma classe de privilegiados”.

Dom Hélder Câmara

## Resumo

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae. Tais enfermidades atingem populações pobres de países subdesenvolvidos e sua incidência está associada, em parte, à ausência de quimioterápicos efetivos, o que enfatiza a importância de estudos focados na biologia desses patógenos. Nos tripanossomatídeos o controle da expressão gênica ocorre, predominantemente, a nível pós-transcricional, envolvendo a regulação da síntese proteica através dos fatores de iniciação da tradução eucarióticos (eIFs). Em mamíferos, a regulação global da tradução ocorre majoritariamente através do complexo heterotrimérico eIF2 (constituído de eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$  e eIF2 $\gamma$ ), o qual é responsável pela interação com o tRNA iniciador, GTP e a subunidade ribossomal 40S. No presente trabalho, objetivou-se contribuir na caracterização do complexo eIF2 em *L. infantum*. Inicialmente, confirmou-se a expressão constitutiva da subunidade eIF2 $\alpha$  durante o crescimento e diferenciação do parasito, bem como, sua associação funcional com a subunidade menor ribossomal. Mais ainda, demonstrou-se sua associação com as subunidades eIF2 $\beta$  e eIF2 $\gamma$  e com os parceiros diretos eIF2B e eIF5, nesse momento confirmando a identificação do complexo eIF2B em *Leishmania*. Nos tripanossomatídeos, a subunidade eIF2 $\alpha$  apresenta uma extensão N-terminal característica, a qual se mostrou importante nas interações com eIF2B, eIF5 e ribonucleoproteínas. Interessantemente, identificou-se um novo parálogo da subunidade eIF2 $\gamma$ , sendo denominado aqui eIF2 $\gamma$ -2. Evolutivamente, o eIF2 $\gamma$ -2 surgiu após provável evento de duplicação exclusivo na família Trypanosomatidae e derivou acumulando características singulares em sua sequência gênica. O eIF2 $\gamma$ -2 é capaz de interagir com eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$ , na formação de um segundo complexo eIF2 exclusivo de tripanossomatídeos, assim como, com o eIF2B e eIF5. Através de ensaios de deleção e complementação gênica, confirmou-se a essencialidade de eIF2 $\gamma$  e se demonstrou a incapacidade de substituição deste pelo seu parálogo eIF2 $\gamma$ -2. Estes resultados demonstram novos aspectos inéditos na identificação e função do eIF2 dos tripanossomatídeos, não observados em outros organismos.

**Palavras-chave:** Tripanossomatídeos. *Leishmania*. Biossíntese proteica.

**Fatores de iniciação da tradução. Complexo eIF2.**

## Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoa from the genus *Leishmania* of the Trypanosomatidae family. These diseases affect poor people in developing countries and its incidence is associated, in part, to the absence of effective chemotherapy, which emphasizes the importance of studies focused on the biology of these pathogens. In trypanosomatids the control of gene expression occurs predominantly at post-transcriptional level involving the regulation of protein synthesis through the eukaryotic initiation factors (eIFs). In mammals, the global translation regulation is mostly controlled by the heterotrimeric complex eIF2 (formed by eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$  and eIF2 $\gamma$ ), which is responsible for the interaction with the initiator tRNA, GTP and 40S ribosomal subunit. In the present study, by characterizing the eIF2 complex in *L. infantum*, we confirmed the constitutive expression of the eIF2 $\alpha$  subunit during the growth and differentiation of the parasite, as well as, their functional association with the minor ribosomal subunit. Furthermore, while demonstrating the association of eIF2 $\alpha$  with eIF2 $\beta$  and eIF2 $\gamma$  subunits and with the direct partners eIF2B and eIF5, we confirmed the identification of *Leishmania* eIF2B complex. Herein, we also showed that eIF2 $\alpha$  subunit in trypanosomatids has a unique N-terminal extension that is important for interaction with eIF2B, eIF5 and ribonucleoproteins. Interestingly, a paralog of eIF2 $\gamma$  subunit, named here eIF2 $\gamma$ -2, was identified for the first time. Evolutionarily, the eIF2 $\gamma$ -2 gene arose most likely after a duplication event in the Trypanosomatidae family and further accumulated singular characteristics in its coding sequence. The eIF2 $\gamma$ -2 is able to interact with eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\beta$ , acting during the formation of a second eIF2 complex exclusive to trypanosomatids, as well as with eIF2B and eIF5. By gene deletion and complementation assays, we confirmed the essentiality of eIF2 $\gamma$  and demonstrated the inability to replace it by eIF2 $\gamma$ -2. Altogether, our data demonstrate novel features of eIF2 function of trypanosomes, not seen in other organisms.

**Key-words:** Trypanosomatids. *Leishmania*. Translation. Translation initiation factors. eIF2 complex.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1.</b> Relações evolutivas dos tripanossomatídeos.	<b>19</b>
<b>Figura 2.</b> Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> .	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b> Situação endêmica global das leishmanioses.	<b>23</b>
<b>Figura 4.</b> Mudanças morfológicas de <i>Leishmania</i> spp.	<b>24</b>
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	<b>25</b>
<b>Figura 6.</b> Formas clínicas das Leishmanioses	<b>28</b>
<b>Figura 7.</b> Aneuploidia em diferentes cepas de <i>Leishmania</i> .	<b>30</b>
<b>Figura 8.</b> Transcrição policistrônica em tripanossomatídeos.	<b>32</b>
<b>Figura 9.</b> Processamento por <i>trans-splicing</i> e poliadenilação do pré-mRNA.	<b>33</b>
<b>Figura 10.</b> Etapas da regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos.	<b>34</b>
<b>Figura 11.</b> Modelo da iniciação da tradução <i>cap</i> -dependente.	<b>41</b>
<b>Figura 12.</b> Complexo eIF2.	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b> Subunidade eIF2 $\alpha$ .	<b>45</b>
<b>Figura 14.</b> Perfil de expressão ectópica de eIF2 $\alpha$ em células promastigotas e amastigotas de <i>L. infantum</i> .	<b>46</b>
<b>Figura 15.</b> Subunidade eIF2 $\gamma$ .	<b>49</b>
<b>Figura 16.</b> Conformação estrutural decamérica do complexo eIF2B.	<b>53</b>
<b>Figura 17.</b> Modelos da reciclagem de eIF2 na iniciação da tradução.	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b> Representação esquemática do plasmídeo pSP72atub-HYG-atub-V5.	<b>71</b>
<b>Figura 19.</b> Representação esquemática da estratégia de construção dos cassetes de deleção gênica.	<b>75</b>
<b>Figura 20.</b> Figura representativa da expressão de eIF2 $\alpha$ ao longo do crescimento e diferenciação de <i>L. infantum</i> .	<b>81</b>

<b>Figura 21.</b> Perfil de purificação polissomal em gradiente de sacarose de <i>L. infantum</i> e imunodeteccção de eIF2 $\alpha$ .	<b>82</b>
<b>Figura 22.</b> Etapas de clonagem de subunidades de eIF2B em vetor de expressão em <i>Leishmania</i> spp.	<b>86</b>
<b>Figura 23.</b> Expressão ectópica das subunidades do complexo eIF2B em linhagens de <i>L. infantum</i> .	<b>88</b>
<b>Figura 24.</b> Análise das interações entre eIF2 $\alpha$ e as subunidades do complexo eIF2B.	<b>90</b>
<b>Figura 25.</b> <i>Western-Blot</i> anti-HA das imunoprecipitações (IP) de eIF2 $\alpha$ .	<b>91</b>
<b>Figura 26.</b> BLASTP de “LinJ.09.1140” disponibilizado pelo TritrypDB.	<b>95</b>
<b>Figura 27.</b> Domínio eIF2_gamma dos ortólogos de eIF2 $\gamma$ em <i>L. infantum</i> .	<b>97</b>
<b>Figura 28.</b> Domínio eIF2_gamma_II dos ortólogos de eIF2 $\gamma$ em <i>L. infantum</i> .	<b>98</b>
<b>Figura 29.</b> Inserção nucleotídica do ortólogo eIF2 $\gamma$ -2 em <i>Leishmania</i> spp.	<b>99</b>
<b>Figura 30.</b> Domínio eIF2_C dos ortólogos de eIF2 $\gamma$ em <i>L. infantum</i> .	<b>100</b>
<b>Figura 31.</b> Relação evolutiva dos parálogos de eIF2 $\gamma$ na família Trypanosomatidae.	<b>103</b>
<b>Figura 32.</b> Etapas de amplificação e clonagem de cassetes de deleção de eIF2 $\gamma$ e eIF2 $\gamma$ -2.	<b>105</b>
<b>Figura 33.</b> Geração de linhagens mutantes de <i>L. infantum</i> haplóides para o gene eIF2 $\gamma$ .	<b>106</b>
<b>Figura 34.</b> Geração de linhagens mutantes de <i>L. infantum</i> nulas para o gene eIF2 $\gamma$ .	<b>109</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Linhagens de <i>L. infantum</i> geneticamente modificadas .	<b>62</b>
<b>Tabela 2.</b> Anticorpos primários utilizados.	<b>65</b>
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos para amplificação dos homólogos de eIF2B de <i>L. infantum</i> .	<b>69</b>
<b>Tabela 4.</b> Linhagens de co-expressão eIF2 $\alpha$ -HA/ eIF2Bs-V5.	<b>72</b>
<b>Tabela 5.</b> Linhagens recombinantes de deleção e complementação gênica.	<b>77</b>
<b>Tabela 6.</b> Ortólogos de eIF2B em tripanossomatídeos.	<b>83</b>
<b>Tabela 7.</b> Complexo eIF2B em <i>L. infantum</i> .	<b>85</b>
<b>Tabela 8.</b> Detecção da formação de complexos proteicos 43S por IP de eIF2 $\alpha$ .	<b>92</b>
<b>Tabela 9.</b> Subunidades do complexo eIF2 em <i>L. infantum</i> .	<b>94</b>
<b>Tabela 10.</b> Ortólogos de eIF2 $\gamma$ em <i>Leishmania</i> spp.	<b>96</b>
<b>Tabela 11.</b> Identificação de parceiros funcionais de eIF2 $\gamma$ e eIF2 $\gamma$ -2.	<b>111</b>

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

<b>40S</b>	Subunidade menor ribossomal eucariótica
<b>60S</b>	Subunidade maior ribossomal eucariótica
<b>80s</b>	Ribossomo eucariótico
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>B.O.D</b>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
<b>BLAST</b>	Ferramenta de Busca e Alinhamento Local
<b>BSA</b>	Albumina Bovina Sérica
<b>cap</b>	7-metilguanosina
<b>dATP</b>	Deoxiadenosina Trifosfato
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Deoxinucleotideo Trifosfatos
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EF</b>	Fator de alongação da tradução eucariótico
<b>eIFs</b>	Fator de Iniciação da tradução eucariótico
<b>GAP</b>	Fator estimulador de atividade GTPase
<b>GCN2</b>	Quinase de controle geral não despressionável
<b>GDF</b>	Fator de liberação do GDI
<b>GDI</b>	Fator de inibição da liberação de nucleotídeo guanosina
<b>GDP</b>	Difosfato de guanosina
<b>GEF</b>	Fator de troca de nucleotídeo guanosina
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>HA</b>	Hemaglutinina
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfônico

<b>HRI</b>	Quinase Heme-Regulada
<b>IP</b>	Imunoprecipitação
<b>IRES</b>	Sítio Interno de Entrada Ribossomal
<b>K-boxes</b>	Tratos de lisinas repetitivas
<b>KDa</b>	QuiloDaltons
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose Cutânea Difusa
<b>LCL</b>	Leishmaniose Cutânea Localizada
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>Met</b>	Metionina
<b>MetAP</b>	Metionina Aminopeptidase
<b>Met-tRNA<sub>i</sub></b>	tRNA iniciador
<b>mRNAs</b>	RNA Mensageiro
<b>ORF</b>	Quadro aberto de leitura.
<b>PABP</b>	Proteína de Ligação à cauda Poli-A
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de Base
<b>P-bodies</b>	Grânulos de Processamento
<b>PBS</b>	Tampão Salina Fosfato
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de polimerase
<b>PERK quinase</b>	Quinase do retículo endoplasmático semelhante à PKR
<b>PKLD</b>	Leishmaniose Dérmica Pós- Kalazar
<b>PKR quinase</b>	Proteína quinase ativada por RNA
<b>PVDF</b>	Polivinil Fluorido
<b>RBP</b>	Proteína de ligação ao RNA
<b>RNApol</b>	RNA polymerase
<b>RNAs</b>	Ácido Ribonucléico

<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com Dodecil Sulfato de Sódio
<b>sítio P</b>	Sítio Peptidil
<b>SL</b>	Sequência Líder
<b>snRNA</b>	RNA pequeno nuclear
<b>SSR</b>	Região de troca de fita
<b>SV5</b>	<i>Simian vírus 5</i>
<b>TBS</b>	Tampão Tris Salino
<b>TC</b>	Complexo Ternário
<b>tRNA<sup>i</sup></b>	RNA Transportador iniciador
<b>tRNA</b>	RNA transportador
<b>UTR</b>	Região não traduzida
<b>WHO</b>	Organização Mundial da Saúde

## Sumário

1. Introdução	18
2. Revisão da literatura	20
2.1 Kinetoplastídeos	20
2.2 Família Trypanosomatidae e o gênero <i>Leishmania</i>	20
2.2.1 Epidemiologia das Leishmanioses	23
2.2.2 Ciclo evolutivo e transmissão de espécies de <i>Leishmania</i>	26
2.2.3 Patologias e tratamentos associados	28
2.3 Biologia molecular de <i>Leishmania</i> e outros tripanossomatídeos	31
2.3.1 Características e organização genômica	31
2.3.2 Transcrição Gênica	33
2.3.3 Processamento dos pré-RNAs policistrônicos	34
2.4 Regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos	35
2.4.1 Processamento diferencial de pré-mRNAs	36
2.4.2 Controle da exportação de mRNAs maduros	37
2.4.3 Regulação da estabilidade dos mRNAs	37
2.5 Síntese proteica	39
2.5.1 Iniciação da tradução	40
2.5.2 O complexo eIF2	44
2.5.3 A subunidade eIF2 $\alpha$	45
2.5.4 A subunidade eIF2 $\beta$	49
2.5.5 A subunidade eIF2 $\gamma$	50
2.5.6 O complexo eIF2B	52
2.6 Regulação da síntese proteica	56
2.7 Os papéis de eIF2, eIF2B e eIF5 na regulação da síntese de proteínas	58

3. Objetivos	62
3.1 Objetivo geral	62
3.2 Objetivos específicos	62
4. Material e métodos	63
4.1 Cultivo de parasitas	63
4.2 Transfecção dos parasitas	64
4.3 Curvas de crescimento de <i>L. infantum</i>	65
4.4 Curvas de diferenciação <i>in vitro</i> de <i>L. infantum</i>	66
4.4 Curvas de diferenciação <i>in vitro</i> de <i>L. infantum</i>	66
4.6 Preparação de lisados celulares de <i>L. infantum</i>	67
4.7 Ensaio de interação polissomal	68
4.8 Rastreamento dos homólogos de eIF2B em tripanossomatídeos	70
4.9 Superexpressão dos fatores eIF2B de <i>L. infantum</i>	70
4.10 Sequenciamento de DNA	74
4.11 Imunoprecipitação	75
4.12 Análise evolutiva entre os parálogos de eIF2 $\gamma$	76
4.13 Ensaios de deleção e complementação gênica	76
4.14 <i>Southern-Blot</i>	79
5. Resultados	81
5.1 Caracterização molecular de eIF2 $\alpha$ em <i>L. infantum</i>	81
5.1.1 Análise da expressão de eIF2 $\alpha$ durante curva de crescimento e diferenciação	81
5.1.2 Análise funcional de eIF2 $\alpha$ durante a síntese proteica	83
5.1.3 Análise das interações de eIF2 $\alpha$ com o complexo parceiro funcional eIF2B	84
5.1.3.1 Rastreamento <i>in silico</i> dos homólogos das cinco subunidades de eIF2B em tripanossomatídeos	84
5.1.3.2 Clonagem das subunidades de eIF2B ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ ) de <i>L. infantum</i>	86

em vetor de expressão	
5.1.3.3 Geração de linhagens de <i>L. infantum</i> super-expressando as subunidades de eIF2B	<b>88</b>
5.1.3.4 Imunoprecipitação de eIF2 $\alpha$ e análise das interações com o complexo eIF2B nas linhagens de co-expressão	<b>90</b>
5.1.4 Caracterização funcional de eIF2 $\alpha$ de <i>L. infantum</i> na formação do complexo de iniciação da tradução 43S	<b>92</b>
5.2 Evidências da formação de complexos distintos eIF2 em <i>Leishmania</i> sp.	<b>95</b>
5.2.1 Identificação de novo parceiro funcional de eIF2 $\alpha$	<b>95</b>
5.2.2 Análise <i>in silico</i> dos homólogos de eIF2 $\gamma$ em <i>Leishmania</i> sp.	<b>97</b>
5.2.2.1 Domínio eIF2_ $\gamma$	<b>99</b>
5.2.2.2 Domínio eIF2_II	<b>100</b>
5.2.2.3 Domínio eIF2_C	<b>101</b>
5.2.3 Relação evolutiva entre os homólogos de eIF2 $\gamma$ em Tripanossomatídeos	<b>102</b>
5.2.4 Essencialidade dos homólogos de eIF2 $\gamma$ em <i>Leishmania</i> sp	<b>106</b>
5.2.5 Identificação das interações funcionais de eIF2 $\gamma$ e eIF $\gamma$ -2	<b>112</b>
6. Discussão	<b>114</b>
7. Conclusões	<b>121</b>
8. Referências Bibliográficas	<b>122</b>
9. <i>Curriculum Vitae</i>	<b>129</b>

## 1. Introdução

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Apesar do grande número de pessoas em situação de risco, da mortalidade e morbidade, poucas intervenções de alto impacto foram desenvolvidas até o momento. Portanto há necessidade de desenvolvimento de métodos eficientes de prevenção e tratamento dessas doenças, o que demanda um conhecimento maior da biologia do parasita.

As diferentes espécies de *Leishmania* são organismos da família Trypanosomatidae, protozoários flagelados que apresentam características biológicas divergentes de seus hospedeiros metazoários. Uma marcante diferença é a regulação da expressão gênica que ocorre de forma pós-transcricional, através do controle dos níveis de mRNAs e via regulação da biossíntese proteica ou tradução.

A tradução eucariótica é didaticamente dividida em quatro etapas (iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos). Dentre estas, a etapa mais susceptível a regulação é a iniciação, onde ao menos 11 fatores de iniciação (eIFs) cooperam para o reconhecimento do mRNA maduro, recrutamento do ribossomos, rastreamento do códon de iniciação da tradução, ancoragem do ribossomo e inserção do primeiro aminoácido, iniciando a tradução propriamente dita.

Em mamíferos, o papel dos eIF2 e eIF2B na tradução é um tema vastamente estudado. Estes dois, são complexos multiproteicos, sendo o eIF2 formado por três subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e o eIF2B por cinco subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$ ). A subunidade eIF2 $\alpha$  têm sido foco de diversos estudos, já que sua fosforilação específica resulta na redução global da tradução dos mRNAs e no

aumento específico da expressão de mRNAs relacionados à sobrevivência celular. Em mamíferos, esse mecanismo vem sendo investigado como promissora ferramenta de apoio ao desenvolvimento e implementação de terapias anti-tumorigênicas efetivas, já que o controle da iniciação da tradução através do eIF2 é um ponto crucial para a viabilidade celular mediante estresse.

Em tripanossomatídeos a via de regulação da atividade do eIF2 pode exercer um papel particularmente importante, em especial devido às características de ausência da regulação gênica transcricional. Contudo não existem trabalhos que caracterizem abrangentemente o papel do complexo eIF2 e seus parceiros funcionais na iniciação da tradução desses organismos.

Nesse contexto o presente trabalho contribuiu para a caracterização do complexo eIF2 de *Leishmania* sp., focando inicialmente os esforços na subunidade eIF2 $\alpha$ , visando estabelecer seu padrão de expressão endógena durante o ciclo de crescimento e diferenciação do parasito. Mais ainda, avaliou-se a funcionalidade desse fator na biossíntese proteica através da análise da capacidade de formação de complexos de pré-iniciação da tradução 43S em parceria com demais eIFs e com a subunidade 40S ribossomal. Concomitantemente, este trabalho confirmou as interações proteicas do complexo eIF2 de *Leishmania* com todas as subunidades identificadas para o complexo parceiro eIF2B destes patógenos. Mais ainda, permitiu, de maneira inédita, a identificação e caracterização inicial de diferentes complexos do tipo eIF2 ocorrendo *in vivo* nesses organismos, baseados em duas subunidades eIF2 $\gamma$ . Os resultados obtidos aqui são contrastantes com os dados já bem explorados dos outros eucariotos, e contribuem para a caracterização molecular das características singulares apresentadas por esses organismos.

## **2. Revisão da literatura**

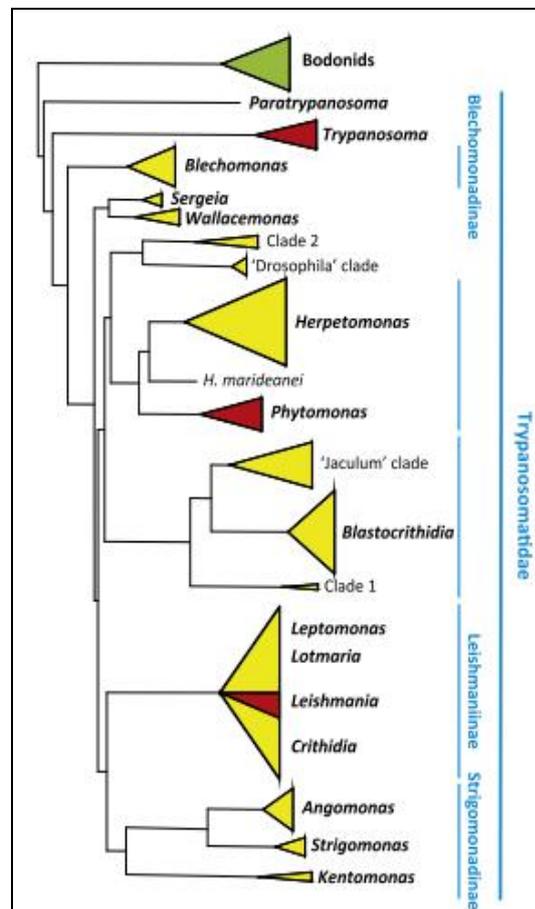
### **2.1 Kinetoplastídeos**

Os kinetoplastídeos constituem um grupo de protozoários flagelados caracterizado pela presença do kinetoplasto, uma região rica em DNA contida em sua única e grande mitocôndria (STUART, *et al.*, 2008). Eles são representados por uma variedade de espécies de vida livre e alguns patógenos, parasitas de invertebrados, vertebrados e até mesmo plantas (Simpson et al. 2006). A biologia celular desses organismos é em sua maioria similar, sendo que todos os representantes dessa ordem possuem formas móveis devido a presença de um flagelo único, originado a partir de uma bolsa flagelar na membrana celular localizada próximo a mitocôndria. Outras características em comum são seus peroxissomos modificados para realizar glicólise, chamados de glicossomos, e suas membranas celulares que apresentam diversas moléculas espécie-específica e que são estruturadas por um citoesqueleto de microtúbulos. Em sua maioria, os kinetoplastídeos se multiplicam assexuadamente por fissão binária durante a qual não ocorrem a dissolução da membrana nuclear e a condensação cromossômica (STUART, *et al.*, 2008).

### **2.2 Família Trypanosomatidae e o gênero *Leishmania***

Dentre os kinetoplastídeos, encontram-se os tripanossomatídeos, organismos da família Trypanosomatidae. Até o presente momento, a classificação taxonômica dessa família não está finalizada e é muita vezes confusa. A classificação taxonômica atual é baseada em uma combinação da taxonomia tradicional e reconstruções filogenéticas e nessa classificação a família Trypanosomatidae é representada por três sub-famílias: *Leishmaniinae*,

representada pelos gêneros *Leishmania*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Lotmaria*; *Strigomonadinae*, com os gêneros *Angomonas*, *Kentomonas* e *Strigomonas*; e *Blechomonadinae* com o gênero *Blechomonas*. Adicionalmente, existem outros clados associados em nível de gênero: *Trypanosoma*, *Phytomonas*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Sergeia*, *Paratrypanosoma*, *Wallacemonas*. Existem ainda clados remanescentes que não estão formalmente classificados uma vez que, até o momento, não foram obtidos isolados cultiváveis (Figura 1) (Votýpka et al. 2015).



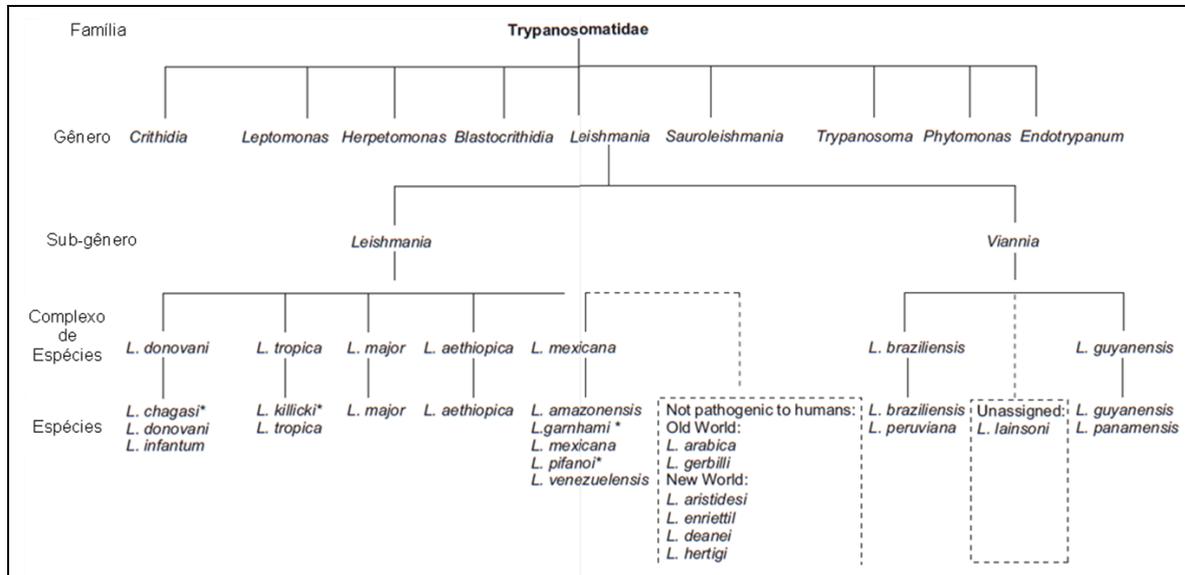
**Figura 1.** Relações evolutivas dos tripanossomatídeos. Montagem baseada na subunidade menor ribossomal. Em verde, *Bodonidae* usado como grupo externo; Amarelo, parasitas monoxênicos (apresentam apenas um hospedeiro no ciclo biológico); Vermelho, parasitas heteroxênicos (apresentam alternância de hospedeiros durante ciclo biológico). Fonte: (Votýpka et al. 2015).

Na família Trypanosomatidae, dois gêneros se destacam por apresentarem importância médica ou veterinária: *Trypanosoma* e *Leishmania*. No gênero *Trypanosoma* as duas espécies causadoras de doenças em humanos são o *Trypanosoma brucei* e o *Trypanosoma cruzi*, responsáveis pelo desenvolvimento da doença do sono e doença de Chagas, respectivamente. No gênero *Leishmania* aproximadamente 20 espécies causam as doenças de sintomatologia espectral denominadas leishmanioses (Stuart et al. 2008).

O parasita causador das leishmanioses, nomeado *Leishmania*, foi identificado independentemente, no final do século XIX, por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna (World Health Organization 2010). Atualmente, o gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Leishmania*, presente no Velho e no Novo Mundo; e *Viannia*, restrito ao Novo Mundo. Essa divisão se baseia no desenvolvimento do parasita nos vetores flebotomíneos, já que o desenvolvimento dos representantes do subgênero *Leishmania* é supra-pilórico, restrito a partes anteriores à junção do intestino médio com o intestino posterior. No caso daqueles do subgênero *Viannia* o desenvolvimento é peri-pilórico, ocorrendo no intestino médio e posterior (BATES, 2007).

As relações filogenéticas entre diferentes espécies de *Leishmania* foram estabelecidas através de métodos enzimáticos ou moleculares: a tipagem por eletroforese de quinze isoenzimas (Sistema Montpellier - MON); e a análise do DNA kinetoplastidial digerido por enzimas de restrição (Esquizodemos). Esses métodos puderam confirmar a divisão nos dois subgêneros, classificar diferentes espécies e ainda, agrupar os parasitas evolutivamente. O gênero *Leishmania* é então composto de cerca de 30 espécies conhecidas (Figura 2), embora a

classificação de algumas espécies ainda esteja em andamento (World Health Organization 2010).



**Figura 2.** Taxonomia do gênero *Leishmania*. O asterisco (\*) indica espécies indefinidas FONTE:(WHO, 2010).

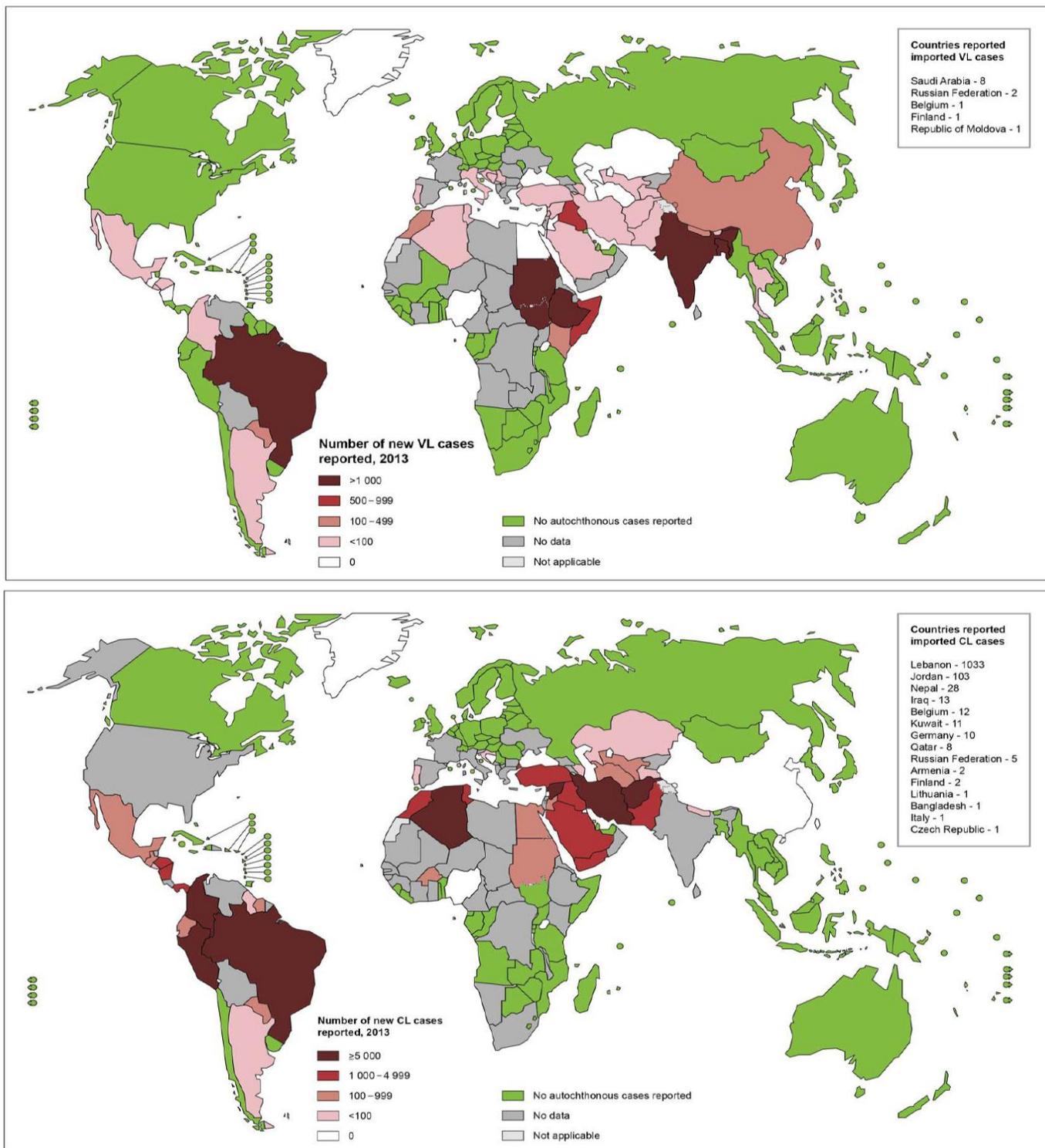
## 2.2.1 Epidemiologia das leishmanioses

As leishmanioses são endêmicas em 98 países nos cinco continentes geográficos (World Health Organization 2012). Sua distribuição ocorre de maneira heterogênea, variando de acordo com a espécie do parasita encontrado, as características ecológicas regionais e o comportamento humano frente à exposição ao protozoário (Dujardin et al. 2008).

A OMS estimou que até o ano de 2010 existiam cerca de 12 milhões de indivíduos infectados mundialmente com diferentes formas das leishmanioses (World Health Organization 2010). Anualmente, um total de mais de 58 mil casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 220 mil casos de Leishmaniose Cutânea (LC) são oficialmente notificados. Com base nas estimativas de sub-notificação,

contudo, estima-se que existam um total de 200 a 400 mil e 700 mil a 1,2 milhões de novos casos de LV e LC, respectivamente, ocorrendo todos os anos mundialmente (World Health Organization 2012). Em 2013, segundo dados do comitê de controle de doenças negligenciadas da OMS, especificamente no Brasil, foram notificados mais de mil casos de LV e cinco mil de LC (Figura 3).

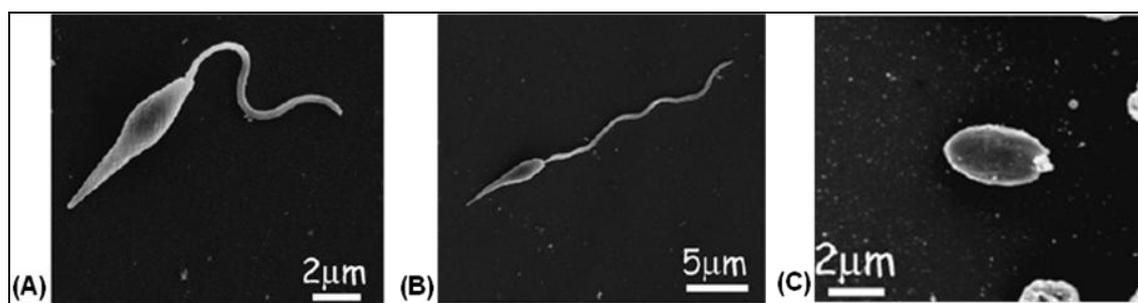
Mais de 90% dos casos globais de LV se concentram em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. Já a LC é mais distribuída, e 10 países concentram entre 70 a 75% de incidência dos casos: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica, Peru e Brasil (World Health Organization 2012).



**Figura 3.** Situação endêmica global das leishmanioses. O painel superior representa o número total de casos anuais notificados para Leishmaniose Visceral (LV) nos países endêmicos em 2013. O painel inferior representa o número total de casos anuais notificados para Leishmaniose Cutânea (LC) nos países endêmicos em 2013 (Fonte: Controle de Doenças Negligenciadas, WHO 2015).

### 2.2.2 Ciclo evolutivo e transmissão de espécies de *Leishmania*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários com complexo ciclo de vida. No hospedeiro invertebrado são encontradas as formas extracelulares, alongadas, flagelares e móveis, denominadas de promastigotas. A partir dessas, podem ser descritas duas sub-formas principais: a promastigota procíclica, replicativa e não infectiva; e a promastigota metacíclica, forma não-multiplicativa porém infectiva. Já no hospedeiro vertebrado, o parasita apresenta-se sob a forma intracelular, arredondada, replicativa, com flagelo rudimentar e de tamanho diminuído, denominada amastigota (Besteiro et al. 2007) (Figura 4).

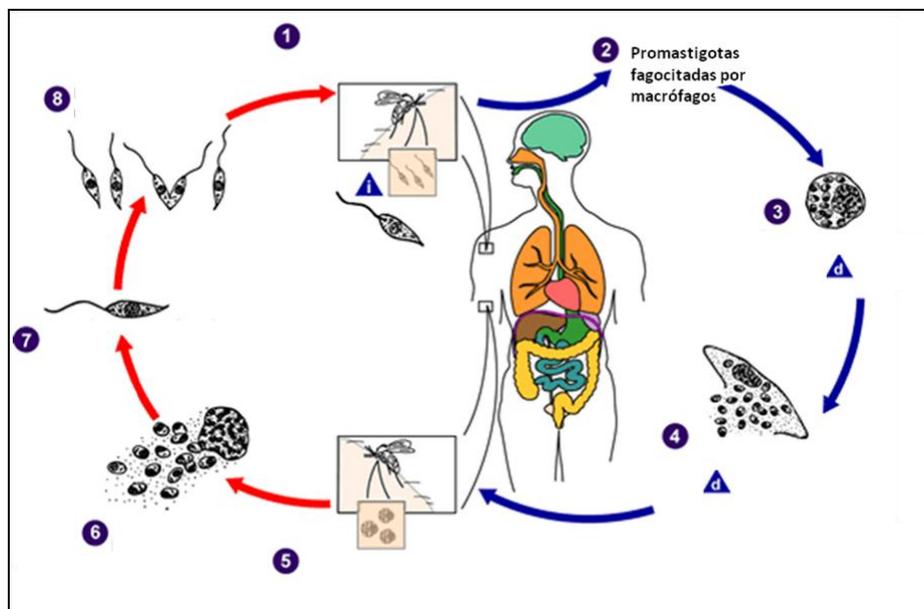


**Figura 4.** Mudanças morfológicas de *Leishmania* spp. durante o ciclo de vida. (A) promastigota procíclica; (B) promastigota metacíclica; (C) amastigota. Imagens de células de *Leishmania major* em microscopia eletrônica de varredura. Fonte: (Modificado de, BESTEIRO et al., 2007).

A transmissão dos protozoários ocorre através da picada das fêmeas infectadas de dípteros flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. Esses insetos são classificados no gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomya*, no Novo Mundo. Ocorre assim a inoculação de formas infectivas (promastigotas metacíclicas) principalmente em canídeos, lagomorfos e roedores, mas acidentalmente em humanos (Dantas-Torres 2007). Uma vez na corrente sanguínea, o parasita é fagocitado por macrófagos e no interior destes ocorre a diferenciação dos parasitas em amastigotas. As amastigotas se multiplicam por fissão binária no interior dos macrófagos que podem então se romper. As

amastigotas liberadas se disseminam na corrente sanguínea e infectam novos macrófagos e tecidos (STUART, *et al.*, 2008).

Eventualmente, fêmeas dos flebotomíneos picam o hospedeiro infectado e ingerem as amastigotas (BATES, 2007). No intestino do inseto as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas e se multiplicam. Após alguns dias os parasitas começam a se replicar mais lentamente e se especializam nas formas infectivas, processo denominado metaciclo, completando assim o ciclo de biológico (Figura 5).



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Leishmania* spp. 1- O flebotomíneo infectado injeta promastigotas metacíclicas no hospedeiro. 2- As promastigotas injetadas são fagocitadas por macrófagos. 3- As promastigotas se diferenciam em amastigotas no interior dos fagolisossomos. 4- As amastigotas se multiplicam, lisam os macrófagos e infectam novas células. 5- Novo vetor se torna infectado ao ingerir amastigotas. 6- Células infectadas que foram ingeridas são lisadas liberando amastigotas no intestino do vetor. 7- As amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas. 8- As promastigotas procíclicas se multiplicam e se especializam em promastigotas metacíclicas. Triângulos azuis contendo "d"- fase de diagnóstico; triângulo azul contendo "i"- fase infectiva. (Fonte: <<http://dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 10 nov. 2011).

Mudanças nas condições ambientais entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado (ex.: diferença de temperatura, pH, abundância de aminoácidos e disponibilidade de oxigênio) desencadeiam uma série de adaptações bioquímicas capazes de satisfazer as exigências para o desenvolvimento do parasita nos respectivos organismos. Contudo, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares que medeiam esse remodelamento fisiológico (BATES, 2007; BESTEIRO *et al.*, 2007).

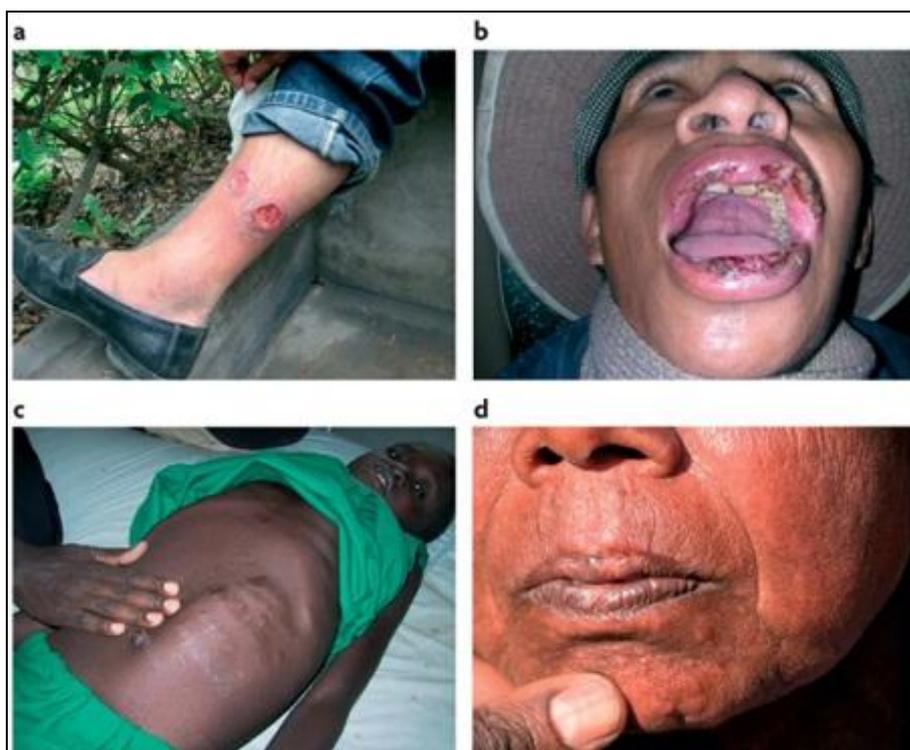
### **2.2.3 Patologias e tratamentos associados**

As leishmanioses se apresentam divididas em quatro formas clínicas principais (Figura 6):

1- A leishmaniose cutânea (LC) localizada é caracterizada por lesões papulares ou nodulares que geralmente tem encaminhamento para a cura espontânea, porém pode se tornar crônica (Reithinger et al. 2007). A OMS recomenda que seja realizado o protocolo de tratamento com antimoniais pentavalentes (ex: estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina) a fim de diminuir o tempo de persistência da lesão reduzindo, por tanto, o tempo de transmissão do parasita e a existência de recidivas (Minodier and Parola 2007). A forma difusa da leishmaniose cutânea é apresentada por máculas, pápulas, nódulos ou placas amplamente distribuídos principalmente nos membros e face. Não há cura espontânea e frequentemente após o tratamento podem ocorrer recidivas (Reithinger et al. 2007).

2- A leishmaniose muco-cutânea (LM) pode ser descrita como metástase da lesão cutânea para o tecido mucoso da boca e/ou do trato respiratório superior por disseminação linfática ou hematogênica. A doença não progride para a cura

espontânea e infecções bacterianas secundárias e pneumonias recorrentes são as principais causas de morte. O protocolo básico para tratamento recomendado pela OMS é semelhante ao empregado para leishmaniose cutânea, contudo o período de duração estende-se até o 28º dia (Minodier and Parola 2007).



**Figura 6.** Formas clínicas das leishmanioses. (a) Lesão característica de leishmaniose cutânea, do tipo localizada; (b) Acometimento da mucosa oral na leishmaniose muco-cutânea; (c) Baço-esplenomegalia desenvolvida na leishmaniose visceral; (d) Lesões nodulares disseminadas da leishmaniose dérmica pós-Kalazar. FONTE: (Chappuis et al. 2007)

**3-** A leishmaniose visceral (LV), ou Kalazar, apresenta sintomatologia de febre, perda de peso, desconforto abdominal, anorexia, hepatomegalia, esplenomegalia, ulceração de mucosa do intestino delgado, linfadenopatia, granulocitopenia e anemia. Também poderá ocorrer trombocitopenia e diminuição da produção de protrombina pelo fígado, resultando em hemorragias. Em estágios avançados infecções secundárias são frequentes, especialmente pneumonia, disenteria e tuberculose. Não existe cura espontânea e se não tratada é fatal

(Chappuis et al. 2007). As drogas de primeira escolha para o tratamento também são os antimoniais pentavalentes, administrados intramuscularmente. Anfotericina B e pentamidinas são usados como segunda linha de medicamentos (Chappuis et al. 2007).

4- A leishmaniose dérmica pós-Kalazar (PKLD) pode acometer entre 10% e 50% dos pacientes curados da leishmaniose visceral. Caracteriza-se por manchas hipopigmentadas ou eritematosas em qualquer parte do corpo que se tornam pápulas e nódulos com presença de infiltrado celular especialmente na face, mas também pode afetar a mucosa bucal, conjuntival e genital. Em raros casos ocorre cura espontânea, requerendo na maioria das vezes o tratamento específico com antimoniais pentavalentes e Anfotericina B (Ganguly et al. 2010).

Os dados referentes às taxas de mortalidade das leishmanioses são extremamente escassos e geralmente representam os casos baseados em óbitos ocorridos em âmbito hospitalar, admitindo-se que a taxa de mortalidade seja em média de 10% (World Health Organization 2012).

Os principais problemas para o controle das leishmanioses são: dificuldade de diagnóstico preciso na ausência de condições básicas para tal; alta toxicidade e sérios efeitos colaterais das drogas empregadas (ex: cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mialgia, pancreatite aguda); ineficácia dos protocolos de tratamento; alto custo dos medicamentos e da atenção à saúde necessária para o emprego dos medicamentos; e dificuldade de acesso a populações rurais. Nesse sentido, na tentativa de reduzir os efeitos colaterais, os custos econômicos e a taxa de evasão ao tratamento, é que pesquisas em todo mundo vem sendo desenvolvidas buscando novas estratégias de tratamento (Minodier and Parola 2007; Reithinger et al. 2007).

## 2.3 Biologia molecular de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos

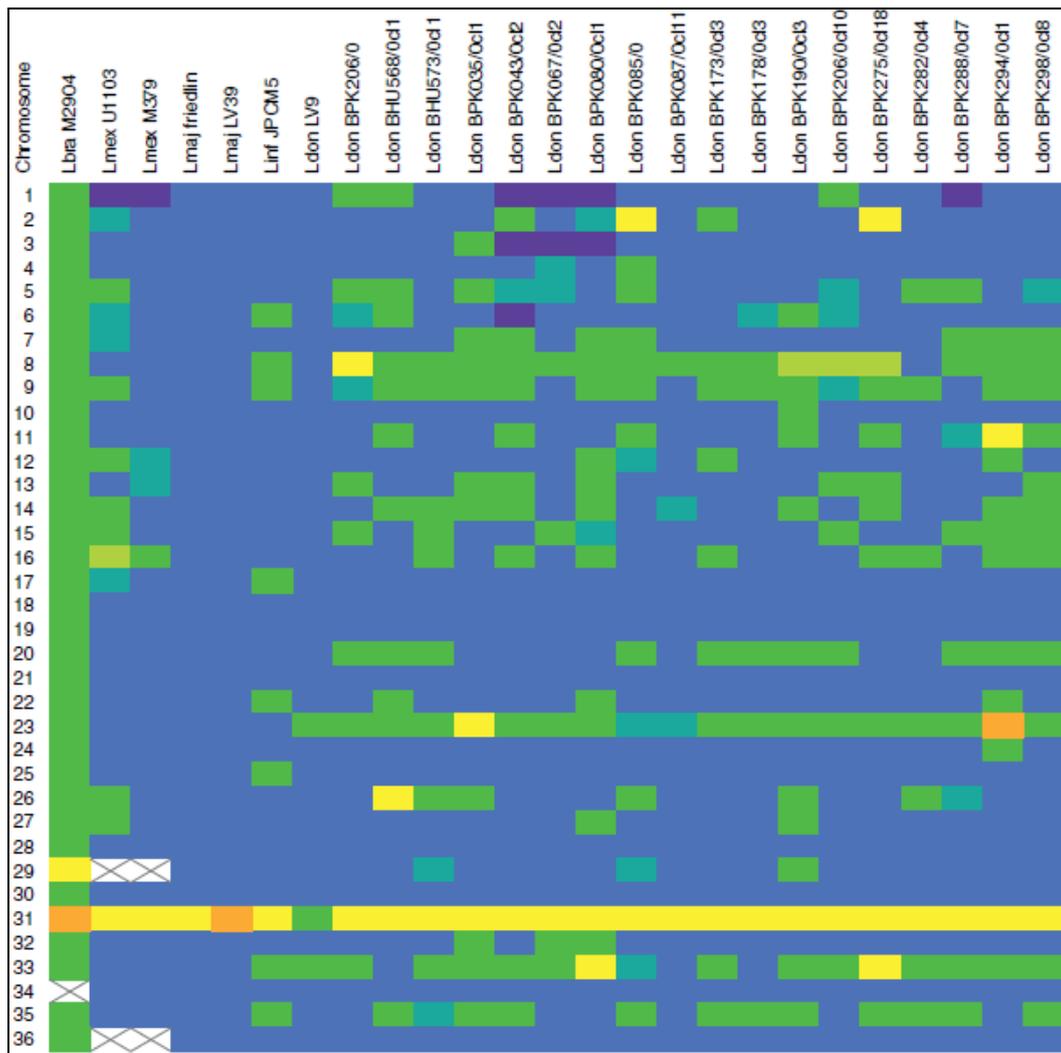
### 2.3.1 Características e organização genômica

Espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos possuem genoma em geral diplóide distribuído em um número variável de cromossomos (de onze a 36) (El-Sayed et al. 2005). Vários trabalhos vêm relatando, contudo, a presença de extensiva variação no número de cópias cromossômicas em isolados selvagens de *Leishmania*, indicando que existe nesse gênero um padrão de aneuploidias cromossômicas, com a presença de triploidias, tetraploidias e até pentaploidias (Figura 7) (MANNNAERT et al., 2012).

*T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* possuem aproximadamente 9.086, 12.000 e 8.311 genes, respectivamente. Nestas três espécies (os Tritryps), 6.158 genes são ortólogos e dos 1.617 domínios protéicos identificados, menos que 4% pertencem a somente uma espécie (EL-SAYED; MYLER; BLANDIN; et al., 2005b). Até 80% dos genes de *T. brucei* e 93% dos genes de *L. major* se encontram distribuídos em grandes blocos gênicos colineares presente em fita única podendo conter de 10 até centenas de genes (El-Sayed et al. 2005). De todos os genes identificados, 94% dos ortólogos estão em sintenia, ou seja, esses blocos gênicos se encontram dispostos na mesma organização no contexto genômico entre organismos distintos (El-Sayed et al. 2005). Desse modo, embora os tripanossomatídeos tenham divergido entre si entre 200 a 500 milhões de anos atrás e apresentarem características biológicas diferenciadas de infecção, de transmissão e de evasão do sistema imune, seus genomas possuem notável grau de conservação da sintenia (Kissinger 2006).

Os grandes blocos gênicos dos tripanossomatídeos são em geral separados por pequenas sequencias de poucos kilobases (Kb) onde a sintenia é

“quebrada”. Uma análise aprofundada revelou que em 40% das vezes esses pontos de quebra da sintonia são associados à regiões de expansão de famílias multigênicas, de inserção de elementos genéticos móveis e codificação de RNAs estruturais (Martínez-Calvillo et al. 2003).



**Figura 7.** Aneuploidia em diferentes cepas de *Leishmania*. O número de cópias de cada cromossomo nos isolados são representados pelas diferentes cores: Azul, dissômico; Verde, trissômico; Amarelo, tetrassômico; Laranja, pentassômico; Cores intermediárias representam valores intermediários derivados provavelmente de população celular mista apresentando mosaicismos cromossômico; Caixas marcadas com “X” indicam cromossomos inexistentes devido a fusão entre os cromossomos 20 e o 34 em *L. braziliensis* e entre os cromossomos 8 e 29, e ainda, 20 e 36 em *L. mexicana*; Abreviações: Lbra, *Leishmania braziliensis*; Lmex, *Leishmania mexicana*; Lmaj, *Leishmania major*; Linf, *Leishmania infantum*; Ldon, *Leishmania donovani* (Fonte: MANNAERT et al., 2012).

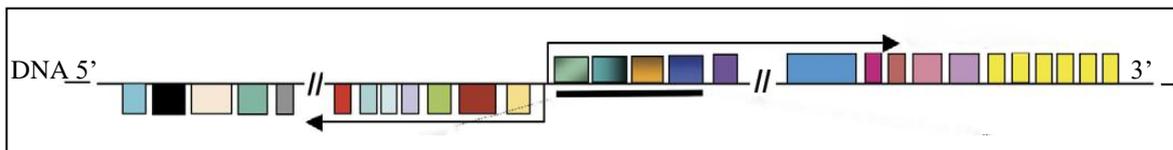
### 2.3.2 Transcrição gênica

Os arranjos gênicos em tripanossomatídeos são semelhantes às unidades poliestrônicas procarióticas (*operons*) especialmente porque as regiões codificantes de proteínas, majoritariamente, não apresentam introns. A diferença se dá porque esses arranjos gênicos, contraditoriamente ao ocorrido nas bactérias, não codificam proteínas com funções biológicas relacionadas e são muito maiores (Clayton 2002).

Os tripanossomatídeos possuem homólogos de todas as RNA polimerases descritas em eucariotos superiores, RNA polimerases I, II e III (RNApol I, RNApol II, e RNApol III). Os promotores da RNA polimerase I foram inicialmente descritos em *T. brucei* e estão relacionados, em sua maioria, à transcrição de genes de RNA ribossômicos (rRNAs), mas também são responsáveis pela transcrição de genes relacionados a antígenos de superfície encontrados nas diferentes formas celulares de *T. brucei*. Os promotores da RNA polimerase III, são encontrados dentro de regiões não sintênicas e foram caracterizados como relacionados à transcrição de pequenos RNA funcionais (*small RNAs*) e à transcrição de RNAs transportadores (tRNAs). Apesar do conhecimento sobre promotores para RNAs funcionais, promotores clássicos da RNA polimerase II para genes codificantes de proteínas são raros ou ausentes (Campbell et al. 2003).

Uma característica dos tripanossomatídeos, portanto, é que a transcrição de genes codificantes de proteínas pela RNA polimerase II ocorre na ausência de promotores clássicos. Esta transcrição foi postulada como sendo bidirecional, de forma contínua, na ausência de fatores de iniciação de transcrição. Ela se inicia a partir de regiões pré-determinadas em cada cromossomo, denominadas regiões de troca de fita ou SSR (do inglês, *Strand Switch Regions*) (Martínez-Calvillo et al.

2003). Desta forma a RNA polimerase II inicia a transcrição a partir das SSR, progredindo através dos blocos gênicos gerando pré-mRNAs transcritos de forma policistrônica (Martínez-Calvillo et al. 2003) (Figura 8).

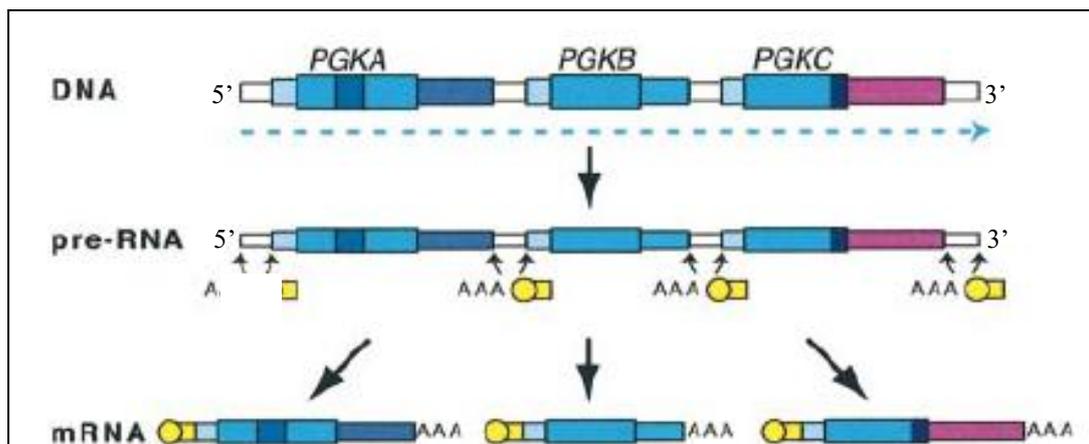


**Figura 8.** Transcrição policistrônica em tripanossomatídeos. Genes não relacionados funcionalmente são dispostos agrupados em blocos que são transcritos constitutivamente pela RNA pol II em RNAs policistrônicos, a partir da região de troca de fita ou SSR (*Strand Switch Region*), na ausência de promotores. Fonte: (Adaptado de, HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

### 2.3.3 Processamento dos pré-mRNAs policistrônicos

Nos tripanossomatídeos o processamento e a maturação dos pré-mRNAs em mRNAs maduros se dá de maneira diferenciada dos eucariotos superiores e requer o envolvimento de dois mecanismos acoplados: processamento em *trans* (*trans-splicing*) e poliadenilação (Liang et al. 2003; Haile and Papadopoulou 2007). O processamento por *trans-splicing* se caracteriza pela adição à extremidade 5' do pré-mRNA de uma seqüência de 39 a 41 nucleotídeos. Esta sequencia é derivada da clivagem de um pequeno RNA nuclear (snRNA) rico em resíduos de uridina denominado RNA *Spliced-Leader* (SL), ou *mini-exon* (Liang et al. 2003). O gene do RNA SL contém o único promotor de RNA polimerase II conhecido (Campbell et al. 2003). Este RNA carrega na sua porção 5' terminal um *cap* de 7-metilguanossina modificado, quando comparado com o *cap* de eucariotos superiores, devido a metilação dos seus quatro primeiros resíduos nucleotídicos, formando uma estrutura denominada de *cap4* que ocorre unicamente nos tripanossomatídeos (Liang et al. 2003; Gunzl 2010). Concomitantemente, ocorre a

poliadenilação na porção 3' do pré-mRNA. A seleção do sítio de poliadenilação é determinada principalmente pela presença de uma sequência de polipirimidinas nas regiões intergênicas, e ainda, pela presença de um sítio acceptor de *splicing* ativo entre 200 e 500 nucleotídeos a jusante desta (Figura 9) (Liang et al. 2003; Requena 2011).

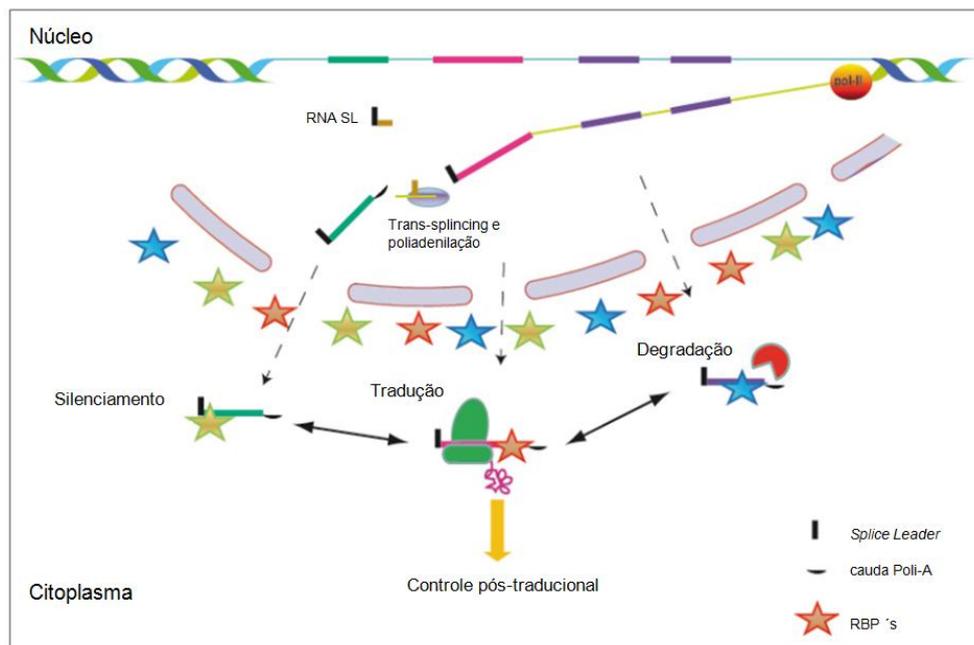


**Figura 9.** Processamento por *trans-splicing* e poliadenilação do pré-mRNA. O DNA é transcrito constitutivamente em blocos gerando transcritos policistrônicos que são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. Assim, é adicionado ao mRNA a seqüência SL (retângulo amarelo) contendo o *cap4* (círculo amarelo) na extremidade 5' do mRNA e a cauda de poli-adeninas (AAA) na extremidade 3'. FONTE: (Modificado de Clayton, 2002).

## 2.4 Regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos

A maioria dos organismos se adapta a mudanças no ambiente que estão inseridos através de ajustes na expressão gênica, sendo a iniciação da transcrição o ponto mais importante da regulação. Contudo, os tripanossomatídeos perderam completamente a capacidade de exercer a regulação da transcrição pela RNA pol II (Clayton 2002). Diante deste panorama é coerente afirmar que não há evidências de mecanismos de regulação gênica no nível transcricional que permitam a expressão diferencial de genes ou blocos gênicos nesses organismos (Requena 2011). Desta forma a regulação de

expressão gênica nos tripanossomatídeos ocorre, em sua maioria, pós-transcricionalmente, através de: processamento diferencial dos pré-mRNAs; controle da exportação de mRNAs maduros; regulação da estabilidade dos mRNAs; controle da tradução proteica; modificações pós-traducionais de proteínas (Figura 10) (Haile and Papadopoulou 2007).



**Figura 10.** Etapas da regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos. A transcrição policistrônica gera pré-mRNAs que são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. Os transcritos maduros poderão, a partir dessa etapa, se acoplarem a várias proteínas ligadoras de RNAs (RBPs) específicas encaminhando-os para o transporte citoplasmático (localização específica), tradução ou degradação. FONTE: (REQUENA, 2011).

#### 2.4.1 Processamento diferencial de pré-mRNAs

Como já descrito acima, os sítios de poliadenilação são localizados de 200-500 nucleotídeos a montante do sítio de *trans-splicing* e o evento de poliadenilação de um dado *cístron* é diretamente dependente do processamento a jusante do *cístron* seguinte. Esse arranjo impede o processamento independente para genes adjacentes. Assim o processamento de um mRNA causaria defeito na

poliadenilação do gene adjacente (Benz et al. 2005). Mais ainda, a perda ou adição de sítios aceptores de *trans-splicing* dentro das seqüências intergênicas gera mRNAs não traduzíveis, pois tais RNAs serão incapazes de sofrer o processamento e a poliadelinação de forma correta (Clayton 2002).

#### **2.4.2 Controle da exportação de mRNAs maduros**

Uma vez processados os mRNAs necessitam ser exportados para o citoplasma a fim de serem traduzidos e a regulação a esse nível é claramente possível. Em eucariotos superiores o *cap* do mRNA é ligado a um complexo nuclear de ligação ao *cap*, CBP80/20 antes de ser exportado. Em *T. brucei* já foi demonstrado que o mRNA processado é reconhecido por um complexo de ligação ao *cap* constituído de cinco proteínas, sendo uma delas homóloga à CBP20 (LI; TSCHUDI, 2005).

#### **2.4.3 Regulação da estabilidade dos mRNAs**

Os transcritos maduros possuem em suas regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR, do inglês, *Untranslated Region*) seqüências ou motivos específicos, denominados de elementos *cis*, necessários ao reconhecimento e interação com proteínas de ligação ao mRNA, as RBPs (do inglês, *RNA Binding Protein*). Essa interação entre mRNAs e RBPs está relacionada ao controle da estabilidade, degradação, tráfego intracelular, e ainda, eficiência da tradução (Mata et al. 2005; Keene 2007) (Fig. 12). Nesse sentido, os tripanossomatídeos possuem em seus mRNAs regiões 3' UTRs mais longas que os demais eucariotos e um número crescente de elementos *cis* tem sido relatados, associados ao controle da

estabilidade dos transcritos quanto a sua expressão gênica estágio-específica (Wu et al. 2000; Zilka et al. 2001; Boucher et al. 2002; Murray et al. 2007).

A degradação dos mRNAs eucarióticos é tipicamente iniciada via deadenilação e posteriormente pode prosseguir por duas vias diferenciadas. Em uma via, a deadenilação estimula o decapeamento do mRNA (retirada do *cap*) e a subsequente degradação do mRNA por uma 5' exonuclease. E na segunda via, a deadenilação estimula a degradação via 3' exonuclease, em sua maioria ocorrendo no exossomo (Haile and Papadopoulou 2007). O modo de degradação dos mRNAs de tripanossomatídeos envolve as duas vias, assim como nos mamíferos. A maioria das enzimas do complexo protéico do exossomo já foi identificada, porém ainda não foram encontrados homólogos para as enzimas de decapeamento nesses organismos (Clayton and Shapira 2007; Haile et al. 2008).

Em mamíferos, os mRNAs que não são traduzidos ou degradados são compartimentalizados em microregiões dentro do citoplasma, chamadas grânulos de processamento, *P-bodies* (do inglês, *Processing bodies*) ou grânulos de estresse (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Os *P-bodies* são envolvidos na degradação de mRNAs e neles se co-localizam enzimas envolvidas no decapeamento e processamento/degradação destas moléculas. Esses grânulos são dinâmicos e os mRNAs contidos neles poderão continuar estocados/silenciados ou alternativamente serem encaminhados para a degradação ou então para a tradução (Balagopal and Parker 2009). Já os grânulos de estresse são associados à situações onde a iniciação da tradução é inibida e neles estão contidos mRNAs não traduzidos complexados com fatores de iniciação da tradução e com a subunidade menor ribossomal 40S (Balagopal and Parker 2009). Estruturas semelhantes a *P-bodies* estão presentes em

tripanosomatídeos, contudo apresentam diferenças dos demais eucariotos e precisam ser melhor estudadas (Holetz et al. 2007).

A respeito da existência dos diferentes tipos de regulação citados atuando sobre os níveis de mRNAs, estudos de expressão gênica demonstram que somente 0,2 a 5% dos genes têm seus mRNAs diferencialmente expressos entre as fases promastigota e amastigota de *Leishmania*. Já a análise proteômica revela que mais de 18% das proteínas são diferencialmente expressas entre os diferentes estágios do ciclo de vida. Portanto, sugere-se que em *Leishmania* e outros tripanossomatídeos a regulação da expressão gênica atuando ao nível do mRNA não seja tão relevante quanto a regulação da sua tradução em proteínas (Cohen-Freue et al. 2007; Leifso et al. 2007; Rosenzweig et al. 2008).

## **2.5 Síntese proteica**

A síntese proteica ou tradução é um processo inerente a todos os seres vivos, pelo qual a informação genética proveniente da transcrição do DNA é traduzida em proteínas. Para ocorrer, é necessária uma complexa maquinaria, composta de ribossomos, tRNAs (RNA transportador) e fatores de tradução, compreendendo quatro etapas distintas: iniciação da tradução, alongamento do peptídeo nascente, terminação da tradução e reciclagem dos ribossomos (MARINTCHEV, 2004). Esse processo biológico pode ser regulado nas etapas de iniciação, alongamento e terminação, contudo é principalmente na iniciação que a regulação acontece, pois é nessa etapa que ocorre a montagem do ribossomo, reconhecimento do mRNA maduro e identificação do códon AUG (Jackson et al. 2010). Para que isso ocorra é necessário a participação de ao menos onze fatores de iniciação da tradução (eIFs), sendo esta portanto a etapa mais sujeita a

regulação, de maior complexidade e a mais divergente entre os organismos vivos (Acker and Lorsch 2008).

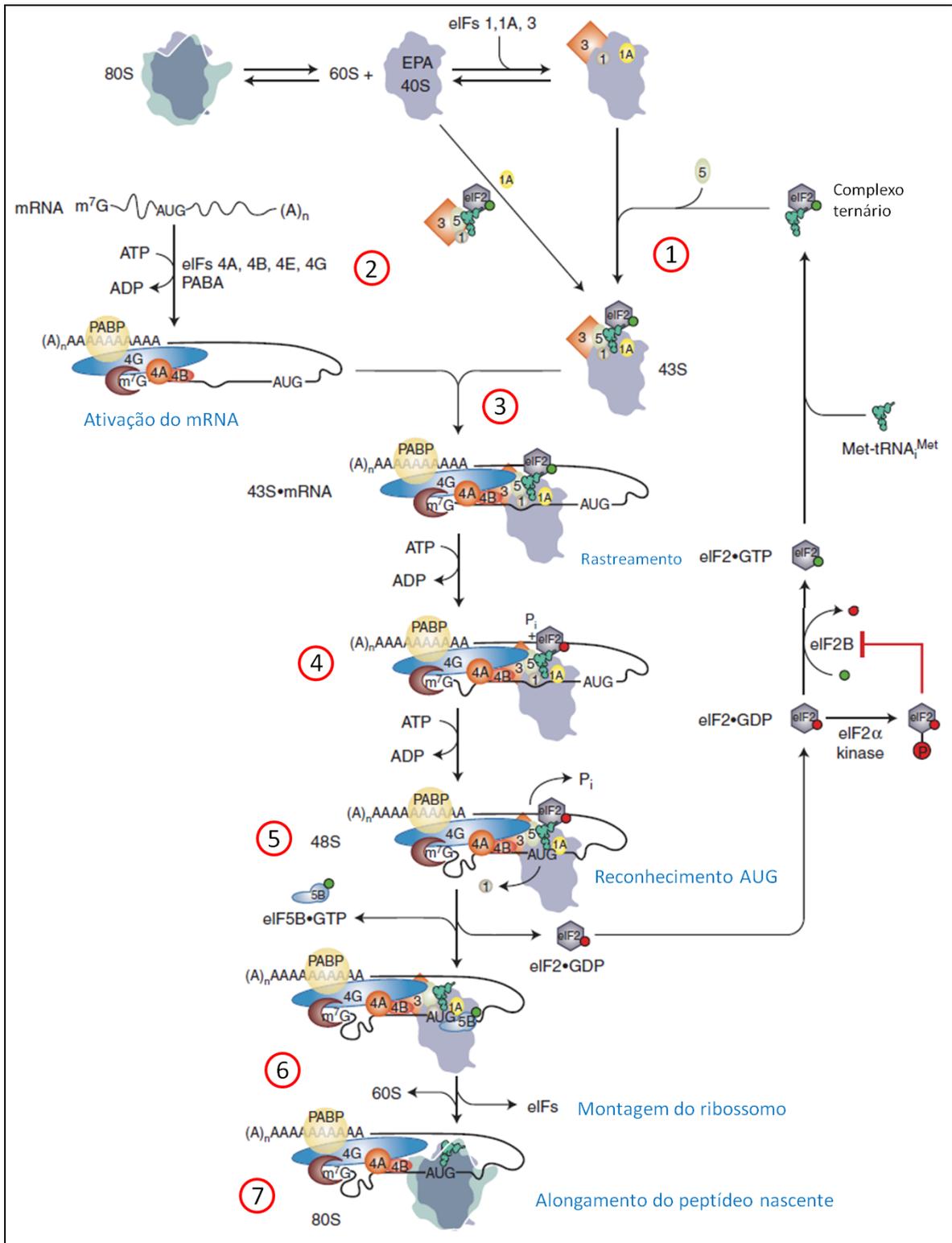
### 2.5.1 Iniciação da tradução

A iniciação da tradução é o processo de montagem dos ribossomos 80S competentes junto ao códon AUG de iniciação da tradução do mRNA maduro. Nesse momento, o códon AUG é pareado com a alça (*loop*) do tRNA iniciador da Metionina (Met-tRNA<sub>i</sub>) contendo o anti-códon, dentro do sítio peptidil (sítio-P) do ribossomo. Esse processo pode ser resumido didaticamente em etapas conforme explicitado nos tópicos abaixo e ilustrado na Figura 11 (Sonenberg and Hinnebusch 2009; Jackson et al. 2010; Hinnebusch and Lorsch 2012):

- 1- A tradução se inicia com a acoplagem do complexo ternário (TC), composto pelo complexo eIF2, o Met-tRNA<sub>i</sub> e o trifosfato de guanosina (GTP), à subunidade menor ribossomal 40S, formando o complexo 43S de pré-iniciação. Essa etapa de montagem é promovida pelos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5.
- 2- Paralelamente, ocorre o reconhecimento da estrutura do *cap* e ligação, na porção 5' do mRNA, do complexo eIF4F (heterotrímero de: eIF4A, uma RNA helicase; eIF4E, proteína de ligação ao *cap*; e eIF4G, proteína ancoradora do complexo). Ocorre também ligação da proteína de ligação a cauda poli- A (PABP) à região 3' terminal do mRNA e a associação do eIF4B junto ao complexo eIF4F. A característica multi-domínios do eIF4G permite que este coordene as interações independentes com o *cap*, cauda poli-A e sequências de reconhecimentos internas no mRNA resultando na circularização e ativação do mRNA maduro.

- 3- Quando montado, o complexo 43S deve se ligar próximo a região do *cap* do mRNA ativado. Esse processo é mediado pelas interações da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP, do inglês, *poli-A binding protein*), eIF4B, eIF4H, eIF4F e eIF3, estimulando a acoplagem do 43S ao mRNA. A atividade da helicase eIF4A elimina as estruturas secundárias do mRNA, no qual agora o complexo 43S pode se ligar.
- 4- Uma vez ligado próximo ao *cap*, o complexo 43S inicia a atividade de varredura do mRNA no sentido 5'-3'. O pareamento entre o anti-codon do Met-tRNA<sub>i</sub> e o AUG dentro do sítio peptidil na subunidade 40S é o evento inicial no reconhecimento do códon de iniciação.
- 5- O reconhecimento do códon AUG causa a fixação do complexo 43S ao mRNA, ocorrendo a hidrólise do GTP ligado ao eIF2, através da sua atividade GTPase que é estimulada pelo eIF5 (atividade GAP, do inglês, *GTPase-Activating Protein*), e a liberação de fosfato inorgânico.
- 6- A formação do ribossomo 80S competente contendo o Met-tRNA<sub>i</sub> corretamente pareado ao AUG no sítio P ocorre através da associação da subunidade 60S ribossomal. Nessa etapa, ocorre a liberação do eIF2-conjugado ao difosfato de guanosina, GDP, mediada pela ação de eIF5B. O complexo eIF2-GDP liberado será reciclado para nova molécula ativa pela troca de GDP por novo GTP através da atividade GEF (do inglês, *guaninenucleotide exchange factor*) do complexo eIF2B.
- 7- Para início do alongamento da tradução do mRNA, ocorre a hidrólise de nova molécula de GTP ligado ao eIF5B e liberação do eIF5B-GDP e do eIF1, iniciando a tradução do mRNA propriamente dita.

A maioria dos mRNAs eucarióticos utilizam o mecanismo de iniciação da tradução descrito acima, no qual há o reconhecimento do *cap*, a ligação dos eIFs e o recrutamento do ribossomo para a varredura do códon de iniciação, processo denominado *cap*-dependente. Contudo, alguns mRNAs virais e alguns mRNAs expressos em situações de estresse celular utilizam uma iniciação da tradução alternativa, onde há ausência da estrutura do *cap* e muitos dos eIFs são dispensáveis. Nesse processo o ribossomo se liga diretamente a uma região interna do mRNA, IRES (do inglês, *Internal Ribosome Entry Sites*) iniciando a tradução (JACKSON *et al.*, 2010; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). No presente trabalho, enfatizam-se os mecanismos de iniciação da tradução *cap*-dependentes.

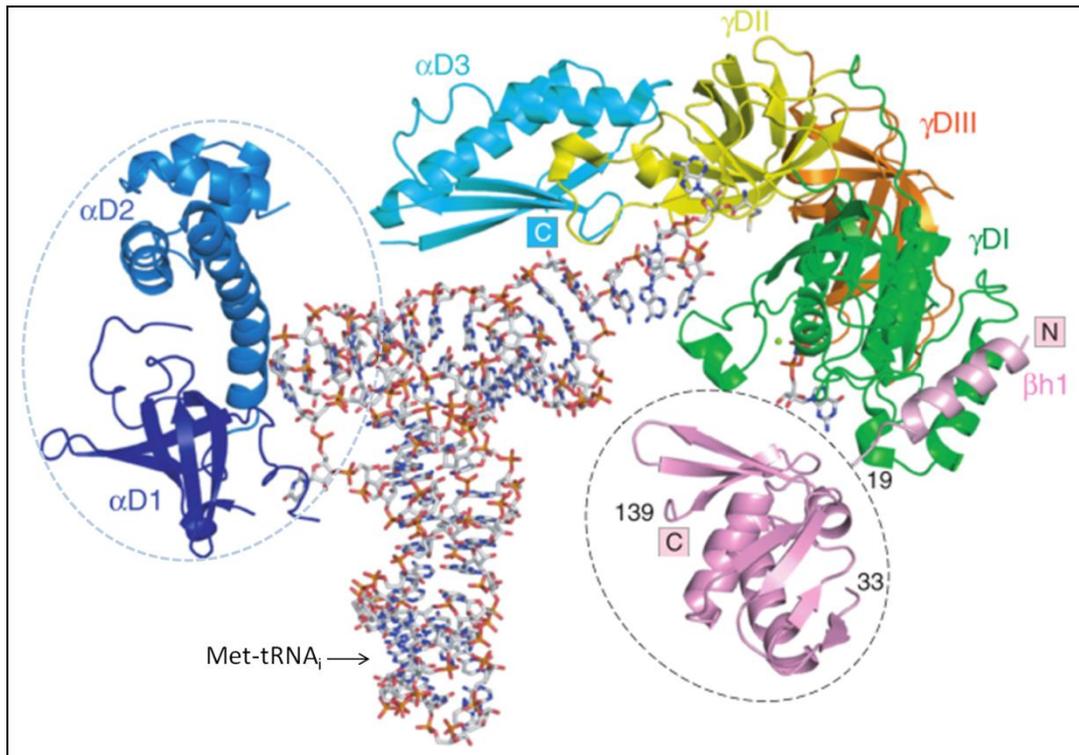


**Figura 11.** Modelo da iniciação da tradução *cap*-dependente. A via canônica de iniciação da tradução pode ser esquematizada em sete etapas: 1- Acoplagem do complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>) à subunidade menor ribossomal formando o complexo 43S ; 2- Ativação do mRNA pelo complexo eIF4F; 3- Ligação do mRNA ao complexo 43S; 4- Rastreamento do códon de iniciação da tradução; 5- reconhecimento do códon AUG; 6- Associação da subunidade maior ribossomal (60S) e formação do ribossomo 80S competente; 7- Iniciação da tradução propriamente dita com alongamento do peptídeo nascente. Fonte: Adaptado de (Hinnebusch and Lorsch 2012).

### 2.5.2 O complexo eIF2

A proteína de ligação a GTP, eIF2, tem função de entrega do Met-tRNA<sub>i</sub>, contendo a metionina inicial, ao ribossomo durante a biossíntese proteica. Esse é um processo fundamental para todas as células eucarióticas e assegura que a síntese proteica se inicie no códon AUG correto de cada mRNA (Jennings and Pavitt 2014). Para tal, esse complexo liga diretamente o Met-tRNA<sub>i</sub>, de modo que a afinidade de ligação é maior quando o eIF2 está ligado a uma molécula de GTP do que quando no estado eIF2-GDP, e é relativamente proporcional à disponibilidade de metionina ligada ao tRNA<sub>i</sub> (Kapp and Lorsch 2004). Adicionalmente existe o papel estimulatório do pareamento específico entre a alça acceptora do tRNA<sub>i</sub> e o eIF2. Esses eventos agem, presumivelmente, para prevenir a ligação de outros tRNAs ao complexo eIF2 (Pestova et al. 2007).

O eIF2 é um heterotrímero composto das subunidades eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$ , e eIF2 $\gamma$ , sendo estas três subunidades essenciais para a viabilidade celular. A estrutura cristalográfica dos seu equivalente em Archaea (aIF2) encontra-se resolvida, bem como as diferentes conformações adotadas mediante interação com os análogos de GTP e GDP (Yatime et al. 2007). Detalhadamente, esse heterotrímero consiste de uma parte rígida central formada pela subunidade aIF2 $\gamma$  junto com o domínio C-terminal da aIF2 $\alpha$  (domínio 3) e, somado a estes, a hélice N-terminal da aIF2 $\beta$ . Essa porção central e rígida do aIF2 encontra-se margeada por duas partes móveis formadas pelos domínio 1 e 2 da subunidade aIF2 $\alpha$  e pelo domínios de ligação ao zinco e domínio  $\alpha$ - $\beta$  da aIF2 $\beta$  (Figura 12) (Naveau et al. 2013). Ainda não existem dados relativos à estrutura tridimensional do complexo trimérico eucariótico (Hinnebusch and Lorsch 2012).



**Figura 12.** Complexo eIF2. Representação do complexo eIF2 ligado ao tRNA<sup>i</sup> Met. A coloração é utilizada conforme o seguinte: subunidade eIF2 $\gamma$  - o domínio G está em verde, domínio II em amarelo e domínio III em laranja; subunidade eIF2 $\alpha$  - domínio 1 em azul escuro, domínio 2 em azul, domínio 3 em azul claro; subunidade eIF2 $\beta$  - a hélice 1 do N-terminal em rosa. Representados em círculos tracejados estão as duas partes móveis formadas pelos domínio 1 e 2 da subunidade eIF2 $\alpha$  e  $\alpha$ - $\beta$  da eIF2 $\beta$ . Fonte: Adaptado de (Naveau et al. 2013).

### 2.5.3 A subunidade eIF2 $\alpha$

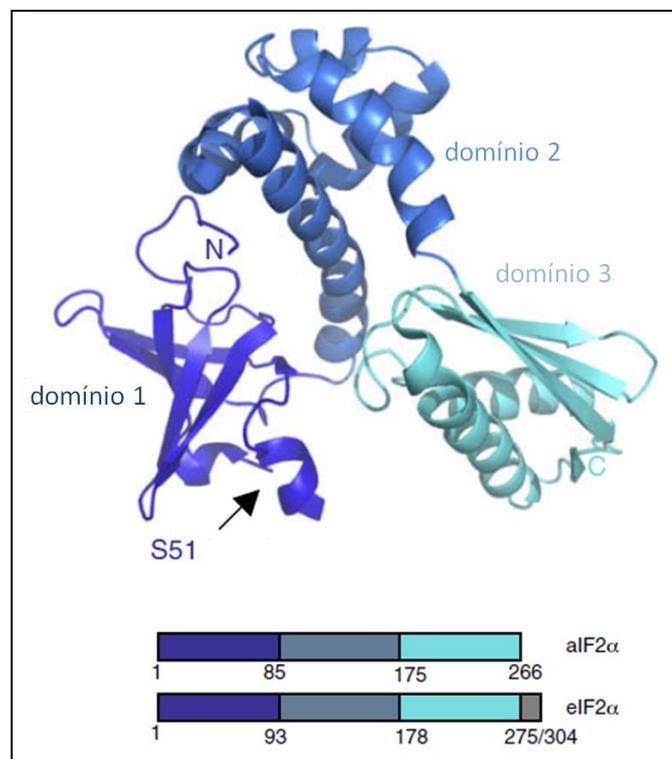
A subunidade eIF2 $\alpha$  possui estrutura molecular do homólogo humano resolvida por ressonância magnética nuclear e demonstra a existência de três domínios distintos: um domínio N-terminal em  $\beta$ -barril (domínio 1); seguido por um domínio em hélice (domínio 2); e um domínio  $\alpha$ - $\beta$  (domínio 3) (Figura 13). (Schmitt et al. 2010). Essa estrutura é conservada nos demais eucariotos e em Archaea, contudo a proteína eucariótica possui uma extensão C-terminal característica, com constituição altamente ácida. Por exemplo, essa região no homólogo de levedura contém 16 aspartatos ou glutamatos dentre 30 resíduos aminoacídicos, resultando em  $pI$  de 3,14 (Naveau et al. 2013).

A subunidade eIF2 $\alpha$  não participa diretamente da interação do complexo eIF2 com o Met-tRNA<sub>i</sub> mas participa ativamente na alteração da afinidade dessa interação. Em Archaea, quando na presença da subunidade eIF2 $\alpha$ , ocorre aumento da afinidade que se equivale ao do eIF2 completo (Yatime et al. 2007; Schmitt et al. 2012). Contraditoriamente, em leveduras, a subunidade eIF2 $\beta$  tem papel majoritário no aumento da afinidade do complexo eIF2 ao Met-tRNA<sub>i</sub>. Através de ensaios mutacionais, pôde-se comprovar que a extensão ácida C-terminal característica do eIF2 $\alpha$  eucariótico altera a constante de associação entre as moléculas de eIF2 e Met-tRNA<sub>i</sub> de forma inversamente proporcional ao tamanho da extensão C-terminal (Naveau et al. 2013).

Em eucariotos, um resíduo especial de serina (S51, em humano e levedura) encontra-se mapeado numa alça do domínio 1 da subunidade eIF2 $\alpha$  (Schmitt et al. 2010). Tal resíduo é alvo de diferentes proteínas quinases e sua fosforilação está diretamente relacionada com a regulação global da tradução. Essa região também é requerida para a interação com o parceiro funcional eIF2B durante a reciclagem do complexo eIF2, mediante a troca de GDP por GTP. Essas características encontram-se finamente interligadas, uma vez que, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  na serina 51 resulta em um aumento da afinidade entre eIF2 e eIF2B. Esta maior afinidade impede que ocorra a reciclagem de GDP ligado ao eIF2, mediada pela atividade GEF (do inglês, *Guanine Exchange Factor*) exercida por eIF2B. O resultado é que a fosforilação de eIF2 $\alpha$  na serina 51 atua de forma a inibir a tradução proteica (Sudhakar et al. 2000).

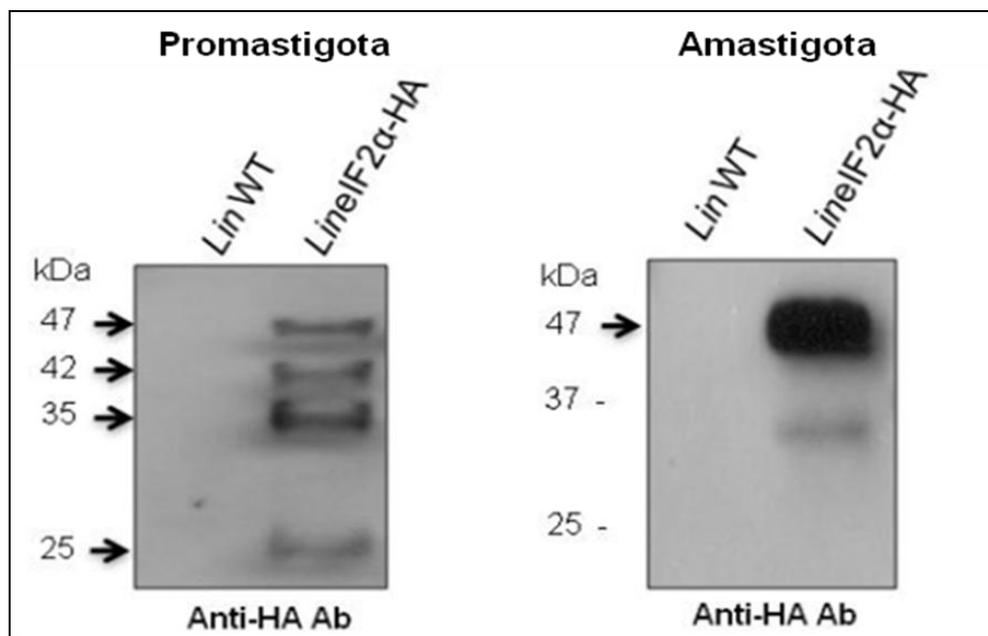
Em tripanossomatídeos, a proteína eIF2 $\alpha$  possui um extensão N-terminal singular, de aproximadamente 110 resíduos que é discretamente variável entre os organismos estudados dessa família. Em geral, a conservação da sequência

de eIF2 $\alpha$  está majoritariamente restrita à porção N-terminal dentro dos domínios 1 e 2, com similaridade diminuída no domínio 3. Assim como os demais eucariotos, as sequências de tripanossomatídeos compartilham a extensão C-terminal ácida inexistente em Archaea (DE MELO NETO et al., comunicação pessoal). Devido ao prolongamento N-terminal característico nesses organismos, a serina 51, importante na regulação por fosforilação, encontra-se alinhada com o aminoácido treonina 169 no ortólogo de *T. brucei*, sendo comprovada a existência de fosforilação nesse resíduo (Moraes et al. 2007).



**Figura 13.** Subunidade eIF2 $\alpha$ . Os três domínios estruturais conservados são apresentados em: Violeta, domínio 1; Azul, domínio 2; e Azul claro, domínio 3. A alça do domínio 1 contendo o sítio de fosforilação na serina 51, encontra-se indicada (seta preta). As caixas abaixo representam as subunidades de e/aIF2 com as cores dos retângulos semelhantes as cores da estrutura. aIF2 de *S. solfataricus* e eIF2 de *S. cerevisiae*. Em cinza, extensão C-terminal exclusiva de eucariotos. Representação proveniente da estrutura Ss-aIF2a3bc (PDB id: 2QMU). Fonte: Adaptado de, (Schmitt et al. 2010).

Em *L. infantum*, o homólogo de eIF2 $\alpha$  possui uma extensão N-terminal de 94 aminoácidos (Chow et al. 2011). Em linhagens de *L. infantum* apresentando super-expressão ectópica de eIF2 $\alpha$ , a proteína recombinante é clivada em fragmentos menores de aproximadamente, 42 kDa, 35 kDa e 25 kDa no estágio promastigota de desenvolvimento, enquanto que na fase amastigota é observada a expressão de somente uma isoforma de 47 kDa (Figura 14). Essa clivagem se dá por excisão da metionina inicial da proteína pela enzima Metionina aminopeptidase (MetAP). A importância biológica desse fenômeno de clivagem em *L. infantum* não é confirmada nesses organismos. Especula-se que, semelhantemente aos mamíferos a excisão da metionina inicial pela MetAP proteja o eIF2 $\alpha$  de *L. infantum* da fosforilação inibitória (Cloutier 2012.b).



**Figura 14.** Perfil de expressão ectópica de eIF2 $\alpha$  em células promastigotas e amastigotas de *L. infantum*. Imunoprecipitação seguida de *Western-Blot* com anti-corpo anti-HA das linhagens recombinantes super-expressando eIF2 $\alpha$  conjugada ao epítipo de HA, em células promastigotas e amastigotas. *LinWT*, *L. infantum* selvagem; *Lin eIF2 $\alpha$ -HA*, *L. infantum* super-expressando eIF2 $\alpha$  ectopicamente transfectado fusionado ao epítipo HA. Adaptado de (Cloutier 2012.b).

#### 2.5.4 A subunidade eIF2 $\beta$

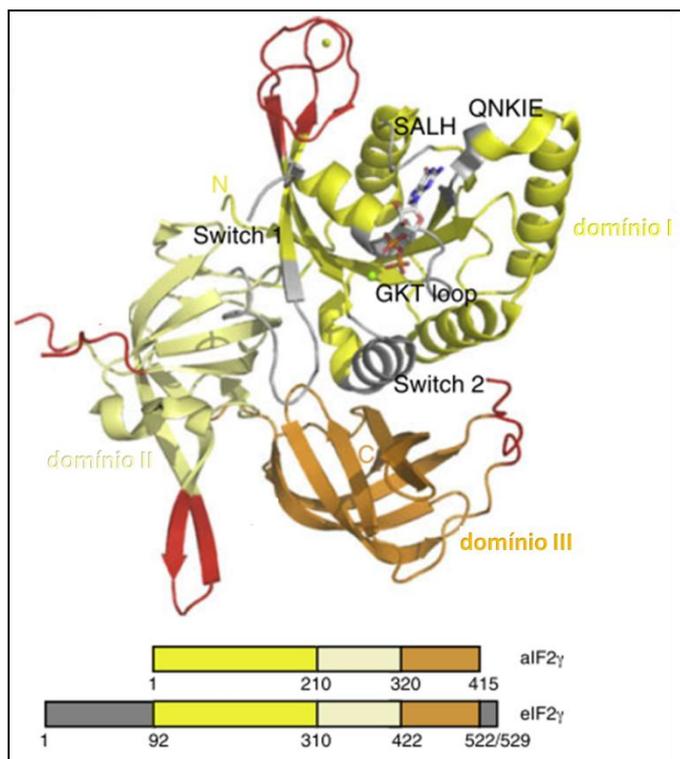
A segunda subunidade do eIF2, a eIF2 $\beta$ , participa de interações com o mRNA, eIF1A, eIF5, eIF2B $\epsilon$  e eIF3. Sua estrutura 3D se encontra resolvida por cristalografia e ressonância magnética nuclear, e é composta de três segmentos definidos com base nos motivos conservados e respectivas funções. A região N-terminal é conectada por uma porção flexível ao domínio central e se caracteriza pela presença de três tratos de lisinas repetitivas (*K-boxes*) que contribuem na atividade de ligação ao mRNA e aos eIF5 e eIF2B $\epsilon$ . O domínio central, por sua vez, interage com o eIF2 $\gamma$  e alguns dos resíduos estão envolvidos com o correto reconhecimento do códon de iniciação da tradução. Finalmente, o domínio C-terminal contém domínios do tipo *zinc-finger* que participam na ligação ao mRNA e também no reconhecimento do códon AUG (SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010).

Em tripanossomatídeos, análises *in silico* de eIF2 $\beta$  de *L. major* e *T. brucei* com sequências representativas de demais eucariotos e Archaea demonstraram que estas possuem uma extensão N-terminal não encontrada em Archaea, entretanto com uma baixa similaridade com a sequência consenso eucariótica. Uma diferença importante é que os *K-boxes* não foram detectados. O domínio central e C-terminal são mais conservadas, todavia também foram observadas substituições importantes, divergindo dos demais eucariotos (DE MELO NETO et al., comunicação pessoal). Até o presente momento não existem dados experimentais de eIF2 $\beta$  nesses organismos.

### 2.5.5 A subunidade eIF2 $\gamma$

O cerne do heterotrímero de eIF2 é a subunidade eIF2 $\gamma$ , uma GTPase, que liga o Met-tRNA<sub>i</sub>, e interage com as subunidades eIF2 $\alpha$  e eIF2 $\beta$  na formação do eIF2 completo. Estruturalmente, o eIF2 $\gamma$  possui três domínios (Figura 15). O domínio I ou domínio G (*guanine nucleotide binding pocket*), N-terminal, contém o domínio de ligação de GTP/GDP, caracterizado pela presença de regiões comuns a todas as proteínas G (alça GKT, regiões de troca 1 e 2, e motivos aminoacídicos QNKIE e SALH) (Roll-Mecak et al. 2004). As regiões de troca 1 e 2 correspondem a motivos móveis encontrados em todas as proteínas G. Mudanças conformacionais nesses dois motivos são relacionadas ao controle da transição do eIF2 $\gamma$  ativo (ligado ao GTP) ao inativo (ligado ao GDP) (Vetter and Wittinghofer 2001). O domínio I também contém um domínio de ligação a zinco (*zinc ribbon motif*) formado por dois pares de cisteínas conservadas, não encontrados em outras GTPases. Seguindo a esse, estão os domínios estruturais II e III em  $\beta$ -barril (Roll-Mecak et al. 2004).

As proteínas eIF2 $\gamma$  e aIF2 $\gamma$  são ortólogos, exceto que a versão eucariótica contém um extensão no domínio N-terminal que varia em comprimento, dependendo do organismo. Contudo, em *S. cerevisiae*, esse domínio não é essencial para a função da proteína (Erickson et al. 2001). Os resíduos implicados na ligação do Met-tRNA<sub>i</sub> foram mapeados dentro do domínio G e domínio II. A subunidade  $\gamma$  do eIF2 de Archaea, *per si*, é capaz de interagir com o Met-tRNA<sub>i</sub>, porém a afinidade da ligação é muito reduzida quando comparada com o heterotrímero completo (Yatime et al. 2007; Schmitt et al. 2012).



**Figura 15.** Subunidade eIF2 $\gamma$ . Os três domínios estruturais conservados são apresentados em: amarelo, domínio I; amarelo claro, domínio II; e laranja, domínio III. As regiões comuns às proteínas G, *loop* GKT, região de troca (*switch*) 1 e 2, QNKIE e SALH, são demonstradas em preto. As caixas abaixo representam aIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$  com as cores dos retângulos semelhantes às cores na estrutura. aIF2 de *S. solfataricus* e eIF2 de *S. cerevisiae*. Em cinza, extensão N-terminal exclusiva de eucarióticos. Representação proveniente da estrutura de código de acesso Ss-aIF2a3bc (PDB id: 2QMU). Fonte: Adaptado de (Schmitt et al. 2010).

De mesmo, o eIF2 $\gamma$  eucariótico tem capacidade de interagir, por si só, com o Met-tRNA<sub>i</sub>, contudo a afinidade de interação é muito aumentada na presença de eIF2 $\beta$  (Naveau et al. 2013). Por sua vez, os resíduos envolvidos na ligação ao eIF2 $\alpha$  são pertencentes ao domínio II. Em Archaea, as subunidades eIF2 $\alpha$  e eIF2 $\beta$  interagem com o eIF2 $\gamma$  independentemente, não havendo interação entre elas (Yatime et al. 2007). Do mesmo modo, em leveduras não existe contato direto entre as subunidades eIF2 $\alpha$  e eIF2 $\beta$  e ambas se ligam individualmente ao eIF2 $\gamma$  (Thompson et al. 2000). Em contraste, são reportadas interações entre as

subunidades eIF2 $\alpha$  e eIF2 $\beta$  na formação do complexo eIF2 de humano (Rajesh et al. 2008).

Os três domínios do eIF2 $\gamma$  são intimamente similares com os encontrados com o fator de alongamento da tradução EF-Tu, contudo a sobreposição entre as duas estruturas demonstra a existência de especificidades entre elas (Schmitt et al. 2010).

Não existem dados experimentais relativos ao eIF2 $\gamma$  em tripanossomatídeos. Os prováveis homólogos de eIF2 $\gamma$  nesses organismos apresentam um alto grau de conservação distribuída por toda sequência gênica quando comparados com os genes de humano, planta, levedura, *G. lamblia* e Archeae. Contudo, algumas características encontradas nos tripanossomatídeos incluem várias substituições únicas dentro do domínio G, e duas outras em resíduos dos domínios II e III relacionadas previamente com a ligação ao Met-tRNA<sub>i</sub> (DE MELO NETO et al., comunicação pessoal).

#### **2.5.6 O complexo eIF2B**

O eIF2B é formado de cinco subunidades, nomeadas de eIF2B $\alpha$ , eIF2B $\beta$ , eIF2B $\gamma$ , eIF2B $\delta$  e eIF2B $\epsilon$ . Esse complexo possui majoritariamente atividade de troca de guanilil-nucleotídeo, ou também denominada atividade GEF, sendo responsável pela troca da molécula de GDP, do eIF2 inativo (eIF2-GDP), por um GTP, proporcionando assim a reciclagem do eIF2. Essa reciclagem de eIF2 parece ser o maior ponto de regulação da tradução proteica tanto de maneira global quanto para mRNAs específicos responsivos a diferentes situações de estresse (Hinnebusch and Lorsch 2012).

Detalhadamente, as subunidades eIF2B $\alpha$ , eIF2B $\beta$  e eIF2B $\delta$  formam um subcomplexo regulatório sensível à fosforilação inibitória de eIF2 $\alpha$ . Assim, o eIF2 $\alpha$  fosforilado é reconhecido por esse subcomplexo e a atividade GEF de eIF2B é inibida de forma competitiva devido ao aumento da afinidade entre eIF2-eIF2B (Rowlands et al. 1988). Estas proteínas do subcomplexo regulatório são homólogas e apresentam mútuas similaridades de sequência por toda a extensão proteica. Em leveduras, elas podem, *in vitro*, formar um subcomplexo trimérico estável na ausência das demais subunidades do eIF2B. Dessas, a subunidade eIF2B $\alpha$  é a única não essencial para a viabilidade celular, contudo sua presença é necessária para a funcionalidade do sub-complexo regulatório (Pavitt 2005).

A estrutura cristalográfica de eIF2B $\alpha$  encontra-se resolvida e demonstra a conformação de um domínio N-terminal em  $\alpha$ -hélice e domínio C-terminal em conformação semelhante a Rossmann (*Rossmann-fold-like domain*) e, entre esses dois domínios, existe um bolsão carregado positivamente onde um íon sulfato é encontrado. Essa estrutura é também presente nas subunidades  $\beta$  e  $\delta$ . Nos homólogos de levedura e humano diferentes resíduos, quando mutados, interferem na função de eIF2B (Hiyama et al. 2009).

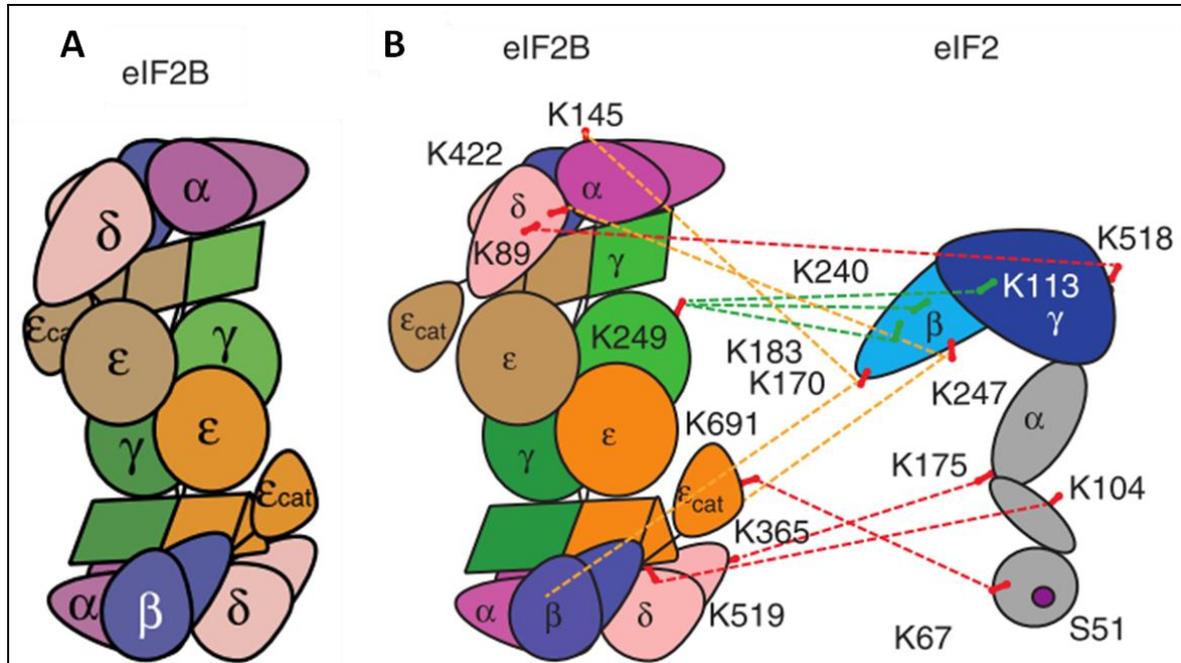
Já as subunidades eIF2B $\gamma$  e eIF2B $\epsilon$  formam o subcomplexo catalítico, e assim como as subunidades regulatórias, compartilham similaridade de sequência e de estrutura, existindo em comum os dois primeiros domínios proteicos, os quais são relacionados a enzimas ligadoras de nucleotídeos (Pavitt 2005). Especificamente, foi demonstrado que a subunidade eIF2B $\gamma$  é a responsável pela ligação direta ao GTP (Gordiyenko et al. 2014). Já o eIF2B $\epsilon$  é a enzima catalítica propriamente dita, função atribuída à existência de um domínio de troca nucleotídica mapeado no C-terminal dessa proteína, a qual interage diretamente

com o domínio G de eIF2 $\gamma$  e com a região rica em lisina de eIF2 $\beta$ . O motivo formado pelos resíduos 518-712 é suficiente para a atividade *in vitro*. Essa região também é capaz de se ligar independentemente ao eIF2 *in vivo*, contudo não é capaz de realizar atividade GEF (Gomez et al. 2002).

Em humanos, a importância do complexo eIF2B para a fisiologia celular é destacada pelo envolvimento deste com o desenvolvimento da desordem neurodegenerativa severa denominada leucoencefalopatia com apagamento de matéria branca, VWM, do inglês *Vanishing White Matter*, ou também conhecida como ataxia infantil com hipomielinização do sistema nervoso central. A VWM é uma doença de caráter genético autossomal recessivo não hereditária, ocasionada por mutações em ambas as cópias dos genes codificadores da mesma subunidade de eIF2B. Como essas mutações estão relacionadas ao desenvolvimento da patologia, entretanto, ainda não se encontra esclarecido (Pavitt and Proud 2009).

Até recentemente, era aceito que o eIF2B funcional é um complexo heteropentâmérico, contudo estudos mais recentes demonstraram, *in vivo*, sua surpreendente estruturação. Estes estudos, afirmam que o complexo é um decâmero, composto de dímeros de tetrâmeros de eIF2B $\beta\gamma\delta\epsilon$ , apresentando um cerne hidrofóbico das subunidades catalíticas e estabilizado por duas cópias de eIF2B $\alpha$  (Figura 16, A) (Gordiyenko et al. 2014; Wortham et al. 2014). Em humanos, a ausência de eIF2B $\alpha$  permite a formação dos dímeros de tetrâmeros, contudo esses apresentam diminuição na capacidade de ligação ao eIF2 e na atividade GEF (Wortham et al. 2014). Interessantemente, através de ensaios de interação entre as moléculas de eIF2B e eIF2, pôde-se concluir que o decâmero

de eIF2B pode interagir e possivelmente catalisar a troca nucleotídica de dois complexos eIF2 simultaneamente (Figura 16, B) (Gordiyenko et al. 2014).



**Figura 16.** Conformação estrutural decamérica do complexo eIF2B. (A) Representação esquemática do eIF2B demonstrando em verde escuro e verde claro, as duas cópias de eIF2By e em laranja e marrom, as duas cópias de eIF2Bε, formando o cerne hidrofóbico. Na superfície do complexo estão as subunidades regulatórias, eIF2Bβ (Roxo) e eIF2Bδ (Rosa) estabilizadas por duas moléculas de eIF2Bα (Lilás). εcat: domínio C-terminal catalítico de eIF2Bε. (B) Representação esquemática de eIF2B e eIF2, demonstrando os sítios de interação mapeados. Interações inter-subunidades: linhas tracejadas verdes - interações entre eIF2β e o eIF2By, localizadas no domínio de ligação ao nucleotídeo; linhas tracejadas laranjas - interações entre eIF2β e o eIF2Bα e eIF2Bδ; linhas tracejadas vermelhas – interações entre o eIF2α e os eIF2Bδ e o eIF2Bε, no seu sítio catalítico. Como método de simplificação somente um eIF2 é representado na ilustração. Fonte: Adaptado de (Wortham et al. 2014).

Além da função primordial de troca guanilil-nucleotídica de eIF2B, trabalhos mais recentes demonstram uma função secundária desse fator, denominada GDF (do inglês, *GDI displacement factor*) (Jennings et al. 2013). Detalhadamente, o eIF2/GDP é liberado do complexo 48S ligado ao parceiro eIF5. O eIF5, nessa condição, exerce a função de estabilizar a ligação do GDP ao eIF2, impedindo a

liberação espontânea dessa molécula através da atividade GDI (do inglês, *Guanine-nucleotide displacement inhibitor*) (Singh et al. 2006). Contudo, afim de que ocorra a troca GDP/GTP é necessário que o fator eIF2B acesse o eIF2•GDP/eIF5, formando um complexo transiente eIF2B/eIF2•GDP/eIF5, e exerça sua atividade GDF, deslocando o fator eIF5, resultando no complexo eIF2B/ eIF2•GDP competente à troca nucleotídica. Ademais, as atividades GEF e GDF de eIF2B são executadas independentemente (Jennings et al. 2013).

Não existe até o presente momento trabalhos publicados que abordem o complexo eIF2B em tripanossomatídeos.

## **2.6 Regulação da síntese proteica**

Um dos mecanismos de regulação da expressão gênica é o de controle da síntese de proteínas propriamente dita, mediante controle da atividade dos fatores de iniciação da tradução. Tal regulação permite o ajuste fino dos níveis de proteínas e proporciona uma funcionalidade homeostática normal, responsiva a estímulos de crescimento, proliferação ou estresse celular (DOBRIKOV *et al.*, 2011; LIVINGSTONE *et al.*, 2010). Ou seja, vias chaves de transdução de sinais convergem regulando os fatores de iniciação da tradução (DOBRIKOV *et al.*, 2011). Esse tipo de regulação da expressão é especialmente importante nos tripanossomatídeos devido à ausência de regulação gênica transcricional característica dos organismos dessa família.

Em eucariotos, um exemplo de regulação da tradução é o controle da disponibilidade de moléculas ativas de eIF2 via fosforilação, como citado anteriormente (Jackson *et al.*, 2010). Em mamíferos, o resíduo de serina 51(S51) do eIF2 $\alpha$  é alvo de fosforilação por quatro diferentes quinases, a quinase inibidora

heme-regulada, HRI (do inglês, *heme-regulated inhibitor*), a proteína quinase ativada por RNA, PKR (do inglês, *protein kinase RNA-activated*), a quinase de retículo endoplasmático semelhante à PKR, PERK (do inglês, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) e a quinase de controle não passível de inibição-2, GCN2 (do inglês, *general control non-depressible-2*). Essas quinases têm homologia em seus sítios catalíticos, contudo o potencial responsivo a diferentes estímulos advém de divergentes sítios regulatórios, convergindo diferentes tipos de estresse celular em uma mesma via de sinalização (Holcik and Sonenberg 2005b). A fosforilação de eIF2 reduz a tradução de forma global, contudo, paradoxalmente, a tradução de alguns poucos mRNAs específicos para a adaptação ao estresse é aumentada (Holcik and Sonenberg 2005b).

Em *Leishmania*, se sabe que a fosforilação de eIF2 $\alpha$  está associada a redução global da taxa de tradução proteica (Cloutier et al. 2012.a). Em *Trypanosoma*, três diferentes quinases foram propostas tendo como alvo o eIF2 $\alpha$  de *T. brucei* (TbEIF2K1 a -K3). A TbEIF2K2, é uma glicoproteína transmembrana localizada na bolsa flagelar e é comprovadamente responsável pela fosforilação de eIF2 $\alpha$  no resíduo T169, equivalente ao S51 de mamífero. Essa fosforilação, entretanto, não se mostrou associada à diminuição da taxa de tradução em células sob estresse (Moraes et al. 2007) e não é necessária para o controle do ciclo celular durante a diferenciação (Avila et al. 2016). Já para *T. cruzi*, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  leva à diminuição da síntese proteica e é necessária para a diferenciação do parasito em formas infectivas (Tonelli et al. 2011).

Em *L. infantum*, um homólogo de PERK quinase foi caracterizado como uma proteína transmembrana associada ao retículo endoplasmático, capaz de fosforilar o eIF2 $\alpha$  na treonina 166, *in vitro*. Funcionalmente, a ausência da PERK

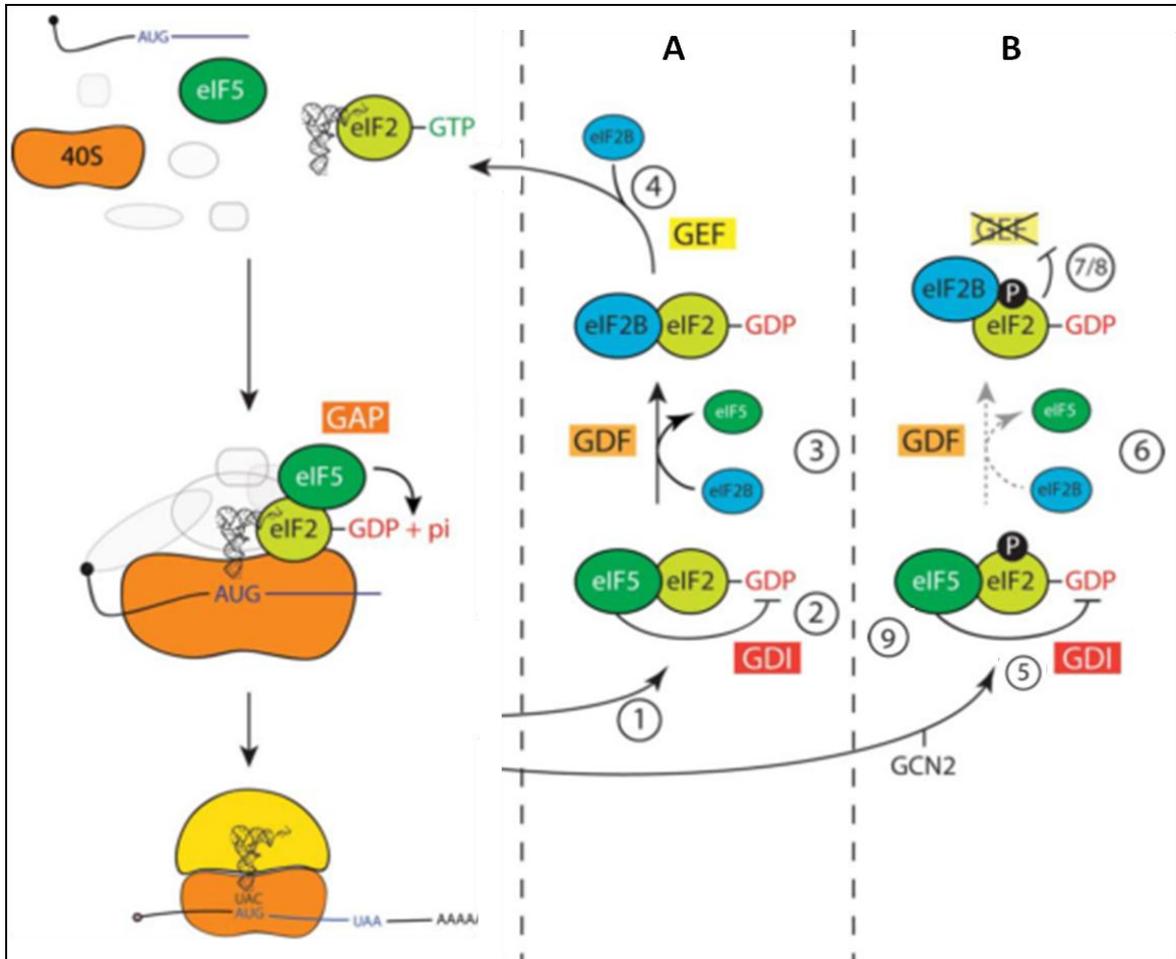
quinase em *L. infantum* causa um retardo no processo de diferenciação de células promastigotas em amastigotas, devido provavelmente à diminuição da capacidade de adaptação ao estresse ácido e térmico necessários à diferenciação (Chow et al. 2011).

## **2.7 Os papéis de eIF2, eIF2B e eIF5 na regulação da síntese de proteínas**

O eIF2, assim como outras proteínas G, necessita ser reciclado e para tal os parceiros eIF5 e eIF2B tem papel crucial nesse processo (Jennings and Pavitt 2014). Dentro do contexto mais atualizado, o eIF2B, se apresenta *in vivo* como um decâmero realizando as funções GEF e GDF. Considerando também a dupla funcionalidade de eIF5, nas atividades GAP e GDI, foi proposto um novo modelo de reciclagem de eIF2 (Jennings and Pavitt 2014), conforme ilustrado na figura 17, painel A, onde em condições fisiológicas normais:

- 1- Após um evento de reconhecimento do códon AUG ocorre a hidrólise do GTP ligado ao eIF2 impulsionado pela atividade GAP de eIF5 (Jackson et al. 2010), e o eIF2 é liberado ligado ao eIF5 (eIF2•GDP/eIF5).
- 2- O eIF5 mantém o eIF2 em seu estado inativo conjugado ao GDP, através da atividade GDI (Singh et al. 2006).
- 3- Afim de que ocorra a troca GDP/GTP é necessário que o fator eIF2B acesse o eIF2•GDP/eIF5 e exerça a atividade GDF, deslocando o eIF5 (Jennings et al. 2013). Entretanto, como o eIF2B é menos abundante que eIF2 ou eIF5 ( $\pm 10$  vezes) ocorre o acúmulo citoplasmático de eIF2 conjugado a eIF5 (Singh et al. 2006).
- 4- O eIF2B pode exercer a atividade GEF, reativando o eIF2 através da troca de GDP/GTP, permitindo assim que o eIF2•GTP se ligue novamente ao Met-

tRNA<sub>i</sub> e participe de novo ciclo de iniciação da tradução. O eIF2B é então prontamente liberado.



**Figura 17.** Modelos da reciclagem de eIF2 na iniciação da tradução. (A) Modelo revisado da reciclagem de eIF2, onde após o recrutamento de eIF2-GTP- Met-tRNA<sub>i</sub> ao ribossomo, o AUG é reconhecido, o GTP hidrolisado e o eIF2-GDP é liberado, seguindo as etapas posteriores, detalhadas de acordo com a numeração referida no corpo do texto. (B) Modelo demonstrando o impacto da fosforilação de eIF2 $\alpha$  nas atividades de eIF2B e eIF5. Fonte: Adaptado, de (Jennings and Pavitt 2014).

Contudo, sob algumas condições celulares que resultem na fosforilação de eIF2 $\alpha$  esse panorama sofre modificações relacionadas à regulação global da tradução, conforme ilustrado na figura 17, painel B, onde:

- 5- O eIF2 fosforilado (**p**eIF2) é liberado ligado ao eIF5 (**p**eIF2•GDP/eIF5).
- 6- O fator eIF2B, da mesma forma, acessará o **p**eIF2•GDP/eIF5 e exercerá a atividade GDF, deslocando o eIF5 (Jennings et al. 2013).
- 7- As subunidades regulatórias de eIF2B reconhecem o **p**eIF2, que se ligará com alta afinidade ao eIF2B, inibindo a atividade GEF (Jennings et al. 2013).
- 8- Um montante crescente de eIF2B se encontrará fixado ao eIF2 fosforilado (**p**eIF2•GDP/eIF2B), e conseqüentemente, restará pouco ou nenhum eIF2B para interagir com o **p**eIF2•GDP/eIF5 e realizar a função GDI (Jennings and Pavitt 2014).
- 9- Haverá o acúmulo de moléculas de complexos eIF2 afixados ao eIF5 (**p**eIF2•GDP/eIF5), prevenindo a troca espontânea de GDT/GTP, a qual poderia ultrapassar a efetividade a regulação pela fosforilação de eIF2 $\alpha$ .

Finalmente, haverá um declínio na taxa global de tradução proteica devido a escassez de moléculas de eIF2 ativas (eIF2•GTP) necessárias à formação do complexo ternário durante a iniciação da tradução.

Como citado anteriormente, pouco se sabe sobre a caracterização do complexo eIF2 na família Trypanosomatidae. Os trabalhos existentes focam especificamente na subunidade eIF2 $\alpha$ , sua fosforilação induzida por estresse e a respectiva implicação desta na fisiologia parasitária. Contudo, não abrangem o complexo eIF2 completo, não discorrem sobre as interações funcionais, nem sobre a funcionalidade bioquímica desse. Ademais, não existem trabalhos que abordem a caracterização molecular do complexo eIF2B nesses organismos,

demonstrado pela incorreta anotação de genes referentes às cinco subunidades e pela completa ausência de citação desse complexo em bancos de dados de publicações científicas. O mesmo também é válido para o fator eIF5.

Conseqüentemente, não existem dados relativos às interações funcionais realizadas entre esses complexos parceiros, nem que discorram sobre a funcionalidade bioquímica de cada um deles, tampouco, sobre o papel desses fatores na iniciação da tradução e regulação global da biossíntese de proteínas nesses organismos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar o complexo eIF2 em *L. infantum*, em relação a expressão proteica endógena, função biológica na biossíntese proteica e parceiros funcionais na iniciação da tradução.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Analisar a expressão proteica do eIF2 $\alpha$  endógeno, bem como, avaliar sua funcionalidade durante a iniciação da tradução de *L. infantum*;
2. Identificar, *in vivo*, as interações de eIF2 $\alpha$  com os prováveis parceiros funcionais clássicos eucarióticos, e investigar a presença de possíveis interações funcionais não elucidadas durante a iniciação da tradução de *L. infantum* ;
3. Caracterizar os parálogos de eIF2 $\gamma$  *in silico* e analisar comparativamente as interações proteicas formadas por esses em *L. infantum*;
4. Avaliar a essencialidade de eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2 para viabilidade celular através de ensaios de deleção e complementação gênica;

## 4. Material e métodos

### 4.1 Cultivo de parasitas

Células de *L. infantum* (linhagem MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram mantidas em fase exponencial de crescimento através de repiques sucessivos em meio SDM-79 (Gibco), pH 7,5 suplementado com 10% de soro fetal bovino, adicionado de 1% v/v de Hemina (Sigma-Aldrich Co.) e cultivadas em estufa de biodisponibilidade de oxigênio, B.O.D. (do inglês, *biological oxygen demand*) a 26°C.

Além da linhagem de *L. infantum* supra-citada também foram utilizadas duas linhagens geneticamente modificadas gentilmente cedidas por Dr. Serge Cloutier, tabela 1. A primeira linhagem, *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA, é derivada desta original a partir da substituição de uma cópia endógena de eIF2 $\alpha$  por uma cópia do mesmo gene fusionado a epítipo de reconhecimento e purificação HA (Hemaglutinina) na porção C-terminal. A segunda linhagem cedida, *Ldi* eIF2 $\alpha$  ( $\Delta$ 2-94)-HA, se trata de cepa de *L. infantum* transfectada com plasmídeo de super-expressão ectópica de eIF2 $\alpha$  em versão mutagenizada através da deleção da porção N-terminal, (aminoácidos 2 a 94) o qual foi denominado aqui de peIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA. Devido a tal mutação o eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94 apresenta peso molecular de 35 KDa, menor que a proteína eIF2 $\alpha$  nativa (47 KDa).

As linhagens descritas foram utilizadas durante os experimentos de modificação genética por transfecção, análise de crescimento e diferenciação parasitária, imunoprecipitação, espectrometria de massas, imunodeteção e perfil de interação polissomal.

**Tabela 1.** Linhagens de *L. infantum* geneticamente modificadas

Linhagens	Genótipo associado
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA	eIF2 $\alpha$ <sup>+</sup> / eIF2 $\alpha$ -HA
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA	+ peIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94-HA

Descrição de linhagens de *L. infantum* utilizadas no presente estudo, obtidas durante o doutoramento de Dr. Cloutier.

## 4.2 Transfecção dos parasitas

A transfecção das células de *L. infantum* como o DNA exógeno desejado foi realizada por eletroporação e apenas formas promastigotas foram utilizadas nos experimentos. Alíquotas de  $2,5 \times 10^8$  células foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos, lavadas com 5 ml de tampão Hepes-NaCl pH 7,05 (Hepes 20 mM, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,7 mM e glicose 20 mM) e ressuspendidas em 400  $\mu$ l do mesmo tampão. As células foram então repassadas para cuvetas de eletroporação de 2 mm de espessura (Biolabs), contendo 2  $\mu$ g do DNA plasmídial ou 1  $\mu$ g do DNA linear a ser transfectado. Após 15 minutos no gelo, as células foram eletroporadas com 1 pulso de 450 Volts e capacitância de 450  $\mu$ F, utilizando o eletroporador *Gene Pulser Xcell™ system* (BIO-RAD). Imediatamente em seguida as células foram coletadas e repassadas para um frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo 5 ml de meio SDM-79.

Para seleção dos parasitos modificados geneticamente, inicialmente foi realizada uma etapa de pré-seleção, onde 24 horas após a transfecção foi adicionado 5 ml de meio SDM-79 à cultura, contendo o antibiótico de escolha em uma concentração equivalente a metade da DL<sub>100</sub> (dose letal para 100% das células). Para *L. infantum* a DL<sub>100</sub> é de: 80  $\mu$ g/ml para neomicina, 150  $\mu$ g/ml para puromicina e 80  $\mu$ g/ml para higromicina.

Após 24 horas da pré-seleção foi realizada a seleção propriamente dita, onde 1 ml de amostra das células pré-selecionadas foi repassado para garrafa de 25 cm<sup>2</sup> com 9 ml de meio SDM-79 contendo a concentração adequada do antibiótico utilizado. Os transfectantes foram recuperados entre 7 e 14 dias após o início da etapa de seleção em cultura policlonal. Para o ensaio de deleção gênica foi necessário realizar a seleção clonal dos transfectantes pelo semeio por espalhamento em placa de ágar SDM-79 contendo o antibiótico de seleção. As colônias monoclonais foram observadas e recuperadas entre 15 e 21 dias.

### **4.3 Curvas de crescimento de *L. infantum***

Células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração inicial de 10<sup>6</sup> células/mL no meio SDM-79. Estas células foram cultivadas até a fase estacionária do crescimento, sendo repassadas no mesmo meio, na mesma condição de cultivo e concentração celular, para dar início a curva de crescimento de formas promastigotas propriamente dita. Essa cultura foi monitorada por microscopia de luz direta e invertida, quanto à morfologia, motilidade e concentração celular durante todo o crescimento. Alíquotas foram retiradas diariamente até a morte celular. As amostras obtidas foram centrifugadas a 10.000 g por cinco minutos a 4°C, o sedimento de células foi lavado com tampão salina fosfato, PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) e novamente centrifugado sob as mesmas condições. A amostra obtida foi ressuspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE para uma concentração final de 2 x 10<sup>5</sup> células/μL e aquecidos por cinco minutos a 95° C. Os extratos obtidos foram analisados posteriormente em ensaios de *Western-Blot*.

#### **4.4 Curvas de diferenciação *in vitro* de *L. infantum***

Com o objetivo de realizar a diferenciação de *L. infantum* para formas amastigotas-axênicas, alíquotas de células obtidas de culturas de *L. infantum* em fase estacionária, ricas em formas promastigota metacíclica do parasita, foram contadas e repassadas, numa concentração final de  $10^6$  células/mL, para o meio MAA/20, pH 5,5, suplementado de 20% de soro fetal bovino, 1% de hemina a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. O meio MAA/20 é obtido por modificação do meio 199 (cat no. M9163, Sigma®), suplementado com 0,5% de trypto caseína de soja (Pasteur Diagnostics®), 0,25% de glucose, 4 mM de NaHCO<sub>3</sub> e 25 mM de HEPES. A diferenciação morfológica em amastigotas foi analisada através de microscopia de luz em campo invertido e alíquotas do cultivo foram retiradas nos mesmos tempos de cultivo e processadas como já descrito para as formas promastigotas do parasito, item 4.3.

#### **4.5 Ensaio de *Western-Blot***

Os extratos protéicos obtidos de  $2 \times 10^6$  células *L. infantum* foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de PVDF (100 mA por 1 hora). A membrana foi então bloqueada com solução de leite desnatado (Molico A e D, Nestlé®) a 5% em TBS (*TRIS Buffered Saline*) adicionado de 0,05% de Tween-20 por uma hora, sob agitação a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário em diluição variável (Tabela 2) em solução de leite sem gordura (Molico A e D, Nestlé®) a 5%, dissolvido em TBS/Tween 20 a 0,05%, durante 16 horas a 4°C, sob agitação.

**Tabela 2.** Anticorpos primários utilizados

Anti-corpo primário	Fonte biológica	Fator de diluição
Anti-HA, HA-7, monoclonal, Abcam®	camundongo	1:3.000
Anti-V5, EPR12989, monoclonal, Abcam®	coelho	1:1.000
Anti-eIF2 $\alpha$ , policlonal,	coelho	1:1.000

Anticorpos primários utilizados com respectivas fontes biológicas de origem e fatores de diluição empregados nos ensaios de *Western-Blot*.

Após três lavagens de 10 minutos cada, sob agitação, com 10 mL de TBS/Tween-20 a 0,05%, houve a incubação com o anticorpo secundário que, a depender do anticorpo primário utilizado, foi o anti-IgG de coelho (1:10.000) ou anti-IgG de camundongo (1:5.000) (Jackson Immuno Research Laboratories®) ambos conjugados a peroxidase, por uma hora, sob agitação a temperatura ambiente. O ensaio foi finalizado com segunda etapa de lavagem como descrita anteriormente. A visualização final foi feita através de uma reação de quimioluminescência e exposição a filme *Biomax Light* (Kodak®). Tal reação utilizou solução quimioluminescente, contendo: 25 mL de luminol a 1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5, adicionado de iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio para 0,03%. O tempo de exposição ao filme sofreu variações de acordo com cada anticorpo utilizado.

#### **4.6 Preparação de lisados celulares de *L. infantum***

Para a obtenção da fração citoplasmática de células de *L. infantum*, formas promastigotas ( $10^8$  células para imunodeteção ou  $10^9$  para espectrometria de massas) foram coletadas por centrifugação e lavadas com PBS suplementado com 10% de inibidor de protease (Complete™ ULTRA Tablets, EDTA-free Roche®). Em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de

lise (20 mM de HEPES-KOH pH 7,4/ 75 mM de acetato de potássio/ 4 mM de acetato de magnésio/ 2 mM de DTT, suplementado com inibidores da protease). A lise foi realizada através de 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria 37°C e a ruptura celular foi monitorada por microscopia ótica. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos e o sobrenadante armazenado a -80°C. As alíquotas foram separadas para análise da integridade dos lisados por *Western-blot*.

#### **4.7 Ensaio de interação polissomal**

Para a realização do ensaio de purificação de frações polissomais foi necessário iniciar com o preparo das culturas celulares e, para tal, 100 ml de cultivo de *L. infantum* em fase promastigota exponencial de crescimento (aproximadamente  $10^9$  células) foram centrifugadas a 3000 g por 5 minutos e ressuspendidas em 5 ml de meio SDM-79 previamente aquecido a 26°C e suplementado com 100 µg/mL de cicloheximida. A cicloheximida é uma droga que tem efeito inibitório da síntese de proteínas interferindo na translocação ribossomal, e é empregada, nesse ensaio, para a estabilização dos polissomos traducionalmente ativos.

A nova cultura foi incubada 10 minutos em estufa B.O.D a 26°C e após esse período foi centrifugada e lavada com tampão PBS suplementado com 100 µg/mL de cicloheximida. As células foram novamente centrifugadas para remoção do sobrenadante e o sedimento celular obtido foi empregado em protocolo de lise como descrito no tópico 4.5.

Paralelamente, foi necessário a preparação de um gradiente linear de sacarose. Para isso, preparou-se 50 mL das soluções de sacarose a 15% e a

45%, usando como solvente o tampão de gradiente (50 mM de Tris-HCl pH 7,4, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de DTT, e 4 U/ml de RNaseOUT™ (Invotrogen®)), preparado em água DEPC. Em seguida, utilizou-se a bomba *gradiente maker* para a preparação do gradiente linear em tubo de centrifugação (Beckman Ref #331372), utilizando 5 ml de cada solução de sacarose. Seguiu-se com a ultracentrifugação dos lisados em gradiente de sacarose. Para isso, os lisados foram cuidadosamente depositados em cima do gradiente de sacarose obtido previamente e ultracentrifugados a 35.000 *g* por 2h15 minutos a 4°C.

Após essa etapa as amostras foram fracionadas em 12 alíquotas de aproximadamente 500 µL cada, através de equipamento coletor de frações (Teleman-ISCO) a 4°C. As amostras coletadas foram monitoradas quanto à quantidade de RNA presente através de espectrofotometria acoplada ao sistema de fracionamento, a qual gerou um gráfico relativo às frações coletadas.

A partir das 12 diferentes frações, foi realizada a purificação proteica por adição de TCA 10%, incubado por 10 minutos a -80°C, seguido de centrifugação dos tubos a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e o sedimento proteico foi lavado com 200 µL de acetona P.A. gelada e novamente centrifugado. A acetona foi removida e o sedimento seco em centrifugação a 26°C por 10 minutos, sob vácuo. Finalmente, as amostras foram adicionadas de tampão para SDS-PAGE 2X concentrado, desnaturadas à 95°C por 5 minutos e utilizadas em ensaios de *Western-Blot*.

#### 4.8 Rastreamento dos homólogos de eIF2B em tripanossomatídeos

Para o rastreamento dos genes homólogos das cinco subunidades de eIF2B nos genomas dos tripanossomatídeos, as sequências nucleotídicas das subunidades de eIF2B de *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, bem como os ortólogos em Archae, *Methanocaldococcus jannaschii*, e em Eubacteria, *E. coli*, foram triados do banco GenBank na plataforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Através de ferramenta de alinhamento local de sequências, BLAST as sequências dos prováveis homólogos de *L. major* e *T. brucei* foram rastreadas. A validação das sequências candidatas obtidas foi realizada através de ensaio reverso onde as sequências proteicas dos possíveis homólogos em Tripanossomatídeos foram alinhadas contra o banco GenBank usando a ferramenta BLASTp. Finalmente, foi realizada a comparação dos genes selecionados entre os genomas dos tripanossomatídeos através do banco de dados TriTrypDB (<http://www.tritrypdb.org>).

#### 4.9 Superexpressão dos fatores eIF2B de *L. infantum*

Para realização da metodologia de superexpressão, foi necessário a amplificação por PCR dos genes referentes aos candidatos às cinco subunidades do complexo eIF2B de *L. infantum* (EIF2B $\alpha$ , EIF2B $\beta$ , EIF2B $\gamma$ , EIF2B $\delta$  e EIF2B $\epsilon$ ) utilizando como molde o DNA genômico deste parasita. Para isso, foram desenhados pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene, contendo o sítio de restrição da enzima *Xba*I anelando na sua extremidade 5' e *Hind*III, na sua extremidade 3' sem o códon de terminação de tradução (Tabela 3).

A amplificação foi obtida com 0,02 U/ml da enzima *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity DNA Polymerase*, com seu tampão *Phusion*<sup>®</sup>GC, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3% de DMSO

e 0,2 mM de dNTPs, para uma reação final de 20 µl. As condições de reação foram: 10 ciclos de: 98 °C por 1 minuto, 30 segundos por 65 °C (anelamento) e 72 °C por 1 minuto. Nesses 10 ciclos iniciais a temperatura de anelamento decrescia 1 °C a cada ciclo. Foram seguidos por 30 ciclos de 98 °C por 1 minuto, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto.

**Tabela 3.** Oligonucleotídeos para amplificação dos homólogos de eIF2B de *L. infantum*.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência específica
EIF2B α	5' <i>Xba</i> I / EIF2B α	tctagaATGGACGTCCCAAGCGAAGA
	3' <i>Hind</i> III / EIF2B α	aagcttTCGCCGCTTTCCTGGAGCAG
EIF2B β	5' <i>Xba</i> I / EIF2B β	tctagaATGCTGAGTAATGTGCCAGA
	3' <i>Hind</i> III / EIF2B β	aagcttATCTGCGTCGCTGTAGTTCG
EIF2B γ	5' <i>Xba</i> I / EIF2B γ	tctagaATGTCTTCCGACACTGCCGC
	3' <i>Hind</i> III / EIF2B γ	aagcttCTCAATTATGGTGTCACTTGCG
EIF2B δ	5' <i>Xba</i> I / EIF2B δ	tctagaATGTCGTCGTCTTCCGGAGAA
	3' <i>Hind</i> III / EIF2B δ	aagcttTCCCCGGACAAGATTCACGA
EIF2B ε	5' <i>Xba</i> I / EIF2B ε	tctagaATGGACATGGCAGCTGTTCG
	3' <i>Hind</i> III / EIF2B ε	aagcttCTCAGCCTCGAGGAAGTCCT

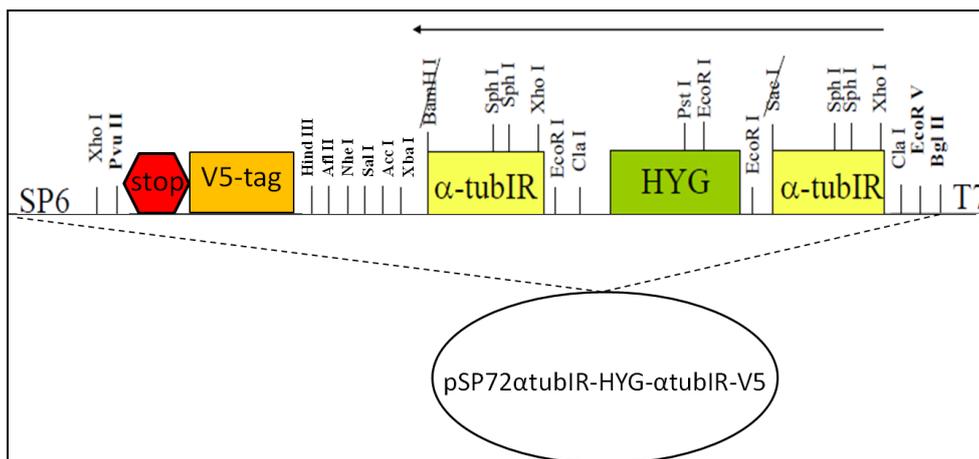
Sequências nucleotídicas específicas para amplificação por PCR dos genes eIF2Bα-ε em *L. infantum*. Letras em minúsculo, sítios de restrição para as enzimas utilizadas na clonagem.

Em seguida, os fragmentos de PCR purificados foram tratados com a enzima *Taq* Polimerase para adição de dATP nas extremidades e submetidos à reação de ligação, utilizando o pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega®), conforme recomendações do fabricante. O período da reação foi de 16 horas, a temperatura de 4 °C.

Cepas de *Escherichia coli* Top 10 foram transformadas com 5 µl da ligação em 50 µl de células quimiocompetentes, submetendo a amostra a 30 minutos no gelo seguido de choque térmico por 5 minutos a 37 °C. As células foram semeadas em meio LB sólido contendo 100 µg/ml ampicilina, 80 µg/ml de X-GAL

e 0,5 mM IPTG, sendo a placa incubada a 37 °C por 16 horas. As colônias recombinantes foram inoculadas em 2 ml de meio LB líquido com 100 µg/ml ampicilina, a 37°C por 16 horas. Os inóculos crescidos foram submetidos à extração de DNA plasmidial através do *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (da Sigma®) segundo recomendações do fabricante. Para a confirmação da clonagem, os DNAs extraídos foram submetidos à digestão a 37 °C com a enzima *EcoRI*, por 4 horas.

As amostras foram então enviadas ao sequenciamento automático, analisadas e as construções confirmadas. E em seguida as amostras foram submetidas a uma nova etapa de restrição enzimática, agora com as enzimas *XbaI* e *HindIII* (sítios de restrição inseridos durante o desenho dos oligonucleotídeos) específicas para a subclonagem direcional no vetor episomal de expressão constitutiva em *Leishmania*, pSP72 $\alpha$ tub-HYG- $\alpha$ tub-V5. Esse vetor foi obtido através da modificação do vetor comercial pSP72 (Promega®), no qual foi inserido o gene de resistência a hygromicina, flanqueado por sequências intergênicas da alfa-tubulina de *L. infantum*. Neste estudo, adicionalmente, a sequência que codifica para o peptídeo V5 foi inserida logo após o sítio de restrição *HindIII*, seguido do códon de parada (Figura 18). O peptídeo V5, é derivado de um pequeno epítipo de *Simian vírus 5* (SV5) e é caracterizado por uma sequência específica de 14 aminoácidos (GKPIP NPLLGLDST).



**Figura 18.** Representação esquemática do plasmídeo pSP72 $\alpha$ tub-HYG- $\alpha$ tub-V5. Em amarelo, região intergênica da alpha-tubulina de *L. infantum*; Em verde, gene codificante da hygromicina fosfotransferase; Em laranja, epítipo de detecção-V5; Em vermelho, códon de terminação; Sítios de clonagem: *Xba*I, *Sal*I, *Nhe*I, *Afl*III, *Hind*III. pSP72 $\alpha$ tub-HYG- $\alpha$ tub-V5  $\pm$  5,2 Kpb.

Os fragmentos liberados foram purificados através do kit *PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences®), conforme recomendação do fabricante. Posteriormente, os insertos purificados foram sub-clonados no vetor de expressão supra-citado utilizando a enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs®), seguindo as condições estabelecidas pelo fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram transformados em células de *E. coli* quimiocompetentes DH10B e os DNAs dos possíveis clones foram extraídos. As sub-clonagens foram confirmadas pelo padrão de restrição enzimática.

Finalmente, as construções plasmidiais de super-expressão das subunidades de eIF2B conjugadas ao epítipo V5, foram transfectadas nas linhagens de *L. infantum*, *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA e *Ldi* eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA, objetivando a co-expressão das proteínas de interesse. As linhagens recombinantes obtidas estão descritas na tabela 4.

**Tabela 4.** Linhagens de co-expressão eIF2 $\alpha$ -HA/ eIF2Bs-V5.

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo associado</b>
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA	eIF2 $\alpha$ <sup>+/eIF2<math>\alpha</math>HA</sup>
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2B $\alpha$ -V5	eIF2 $\alpha$ <sup>+/eIF2<math>\alpha</math>HA</sup> + p eIF2B $\alpha$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2B $\beta$ -V5	eIF2 $\alpha$ <sup>+/eIF2<math>\alpha</math>HA</sup> + p eIF2B $\beta$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2B $\gamma$ -V5	eIF2 $\alpha$ <sup>+/eIF2<math>\alpha</math>HA</sup> + p eIF2B $\gamma$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2B $\delta$ -V5	eIF2 $\alpha$ <sup>+/eIF2<math>\alpha</math>HA</sup> + p eIF2B $\delta$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2B $\epsilon$ -V5	eIF2 $\alpha$ <sup>+/eIF2<math>\alpha</math>HA</sup> + p eIF2B $\epsilon$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA	+ p eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94-HA
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA+ eIF2B $\alpha$ -V5	+ p eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94-HA + p eIF2B $\alpha$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA+ eIF2B $\beta$ -V5	+ p eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94-HA + p eIF2B $\beta$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA+ eIF2B $\gamma$ -V5	+ p eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94-HA + p eIF2B $\gamma$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA+ eIF2B $\delta$ -V5	+ p eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94-HA + p eIF2B $\delta$ -v5
<i>Ldi</i> eIF2 $\alpha$ ( $\Delta$ 2-94)-HA+ eIF2B $\epsilon$ -V5	+ p eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94- HA + p eIF2B $\epsilon$ -v5

Descrição de linhagens de *L. infantum* obtidas visando a co-expressão de eIF2 $\alpha$ -HA, nas versões selvagem e mutagenizadas, com as cinco subunidades do complexo eIF2B transfectadas individualmente. As respectivas características genótípicas associadas as linhagens recombinantes estão mostradas. **p**, plasmídeo de complementação.

#### 4.10 Sequenciamento de DNA

No presente estudo todas as construções em vetor pGEM-T-Easy tanto dos genes para superexpressão quanto dos cassetes de deleção gênica foram submetidas ao sequenciamento de DNA, realizado utilizando o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®). Todas as amostras foram analisadas através do seqüenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM / FIOCRUZ. Após o seqüenciamento, as sequências obtidas foram submetidas a uma busca em bancos de dados públicos como NCBI através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificar a integridade das seqüências.

#### 4.11 Imunoprecipitação

Os lisados celulares, obtidos conforme explicitado no tópico 4.3, foram incubados com resina magnética conjugada ao anticorpo monoclonal anti-HA (Pierce™) ou Dynabeads® proteína G magnética conjugada ao anti-corpo anti-V5. A resina foi ressuspensa por agitação em aparelho “vortex” por 10 segundos e entre dez a 40 µl foram coletados em tubo e colocados em estantes magnética para remoção da solução de armazenamento. Em seguida, foram feitas duas etapas de lavagem com 1 mL de TBS/Tween-20 a 0,05 %, separando a resina da solução de lavagem a cada troca de solução, finalizando com a remoção da solução de lavagem. O lisado celular então foi incubado com a resina previamente lavada, por 4 horas a 4°C, sob agitação.

Após o período de incubação, o tubo foi deixado em repouso na estante magnética para remoção do lisado depletado, o qual foi descartado. A resina foi então tratada para remoção de ligantes inespecíficos com três lavagens com 1 mL de TBS/Tween-20 a 0,05%, conforme executado anteriormente. Finalmente, a resina contendo o conteúdo imunoprecipitado foi analisada por imunodeteção e/ou espectrometria de massas. Para o *Western-Blot* o imunoprecipitado foi ressuspensa em 40 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE e incubado a 95°C por cinco minutos. Já para espectrometria de massas o imunoprecipitado foi lavado com solução de bicarbonato de amônia e enviado à plataforma de Proteômica do Centre de Recherche en Infectologie L'Université Laval (Quebec, Canadá).

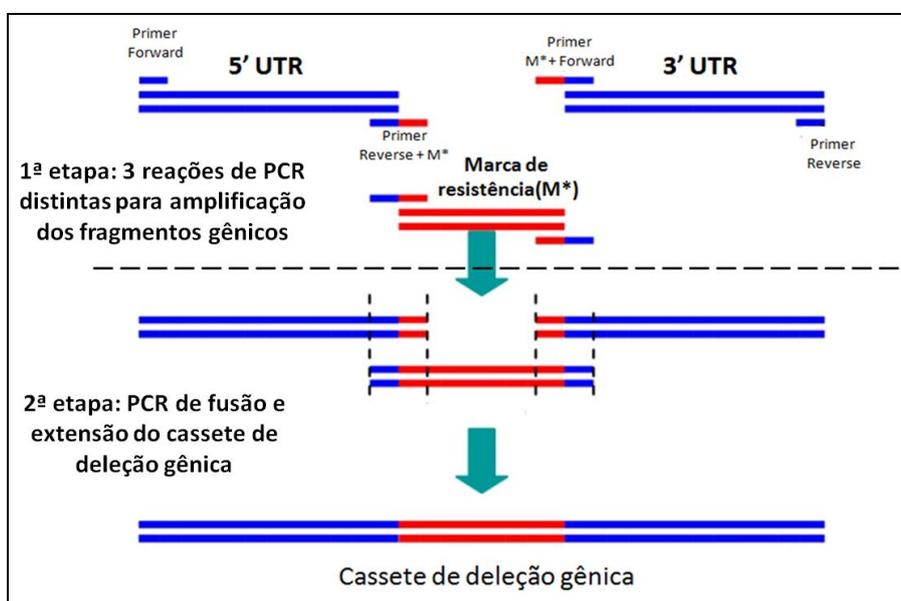
#### 4.12 Análise evolutiva entre os parálogos de eIF2 $\gamma$

A presença das sequências dos parálogos de eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2 foi investigada nos genomas de *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. tarentolae*, *Endotrypanum monterogeii*, *Chritidia fasciculata*, *Leptomonas pyrrocoris*, *Leptomonas seymouri*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *T. vivax*, *T. congolenses*, *T. grayi* e *Bodo saltans*. De posse dessas sequências, foi realizado um alinhamento múltiplo local através do software MAFFT, compatível com análises entre sequências contendo possíveis motivos isolados. Posteriormente, o alinhamento gerado foi tratado usando o software TrimAL, para seleção de blocos contendo regiões conservadas. Em seguida, para a escolha do modelo evolutivo mais adequado ao alinhamento, onze modelos de substituição foram testados incluindo modelos de frequência de bases iguais/desiguais, modelos com/sem proporções de sítios invariáveis e modelos com/sem taxa de variação através dos sítios, resultando em 88 modelos que foram testados usando o jModel Test. Este alinhamento foi usado como dado de entrada para o software de análise por máxima verossimilhança, PhyML 3.0. A árvore gerada foi lida no software FigTree1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). A sequência de *B. saltans* foi usada como grupo externo (*outgroup*).

#### 4.13 Ensaios de deleção e complementação gênica

Para a geração de linhagens com deleção de cópia única ou da deleção dupla dos genes eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2, foi seguido o protocolo simplificado descrito por (Derbise et al. 2003). Em uma primeira etapa, este protocolo utiliza pares de oligonucleotídeos específicos para amplificação de aproximadamente 500 pb das regiões 5' e 3' UTR dos genes alvo a serem deletados. Foram amplificados

também genes de resistência aos antibióticos higromicina e puromicina. Na segunda etapa, foram realizadas reações de PCR de fusão entre as regiões flanqueadoras (5' e 3' UTR ) e o gene de resistência ao antibiótico a fim de obter o cassete de deleção (Figura 19). Todas as amplificações e fusões foram realizadas com enzima *Phusion* DNA Polimerase (New England Biolabs), seguindo as adaptações necessárias à amplificação de fragmentos ricos em conteúdo GC, segundo recomendações do fabricante.



**Figura 19.** Representação esquemática da estratégia de construção dos cassetes de deleção gênica. Na primeira etapa é realizada a amplificação dos fragmentos 5' e 3' UTR e gene de resistência, necessários para a construção do cassete de deleção. Na segunda etapa é realizado a PCR de fusão entre os fragmentos obtidos previamente para a geração do cassete de deleção gênica.

Os cassetes de deleção obtidos foram purificados, clonados no vetor pGEM-T-Easy, e sequenciados seguindo metodologia já descrita. Os cassetes confirmados por sequenciamento foram excisados do vetor pGem-T-Easy por digestão enzimática, com *NotI* (cassete com higromicina) ou *EcoRI* (cassete com

puromicina) e novamente purificados. Cerca de 1 µg do cassete de deleção foi utilizado para cada ensaio de transfecção dos parasitos.

Uma vez de posse de todas as construções, foram realizados os ensaios de deleção e complementação propriamente ditos. Para tal foi necessário adoção de estratégia experimental onde, após deleção de uma cópia endógena do gene em questão as células foram então novamente transfectadas com o plasmídeo de superexpressão do gene alvo fusionado a etiqueta de HA (plasmídeo de complementação, **pelF2γ-HA** ou **pelF2γ-2-HA**). Depois de confirmada a expressão da proteína recombinante por *Western-Blot* anti-HA, a célula foi submetida a uma terceira etapa de transfecção com o segundo cassete de deleção gênica para retirada da cópia endógena remanescente do gene alvo. No ensaio de complementação foi avaliada a capacidade do gene ectopicamente inserido em substituir a função do gene endógeno.

Em paralelo, após deleção de uma cópia endógena do gene alvo, foi realizada a transfecção dos parasitos selecionados com o segundo cassete de deleção. Desse modo, se o gene alvo for essencial para a sobrevivência celular, a retirada da segunda cópia gênica seria letal para o protozoário.

Os parasitos foram selecionados pela adição dos antibióticos relacionados às marcas de resistência empregadas, e durante a etapa de seleção as células foram também observadas por microscopia de luz direta e invertida para verificação de alterações morfológicas e/ ou de viabilidade celular associada à deleção gênica. Em seguida, as linhagens previamente triadas foram submetidas à seleção monoclonal em placa de SDM-79 ágar adicionado dos antibióticos de seleção específicos. As culturas recombinantes foram submetidas a avaliação

por *Southern-Blot* para confirmação da correta construção gênica obtida nos organismos modificados.

Através da utilização de controles positivos (células transfectadas com cada cassete de deleção separadamente, as quais são resistentes aos antibióticos testados) e controles negativos (células selvagens submetidas a seleção com os antibióticos de escolha) é possível assegurar a confiabilidade aos ensaios. Todas as transfecções para ensaios de deleção gênica foram realizadas em triplicata. Desse modo, foram geradas linhagens recombinantes, conforme descrito na tabela 5.

**Tabela 5.** Linhagens recombinantes de deleção e complementação gênica.

<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo associado</b>
<i>Ldi</i> SKOeIF2 $\gamma$	eIF2 $\gamma$ <sup>+/-</sup>
<i>Ldi</i> SKOeIF2 $\gamma$ + eIF2 $\gamma$ -HA	eIF2 $\gamma$ <sup>+/-</sup> + <b>p</b> eIF2 $\gamma$ -HA
<i>Ldi</i> SKOeIF2 $\gamma$ + eIF2 $\gamma$ -2-HA	eIF2 $\gamma$ <sup>+/-</sup> + <b>p</b> eIF2 $\gamma$ -2-HA
<i>Ldi</i> DKOeIF2 $\gamma$	eIF2 $\gamma$ <sup>-/-</sup>
<i>Ldi</i> DKOeIF2 $\gamma$ + eIF2 $\gamma$ -HA	eIF2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> + <b>p</b> eIF2 $\gamma$ -HA
<i>Ldi</i> DKOeIF2 $\gamma$ + eIF2 $\gamma$ -2-HA	eIF2 $\gamma$ <sup>-/-</sup> + <b>p</b> eIF2 $\gamma$ -2-HA

Descrição de linhagens de *L. infantum* obtidas através de ensaio de deleção e/ou complementação gênica e respectivas características genóticas associadas as linhagens recombinantes. **p**, plasmídeo de complementação gênica.

#### 4.14 *Southern-Blot*

Visando a confirmação das corretas construções genômicas obtidas nos ensaios de deleção e complementação gênica, as linhagens recombinantes foram submetidas a ensaio de *Southern-Blot*. Para isso, o DNA total das linhagens recombinantes de *L. infantum* foi extraído a partir de 10 mL de cultura promastigota em fase exponencial. As células foram centrifugadas a 3.000 g por 5

minutos para remoção do sobrenadante e, em seguida, lavadas com 1mL de tampão PBS 1X e novamente centrifugadas com descarte do sobrenadante. O sedimento de células foi então lentamente ressuspensionado com 1mL de DNazol® (Invitrogen®). Posteriormente foi adicionado 500 µL de isopropanol e o DNA foi precipitado a 30 minutos a -80°C. Após o período de precipitação as amostras foram centrifugadas a 13.000 g a 4°C e o DNA precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 70% e seco por 30 minutos, a temperatura ambiente em tubo aberto e invertido. O DNA foi então ressuspensionado em 1 mL de água ultrapura e quantificado por espectrofotometria em equipamento Nanodrop.

O ensaio de *Southern-Blot* propriamente dito foi realizado, segundo protocolo padrão já descrito (Sambrook and Maniatis 1989), pela assistente de pesquisa Bch. Carole Dumas do Centre de Recherche en Infectologie da L'Université Laval, Quebec, Canadá.

## 5. Resultados

### 5.1 Caracterização molecular de eIF2 $\alpha$ em *L. infantum*

O complexo eIF2 de mamíferos é vastamente estudado e sua regulação através da fosforilação por proteínas quinases vem sendo alvo de diferentes estudos almejando o desenvolvimento de terapias anti-tumorigênicas. Em tripanossomatídeos, existe um limitado número de trabalhos que abordam a caracterização do complexo eIF2. Sabe-se que em *Leishmania*, a ausência da expressão do homólogo da PERK quinase causa retardo no processo de diferenciação do parasito (Chow et al. 2011) e a fosforilação de eIF2 $\alpha$  está associada a diminuição global da tradução (Cloutier et al. 2012.a). Adicionalmente, foi sugerido que o eIF2 $\alpha$  é diferencialmente expresso durante o ciclo de vida do parasito, mediante possível mecanismo de clivagem (Cloutier 2012.b).

Diante do conhecimento limitado relativo ao homólogo de eIF2 $\alpha$  em *Leishmania* e baseado na caracterização em andamento, almejou-se nesse tópico analisar o padrão de expressão endógena desse fator, confirmar sua provável participação na iniciação da tradução proteica e determinar as possíveis interações com os parceiros funcionais preditos.

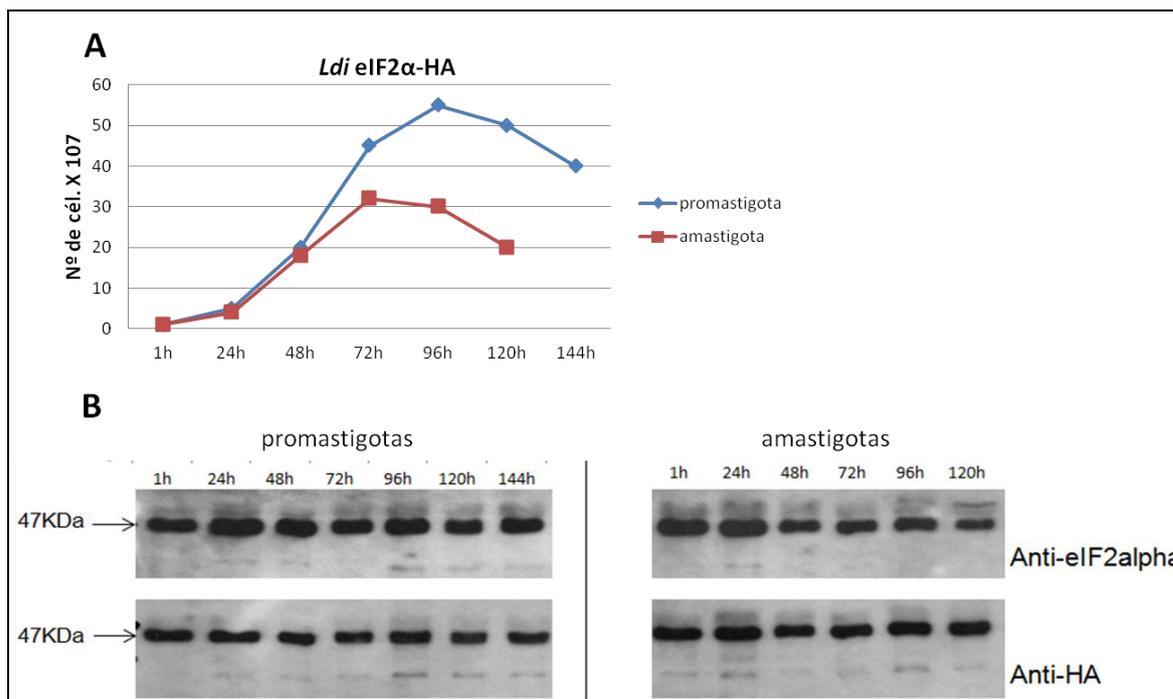
#### 5.1.1 Análise da expressão de eIF2 $\alpha$ durante curva de crescimento e diferenciação de *L. infantum*

Linhagens de *L. infantum* selvagem e *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA, (linhagem de *L. infantum* expressando o gene eIF2 $\alpha$  conjugado ao epítopo de HA e integrado no *locus* genômico de origem), foram submetidas a ensaios de crescimento de formas promastigotas e diferenciação de formas amastigotas-axênicas.

Contagens do crescimento celular e retirada de alíquotas foram realizadas e estas alíquotas foram submetidas à imunodeteção com anticorpos por *Western-Blot*.

Para a linhagem *L. infantum* selvagem a detecção da proteína eIF2 $\alpha$  foi realizada com anticorpo policlonal anti-eIF2 $\alpha$  produzido em coelho, previamente testado quanto à afinidade e especificidade (MORAES, 2014). Já para a linhagem *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA, foi empregado ainda um anticorpo monoclonal anti-HA. Deste modo, foi possível analisar a expressão de eIF2 $\alpha$  tanto na linhagem selvagem quanto validar a expressão obtida pela construção integrativa. As curvas de crescimento, de ambas as linhagens empregadas, foram realizadas em três réplicas biológicas independentes. Na figura 20, representativa, é demonstrada a detecção de eIF2 $\alpha$ , na linhagem *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA (genótipo eIF2 $\alpha$ <sup>+eIF2 $\alpha$ -HA</sup>) com ambos os anticorpos, anti-eIF2 $\alpha$  e anti-HA.

Através dessas análises foi possível afirmar que em todas as curvas de crescimento e diferenciação testadas se observou a proteína eIF2 $\alpha$  presente durante todo o crescimento das formas promastigotas, bem como, durante o processo de diferenciação *in vitro*. Desse modo, a expressão endógena de eIF2 $\alpha$  foi constante, não sofrendo nenhuma alteração qualitativa relacionada ao ciclo de vida do parasito, sendo detectado sua expressão como uma única isoforma de peso molecular de 47 KDa.



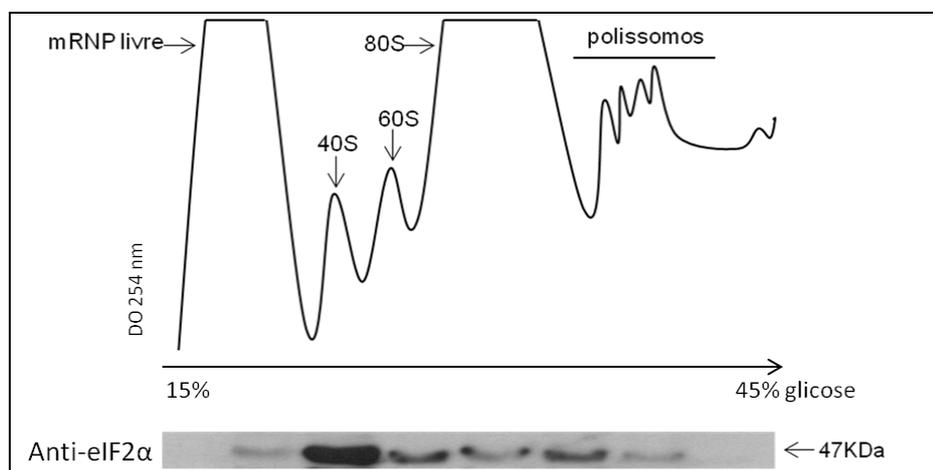
**Figura 20.** Figura representativa da expressão de eIF2 $\alpha$  ao longo do crescimento e diferenciação de *L. infantum*. A) Gráfico de curva de crescimento e diferenciação de linhagem *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA. B) Análise da expressão de eIF2 $\alpha$  em linhagem *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA. Setas pretas apontam a proteína de interesse; KDa, peso molecular em QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

### 5.1.2 Análise funcional de eIF2 $\alpha$ durante a síntese proteica de *L. infantum* selvagem

Células promastigotas procíclicas de *L. infantum* selvagem foram cultivadas, lisadas e ultra-centrifugadas em gradiente de sacarose seguida de fracionamento em coletor de frações. As diferentes frações foram inicialmente analisadas quanto ao perfil de formação dos complexos ribossomais, sendo possível visualizar o gráfico condizente com o encontrado em organismos com síntese proteica ativa, um indicativo de que a execução da técnica foi satisfatória e reprodutível.

A presença do eIF2 $\alpha$  na amostra fracionada foi analisada por *Western-Blot*, empregando-se o anticorpo policlonal anti-eIF2 $\alpha$ . Foi possível observar a distribuição dessa proteína, em seu peso molecular predito (47 KDa), através de

todas as frações do gradiente de purificação. Contudo, é importante salientar, a grande concentração de eIF2 $\alpha$  co-purificado com a fração correspondente à purificação das subunidades menores ribossomais 40S (Figura 21).



**Figura 21.** Perfil de purificação polissomal em gradiente de sacarose de *L. infantum* e imunodeteção de eIF2 $\alpha$ . mRNP livres, ribonucleoproteínas livres; 40S, purificação de subunidade menor ribossomal; 60S, purificação de subunidade maior ribossomal; 80S, purificação do ribossoma completo; KDa, peso molecular em QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

### 5.1.3 Análise das interações de eIF2 $\alpha$ com o complexo parceiro funcional eIF2B em *L. infantum*

#### 5.1.3.1 Rastreamento *in silico* dos homólogos das cinco subunidades de eIF2B em tripanossomatídeos

Objetivando a análise *in vivo* das interações entre eIF2 $\alpha$  e as cinco subunidades componentes do complexo eIF2B, seu parceiro funcional, foi necessário inicialmente identificar *in silico* os prováveis genes codificantes dessas subunidades no genoma dos tripanossomatídeos, sendo utilizados como base os genomas de *L. major* e *T. brucei*. Salienta-se que essa demanda é devida à falta de dados da caracterização molecular do complexo eIF2B nesses organismos.

A partir de alinhamento local das sequências foram encontrados prováveis genes codificantes para todas as subunidades de eIF2B. Esses possuem diferentes graus de similaridade quando comparados com os seus ortólogos nos demais eucariotos, onde as subunidades regulatórias (eIF2B $\alpha$ /eIF2B $\beta$ /eIF2B $\delta$ ) se apresentam mais conservadas que às catalíticas (eIF2B $\gamma$ /eIF2B $\epsilon$ ). As características como, número de acesso, identidade e similaridade dos prováveis genes codificantes das subunidades de eIF2B são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** Ortólogos de eIF2B em tripanossomatídeos

Fator	Nº acesso TritypDB	Peso molecular (KDa)	Comparação com o ortólogo Humano%		
			Identidade	Similaridade	Cobertura
eIF2B $\alpha$	LmjF.12.0010	37.5	29	51	72
	Tb927.6.1280	35.9	29	51	71
eIF2B $\beta$	LmjF.10.0950	57.5	33	52	69
	Tb927.8.4390	51.6	34	54	77
eIF2B $\gamma$	LmjF.28.2440	71.1	23	57	33
	Tb11.01.3570	63.4	23	38	74
eIF2B $\delta$ *	LmjF.27.1210	59.5	24	41	93
	Tb11.39.0006	68.6	25	39	63
eIF2B $\epsilon$	LmjF.28.2290	90.4	22	37	56
	Tb11.01.3400	87.6	22	34	54

Identificação dos ortólogos das subunidades de eIF2B em *L. major* e *T. brucei*. Resultados obtidos através de pesquisas no GenBank e TritypDB seguido de alinhamento *par-a-par* usando ferramenta BLAST. \* Para a análise do eIF2B $\delta$  a isoforma 2 do ortólogo de humano foi empregada por ser a mais semelhante com os genes de tripanossomatídeos. KDa, QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

Especificamente para as subunidades regulatórias, os genes de eIF2B $\alpha$  de tripanossomatídeos codificam para proteínas com tamanhos similares quando comparadas às demais sequências ortólogas. Entretanto, as proteínas de tripanossomatídeos possuem substituições importantes em resíduos específicos que são conservados nos demais organismos. Tais substituições também são vistas nas sequências de eIF2B $\beta$ , as quais diferem das sequências dos demais eucariotos por possuírem uma longa inserção próxima a região N-terminal, resultando em uma proteína de maior peso molecular. Já o eIF2B $\delta$  é a menos conservada dentre as três subunidades regulatórias, com pouca ou nenhuma similaridade compartilhada na região N-terminal, sendo a similaridade encontrada restrita a região C-terminal, embora essa região também apresente a substituição de resíduos importantes.

Para as subunidades catalíticas, eIF2B $\gamma$  e eIF2B $\epsilon$ , o alinhamento demonstra um baixo grau de conservação entre as sequências de tripanossomatídeos e as dos demais eucariotos. Essas sequências apresentam diferentes inserções em seus domínios N-terminais, resultando em proteínas maiores nos parasitos.

#### 5.1.3.2 Clonagem das subunidades de eIF2B ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , $\delta$ , $\epsilon$ ) de *L. infantum* em vetor de expressão

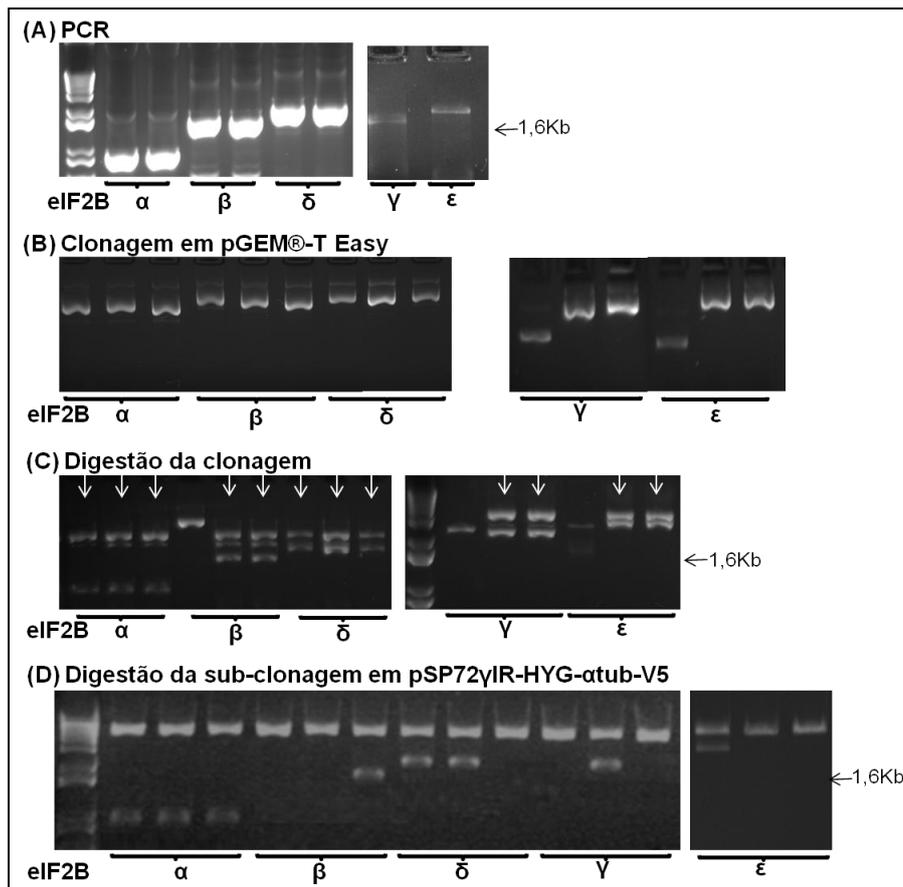
Os genes referentes às cinco subunidades do complexo eIF2B em *L. infantum*, organismo modelo desse estudo, são listados detalhadamente na tabela 7 a seguir.

**Tabela 7.** Complexo eIF2B em *L. infantum*.

<b>Fator</b>	<b>Nº de acesso TritypDB</b>	<b>Anotação gênica</b>
eIF2B $\alpha$	LinJ.12.0001	<i>Translation initiation factor EIF-2b alpha subunit, putative</i>
eIF2B $\beta$	LinJ.10.1030	<i>Guanine nucleotide exchange factor subunit GCD7</i>
eIF2B $\gamma$	LinJ.28.2620	<i>Hypothetical protein, conserved</i>
eIF2B $\delta$	LinJ.27.1090	<i>Guanine nucleotide exchange factor subunit GCD2</i>
eIF2B $\epsilon$	LinJ.28.2460	<i>Translation initiation factor eIF-2B subunit epsilon, putative</i>

Genes referentes às prováveis subunidades do complexo eIF2B em *L. infantum*, com os respectivos números de acesso e a anotação gênica prévia disponível no TritypDB. Fonte: A Autora, 2016.

Tais genes foram amplificados por PCR, utilizando-se de *primers* especificamente desenhados com base no DNA genômico sequenciado de *L. infantum* JPCM5. Os *amplicons* obtidos foram clonados em vetor de passagem, digeridos e encaminhados para sequenciamento a fim de confirmar a integridade nucleotídica dos construtos obtidos. Após confirmação da integridade das sequências, os plasmídeos selecionados foram redigeridos e seus insertos subclonados em vetor de expressão epissomal constitutiva em *Leishmania*, o pSP72  $\alpha$ tubIR-HYG- $\alpha$ tubIR-V5. Todas as etapas referentes à clonagem e subclonagem desses genes foram realizadas com sucesso (Figura 22).



**Figura 22.** Etapas de clonagem de subunidades de eIF2B em vetor de expressão em *Leishmania* spp. (A), Amplificação por PCR dos genes específicos para as subunidades do complexo eIF2B. (B), Extração de DNA plasmidial de possíveis clones recombinantes. (C), Digestão de prováveis plasmídeos de passagem corretamente construídos. (D), Digestão plasmidial para confirmação da sub-clonagem em vetor de expressão pSP72γIR-HYG-αtub-V5. Peso molecular de eIF2B $\alpha$  - 906pb; eIF2B $\beta$  - 1,6Kb; eIF2B $\gamma$  - 2,2Kb; eIF2B $\delta$  - 2Kb; eIF2B $\epsilon$  - 2,5Kb. Setas brancas, DNAs confirmados por sequenciamento. Setas pretas, apontam a banda de 1,6Kb do marcador de peso molecular. Kb, Quilobases. Fonte: A Autora, 2016.

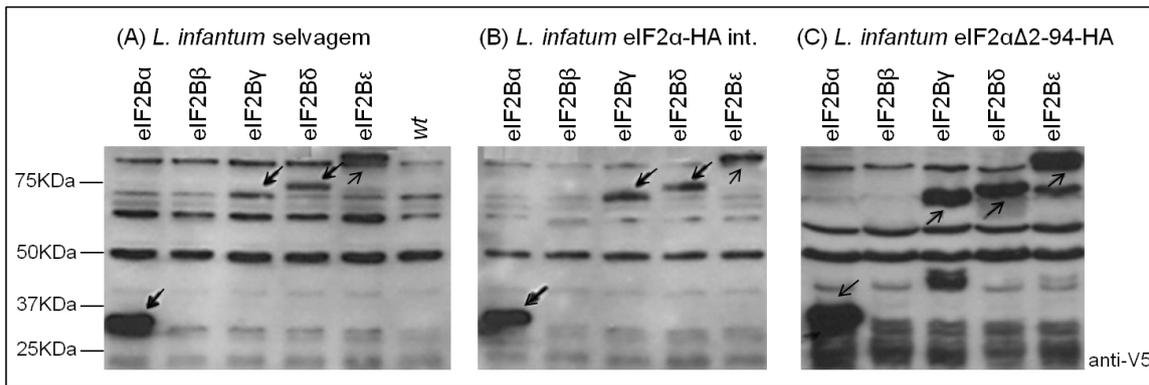
### 5.1.3.3 Geração de linhagens de *L. infantum* super-expressando as subunidades de eIF2B

De posse das construções plasmidiais pSP72γIR-HYG-αtub-eIF2Bs-V5, células selvagens de *L. infantum* foram transfectadas com as diferentes construções, selecionadas com antibiótico específico, recuperadas e cultivadas

para a obtenção de extratos proteicos totais. Estes extratos foram então analisados quanto a expressão das proteínas recombinantes desejadas utilizando-se de anticorpo comercial contra epítipo V5. Não foi possível encontrar em trabalhos anteriores da literatura a utilização do anticorpo anti-V5 em *L. infantum*. Dessa forma uma linhagem selvagem não transfectada foi também hibridizada com o mesmo anticorpo, afim de observar a existência, ou não, de reconhecimento inespecífico (Figura 23, A, linha 6 *L. infantum wt*).

Muito embora sejam visualizadas diversas bandas de reconhecimento inespecífico do anti-V5 nos extratos totais de células selvagens foi possível observar através de *Western-Blot*, nos extratos totais das células transfectadas, a expressão de eIF2B $\alpha$ , eIF2B $\gamma$ , eIF2B $\delta$  e eIF2B $\epsilon$  nos respectivos pesos moleculares preditos. A exceção foi subunidade eIF2B $\beta$ , cuja expressão não foi detectada (Figura 23, A).

Uma vez analisada a capacidade de expressão dessas proteínas no vetor pSP72yIR-HYG- $\alpha$ tub e objetivando a obtenção de linhagens de co-expressão eIF2 $\alpha$  + eIF2B's, foram realizadas novas transfecções dessas construções nas linhagens *Ldi*eIF2 $\alpha$ -HA e na *Ldi*eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA. A co-expressão permite analisar a interação de eIF2 $\alpha$  com seu parceiro eIF2B, através da IP do eIF2 $\alpha$ -HA com o anticorpo anti-HA e a detecção de subunidade do eIF2B no imunoprecipitado com o anti-V5. As linhagens de co-expressão *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2Bs-V5 estão ilustradas na figura 23, item "B", e as linhagens de eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA + eIF2Bs-V5 no item "C". Semelhantemente ao resultado observado para a linhagem selvagem, foi possível detectar a expressão das subunidades eIF2B $\alpha$ , eIF2B $\gamma$ , eIF2B $\delta$  e eIF2B $\epsilon$  em ambas as linhagens de co-expressão. Contudo, do mesmo modo, não foi possível visualizar a expressão da subunidade eIF2B $\beta$ .



**Figura 23.** Expressão ectópica das subunidades do complexo eIF2B em linhagens de *L. infantum*. (A), Expressão das subunidades de eIF2B em *L. infantum* selvagem. (B), Co-expressão de subunidades de eIF2B na linhagem *Ldi* eIF2 $\alpha$ -HA. (C), Co-expressão de subunidades de eIF2B na linhagem *Ldi*eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA. eIF2B $\alpha$ , 33KDa; eIF2B $\beta$ , 57KDa; eIF2B $\gamma$ , 71KDa; eIF2B $\delta$ , 72KDa; eIF2B $\epsilon$ , 90KDa; Setas pretas apontam a detecção das proteínas recombinantes de interesse; KDa, peso molecular em QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

#### 5.1.3.4 Imunoprecipitação de eIF2 $\alpha$ e análise das interações com o complexo eIF2B nas linhagens de co-expressão

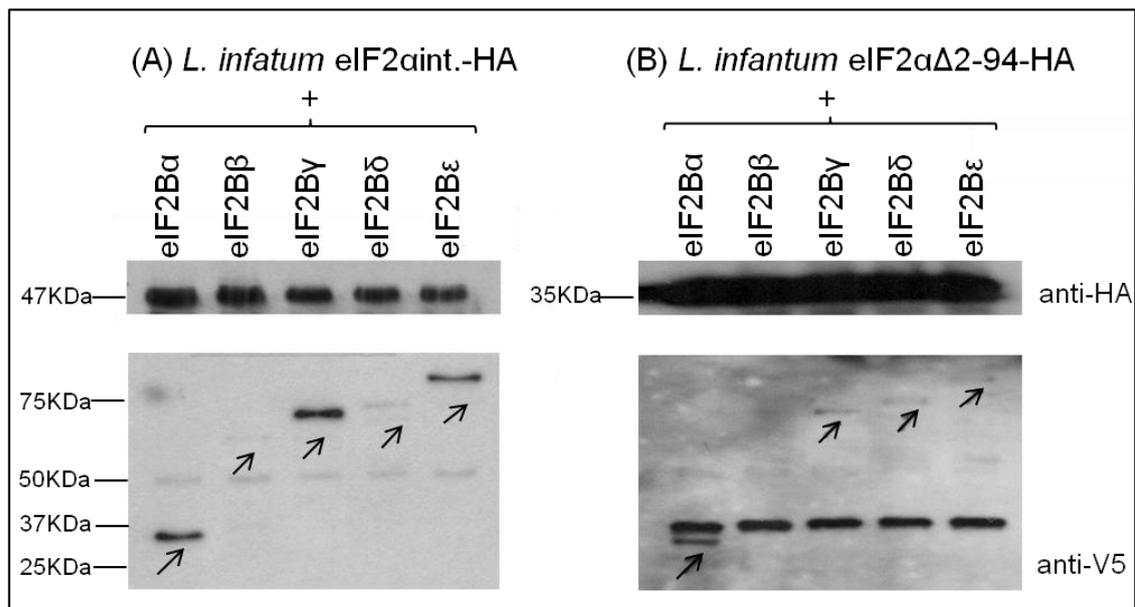
As linhagens de co-expressão eIF2 $\alpha$  + eIF2B previamente obtidas e detalhadas no tópico anterior, foram cultivadas, lisadas e utilizadas com êxito em ensaios de imunoprecipitação. As imunoprecipitações de eIF2 $\alpha$  nas cinco linhagens de co-expressão *Ldi*eIF2 $\alpha$ -HA + eIF2Bs-V5 foram analisadas inicialmente com o anticorpo anti-HA, afim de, confirmar de forma qualitativa a eficiência da purificação dessa proteína. Através desse ensaio foi possível afirmar que eIF2 $\alpha$  foi imunoprecipitado eficientemente seguindo o perfil de expressão conhecido e dentro do peso molecular predito de 47 KDa (Figura 24, A, painel superior).

Paralelamente, também foram testadas as linhagens de co-expressão *Ldi*eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA + eIF2Bs-V5. Assim como o observado para o eif2 $\alpha$  int-HA a IP do eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA foi realizada satisfatoriamente, lembrando que para essa

construção a proteína eIF2 $\alpha$  possui peso molecular de 35 KDa devido a deleção da extensão N-terminal da proteína (Figura 24, B, painel superior)

Vale salientar que as linhagens que expressam eIF2 $\alpha$ -HA proveniente da construção integrada no *locus* cromossômico de origem possuem uma única cópia do gene recombinante no genoma, enquanto as que expressam o mutante eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA são provenientes de uma expressão ectópica em vetor de alto número de cópias. Desta forma, quando comparada quantitativamente a expressão desses dois sistemas, a proteína recombinante pode ser encontrada em maior concentração por célula nas linhagens de expressão episomal, do que naquelas provenientes da expressão da proteína recombinante na construção integrativa.

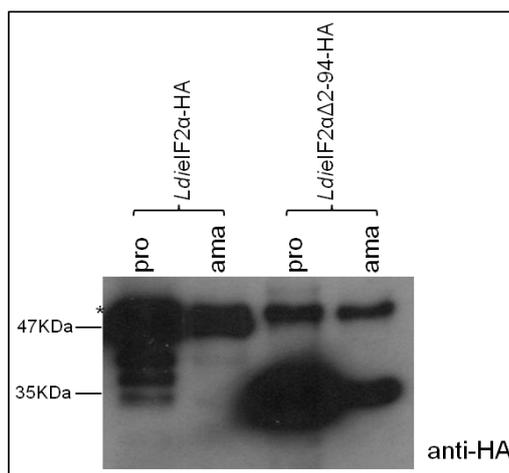
Em conseqüente, objetivando discorrer sobre a capacidade de interação de eIF2 $\alpha$  com as subunidades do complexo eIF2B e traçando as possíveis diferenças encontradas entre a proteína selvagem e sua versão mutagenizada, os imunoprecipitados foram analisados através de *Western-Blot* com anti-corpo anti-V5. Pôde-se inferir que, todas as subunidades de eIF2B interagem com eIF2 $\alpha$ -HA, observado pelas co-purificações evidenciadas nas setas pretas da figura 25, (A) painel inferior. Já para as linhagens de eIF2 $\alpha$  mutante podemos observar a interação de quatro subunidades de eIF2B (eIF2B $\alpha$ , eIF2B $\gamma$ , eIF2B $\delta$  e eIF2B $\epsilon$ ), também apontado em setas pretas na figura 24, (B), painel inferior. Não foi possível, contudo, detectar, através desse experimento a co-purificação da subunidade eIF2B $\beta$  na linhagem *Ld*eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA.



**Figura 24.** Análise das interações entre eIF2 $\alpha$  e as subunidades do complexo eIF2B. (A) IP de eIF2 $\alpha$ -HA em linhagens co-expressando as subunidades de eIF2B-V5; (B) IP de eIF2 $\alpha$   $\Delta$ 2-94 em linhagens co-expressando as subunidades de eIF2B-V5. Nos painéis superiores de cada ensaio, *Western-Blot* anti-HA das imunoprecipitações; Nos painéis inferiores, *Western-Blot* anti-V5 evidenciando as co-purificações. eIF2 $\alpha$ -HA, 47kDa; eIF2 $\alpha$   $\Delta$ 2-94, 35kDa; eIF2B $\alpha$ , 33kDa; eIF2B $\beta$ , 57kDa; eIF2B $\gamma$ , 71kDa; eIF2B $\delta$ , 72kDa; eIF2B $\epsilon$ , 90kDa; Setas pretas apontam a detecção das subunidades de eIF2B co-purificadas; kDa, peso molecular em QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

#### 5.1.4 Caracterização funcional de eIF2 $\alpha$ de *L. infantum* na formação do complexo de iniciação da tradução 43S

As duas linhagens recombinantes de *L. infantum* que expressam eIF2 $\alpha$  nas suas formas selvagem e mutagenizada foram submetidas paralelamente a crescimento de formas promastigotas e diferenciação em amastigotas axênicas. Os crescimentos celulares obtidos, foram lisados, imunoprecipitados, e analisados por *Western-Blot* com anti-corpo anti-HA para a verificação da eficiência de purificação e qualidade do produto imunoprecipitado (Figura 25).



**Figura 25.** *Western-Blot* anti-HA das imunoprecipitações (IP) de eIF2 $\alpha$ . À esquerda, IP anti-HA de eIF2 $\alpha$  em células promastigotas e amastigotas axênicas. À direita, imunoprecipitações anti-HA de eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94 em células promastigotas e amastigotas axênicas; \*, cadeia pesada do IgG anti-HA; eIF2 $\alpha$ -HA, 47KDa; eIF2 $\alpha$   $\Delta$ 2-94, 35KDa; KDa, peso molecular em QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

Os produtos imunoprecipitados foram então enviados à plataforma de análise por espectrometria de massas do *Centre de Recherche en Infectologie/Université Laval-Canada*. Os resultados brutos foram tratados para exclusão de possíveis contaminantes e os dados curados foram analisados comparativamente a fim de identificar a presença de parceiros proteicos co-imunoprecipitados nas diferentes situações descritas, estabelecendo prováveis aspectos diferenciais relacionados à funcionalidade da extensão N-terminal de eIF2 $\alpha$  de tripanossomatídeos. Os resultados tratados das imunoprecipitações de eIF2 $\alpha$  selvagem confirmam a formação clássica do complexo eIF2 como descrito nos demais eucariotos com a ligação forte e específica às proteínas preditas eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\beta$ , tanto em células promastigotas quanto em amastigotas (Tabela 9) Semelhantemente, foi observada também a formação do complexo eIF2 para a proteína mutante eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94.

**Tabela 8.** Detecção da formação de complexos proteicos 43S por IP de eIF2 $\alpha$ .

Proteínas Identificadas	nº acesso TritypDB	Peptídeos exclusivos			
		eIF2 $\alpha$		eIF2 $\alpha$ $\Delta$ 2-94	
		pro.	ama.	pro.	ama.
eIF2 $\alpha$	LinJ.03.0960	26	15	21	8
eIF2 $\gamma$	LinJ.09.1130	10	8	13	3
eIF2 $\beta$	LinJ.08.0570	6	5	6	1
eIF5	LinJ.34.0370	15	6	1	-
eIF2B $\beta$	LinJ.10.1030	2	1	-	-
eIF3 c	LinJ.36.7320	1	1	-	-
eIF3 e	LinJ.28.2480	1	1	-	-
eIF3 i	LinJ.36.4070	-	1	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S18</b>	LinJ.36.0990	3	9	3	3
<b>Proteína ribossomal 40S, S4</b>	LinJ.13.1120	6	7	1	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S13</b>	LinJ.19.0390	-	4	-	3
<b>Proteína ribossomal 40S, S2</b>	LinJ.19.0050	2	8	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S6</b>	LinJ.21.2150	3	5	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S14</b>	LinJ.28.1050	3	4	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S3A</b>	LinJ.35.0400	3	4	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S16</b>	LinJ.26.0840	2	3	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S10</b>	LinJ.36.1040	2	2	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S,15A</b>	LinJ.11.1180	1	3	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S9</b>	LinJ.07.0760	2	2	1	-
<b>Proteína ribossomal 40S, L14</b>	LinJ.22.1370	1	2	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S23</b>	LinJ.21.1300	1	2	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S15</b>	LinJ.22.0310	1	2	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, SA</b>	LinJ.36.5240	2	-	-	-
<b>Proteína ribossomal 40S, S21</b>	LinJ.11.0770	1	1	-	-
<b>LinJ.09.1140</b>	LinJ.09.1140	1	-	-	-

As proteínas listadas foram identificadas pelas análises por espectrometria de massa dos constituintes das IPs de eIF2 $\alpha$ -HA e eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94-HA em células nas fases promastigota e amastigota-axênica de *L. infantum*; - ausência de detecção; KDa, QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

Focando, especificamente, na interação de eIF2 $\alpha$  com os complexos parceiros funcionais mais imediatos, como o eIF2B, que é necessário a ativação de eIF2, e ainda interações com eIF3, eIF5 e proteínas constituintes da

subunidade menor ribossomal 40S, que são imprescindíveis à formação do complexo de pré-iniciação da tradução 43S podemos inferir diferenças importantes entre as linhagens selvagens de eIF2 $\alpha$  e a linhagem mutante (Tabela 9).

As linhagens selvagens demonstram a ocorrência das interações com os complexos parceiros funcionais através da detecção de algumas subunidades representantes dos mesmos. Assim é possível identificar o eIF2 $\alpha$  interagindo com a subunidade  $\beta$  do eIF2, com o eIF5, bem como, com algumas subunidades de eIF3 e mais ainda com inúmeras riboproteínas constituintes da subunidade ribossomal 40S. Em contrapartida, na linhagem expressando o mutante eIF2 $\alpha$  $\Delta$ 2-94, que apresenta deleção da extensão N-terminal, não houve detecção da interação com eIF5 nas formas amastigotas de crescimento. Adicionalmente, não foi possível detectar nenhuma interação ocorrendo com os complexos eIF2B ou eIF3. Mais ainda, houve perda de interação com inúmeras riboproteínas da subunidade 40S ribossomal (Tabela 9).

## **5.2 Evidências da formação de complexos distintos eIF2 em *Leishmania* sp.**

### **5.2.1 Identificação de novo parceiro funcional de eIF2 $\alpha$**

Nos ensaios de imunoprecipitação da proteína eIF2 $\alpha$ -HA nativa de *L. infantum*, foi possível observar a interação específica desse fator de iniciação com a proteína codificada pelo gene "LinJ.09.1140". (Tabela 9). Em estudos prévios realizados por Dr<sup>o</sup> S. Cloutier durante seu doutoramento em Microbiologia sob orientação de Dr<sup>a</sup> B. Papadopoulou na Université Laval, também foi detectado esse tipo de interação, através de super-expressão epissomal ectópica, IP e

espectrometria de massas de eIF2 $\alpha$ -HA (Tabela 10) (Dr<sup>a</sup> Barbara Papadopoulou, comunicação pessoal).

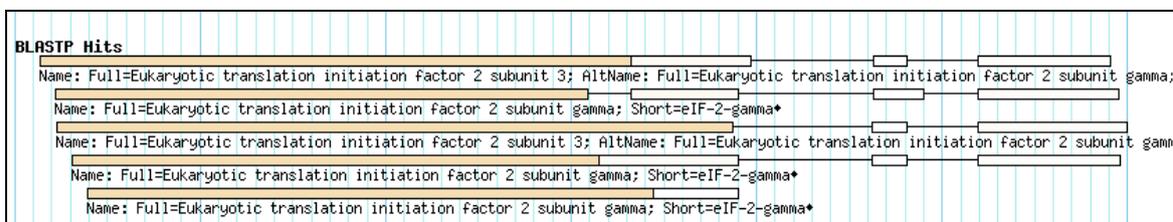
**Tabela 9.** Subunidades do complexo eIF2 em *L. infantum*.

Nº acesso	Descrição TriTrypDB	Peptídeos exclusivos	
		eIF2 $\alpha$ locus endógeno	eIF2 $\alpha$ ectópico *
<b>LinJ.03.0960</b>	eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$	26	36-41
<b>LinJ.08.0570</b>	eukaryotic translation initiation factor eIF2 $\beta$ subunit	6	4-8
<b>LinJ.09.1130</b>	eukaryotic translation initiation factor eIF2 subunit	10	18-28
<b>LinJ.09.1140</b>	translation initiation factor eIF2B $\gamma$ subunit	1	2

As proteínas listadas foram visualizadas por IP de eIF2 $\alpha$ HA; eIF2 $\alpha$  ectópico, análise de IP eIF2 $\alpha$ -HA em linhagem de superexpressão em plasmídeo pSP-BT1-Yneo $\alpha$ -tub; eIF2 $\alpha$  locus endógeno, análise de IP em linhagem de expressão de eIF2 $\alpha$ -HA integrado em locus cromossômico de origem; \*resultados prévios do colaborador Dr. Cloutier, comunicação pessoal; KDa, QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

Surpreendentemente, o produto proteico de “LinJ. 09.1140” é anotado no TryTripDB como “*translation initiation factor eIF2B  $\gamma$  subunit*”. Contudo, através dos dados de bioinformática dos homólogos das subunidade de eIF2B, abordado em tópico anterior, sabe-se que o homólogo predito para a subunidade  $\gamma$  de eIF2B em *L. major* é o designado pelo gene LmjF.28.2440, sintênico ao gene LinJ.28.2620 de *L. infantum*, ambos anotados como codificantes de proteínas hipotéticas. Em adição, foi possível observar que embora esse gene seja denominado no TritypDB como “*translation initiation factor eIF2B  $\gamma$  subunit*” a página do gene nesse mesmo banco de dados mostra que através de alinhamento proteico local (BLASTP) a proteína codificada por “LinJ.09.1140” possui maior similaridade de sequência de aminoácidos com a subunidade eIF2 $\gamma$  do complexo eIF2 de outros eucariotos superiores, indicando que esta seja um

segundo homólogo da subunidade eIF2 $\gamma$  do eIF2 (Figura 26). A descoberta desse novo homólogo exigiu então um maior foco na sua caracterização funcional e suas implicações para a função do eIF2.



**Figura 26.** BLASTP de “LinJ.09.1140” disponibilizado pelo TritypDB. Barras horizontais representam as sequências proteicas com maior similaridade com LinJ.09.1140. Fonte: [http://tritypdb.org/tritypdb/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source\\_id=LinJ.09.1140&project\\_id=TriTrypDB](http://tritypdb.org/tritypdb/showRecord.do?name=GeneRecordClasses.GeneRecordClass&source_id=LinJ.09.1140&project_id=TriTrypDB). Acessado em 13/05/2016.

### 5.2.2 Análise *in silico* dos homólogos de eIF2 $\gamma$ em *Leishmania* sp.

O rastreamento de homólogos de eIF2 $\gamma$  nos genomas disponíveis de organismos da família Trypanosomatidae produziu resultados distintos. Em espécies do gênero *Trypanosoma* foi possível identificar um único gene, semelhante aos demais eucariotos superiores, enquanto que, para *Trypanosoma grayi*, surpreendentemente, foram encontrados dois genes homólogos. Paralelamente, foi possível identificar outros gêneros nessa mesma família que também apresentam duas cópias gênicas. São eles: *Leishmania* sp., *Phytomonas* sp., *Critidia* sp., *Endotrypanum* sp., *Leptomonas* sp..

Os dois genes codificando proteínas homólogas de eIF2 $\gamma$  de tripanosomatídeos estão localizados por sequências dispostas, uma ao lado da outra, no mesmo cromossoma e com sintonia conservada em todas as espécies de *Leishmania* no TritypDB. Em *L. infantum* os eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2 são

representados pelos números de acesso “LinJ.09.1130” e “LinJ.09.1140”, respectivamente (Tabela 11).

**Tabela 10.** Ortólogos de eIF2 $\gamma$  em *Leishmania* spp.

Fator	Nº acesso	Peso molecular (Kda)	Comparação com o ortólogo Humano%		
			Identidade	Similaridade	Cobertura
eIF2 $\gamma$	LmjF.09.1070	53	53	71	94
eIF2 $\gamma$ -2	LmjF.09.1090	65	48	63	84

Identificação dos ortólogos de eIF2 $\gamma$  através de alinhamentos locais nos bancos de dados Genbank e TritypDB.. KDa, QuiloDaltons. Fonte: A Autora, 2016.

Especificamente sobre os dois homólogos em *Leishmania* sp., e usando como base o genoma de *L. major*, observa-se que o homólogo de maior similaridade com o eIF2 $\gamma$  de *Homo sapiens* é o gene “LmjF.09.1070”, anotado previamente como *eukaryotic translation initiation factor 2 subunit*. Estes possuem 53% de identidade e 71% de similaridade entre si. Já o segundo homólogo, denominado nesse trabalho de eIF2 $\gamma$ -2, é o gene identificado pelo número de acesso “LmjF.09.1090”. Este é menos conservado, compartilhando 48% de identidade e 63% de similaridade quando comparado, de mesmo modo, com o ortólogo em humano.

Através de alinhamento local contra o banco de dados NCBI, nota-se a existência e conservação dos três domínios funcionais característicos do eIF2 $\gamma$  clássico tanto no eIF2 $\gamma$  como no eIF2 $\gamma$ -2. Este último, contudo, é mais divergente devido a inclusão de pequenas inserções nos domínios eIF2 $\gamma$ \_II e eIF2\_C e ainda devido a uma grande inserção de aproximadamente 80 nucleotídeos entre esses dois domínios.

### 5.2.2.1 Domínio eIF2<sub>γ</sub>

O domínio eIF2<sub>γ</sub> de ambas as sequências é abrangentemente conservado com os demais eucariotos (Figura 27 A), apresentando manutenção dos sítios responsáveis pela ligação dessa proteína com as moléculas de GTP, Magnésio (*GTP/Mg<sup>2+</sup> binding site*) e Zinco (*Zinc binding site*), e dos sítios de interação funcional com o complexo parceiro eIF2B (*GEF/eIF2B interaction site*), que são sítios primordiais para a funcionalidade dessa proteína. De mesmo modo, a assinatura molecular relacionada a domínios proteicos da alça ligadora de fosfato (*signature motif of phosphate-binding site*) é mantida (Figura 27 B). Essa região é altamente conservada entre os dois homólogos de *L. infantum* com 83% de identidade entre elas.

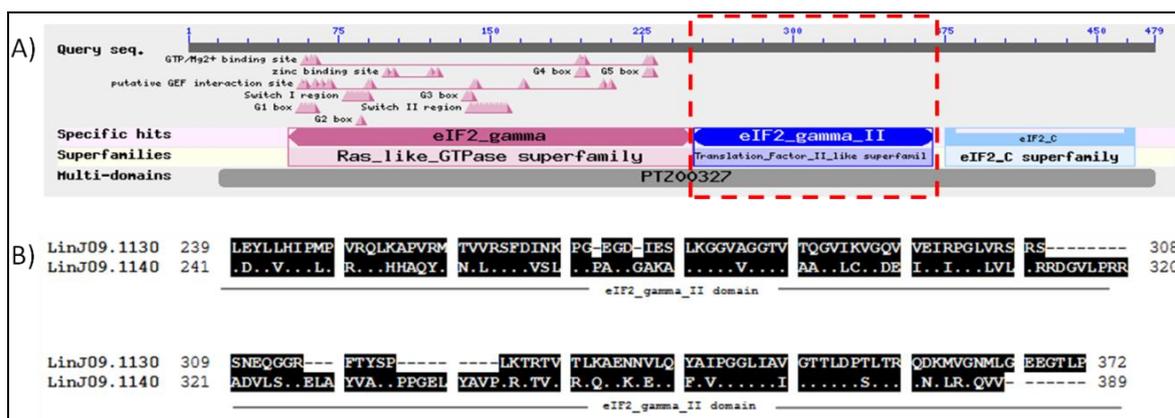


**Figura 27.** Domínio eIF2<sub>γ</sub> dos ortólogos de eIF2<sub>γ</sub> em *L. infantum*. A) Representação ilustrativa do alinhamento proteico local (BLASTP) de eIF2<sub>γ</sub> de *L. infantum* em relação à base de dados do NCBI. A barra cinza numerada indica a posição dos aminoácidos no gene de interesse; a barra magenta delimitada por retângulo vermelho tracejado o domínio eIF2<sub>γ</sub>; pequenos triângulos especificam sítios conservados com consenso eucariótico; B) Alinhamento pareado dos dois ortólogos de eIF2<sub>γ</sub> em *L. infantum*. O "LinJ.09.1130" é o gene codificador de eIF2<sub>γ</sub>, enquanto o "LinJ.09.1140" é o gene codificador do eIF2<sub>γ</sub>-2. Domínios realçados: eIF2<sub>γ</sub> domain, domínio n-terminal ligador de GTP/Mg<sub>2</sub><sup>+</sup>, Zinco, e de interação com eIF2B. Motivos realçados em

amarelo, *GTP/Mg2+* binding site. Motivos realçados em verde, *Zinc binding site*. Motivos demarcados por ↓ *GEF/eIF2B interaction site*; ###, *Switch region*; aminoácidos em vermelho, *signature motif of phosphate-binding site*. Aminoácidos representados com pontos (.) ilustram a similaridade entre as sequências. Fonte: A Autora, 2016.

### 5.2.2.2 Domínio eIF2\_II

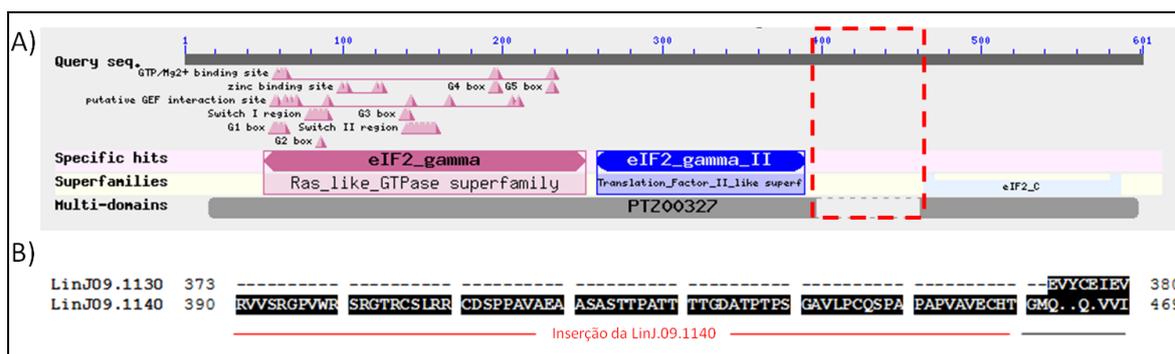
No que concerne ao domínio eIF2 $\gamma$ \_II, do mesmo modo que o anterior, este está presente em ambas as sequências e é conservado na comparação com o eIF2 $\gamma$  dos demais organismos já caracterizados (Figura 28, A e B). Nos eucariotos superiores essa região é composta de um domínio estrutural com conformação em  $\beta$ -barril.



**Figura 28.** Domínio eIF2 $\gamma$ \_II dos ortólogos de eIF2 $\gamma$  em *L. infantum*. A) Representação ilustrativa do alinhamento proteico local (BLASTP) de eIF2 $\gamma$  de *L. infantum* em relação à base de dados do NCBI. A barra azul escura delimitada por retângulo vermelho tracejado o domínio eIF2 $\gamma$ \_II. B) Alinhamento pareado dos dois ortólogos de eIF2 $\gamma$  em *L. infantum*. “LinJ.09.1130”, gene codificador de eIF2 $\gamma$ ; “LinJ.09.1140”, gene de eIF2 $\gamma$ -2; eIF2 $\gamma$ \_II, domínio central estrutural. Aminoácidos representados com pontos (.) ilustram a similaridade entre as sequências. Fonte: A Autora, 2016.

É importante salientar que, imediatamente após o domínio eIF2 $\gamma$ \_II, o ortólogo eIF2 $\gamma$ -2 de *Leishmania* apresenta uma inserção de 72 aminoácidos que não é encontrada nos demais homólogos de eIF2 $\gamma$  já descritos (Figura 29, A e B).

Essa inserção, por si só, não apresenta similaridade com nenhuma sequência conhecida e tampouco demonstra a existência de nenhum motivo e/ou domínio proteico conservado. Em adição, sua estrutura terciária, de mesmo modo, não é compatível com nenhuma estrutura proteica descrita em banco de dados de modelagem molecular.

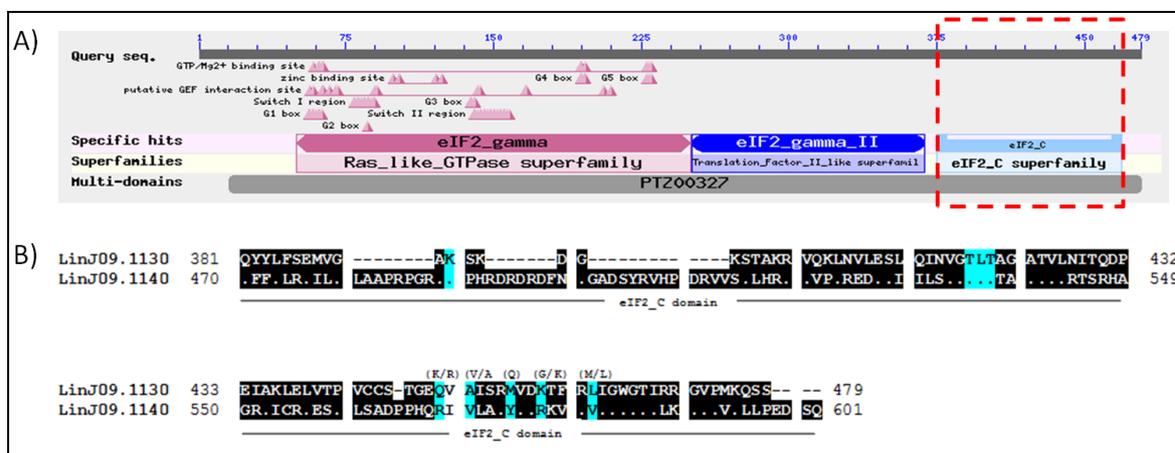


**Figura 29.** Inserção nucleotídica do ortólogo eIF2 $\gamma$ -2 em *Leishmania* spp. A) Representação ilustrativa do alinhamento proteico local (BLASTP) de eIF2 $\gamma$  de *L. infantum* em relação à base de dados do NCBI. O retângulo vermelho tracejado indica a inserção de aminoácidos presente no ortólogo eIF2 $\gamma$ -2; B) Alinhamento pareado dos dois ortólogos de eIF2 $\gamma$  em *L. infantum*. “LinJ.09.1130”, gene codificador de eIF2 $\gamma$ ; “LinJ.09.1140”, gene de eIF2 $\gamma$ -2; Inserção da Linj09.1140, inserção no ortólogo eIF2 $\gamma$ -2 presente entre os domínios eIF2\_gamma\_II e eIF2\_C. Aminoácidos representados com pontos (.) ilustram a similaridade entre as sequências Fonte: A Autora, 2016.

### 5.2.2.3 Domínio eIF2\_C

O domínio do eIF2 $\gamma$  responsável pela ligação com o tRNA iniciador (*tRNA binding site*), o eIF2\_C, pôde ser claramente identificado nos dois homólogos de eIF2 $\gamma$  de *Leishmania*, mesmo sendo o domínio menos conservado. As proteínas de *L. infantum* apresentam 32% de identidade entre si, e quando comparadas ao homólogo humano apresentam importantes substituições nos aminoácidos descritos para a sequência consenso no sítio ligador de tRNA clássico. Adicionalmente, esses ortólogos também possuem diferenças entre si nessa

região resultando em sequências consenso diferentes para os sítios ligadores de tRNA de cada eIF2 $\gamma$  de *L. infantum* (Figura 30 A e B).



**Figura 30.** Domínio eIF2\_C dos ortólogos de eIF2 $\gamma$  em *L. infantum*. A) Representação ilustrativa do alinhamento proteico local (BLASTP) de eIF2 $\gamma$  de *L. infantum* em relação à base de dados do NCBI. A barra azul clara delimitada por retângulo vermelho tracejado, domínio eIF2\_C. B) Alinhamento pareado dos dois ortólogos de eIF2 $\gamma$  em *L. infantum*. “LinJ.09.1130”, gene codificador de eIF2 $\gamma$ ; “LinJ.09.1140”, gene de eIF2 $\gamma$ -2; eIF2\_C, domínio de ligação ao tRNA; Aminoácidos realçados em azul, tRNA binding site. Aminoácidos entre parênteses, consenso nos demais eucariotos. Aminoácidos representados com pontos (.) ilustram a similaridade entre as sequências. Fonte: A Autora, 2016.

### 5.2.3 Relação evolutiva entre os homólogos de eIF2 $\gamma$ em tripanossomatídeos

Para a análise das relações evolutivas entre os dois homólogos de eIF2 $\gamma$ , foram utilizadas sequências proteicas de 16 espécies representando a maioria dos diferentes gêneros até então descritos para a família Trypanosomatidae. Para o gênero *Leishmania* foram utilizadas três espécies do sub-gênero *Leishmania*: *L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana* e uma espécie do subgênero *Vianna*: *L. braziliensis*. Também foram inclusos os seguintes gêneros/ subgêneros: *Sauroleishmania*, representado pela espécie *L. tarentolae*; *Endotrypanum*, espécie *E. monterogeii*; *Chritidia*, espécie *C. fasciculata*; *Leptomonas*, espécies *L. pyrrocoris* e *L. seymouri*; e o gênero *Trypanosoma* com as espécies *T. brucei*, *T.*

*cruzi*, *T. vivax*, *T. congolenses* e *T. grayi*. Como grupo externo utilizou-se *Bodo saltans*, uma espécie representante da família Bodonidae, ancestral imediato dos tripanossomatídeos.

Empregou-se para esse estudo critérios de agrupamento utilizando modelos probabilísticos em concordância com o acúmulo de mutações ocorrido durante a evolução das proteínas em questão. Salienta-se que, para realização dessa metodologia é primordial utilizar somente as regiões que as proteínas compartilham entre si. Portanto, no presente ensaio, as inserções encontradas na sequência de eIF2 $\gamma$ -2, foram removidas durante a etapa inicial de alinhamento global das sequências.

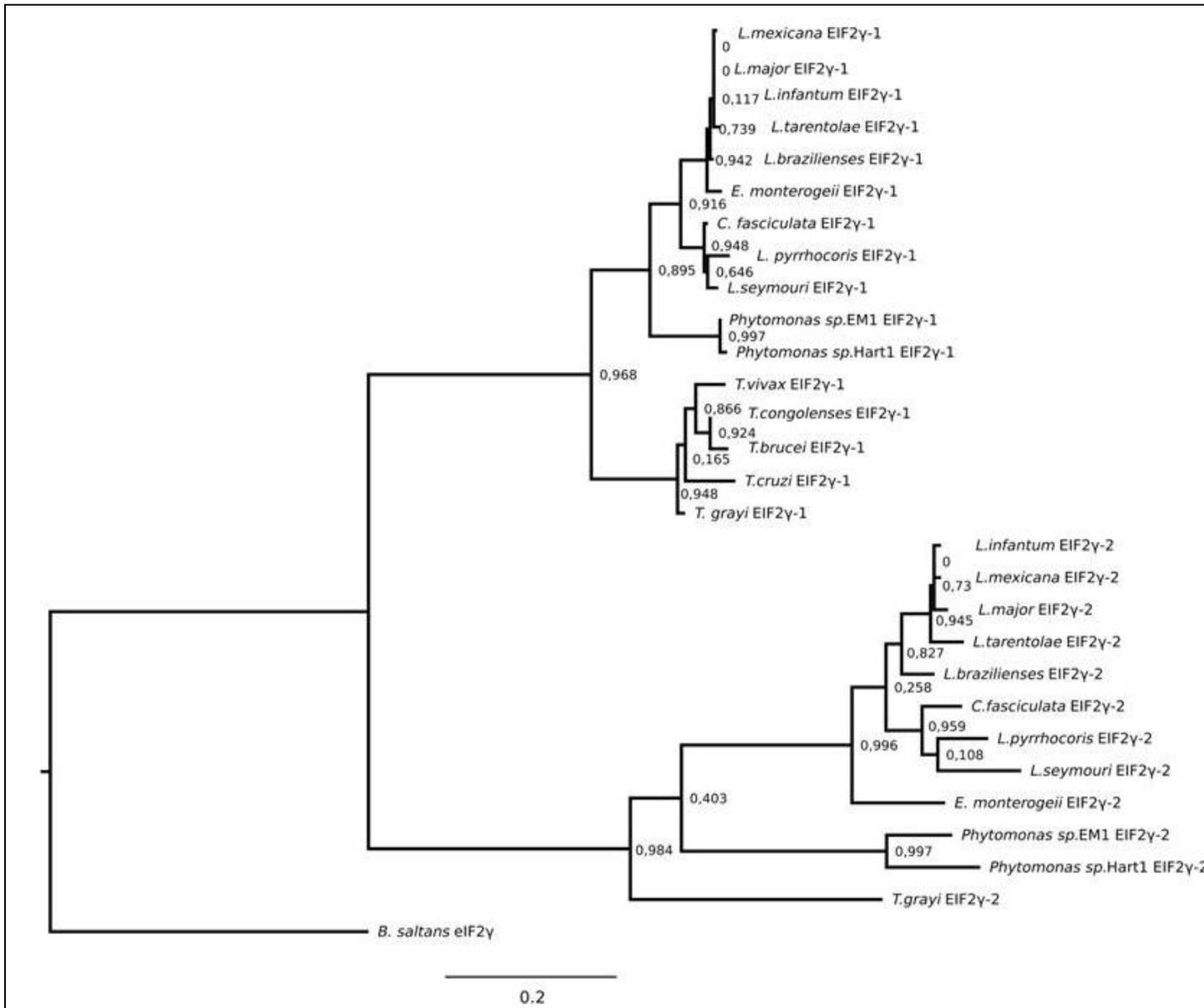
Através dessa análise foi possível resolver evolutivamente as divergências existentes entre essas sequências e de posse da árvore filogenética pôde-se inferir inicialmente que a mesma se divide em dois grandes clados (Figura 31). O primeiro ramo agrupa os ortólogos do eIF2 $\gamma$  clássico das diferentes espécies estudadas, assumindo que este conserva as funções originais da proteína eIF2 $\gamma$  clássica. Observa-se, claramente que esse ramo se expande em duas subdivisões que agrupam os organismos do gênero *Trypanosoma* separadamente dos demais Tripanossomatídeos (Figura 31, ramo azul).

Um segundo ramo existente agrupa todos os ortólogos de eIF2 $\gamma$ -2. Contudo nesse ramo houve maior acúmulo de mutações nas sequências de eIF2 $\gamma$ -2, refletido numa maior divergência entre os ortólogos dentro do mesmo gênero (Figura 31, ramo vermelho).

Os eucariotos superiores possuem uma única cópia de eIF2 $\gamma$  em seu genoma, o que se observa também para os organismos evolutivamente aproximados à família Trypanosomatidae, uma vez que a busca em banco de

dados de sequências genômicas de organismos evolutivamente relacionados como *B. saltans* (representante dos Metakinetoplastideos), *Perkinsela* sp. (representando os Protokinetoplastideos), e mais distante, *Giardia lamblia* (organismo presente na raiz da ordem Excavata), resultu na detecção de somente uma cópia de eIF2 $\gamma$ . Portanto, pode-se afirmar que durante a evolução dos Kinetoplastideos ocorreu um evento de duplicação gênica exclusivamente na família Trypanosomatidae. Entretanto, vale lembrar que no gênero *Trypanosoma*, somente *T. grayi* possui ambas as cópias de eIF2 $\gamma$ , ou seja, posteriormente ao evento de duplicação ocorrido nos tripanossomatideos ocorreu um evento de perda no gênero *Trypanosoma*, especificamente no ramo filogenético delimitado pelos organismos mais derivados desse gênero.

Por tudo, a partir dos dados dessa análise filogenética dos homólogos de eIF2 $\gamma$  pode-se afirmar que o gene eIF2 $\gamma$ -2 surgiu após provável evento único de duplicação gênica de eIF2 $\gamma$  na família Trypanosomatidae, gerando parálogos que evoluíram separadamente, de forma que, para um gene houve a conservação majoritária da sequência do eIF2 $\gamma$  eucariótico, sugerindo provável manutenção da função proteica. Já para o segundo gene, eIF2 $\gamma$ -2, ocorreu um acúmulo de mutações e inserções refletindo na maior divergência desse com a sequência consenso eucariótica.



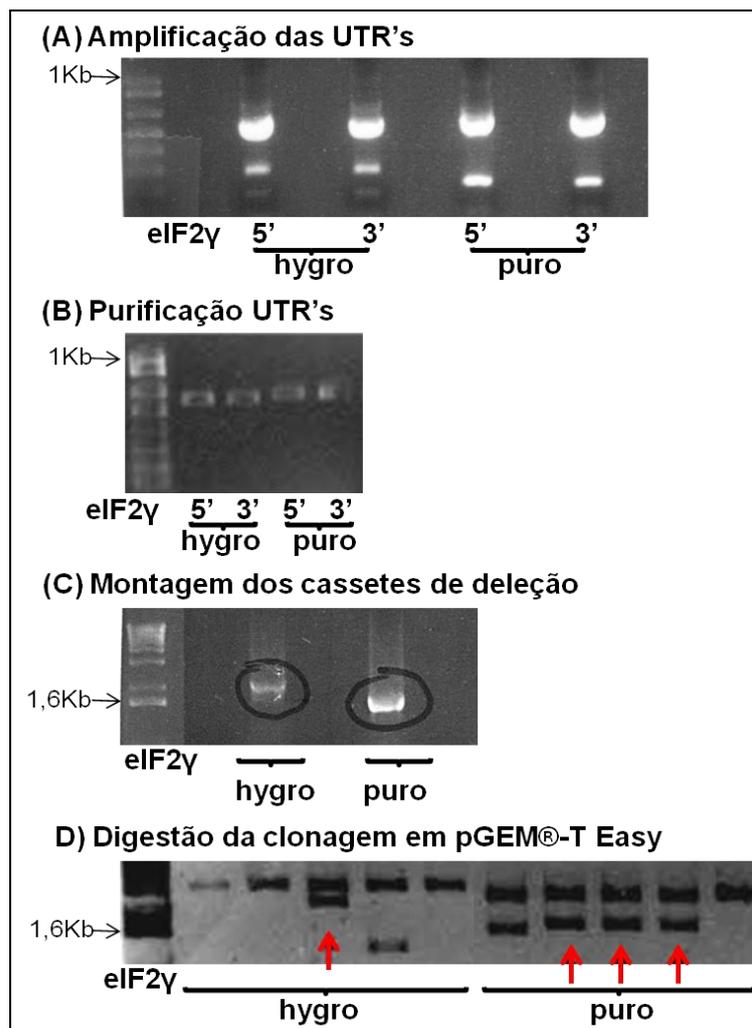
**Figura 31.** Relação evolutiva dos parálogos de eIF2γ na família Trypanosomatidae. Clado superior, agrupamento dos ortólogos de eIF2γ; Clado abaixo, agrupamento dos ortólogos de eIF2γ-2. Árvore de máxima verossimilhança baseada no alinhamento das sequências conservadas dos homólogos de eIF2γ de organismos das famílias Trypanosomatidae e Bodonidae. Valores de sustentação são mostrados próximos aos respectivos ramos. Fonte: A Autora, 2016.

#### 5.2.4 Essencialidade dos homólogos de eIF2 $\gamma$ em *Leishmania sp.*

Diante das evidências dos dados filogenéticos que apontam para a divergência entre eIF2 $\gamma$  e seu parálogo em tripanossomatídeos, eIF2 $\gamma$ -2, objetivou-se investigar sobre a essencialidade de cada um dos genes em questão para a sobrevivência e desenvolvimento celular. Para tal, foram realizados ensaios de deleção gênica e complementação para ambos.

Inicialmente foi necessário construir os cassetes de deleção por PCR de fusão, para isso *primers* foram desenhados baseados nas regiões não traduzidas de ambos genes e as UTRs foram amplificadas por PCR (Figura 32, A). Em seguida os *amplicons* gerados foram purificados (Figura 32, B), quantificados e utilizados em nova reação de PCR em reação de fusão propriamente dita, onde o as regiões 5' e 3' UTR são montadas juntamente com os genes de resistência aos antibióticos, higromicina ou puromicina, formando o cassete de deleção desejado (Figura 32, C). Tais construções foram clonadas em plasmídeo de passagem pGem-T Easy, rastreadadas por digestão enzimática e confirmadas quanto à integridade do fragmento obtido por sequenciamento nucleotídico automatizado (Figura 32, D) .

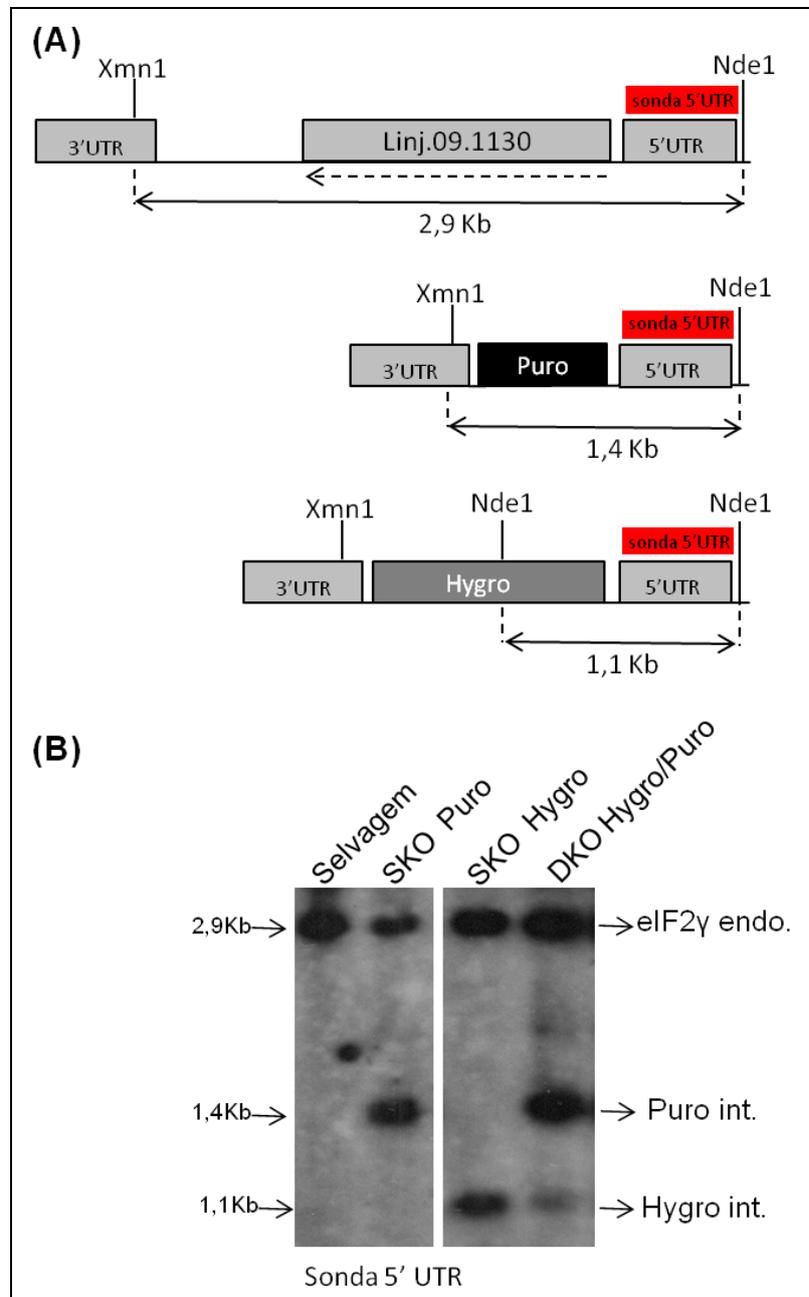
Os cassetes corretamente confirmados foram utilizados em ensaios de transfecção de células selvagens de *L. infantum*, para a obtenção das possíveis linhagens haplóides e/ou linhagens nulas para os genes eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2.



**Figura 32.** Etapas de amplificação e clonagem de cassetes de deleção de eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2. (A), Amplificação das regiões 5' e 3' UTR. (B), Purificação dos fragmentos amplificados por PCR. (C) PCR de fusão entre os fragmentos purificados para a obtenção do cassete de deleção completo. (D) Digestão enzimática (*Eco* RI) das clonagens dos cassetes em vetor pGEM®-T-Easy. Setas vermelhas apontam as construções corretamente confirmadas por digestão e sequenciamento; Hygro, Higromicina; Puro, Puromicina; Kb, Quilobases. Fonte: A Autora, 2016.

Especificamente para a deleção de uma cópia gênômica de eIF2 $\gamma$ , o ensaio resultou na geração de duas linhagens haplóides viáveis e resistentes aos antibióticos empregados, a primeira, *Ld*/SKOeIF2 $\gamma$  resistente à puromicina, e a segunda *Ld*/SKOeIF2 $\gamma$  resistente à higromicina. O êxito das deleções gênicas de um alelo foi acessado através de ensaios de *Southern-Blot*, através dos quais se confirmou a correta deleção do gene em questão, e ainda, a inserção do cassete

de deleção dentro do contexto cromossômico adequado, como explicitado na Figura 33.



**Figura 33.** Geração de linhagens mutantes de *L. infantum* haplóides para o gene eIF2 $\gamma$ . (A) Representação esquemática do *locus* cromossômico de eIF2 $\gamma$  selvagem e das substituições gênicas geradas por integração das marcas de resistência à puomicina (Puro) e higromicina (Hygro), mostrando os sítios de restrição para as enzimas Xmn1 e Nde1, bem como o tamanho do fragmento gerado após hibridização com a sonda ancorada na região 5' UTR de eIF2 $\gamma$ . (B) *Southern-Blot* com sonda 5' UTR, demonstrando o padrão obtido para a célula selvagem (*L. infantum*), confirmando a geração de linhagens haplóides para eIF2 $\gamma$  (*Ld*/SKOeIF2 $\gamma$ ) pela

integração de higromicina (Hygro int.) e puromicina (Puro int.) e analisando a geração de provável linhagem nula (*LdiDKOeIF2γ*). eIF2γ endo, gene eIF2γ no *locus* cromossômico de origem; Kb, Quilobases. Fonte: A Autora, 2016.

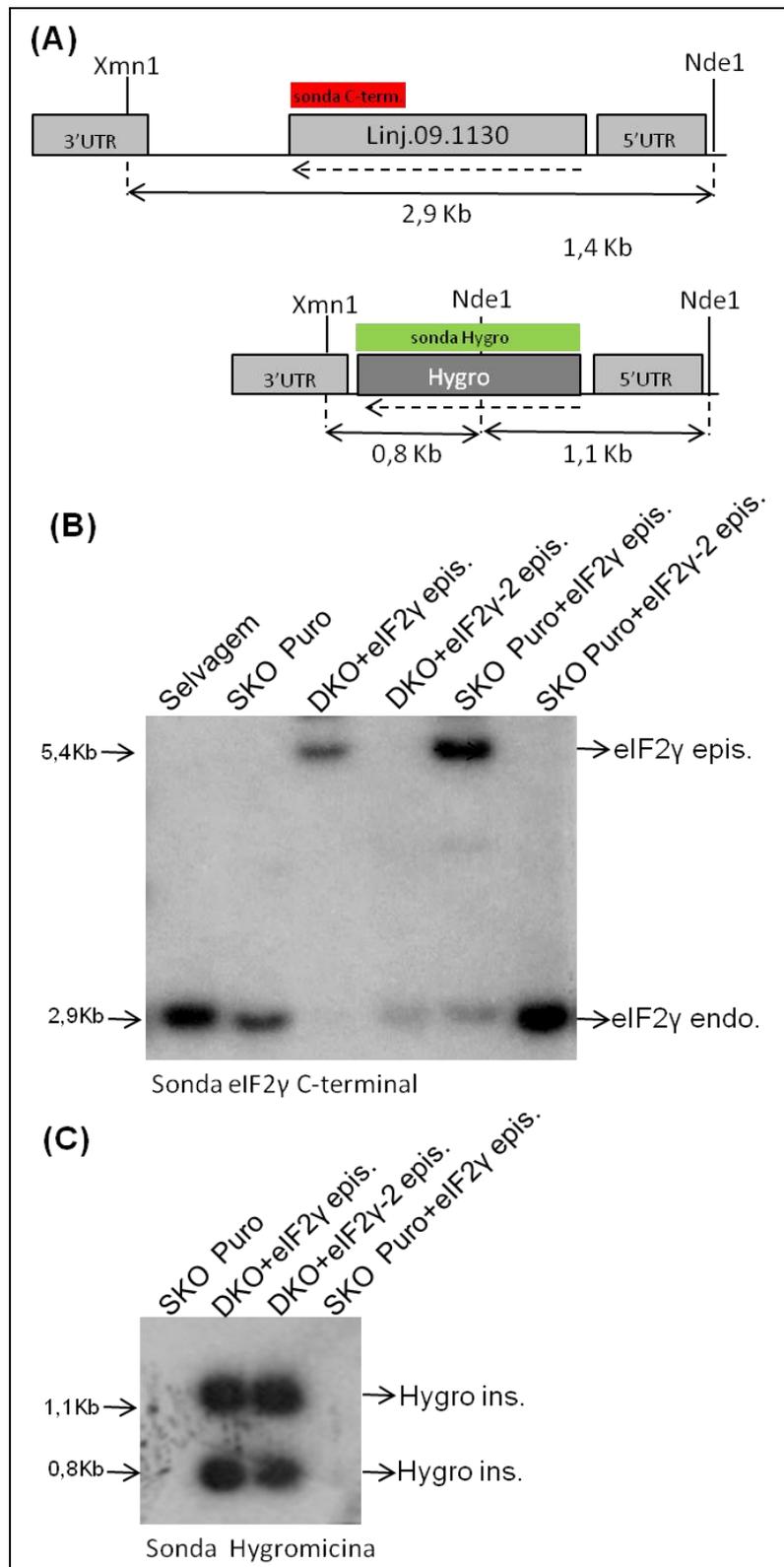
Subsequentemente, empregou-se a linhagem *LdiSKOeIF2γ* resistente à higromicina para a tentativa de geração de linhagem nula para eIF2γ, ou seja, tal cultura foi submetida à nova etapa de transfecção, agora com cassete de deleção gênica contendo a marca de resistência à puromicina, resultando assim, na possível geração de linhagem nula *LdiDKOeIF2γ*, em que ambos alelos de eIF2γ estariam deletados por substituição dos mesmos por genes de resistência aos antibióticos.

As etapas de transfecção e seleção concomitantemente com os dois antibióticos foram realizadas com sucesso, contudo durante ensaio confirmatório da deleção e integração das marcas de seleção por *Southern-Blot*, foi possível observar que, embora as marcas de seleção tenham sido integradas nos *loci* cromossômicos de interesse, não foi possível observar a deleção do gene eIF2γ, resultado evidenciado pela presença do alelo endógeno remanescente nas células *LdiDKOeIF2γ*. Desse modo, não foi possível selecionar linhagens mutantes verdadeiramente deletórias para eIF2γ em células de *L. infantum*. Esse resultado sugere que o gene em questão é essencial para a sobrevivência celular devido a incapacidade de geração da linhagem nula.

Ainda almejando discorrer sobre a essencialidade de eIF2γ na fisiologia celular, bem como inferir sobre a existência de redundância entre as funções dos parálogos eIF2γ e eIF2γ-2, iniciou-se uma estratégia de ensaios de complementação.

O ensaio de complementação de eIF2 $\gamma$  foi realizado com êxito, e para tal, iniciou-se com a linhagem obtida e confirmada anteriormente, *LdiSKOeIF2 $\gamma$*  resistente a higromicina. Essa linhagem foi submetida a ensaios de complementação independentes com os genes eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2, clonados em vetor de expressão em *Leishmania*. Resultou-se em duas linhagens distintas *LdiSKOeIF2 $\gamma$  + eIF2 $\gamma$ -HA* e *LdiSKOeIF2 $\gamma$  + eIF2 $\gamma$ -2-HA*, essas linhagens foram selecionadas pela adição de antibiótico contido na marca de seleção plasmidial. Essas duas linhagens complementadas e selecionadas foram, agora, submetidas à nova transfecção objetivando deleção da outra cópia de eIF2 $\gamma$  cromossômica. Após a transfecção foi possível recuperar parasitos por seleção das culturas pela adição de higromicina, resultando na recuperação de prováveis linhagens *LdiDKOeIF2 $\gamma$  + eIF2 $\gamma$ -HA* e *LdiDKOeIF2 $\gamma$  + eIF2 $\gamma$ -2-HA*.

Embora as linhagens estejam devidamente selecionadas foi necessário investigar por *Southern-Blot* a confirmação da deleção do gene endógeno e ainda confirmar a complementação episomal. Por tanto, tal ensaio foi realizado exitosamente e demonstraram que a linhagem *LdiDKOeIF2 $\gamma$  + eIF2 $\gamma$ -HA* foi obtida com sucesso, ou seja, foi possível realizar a deleção de ambas as cópias de eIF2 $\gamma$  mediante adição de cópia episomal do mesmo gene, corroborando assim com a afirmação que o gene eIF2 $\gamma$  é essencial ao metabolismo celular. Contrariamente, nas células complementadas com o parálogo eIF2 $\gamma$ -2 não foi possível acessar a dupla deleção de eIF2 $\gamma$  em células promastigotas de *L. infantum*, assim sinalizando que, embora esses genes sejam homólogos, a função proteica de eIF2 $\gamma$  não pode ser substituída por seu parálogo eIF2 $\gamma$ -2. Desse modo, esses resultados contribuem para a sugestão de que esses genes assumem funções distintas na fisiologia celular (Figura 34).



**Figura 34.** Geração de linhagens mutantes de *L. infantum* nulas para o gene eIF2 $\gamma$ . (A) Representação esquemática do *locus* cromossômico de eIF2 $\gamma$  selvagem e da substituição gênica gerada por integração da marca de resistência à higromicina (Hygro), mostrando os sítios de

restrição para as enzimas Xmn1 e Nde1, bem como o tamanho do fragmento gerado após hibridização com as sonda ancorada na região C-terminal de eIF2 $\gamma$ . (B) *Southern-Blot* com sonda C-terminal, confirmando os genótipos das linhagens haploide para eIF2 $\gamma$  (*LdiSKOeIF2 $\gamma$* ) e das linhagens complementadas com eIF2 $\gamma$  ou eIF2 $\gamma$ -2, (*LdiSKOeIF2 $\gamma$*  + eIF2 $\gamma$ -HA e *LdiSKOeIF2 $\gamma$*  + eIF2 $\gamma$ -2-HA) e analisando a provável dupla deleção de eIF2 $\gamma$  nas linhagens complementadas (*LdiDKOeIF2 $\gamma$*  + eIF2 $\gamma$ -HA e *LdiDKOeIF2 $\gamma$*  + eIF2 $\gamma$ -2-HA). eIF2 $\gamma$  endo, gene eIF2 $\gamma$  no locus cromossômico de origem; eIF2 $\gamma$  epis., gene eIF2 $\gamma$  ectópico episomal. (C) *Southern-Blot* com sonda ancorada no gene de resistência a higromicina confirmando a correta integração do gene de resistência à higromicina linhagens nulas para eIF2 $\gamma$  e complementadas (*LdiDKOeIF2 $\gamma$*  + eIF2 $\gamma$ -HA e *LdiDKOeIF2 $\gamma$*  + eIF2 $\gamma$ -2-HA). Kb, Quilobases; Fonte: A Autora, 2016.

### 5.2.5 Identificação das interações funcionais de eIF2 $\gamma$ e eIF $\gamma$ -2

Para a identificação das interações de eIF2 $\gamma$  e eIF $\gamma$ -2 de *L. infantum*, células promastigotas super-expressando esses fatores, *L. di* eIF2 $\gamma$ -HA e *Ldi* eIF2 $\gamma$ -2-HA, respectivamente, foram cultivadas, lisadas e imunoprecipitadas. Estes ensaios foram realizados em duplicata para confiabilidade das informações geradas. O produto dos imunoprecipitados foram então enviados para espectrometria de massa para a identificação de proteínas que co-precipitaram com os dois parálogos de eIF2 $\gamma$ .

A partir da análise dos produtos de imunoprecipitação identificados foi possível observar que ambos os parálogos são capazes de interagir com os parceiros funcionais diretos, eIF2 $\alpha$  e eIF2 $\beta$ , para a constituição do complexo eIF2 de acordo com sua conformação clássica eucariótica. Interessantemente, contudo, o eIF2 $\gamma$  e o eIF2 $\gamma$ -2 não interagem entre si (Tabela 12). Dessa forma, fica claro que existe a formação de dois complexos do tipo eIF2 ocorrendo nas células promastigotas de *L. infantum*.

Externamente aos parceiros diretos, podemos observar que os dois parálogos tem capacidade de interagir com o fator eIF5. Em contrapartida, o fator eIF2 $\gamma$ -2 interage com o complexo eIF2B, enquanto para o eIF2 $\gamma$  não foi possível

detectar esse tipo de interação. Um segundo parceiro investigado foi o complexo eIF3 que durante a iniciação da tradução interage com o eIF2 e também possibilita o recrutamento do ribossomo ao RNA mensageiro maduro. Através dos ensaios de imunoprecipitação realizados aqui foi possível visualizar a interação de ambos os parálogos com diversas subunidades de eIF3, demonstrando assim que ambos os complexos formados devam estar participando na síntese proteica.

**Tabela 11.** Identificação de parceiros funcionais de eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2.

Proteínas Identificadas	GeneDB nº	PM	Peptídeos exclusivos	
			eIF2 $\gamma$	eIF2 $\gamma$ -2
<b>Complexo eIF2</b>				
eIF2 $\gamma$	LinJ.09.1130	53 kDa	19	-
eIF2 $\gamma$ -2	LinJ.09.1140	65 kDa	-	13
eIF2 $\alpha$	LinJ.03.0960	47 kDa	30	19
eIF2 $\beta$	LinJ.08.0570	38 kDa	17	10
<b>Complexo eIF2B</b>				
eIF2B $\beta$	LinJ.10.1030	58 kDa	-	2
eIF2B $\gamma$	LinJ.28.2620	71 KDa	-	2
eIF2B $\delta$	LinJ.27.1090	71 kDa	-	2
EIF2B $\epsilon$	LinJ.28.2460	90 kDa	-	2
<b>eIF5</b>	LinJ.34.0370	43 kDa	32	12
<b>Complexo eIF3</b>				
eIF3 subunidade a	LinJ.17.0010	88 KDa	34	12
eIF3 subunidade b	LinJ.17.1390	81 kDa	28	7
elf3 subunidade c	LinJ.36.7320	82 kDa	33	9
eIF3 subunidade d	LinJ.30.3080	61 kDa	17	4
eIF3 subunidade e	LinJ.28.2480	46 kDa	26	11
eIF3 subunidade f	LinJ.25.1670	37 kDa	12	4
eIF3 subunidade g	LinJ.34.2530	29 KDa	12	2
eIF3 subunidade h	LinJ.07.0710	38 kDa	18	12
elf3 subunidade i	LinJ.36.4070	39 kDa	15	10
elf3 subunidade k	LinJ.32.2330	26KDa	13	4
eIF3 subunidade l	LinJ.36.0270	63 kDa	26	7

As proteínas listadas foram identificadas por espectrometria de massa das IPs de eIF2 $\gamma$ - HA e eIF2 $\gamma$ -2-HA em células nas fases promastigota de *L. infantum* super-expressando esses fatores; KDa, QuiloDaltons.

## 6. Discussão

O papel do eIF2 e do eIF2B no processo de iniciação da tradução dos eucariotos superiores é um tema vastamente estudado e que vem sendo investigado como promissora ferramenta ao desenvolvimento e implementação de terapias anti-tumorigênicas (Joshi et al. 2013; Koromilas and Mounir 2013; Koromilas 2014). Nos eucariotos superiores, diferentes tipos de estresse convergem para estímulos da via de regulação por fosforilação do eIF2 $\alpha$ , acarretando na diminuição da taxa global de síntese proteica, porém aumentando a expressão de mRNAs associados à adaptação ao estresse (Holcik and Sonenberg 2005a; Jackson et al. 2010). Durante o processo de infecção a *Leishmania* é internalizada pelos macrófagos do hospedeiro vertebrado sofrendo forte estresse celular relacionado às mudanças de temperatura e pH, sendo necessária uma rápida adaptação para que ocorra a diferenciação do parasito (Besteiro et al. 2007; McConville et al. 2007). Sabe-se que em *L. infantum*, a fosforilação de eIF2 $\alpha$  coincide com a diminuição da taxa de tradução global durante o processo de diferenciação nesses organismos (Cloutier et al. 2012); Além disso, a ausência da expressão do homólogo da PERK quinase causa diminuição da fosforilação de eIF2 $\alpha$ , e as linhagens submetidas ao estresse de diferenciação tem o processo de adaptação deficitário (Chow et al. 2011).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal compreender o comportamento do complexo eIF2 *in vivo*, focando na análise da expressão da subunidade eIF2 $\alpha$  endógena durante o crescimento e diferenciação de *L. infantum*, bem como, confirmar a provável participação desse fator na iniciação da síntese proteica. Além disso, buscou-se confirmar as interações funcionais com os fatores de iniciação parceiros na tradução, investigando a

existência de possíveis interações diferenciais ocorrendo nesses organismos. Inicialmente, foi possível demonstrar que a proteína eIF2 $\alpha$  endógena é expressa tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas de *L. infantum*, sendo observada majoritariamente com 47KDa, peso relativo a proteína em tamanho integral. Também, observou-se em menor intensidade isoformas de menor peso molecular. Esse aparente padrão semelhante à clivagem não foi especificamente associado a nenhuma forma evolutiva.

Em trabalho prévio, Cloutier 2012b afirmou que o eIF2 $\alpha$  sofre um drástico processo de clivagem estágio-específico em células promastigotas, contudo a expressão de eIF2 $\alpha$ , no citado trabalho, foi analisada mediante sua super-expressão proteica proveniente de construção em vetor episomal (Cloutier 2012b). De acordo com o resultado aqui obtido, o mecanismo de clivagem de eIF2 $\alpha$  pode ser confirmado ocorrendo nas células selvagens de *L. infantum*, contudo existe incongruência nos dados relativos à existência de um padrão de clivagem estágio específico, muito provavelmente relacionada as aberrantes concentrações acessadas durante a super-expressão ectópica.

Funcionalmente, o eIF2 $\alpha$  dos eucariotos superiores participa ativamente junto com o tRNA iniciador e com GTP na formação do complexo ternário (TC). Esse, por sua vez, irá se associar a eIF5, eIF3 e a subunidade 40S para o constituição do complexo 43S de pré-iniciação (Jackson et al. 2010). O complexo eIF2 já havia sido abordado *in silico* e *in vitro* em diferentes espécies de tripanossomatídeos, especificamente em trabalhos que analisaram a fosforilação da subunidade eIF2 $\alpha$  e as características fenotípicas associadas a esta durante crescimento e diferenciação dos parasitos (Chow et al. 2011; Tonelli et al. 2011; Avila et al. 2016), contudo a funcionalidade do complexo eIF2, durante a iniciação

da tradução propriamente dita, ainda não havia sido confirmada. No presente estudo, a funcionalidade do homólogo de eIF2 $\alpha$  em células promastigotas de *Leishmania* foi avaliada mediante purificação de frações ribossomais onde o eIF2 $\alpha$  em seu tamanho integral de 47KDa, foi co-purificado em todas as diferentes frações ribossomais, mas se mostrou majoritariamente presente na fração contendo as subunidades menor ribossomal, 40S. Relembrando que, embora seja relatado a clivagem de eIF2 $\alpha$  em células promastigotas de *L. infantum* (Cloutier 2012b), no ensaio de interação polissomal, o eIF2 $\alpha$  foi detectado integralmente, ou seja, expressando a extensão N-terminal característica de Tripanossomatídeos.

Assim como todas as proteínas G, o eIF2 necessita ser reciclado quanto sua ligação ao GDP/GTP, e o complexo eIF2B é o responsável por essa troca nucleotídica. Esse processo é amplamente conhecido em eucariotos superiores (Pavitt 2005; Jennings and Pavitt 2014) contudo, não existem dados relativos ao complexo eIF2B de tripanossomatídeos. Os genes identificados *in silico* para eIF2B de *L. infantum* foram expressos e avaliados quanto à capacidade de interação, *in vivo*, com o eIF2 $\alpha$  selvagem. Dessa forma, confirmou-se que os homólogos identificados são funcionalmente ativos quanto sua capacidade de interação com o eIF2 $\alpha$ . Interessantemente, nesse ensaio também se utilizou uma versão ectópica de eIF2 $\alpha$  mutante apresentando deleção da extensão N-terminal ( $\Delta$ 2-94), e se observou que a ausência da porção N-terminal resultou numa drástica diminuição da capacidade de interação com os componentes do complexo eIF2B.

Dando continuidade a caracterização das interações funcionais de eIF2 $\alpha$ , foi realizada uma abordagem paralela visando analisar em amplo espectro as

interações funcionais realizadas por este em linhagens de *L. infantum*. Para tal, versões selvagem e mutante ( $\Delta 2-94$ ) de eIF2 $\alpha$  foram analisadas por espectrometria de massas, sendo possível confirmar as interações do eIF2 $\alpha$  selvagem com os parceiros na formação do complexo eIF2, e com os complexos parceiros eIF5 e eIF2B e eIF3. Nesta análise, também foi demonstrada sua capacidade de interação com as proteínas 40S ribossomais. Pode-se afirmar, portanto que o comportamento do eIF2 $\alpha$  de *L. infantum* frente as interações funcionais é semelhante ao já vastamente estudado em mamíferos (Pestova et al. 2001; Pavitt 2005; Holcik and Sonenberg 2005b; Singh et al. 2006; Jennings and Pavitt 2014). Contudo, a versão mutante de eIF2 $\alpha$  ( $\Delta 2-94$ ) se comportou de maneira divergente, uma vez que, embora seja possível visualizar a formação do complexo eIF2, a capacidade de interação com os parceiros funcionais é alterada, já que, não foi possível detectar interações *in vivo* com eIF2B e eIF3. Adicionalmente, foi observada uma grande redução na detecção de eIF5 e das proteínas menores ribossomais. De posse desse conjunto de resultados, referentes à versão mutante truncada de eIF2 $\alpha$  ( $\Delta 2-94$ ), sugere-se então que a extensão N-terminal do eIF2 $\alpha$  de tripanossomatídeos esteja relacionada com a estabilização das interações entre o eIF2 $\alpha$  e seus parceiros funcionais, embora nenhum provável sítio de interação funcional tenha sido mapeado nessa extensão.

Baseado nos resultados prévios da caracterização de eIF2 $\alpha$  e através dos resultados obtidos nesse trabalho, sugere-se um modelo adaptado da regulação do eIF2 na tradução de *L. infantum*, detalhadamente: Nas células amastigotas, que são submetidas a forte estresse de temperatura e pH, os estímulos convergem para a fosforilação inibitória de eIF2 $\alpha$ , resultando a diminuição na taxa

global de tradução proteica (Chow et al. 2011; Cloutier et al. 2012a), de forma similar ao modelo mamífero (Sudhakar et al. 2000; Jackson et al. 2010; Jennings and Pavitt 2014). Já nas células promastigotas, onde há alta taxa de tradução, o eIF2 $\alpha$  será expresso e funcionalmente ativo na biossíntese proteica em seu tamanho integral (47KDa) (Cloutier 2012b). Adicionalmente, o eIF2 $\alpha$  pode ser dirigido a clivagem da extensão N-terminal, resultando na perda da função biológica e interações funcionais. Tal clivagem, é claramente observada durante super-expressão ectópica de eIF2 $\alpha$  e sugere que, assim como observado para outros fatores de iniciação da tradução de tripanossomatídeos (Moura et al. 2015), a concentração intra-celular de eIF2 $\alpha$  pode ser regulada. Especula-se que essa proteólise ocorra a fim de re-estabelecer a proporção ideal de eIF2/eIF2B (10:1) a ser mantida, nos eucariotos superiores, para a obtenção de uma taxa ótima reciclagem (Jennings and Pavitt 2014). Resumidamente, o eIF2 $\alpha$  de *L. infantum* é susceptível a dois diferentes mecanismos de regulação. O primeiro mecanismo clássico de regulação inibitória ocorre através da fosforilação específica em situações de estresse celular (Chow et al. 2011; Cloutier et al. 2012a). E um secundário, através da inativação proteica por clivagem específica da extensão N-terminal exclusiva dos tripanossomatídeos.

Em um segundo momento desse trabalho, visou-se caracterizar a nova interação funcional identificada entre o eIF2 $\alpha$  e uma proteína codificada pelo gene "LinJ.09.1140". Através de análises *in silico* pudemos sugerir que tal gene codifica um homólogo de eIF2 $\gamma$  exclusivo da família Trypanosomatidae, sendo denominado nesse trabalho de eIF2 $\gamma$ -2. Tal proteína, possui conservação em sua sequência quando comparada ao homólogo clássico com exceção de diferenças nas sequências consenso para os sítios ligadores de tRNA e pela presença de

uma inserção característica de 72 aminoácidos que, mesmo após exaustiva análise, não foi associada a nenhum motivo ou domínio proteico conhecido. Encontram-se em andamento ensaios de análise da expressão de eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2 durante crescimento e diferenciação de *L. infantum* com o objetivo de comparar os perfis e níveis de expressão nas diferentes situações fisiológicas.

Afirmamos aqui que a segunda cópia gênica surgiu através de evento de duplicação gênica ocorrido exclusivamente na família Trypanosomatidae já que em todos os ancestrais diretos ou ainda os eucariotos em geral não possuem o segundo homólogo. Uma vez duplicado nos tripanossomatídeos, o eIF2 $\gamma$ -2 evoluiu acumulando mutações e inserções não encontradas no gene clássico culminando numa possível divergência funcional. Um evento semelhante de duplicação gênica foi observado no surgimento do gene da PABP3 nos tripanossomatídeos, originalmente identificado no gênero *Leishmania* (da Costa Lima et al. 2010; Kramer et al. 2013).

Corroborando com a análise evolutiva, as análises de deleção e complementação gênicas apontam para a dualidade funcional dessas proteínas, já que ensaios de deleção e complementação demonstram que não é possível deletar o gene eIF2 $\gamma$ , sugerindo a essencialidade dessa cópia para a fisiologia celular. E mais ainda, não foi possível realizar complementação de eIF2 $\gamma$  por uma cópia adicional de eIF2 $\gamma$ -2, ou seja, demonstrando que os genes não apresentam redundância de função. Os estudos de deleção de eIF2 $\gamma$ -2 encontram-se em andamento e irão colaborar com o conhecimento sobre a essencialidade desses fatores para o fisiologia celular. Em tripanossomatídeos, outros fatores de iniciação da tradução apresentam múltiplos homólogos, como exemplo os eIF4E (eIF4E1 a 6) e eIF4G (eIF4G1- 5), e de modo semelhante não é possível realizar

a deleção de alguns desses homólogos sugerindo que esses fatores são funcionalmente divergentes (De Melo Neto et al. 2015; Moura et al. 2015).

Os resultados de imunoprecipitação de eIF2 $\gamma$  e eIF2 $\gamma$ -2 super-expressos em células promastigotas seguido de identificação proteica por espectrometria de massa demonstraram que ambas as proteínas são capazes de interagir com o eIF2 $\alpha$  e eIF2 $\beta$  na formação do complexo eIF2, de forma similar ao descrito para o modelo de eIF2 $\gamma$  eucariótico. Entretanto em *L. infantum*, os homólogos de eIF2 $\gamma$  possuem a particularidade de não interagirem entre si. Os dois complexos eIF2 formados independentemente podem interagir com os parceiros funcionais na iniciação da tradução como o eIF5 e eIF3, todavia somente o eIF2 $\gamma$ -2 foi encontrado em parceria com o fator de regeneração de GTP, eIF2B. De acordo, com as divergências encontradas nas sequências lineares, sugere-se ainda que esses homólogos possam diferir quanto à capacidade de interação com o tRNA<sub>i</sub> e estudos futuros são necessários para confirmar essa hipótese.

## 7. Conclusões

- O eIF2 $\alpha$  de tripanossomatídeos é expresso constitutivamente durante curva de crescimento e diferenciação do parasito em seu tamanho integral característico
- O eIF2 $\alpha$  de *L. infantum* é capaz de interagir com as cinco subunidades do complexo de reciclagem eIF2B, bem como com fatores de iniciação da tradução parceiros como os eIF3 e eIF5 e proteínas ribossomais.
- A extensão N-terminal de eIF2 $\alpha$  é relevante para capacidade de interação com os parceiros na iniciação da tradução e com a subunidade menor ribossomal, embora não tenha sido possível identificar nenhum domínio ou motivo que justificasse essa função.
- O complexo eIF2 de *Leishmania* é formado pelas subunidades eIF2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , assim como em seu hospedeiro mamífero. Nesse estudo, foi identificado ainda, um novo homólogo de eIF2 $\gamma$ , denominado eIF2 $\gamma$ -2.
- O eIF2 $\gamma$ -2 é um parálogo exclusivo da família Trypanosomatidae surgindo após provável evento de duplicação nesta família, embora tenha sido perdido subsequentemente em espécies do gênero *Trypanosoma*.
- eIF2 $\gamma$ -2 é incapaz de substituir o eIF2 $\gamma$ , o que sugere uma provável divergência de função fisiológica.
- eIF2 $\gamma$ -2 tem capacidade de realizar as interações funcionais de maneira semelhante ao eIF2 $\gamma$  clássico eucariótico, interagindo com eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$ , e ainda com o eIF5 e eIF2B, formando assim um segundo complexo do tipo eIF2 único de tripanossomatídeos.

## 8. Referências Bibliográficas

- Acker MG and Lorsch JR (2008) Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36:653–657.
- Avila CCDC, Peacock L, Machado FC, Gibson W, Schenkman S, Carrington M and Castilho BA (2016) Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  on Threonine 169 is not required for *Trypanosoma brucei* cell cycle arrest during differentiation. *Mol Biochem Parasitol* 205:16–21. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.03.004
- Balagopal V and Parker R (2009) Polysomes, P bodies and Stress granules: states and fates of Eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol* 21:403–408. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.09.001.Evidence
- Bates PA (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol* 37:1097–1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C and Guilbride DL (2005) Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 143:125–134. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.05.008
- Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH and Mottram JC (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37:1063–1075. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.03.008
- Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dubé M, Sereno D, Breton M and Papadopoulou B (2002) A common mechanism of stage-regulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. *J Biol Chem* 277:19511–19520. doi: 10.1074/jbc.M200500200
- Campbell DA, Thomas S and Sturm NR (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: Why be normal? *Microbes Infect* 5:1231–1240. doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.005
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J and Boelaert M (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5:873–82. doi: 10.1038/nrmicro1748
- Chow C, Cloutier S, Dumas C, Chou MN and Papadopoulou B (2011) Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2 $\alpha$  kinase-dependent eIF2 $\alpha$  phosphorylation. *Cell Microbiol* 13:1059–1077. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01602.x
- Clayton C and Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156:93–101. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.07.007
- Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21:1881–1888. doi: 10.1093/emboj/21.8.1881

Cloutier S (2012) Régulation du facteur de traduction eIF2alpha au cours du développement du parasite protozoaire *Leishmania*. l'Université Laval

Cloutier S, Laverdière M, Chou MN, Boilard N, Chow C and Papadopoulou B (2012) Translational control through eIF2alpha phosphorylation during the *Leishmania* differentiation process. PLoS One 7:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0035085

Cohen-Freue G, Holzer TR, Forney JD and McMaster WR (2007) Global gene expression in *Leishmania*. Int J Parasitol 37:1077–1086. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.011

da Costa Lima TD, Moura DMN, Reis CRS, Vasconcelos JRC, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RCBQ and de Melo Neto OP (2010) Functional characterization of three *Leishmania* poly(A) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. Eukaryot Cell 9:1484–1494. doi: 10.1128/EC.00148-10

Dantas-Torres F (2007) The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet Parasitol 149:139–146. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.07.007

De Melo Neto OP, Da Costa Lima TDC, Xavier CC, Nascimento LM, Romão TP, Assis L a., Pereira MMC, Reis CRS and Papadopoulou B (2015) The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. RNA Biol 1–13. doi: 10.1080/15476286.2015.1086865

de Melo Neto OP, Nunes EC, Katz R, Freire ER and Reis CRS Translation initiation factors in trypanosomatids: identification of conserved and divergent features based on sequence analysis of the available genomes.

Derbise A, Lesic B, Dacheux D, Ghigo JM and Carniel E (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. FEMS Immunol Med Microbiol 38:113–116. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00181-0

Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbek Y and Boelaert M (2008) Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis 14:1013–1018. doi: 10.3201/eid1407.071589

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwa G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C et al. (2005) Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. Science (80- ) 309:404–409. doi: 10.1126/science.1112181

Erickson FL, Nika J, Rippel S and Hannig EM (2001) Minimum requirements for the function of eukaryotic translation initiation factor 2. Genetics 158:123–132.

Ganguly S, Das NK, Barbhuiya JN and Chatterjee M (2010) Post-kala-azar dermal leishmaniasis – an overview. Int J Dermatol 49:921–931.

- Gomez E, Mohammad SS and Pavitt GD (2002) Characterization of the minimal catalytic domain within eIF2B: The guanine-nucleotide exchange factor for translation initiation. *EMBO J* 21:5292–5301. doi: 10.1093/emboj/cdf515
- Gordiyenko Y, Schmidt C, Jennings MD, Matak-Vinkovic D, Pavitt GD and Robinson C V (2014) eIF2B is a decameric guanine nucleotide exchange factor with a  $\gamma 2\epsilon 2$  tetrameric core. *Nat Commun* 5:3902. doi: 10.1038/ncomms4902
- Gunzl A (2010) The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? *Eukaryot Cell* 9:1159–1170. doi: 10.1128/EC.00113-10
- Haile S, Dupé A and Papadopoulou B (2008) Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 36:1634–44. doi: 10.1093/nar/gkn019
- Haile S and Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10:569–577. doi: 10.1016/j.mib.2007.10.001
- Hinnebusch AG and Lorsch JR (2012) The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1–25. doi: 10.1101/cshperspect.a011544
- Hiyama TB, Ito T, Imataka H and Yokoyama S (2009) Crystal Structure of the  $\alpha$  Subunit of Human Translation Initiation Factor 2B. *J Mol Biol* 392:937–951. doi: 10.1016/j.jmb.2009.07.054
- Holcik M and Sonenberg N (2005a) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:318–327. doi: nrm1618 [pii]r10.1038/nrm1618
- Holcik M and Sonenberg N (2005b) Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:318–27. doi: 10.1038/nrm1618
- Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Krieger MA and Goldenberg S (2007) Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 356:1062–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.03.104
- Jackson RJ, Hellen CUT and Pestova T V (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113–127. doi: 10.1038/nrm2838
- Jennings MD and Pavitt GD (2014) A new function and complexity for protein translation initiation factor eIF2B. *Cell Cycle* 13:2660–2665. doi: 10.4161/15384101.2014.948797
- Jennings MD, Zhou Y, Mohammad-Qureshi SS, Bennett D and Pavitt GD (2013) eIF2B promotes eIF5 dissociation from eIF2•GDP to facilitate guanine nucleotide exchange for translation initiation. *Genes Dev* 27:2696–2707. doi: 10.1101/gad.231514.113
- Joshi M, Kulkarni A and Pal JK (2013) Small molecule modulators of eukaryotic initiation factor 2alpha kinases, the key regulators of protein synthesis. *Biochimie*

95:1980–1990. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.030

Kapp LD and Lorsch JR (2004) GTP-dependent Recognition of the Methionine Moiety on Initiator tRNA by Translation Factor eIF2. *J Mol Biol* 335:923–936. doi: 10.1016/j.jmb.2003.11.025

Keene J (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8:533–543. doi: doi: 10.1038/nrg2111

Kissinger JC (2006) A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends Parasitol* 22:240–243. doi: 10.1016/j.pt.2006.04.002

Koromilas AE (2014) Roles of the translation initiation factor eIF2 $\alpha$  serine 51 phosphorylation in cancer formation and treatment. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1849:871–880. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.12.007

Koromilas AE and Mounir Z (2013) Control of oncogenesis by eIF2 $\alpha$  phosphorylation: implications in PTEN and PI3K–Akt signaling and tumor treatment. *Futur Oncol* 9:1005–1015. doi: doi:10.2217/fon.13.49

Kramer S, Bannerman-Chukualim B, Ellis L, Boulden EA, Kelly S, Field MC and Carrington M (2013) Differential Localization of the Two *T. brucei* Poly(A) Binding Proteins to the Nucleus and RNP Granules Suggests Binding to Distinct mRNA Pools. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0054004

Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A and McMaster WR (2007) Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* 152:35–46. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.11.009

Li H and Tschudi C (2005) Novel and essential subunits in the 300-kilodalton nuclear cap binding complex of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 25:2216–2226. doi: 10.1128/MCB.25.6.2216-2226.2005

Liang X, Haritan A and Uliel S (2003) trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. *Eukaryot Cell* 2:830–840. doi: 10.1128/EC.2.5.830

Mannaert A, Downing T, Imamura H and Dujardin JC (2012) Adaptive mechanisms in pathogens: Universal aneuploidy in *Leishmania*. *Trends Parasitol* 28:370–376. doi: 10.1016/j.pt.2012.06.003

Marintchev A WG (2004) Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* 37:197–284.

Martínez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K and Myler PJ (2003) Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* 11:1291–1299. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00143-6

Mata J, Marguerat S and Bähler J (2005) Post-transcriptional control of gene expression: A genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* 30:506–514. doi:

10.1016/j.tibs.2005.07.005

McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA and Naderer T (2007) Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol* 23:368–375. doi: 10.1016/j.pt.2007.06.009

Minodier P and Parola P (2007) Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 5:150–158. doi: 10.1016/j.tmaid.2006.09.004

Moraes MCS, Jesus TCL, Hashimoto NN, Dey M, Schwartz KJ, Alves VS, Avila CC, Bangs JD, Dever TE, Schenkman S et al. (2007) Novel membrane-bound eIF2 $\alpha$  kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 6:1979–1991. doi: 10.1128/EC.00249-07

Moura DM, Reis CR, Xavier CC, da Costa Lima TD, Lima RP, Carrington M and de Melo Neto OP (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol* 12:305–19. doi: 10.1080/15476286.2015.1017233

Murray A, Fu C, Habibi G and McMaster WR (2007) Regions in the 3' untranslated region confer stage-specific expression to the *Leishmania mexicana* a600-4 gene. *Mol Biochem Parasitol* 153:125–32. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.02.010

Naveau M, Lazennec-Schurdevin C, Panvert M, Dubiez E, Mechulam Y and Schmitt E (2013) Roles of yeast eIF2 $\alpha$  and eIF2 $\beta$  subunits in the binding of the initiator methionyl-tRNA. *Nucleic Acids Res* 41:1047–1057. doi: 10.1093/nar/gks1180

Pavitt GD (2005) eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem Soc Trans* 33:1487–1492. doi: 10.1042/BST20051487

Pavitt GD and Proud CG (2009) Protein synthesis and its control in neuronal cells with a focus on vanishing white matter disease. *Biochem Soc Trans* 37:1298–1310.

Pestova T V, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko E V, Shatsky IN, Agol VI and Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7029–36. doi: 10.1073/pnas.111145798

Pestova T, Lorsch J and Hellen C (2007) The mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Translational control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp 87–128

Rajesh K, Iyer A, Suragani RNVS and Ramaiah KVA (2008) Intersubunit and interprotein interactions of alpha- and beta-subunits of human eIF2: Effect of phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 374:336–340. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.022

Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B and Brooke S (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7:581–596. doi: 10.1111/j.1600-0560.2011.01844.x

Requena JM (2011) Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. *Front Biosci* 16:2069–2085.

Roll-Mecak A, Alone P, Cao C, Dever TE and Burley SK (2004) X-ray Structure of Translation Initiation Factor eIF2gamma: Implications for tRNA and eIF2alpha binding. *J Biol Chem* 279:10634–10642. doi: 10.1074/jbc.M310418200

Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW and Zilberstein D (2008) Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *Federation Am Soc Exp Biol J* 22:590–602.

Rowlands a G, Panniers R and Henshaw EC (1988) The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem* 263:5526–33.

Sambrook J and Maniatis F (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor

Schmitt E, Naveau M and Mechulam Y (2010) Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: A heterotrimeric tRNA carrier. *FEBS Lett* 584:405–412. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.002

Schmitt E, Panvert M, Lazennec-Schurdevin C, Coureux P-D, Perez J, Thompson A and Mechulam Y (2012) Structure of the ternary initiation complex aIF2-GDPNP-methionylated initiator tRNA. *Nat Struct Mol Biol* 19:450–4. doi: 10.1038/nsmb.2259

Simpson AGB, Stevens JR and Lukeš J (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 22:168–174. doi: 10.1016/j.pt.2006.02.006

Singh CR, Lee B, Udagawa T, Mohammad-Qureshi SS, Yamamoto Y, Pavitt GD and Asano K (2006) An eIF5/eIF2 complex antagonizes guanine nucleotide exchange by eIF2B during translation initiation. *EMBO J* 25:4537–4546. doi: 10.1038/sj.emboj.7601339

Sonenberg N and Hinnebusch AG (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136:731–745. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042

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

Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ and Ramaiah KVA (2000) Phosphorylation of Serine 51 in Initiation Factor 2alpha (eIF2alpha) Promotes Complex Formation between eIF2alpha(P) and eIF2B and Causes Inhibition in the Guanine Nucleotide Exchange Activity of eIF2B. *Biochemistry* 39:12929–38.

Thompson GM, Pacheco E, Melo EO and Castilho B a (2000) Conserved sequences in the beta subunit of archaeal and eukaryal translation initiation factor

2 (eIF2), absent from eIF5, mediate interaction with eIF2gamma. *Biochem J* 347 Pt 3:703–709. doi: 10.1042/0264-6021:3470703

Tonelli RR, da Silva Augusto L, Castilho BA and Schenkman S (2011) Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2alpha is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS One* 6:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0027904

Vetter IR and Wittinghofer a (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294:1299–1304. doi: 10.1126/science.1062023

Votýpka J, D'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukes J and Yurchenko V (2015) New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends Parasitol* 31:460–469. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.015

World Health Organization (2012) *Leishmaniasis : worldwide epidemiological and drug access update*. 24.

World Health Organization W (2010) *Control of the leishmaniasis*. World Health Organ Tech Rep Ser 949:1–186.

Wortham NC, Martinez M, Gordiyenko Y, Robinson C V and Proud CG (2014) Analysis of the subunit organization of the eIF2B complex reveals new insights into its structure and regulation. *FASEB J* 28:2225–37. doi: 10.1096/fj.13-243329

Wu Y, El Fakhry Y, Sereno D, Tamar S and Papadopoulou B (2000) A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 110:345–357. doi: 10.1016/S0166-6851(00)00290-5

Yatime L, Mechulam Y, Blanquet S and Schmitt E (2007) Structure of an archaeal heterotrimeric initiation factor 2 reveals a nucleotide state between the GTP and the GDP states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:18445–50. doi: 10.1073/pnas.0706784104

Zilka a, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V and Shapira M (2001) Developmental regulation of heat shock protein 83 in *Leishmania*. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 276:47922–9. doi: 10.1074/jbc.M108271200

## 9. Curriculum Lattes

---

### Dados pessoais

**Nome** Larissa Mélo do Nascimento  
**Filiação** José Antônio Junior e Maria Eliêuda Bezerra de Mélo  
**Nascimento** 22/02/1987 - Recife/PE - Brasil  
**Carteira de Identidade** 6907467 sds - PE - 22/09/2001  
**CPF** 071.797.574-62

**Endereço residencial** Rua João Braga, 247 apt° 102  
Imbiribeira - Recife  
51170580, PE - Brasil  
Celular 81 992762237

**Endereço profissional** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Campus da UFPE - Av. Moraes Rego s/n  
Cidade Universitária - Recife  
50670420, PE - Brasil  
Telefone: 81 21012500

**Endereço eletrônico** E-mail para contato : larissa@cpqam.fiocruz.br  
E-mail alternativo: larissam.donascimento@gmail.com

---

### Formação acadêmica/titulação

**2012** Doutorado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil com **período sanduíche** em Centre de recherche en infectiologie - Université Laval (Orientador : Barbara Papadopoulou)  
Título: Complexo eIF2 em *Leishmania* sp.: Expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de novo fator de iniciação da tradução

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2010 - 2012** Mestrado em Genética.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*., Ano de obtenção: 2012

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**2005 - 2009** Graduação em BIOMEDICINA.  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil  
Título: Genotipagem e detecção de genes de virulência em cepas de *Aeromonas* isoladas de um surto de diarreia em São Bento do Una, PE, em 2004. Orientador: Nilma Cintra Leal

---

### Formação complementar

**2013 - 2013** Curso de curta duração em V Curso de Biossegurança e Experimentação Animal. (Carga horária: 15h).

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, CPQAM, Brasil

**2009 - 2009** Curso de curta duração em Curso de Verão em Biologia Celular e Molecular. (Carga horária: 90h).

Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

- 2007 - 2007** Curso de curta duração em III curso de interpretação de exames laboratoriais. (Carga horária: 40h).  
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em MINI CURSO DE BIOLOGIA MOLECULAR. (Carga horária: 10h).  
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em 3º curso de atualização em biossegurança. (Carga horária: 20h).  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, CPQAM, Brasil

## Atuação profissional

### 1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ - CPQAM

---

#### Vínculo institucional

- 2012 - Atual** Vínculo: Bolsista de Doutorado CAPES , Enquadramento funcional: Doutoranda, Regime: Parcial
- 2010 - 2012** Vínculo: Bolsista de Mestrado CNPq , Enquadramento funcional: Mestrando, Regime: Parcial

### 2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

#### Vínculo institucional

- 2013 - 2013** Vínculo: Estágio à Docência , Enquadramento funcional: Estágio à docência em GENÉTICA MOLECULAR , Carga horária: 4, Regime: Parcial
- 2011 - 2011** Vínculo: Estágio à Docência , Enquadramento funcional: Estágio à docência em CITOLOGIA , Carga horária: 4, Regime: Parcial

---

## Áreas de atuação

1. Genética
2. Microbiologia
3. Biologia Molecular
4. Genética Molecular e de Microrganismos.

---

## Idiomas

- Inglês** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem.
- Francês** Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente.

---

## Prêmios e títulos

- 2012** Melhor Apresentação em Pôster, Programa de Pós-Graduação em Genética.

---

## Produção bibliográfica

### Artigos completos publicados em periódicos

1. DE MELO NETO, OSVALDO P.; DA COSTA LIMA, TAMARA D. C.; XAVIER, CAMILA C.; NASCIMENTO, LARISSA M.; ROMÃO, TATIANY P.; ASSIS, LUDMILA A.; PEREIRA, MARIANA

M. C.; REIS, CHRISTIAN R. S.; PAPADOPOULOU, BARBARA

The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA Biology*. , v.4, p.00 - 00, 2015.

2. PEREIRA, M. M. C.; MALVEZZI, A. M.; **NASCIMENTO, L. M.**; DA COSTA LIMA, T. C.; ALVES, V. S.; PALMA, M. L.; FREIRE, E. R.; MOURA, D. M. N.; REIS, C. R. S.; DE MELO-NETO, O. P.

The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology (Print)*. , v.190, p.82 - 86, 2013.

3. MARIZ, F.C.; COIMBRA, E.C.; JESUS, A. L. S.; **NASCIMENTO, L. M.**; TORRES, F. A. G.; FREITAS, A.C.

Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the Promoter. *BIOMED RES INT*. , v.2015, p.1 - 11, 2015.

4. JESUS, A.L.S.; MARIZ, F.C.; SOUZA, H.M.; CORDEIRO, M.N.; COIMBRA, E.C.; LEITÃO, M.C.G.; **NASCIMENTO, L.M.**; STOCCO, R.C.; BEÇAK, W.; FREITAS, A.C.

Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics and Molecular Research*. , v.11, p.2598 - 2607, 2012.

5. MENDES, C. L.; **NASCIMENTO, L. M.**; TEOFILO, G. N. D.; DE MELO-NETO, O. P.; HOFER, E.; LEAL, N. C.

Molecular characterization of *Aeromonas* spp. and *Vibrio cholerae* O1 isolated during a diarrhea outbreak. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Impresso)*. , v.54, p.299 - 304, 2012.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. MARIZ, F.C.; **NASCIMENTO, L.M.**; DE MELO-NETO, O. P.; PAPADOPOULOU, B.; FREITAS, A.C. Expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 and L2 capsid proteins in the non-pathogenic protozoan *Leishmania tarentolae*: targeting chimeric virus-like particles and capsomeres as prophylactic and therapeutic vaccine strategies In: Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2015, Brasília.

**Anais do Congresso Brasileiro de Biotecnologia**. , 2015.

2. SAMANT, M.; CLOUTIER, S.; **NASCIMENTO, L.M.**; DUMAS, C.; PAPADOPOULOU, B. New insights on *Leishmania* translation regulation throughout the parasite development In: 13th international congress of parasitology, 2014, cidade do mexico.

**13th international congress of parasitology**. , 2014. v.unico. p.401 - 401

3. PEREIRA, M. M. C.; **NASCIMENTO, L. M.**; DE MELO NETO, O. P. A COMPLEX PATTERN OF POST-TRANSLATION MODIFICATIONS ACTS UPON A SINGLE HOMOLOGUE OF THE TRANSLATION INITIATION FACTOR EIF4E FROM DIFFERENT LEISHMANIA SPECIES In: fifth world congress on Leishmaniasis, 2013, ipojuca.

**Fifth world congress on Leishmaniasis**. , 2013. v.unico. p.p270 -

4. PEREIRA, M. M. C.; **NASCIMENTO, L. M.**; REIS, C. R. S.; DE MELO NETO, O. P. Selected *Leishmania* eIF4E and eIF4G homologues are differentially affected by phosphorylation events during growth in culture In: XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology, 2012, Caxambú.

**XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2012. v.unico. p.117 - 117

5. JESUS, A. L. S.; MARIZ, F.C.; SOUZA, H.M.; CORDEIRO, M.N.; COIMBRA, E.C.; **NASCIMENTO, L. M.**; GOMES-LEITÃO, M.C.; STOCCO, R.; BEÇAK, W.; FREITAS, A.C.

Expression of Bovine Papillomavirus type 1,2 and 4 L1 gene in *Pichia Pastoris* In: XXII encontro Brasileiro de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.

**Anais do XXII encontro Brasileiro de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul**. , 2011.

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. PAPAPOPOULOU, B.; PADMANABHAN, P. K.; AZIZI, H.; ZGHIDI-ABOUZID, O.; CLOUTIER, S.; CHARRET, K. S.; **NASCIMENTO, L.M.**; DUMAS, C.  
MECHANISMS OF RNA DEGRADATION AND TRANSLATIONAL CONTROL IN THE PROTOZOAN PARASITE *Leishmania* In: X Congresso de Protozoologia y enfermedades parasitarias, 2014, Mar del Plata.  
**X Congresso de Protozoologia y enfermedades parasitarias.** , 2014. v.unico. p.6 - 7

## Apresentação de trabalho e palestra

1. PEREIRA, M. M. C.; **NASCIMENTO, L.M.**; DE MELO-NETO, O. P.  
**A COMPLEX PATTERN OF POST-TRANSLATION MODIFICATIONS ACTS UPON A SINGLE HOMOLOGUE OF THE TRANSLATION INITIATION FACTOR EIF4E FROM DIFFERENT LEISHMANIA SPECIES**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. MARIZ, F.C.; **NASCIMENTO, L.M.**; DE MELO NETO, OSVALDO P.; FREITAS, A.C.  
**Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas para produção de estratégias vacinais contra o papilomavirus humano (HPV)**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. **NASCIMENTO, L.M.**; DE MELO-NETO, O. P.  
**Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis***, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
4. **NASCIMENTO, L.M.**; DE MELO-NETO, O. P.  
**Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis***, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

## Orientações e Supervisões

### Orientações e supervisões concluídas

#### Iniciação científica

1. Gustavo Barbosa de Lima. **CLONAGEM EM VETOR DE TRANSFEÇÃO E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NOVOS HOMÓLOGOS DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO CAP. eIF4E (EIF4E5 e EIF4E6), DE *Leishmania sp.*** 2013. Iniciação científica (BIOMEDICINA) - Universidade Federal de Pernambuco

## Eventos

### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **V Worldleish**, 2013. (Congresso)  
**A COMPLEX PATTERN OF POST-TRANSLATION MODIFICATIONS ACTS UPON A SINGLE HOMOLOGUE OF THE TRANSLATION INITIATION FACTOR EIF4E FROM DIFFERENT LEISHMANIA SPECIES.**
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2012. (Outra)  
Análise das interações funcionais e modificações pós-traducionais de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G (eIF4G3 e eIF4G4) durante o ciclo de vida de *Leishmania infantum*.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology**, 2012. (Congresso)  
Selected *Leishmania* eIF4E and eIF4G homologues are differentially affected by phosphorylation events during growth in culture.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Jornada De pós-Graduação em Genética**, 2011.

(Outra)

Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*.

## **Bancas**

### **Participação em banca de trabalhos de conclusão**

#### **Graduação**

1. DE MELO-NETO, O. P.; TEODORO, T. M.; XAVIER, C. C.; **NASCIMENTO, L. M.**

Participação em banca de Jeyselaine Nataly Vieira Lima. **Análise da interação entre a proteína EIF4E5 e seu parceiro funcional EIF4G2 de *Trypanosoma brucei***, 2015

(BIOMEDICINA) Universidade Federal de Pernambuco

2. MELO, M. E. B.; FRANCO, E. S.; MERLO, K. C.; **NASCIMENTO, L. M.**

Participação em banca de Laila Thamiris Gonçalves Alves da Silva. **Investigação do potencial genotóxico do anti-parasitário praziquantel através do teste de metáfase em camundongos *swiss webster***, 2015

(BIOMEDICINA) Universidade Federal de Pernambuco