

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

Guilherme Santana Barbosa

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MOTIVOS DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À POLI-A
1 (PABP1) NA INTERAÇÃO COM PARCEIROS EM *Leishmania infantum***

**Recife
2022**

Guilherme Santana Barbosa

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MOTIVOS DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À POLI-A
1 (PABP1) NA INTERAÇÃO COM PARCEIROS EM *Leishmania infantum***

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

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Dra. Camila Cavalcanti Xavier

Dr. Christian Robson de Souza Reis

**Recife
2022**

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

Barbosa, Guilherme Santana

Avaliação funcional de motivos da proteína de ligação à POLI-A 1 (PABP1) na interação com parceiros em *Leishmania infantum* / Guilherme Santana Barbosa. - 2022.

98 f. : il.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Coorientadora: Dra. Camila Cavalcanti Xavier.

Coorientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Protozoário. 2. Leishmania. 3. Proteínas microbianas. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orientador). II. Xavier, Camila Cavalcanti (coorientadora). III. Reis, Christian Robson de Souza (coorientador). IV. Título.

579.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-059-2022

GUILHERME SANTANA BARBOSA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MOTIVOS DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO
À POLI-A 1 (PABP1) NA INTERAÇÃO COM PARCEIROS EM
*Leishmania infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética. Área de concentração: Biologia Molecular.

Aprovado em: 25/02/2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Isabelle Freire Viana (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Fabíola Barbieri Holetz (Examinador Externo)
Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ PR

Prof^a. Dra. Danielle Maria Nascimento Moura (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pela confiança em me integrar ao seu grupo de pesquisa, pelos grandes ensinamentos não só metodológicos como pessoais e profissionais. Serei sempre grato por essa oportunidade.

Aos meus Coorientadores Dra. Camila Xavier e Dr. Christian Reis. Pelo apoio, confiança, conselhos e pela paciência comigo durante esse processo tão complexo. Vocês foram fundamentais nessa jornada.

Aos meus colegas do IAM: Ada, Adriana, Amanda, Angela, M^a Carolina, Caroline, Cláudio, Danielle, Deyvisson, Gustavo, Hemilly, Igor, Julia, Ludmilla, Maria, Matheus, Mayara, Rafaela, Renata, Romero, Stéphanhy e Yallen. Em especial à minha ex-vizinha de bancada Amanda Soares, por termos sido suporte um do outro e certamente pela conclusão dessa etapa. Aos meus amigos de laboratório Romero e Angela, por sempre oferecerem e serem tanto pra mim. E ao meu parceiro de experimentos Deyvisson, por ser tão presente e fazer o mestrado parecer ter sido em dupla.

À equipe de profissionais que mantém o departamento de Microbiologia do IAM: M^a Carolina, Bruna, Fabiana, Silvana, Cláudio e Matheus.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela excelente contribuição para minha formação profissional e acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro indispensável para o desenvolvimento da pós-graduação e deste estudo.

Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – FIOCRUZ-PE pelo suporte relativo à infraestrutura necessária para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas Anna, Beatriz, Thyaly e Victória, por sempre me lembrarem que a vida pode ser leve e que eu tenho um lugar pra onde voltar.

Ao meu trio do mestrado: Aldianne, Rebeca e Thays. Pelos grupos de estudos, chamadas de vídeo e desabafos, fazendo da pós-graduação à distância uma experiência divertida e afetuosa.

E finalmente aos meus pais, por serem o meu maior suporte desde o dia 1. Por acreditarem mais em mim do que eu mesmo e por serem o motivo de tudo que eu faço.

Ser corajoso não significa que você não está assustado. Ser corajoso significa que você está assustado, realmente assustado, bastante assustado e faz a coisa certa mesmo assim (Neil Gaiman, Coraline).

RESUMO

Protozoários patogênicos do gênero *Leishmania* apresentam o controle de expressão gênica predominantemente pós-transcricional, onde proteínas de ligação ao RNA parecem atuar, como a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP). Três PABPs homólogas foram descritas em *Leishmania*, estruturadas em uma região N-terminal com motivos de reconhecimento ao RNA (RRMs), uma região de ligação (*linker*) e um domínio MLLE de ligação a peptídeos. Pretendendo ampliar a compreensão de papéis da PABP1 na iniciação da tradução, o estudo objetivou identificar regiões associadas à essencialidade e interações importantes. A PABP1 associa-se a mRNAs específicos e ao complexo eIF4F constituído por EIF4E4 e EIF4G3. Motivos nos RRM1 e 2, na região de ligação e no domínio MLLE foram mutagenizados previamente e determinados como importantes para a função da PABP1. Nesse trabalho, mutantes nos RRM3 e 4 foram gerados e avaliados quanto aos potenciais em complementar a ausência da PABP1 nativa em *Leishmania infantum*, onde o MLN (RRM4) foi incapaz de compensar esse efeito deletério. Para a PABP1, ensaios de co-precipitação e análises por espectrometria de massa indicaram interações com diferentes parceiros. Ensaios com as proteínas mutantes determinaram os motivos LMW (RRM2), MLN e TGM (MLLE) como essenciais na co-precipitação com EIF4G3, EIF4E4 e a quinase CRK3, respectivamente. Os resultados sugerem o motivo MLN como crítico para a atividade da proteína e o RRM12 como sítio de interação a componentes do eIF4F canônico.

Palavras-chave: *Proteínas de ligação ao RNA; tripanosomatídeos; iniciação da tradução.*

ABSTRACT

Pathogenic protozoa of the genus *Leishmania* have their gene expression being controlled predominantly at post-transcriptional level, where different RNA binding proteins seem to act, such as the poly-A binding protein (PABP). Three PABP homologues have been described in *Leishmania*, with an N-terminal region containing four RNA recognition domains (RRMs), a linker region and a C-terminal MLLE domain. In order to expand the understanding of PABP1 roles in translation initiation, this study aimed to identify regions related to essentiality and important interactions. PABP1 associates with specific mRNAs and the eIF4F complex based on EIF4E4 and EIF4G3. Mutants in RRM1 and 2, in the linker region and in the MLLE domain were previously obtained and identified as important for PABP1 function. In this study, mutants in RRM3 and 4 were generated and evaluated for their potential to complement the absence of native PABP1 in *Leishmania infantum*, leading to the identification of the MLN motif in RRM4 as unable to compensate this deleterious effect. For PABP1, co-precipitation assays followed by mass spectrometry analysis allowed the definition of its interaction with different partners. New assays with the mutant proteins defined the LMW (RRM2), MLN and TGM (MLLE) motifs as essential for co-precipitation with EIF4G3, EIF4E4 and the CRK3 kinase, respectively. These results suggest the MLN motif as critical for protein activity and the RRM12 as an interaction site for eIF4F canonic components.

Key words: *RNA binding proteins; Trypanosomatids; translation initiation.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Formas clínicas das Leishmanioses.....	21
Figura 2 -	Situação global de endemicidade da Leishmaniose Tegumentar e Visceral.....	23
Figura 3 -	Ciclo de infecção da Leishmaniose.....	25
Figura 4 -	Comparação entre mecanismos de <i>cis</i> e <i>trans splicing</i>	28
Figura 5 -	Representação linear das diferentes regiões das PABPs citoplasmáticas.....	31
Figura 6 -	Tradução via reconhecimento do cap e escaneamento ribossomal.....	33
Figura 7 -	eIF4F mediando recrutamento do mRNA.....	35
Figura 8 -	Complexos EIF4F formado pelas subunidades EIF4E4 e EIF4E3.	37
Figura 9 -	Papel proposto para a RBP23 na mediação da associação de mRNAs de proteínas ribossomais com a PABP1 e um dos complexos EIF4F de tripanosomatídeos.....	39
Figura 10 -	Representação esquemática de motivos funcionais mutagenizados ao longo da PABP1.....	40
Figura 11 -	Alinhamento das sequências de aminoácidos da PABP1 em diferentes espécies de Leishmania.....	41
Figura 12 -	Estrutura do RRM34 da PABP1 de <i>Leishmania infantum</i>	42
Figura 13 -	Representação da primeira reação de PCRs: Amplificação dos megaprimers.....	45
Figura 14 -	Esquema da segunda reação de PCR: Geração de construções mutantes.....	46
Figura 15 -	Esquema do plasmídeo pSP-BT1-Yneo α IR.....	48
Figura 16 -	Eletroforese das PCRs dos megaprimers e sequências mutantes.	56

Figura 17 - Digestão das construções mutantes sem códon de parada do gene PABP1 em pGEM-T Easy.....	57
Figura 18 - Alinhamento das sequências selvagem e mutantes do gene PABP1.....	57
Figura 19 - Colônias de linhagens nocauteadas para o gene PABP1 de <i>Leishmania infantum</i>	59
Figura 20 - Esquema da geração de cassetes por PCR de fusão.....	60
Figura 21 - Representação dos ensaios de PCR para a confirmação dos eventos integrativos.....	61
Figura 22 - PCRs para confirmação dos eventos integrativos de linhagens nocauteadas pós transfecção com mutantes.....	62
Figura 23 - Curva de crescimento de linhagens SKO.....	63
Figura 24 - PCRs para confirmação dos eventos integrativos de linhagens nocauteadas duplamente.....	64
Figura 25 - Curva de crescimento de linhagens DKO.....	64
Figura 26 - Extrato total de linhagens SKO de <i>Leishmania infantum</i> expressando os diferentes mutantes.....	65
Figura 27 - Lisados celulares referentes aos mutantes.....	66
Figura 28 - Ensaios de imunoprecipitação dos mutantes.....	67
Figura 29 - Comparação de enriquecimento de fatores de iniciação eucarióticos para versões mutantes da PABP1.....	72
Figura 30 - Comparação de enriquecimento de proteínas de ligação ao RNA, RNA helicases e quinases para versões mutantes da PABP1.....	73
Figura 31 - Comparação de enriquecimento de fatores de proteínas hipotéticas para versões mutantes da PABP1.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese do gene LiPABP1.....	44
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a confirmação dos eventos integrativos.....	50
Tabela 3 - Peptídeos co-purificados com a proteína PABP1 fusionada com HA.....	69

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Ala	A lanina
Asp	Ácido a spártico
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio (B iochemical o xxygen d emand)
CCNV	Variação de número de cópias cromossômicas (C hromosome c opy n umber v ariation)
CT	C omplexo t ernário
ATP	Adenina trifosfato
DKO	Duplo nocaute (D ouble k nockout)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (D eoxyribonucleic a cid)
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato (D eoxyribonucleoside t riphosphate)
E4	EIF4 E 4
eIF	Fator de iniciação eucariótico (E ukaryotic i nitiation f actor)
Fen	F enilalanina
G3	EIF4 G 3
GDP	Guanosina difosfato (G uanosine d iphosphate)
Glu	Ácido g lutâmico
Gly	Glicina (G lycine)
GTP	Guanosina trifosfato (G uanosine t riphosphate)
Ile	I soleucina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
kb	K ilobases
kDa	K ilodaltons
kDNA	DNA do cinetoplasto (K inetoplast D N A)
LB	Luria B ertani
Leu	L eucina
LMC	Leishmaniose m uco-cutânea
LT	Leishmaniose t egumentar
LV	Leishmaniose v isceral
Lys	Lisina (L ysine)
m7G	7 -Metilguanosina

Met	M etionina
mL	M ililitro
MNK1	MAP Kinase-Interacting Serine/Threonine-Protein Kinase 1
mRNA	RNA mensageiro (M essenger RNA)
RNP	Complexo ribonucleoproteico
ORF	Matriz de leitura aberta (O pen r eadin g f rame)
PABC	Domínio C-terminal da proteína de ligação à cauda poli-A (P oly- A b inding protein C -terminus domain)
PABP	Proteína de ligação à cauda poli-A (P oly- A b inding protein)
PABPC	Proteína de ligação à cauda poli-A Citoplasmática (C ytoplasmic p oly- A b inding protein)
PABPN	Proteína de ligação à cauda poli-A Nuclear (N uclear p oly- A b inding protein)
PAGE	Gel de Poliacrilamida (P olyacrylamide g el)
PAM1	Motivo de interação à PABP 1 (P ABP interacting m otif 1)
PAN3	P oli(a) nuclease 3
pb	P ares de b ase
PCR	Reação em cadeia da polimerase (P olymerase c hain r eaction)
PIC	Pré-complexo de iniciação (P reinitiation c omplex)
pré-mRNA	P ré- R NA mensageiro
Pro	P rolina
RBP	Proteína de ligação ao RNA (R NA b inding protein)
RNA	Ácido ribonucleico (R ibonucleic a cid)
RNA-pol I	R NA polimerase I
RRM	Motivo de reconhecimento ao RNA (R NA r ecognition m otif)
rRNA	RNA ribossomal (R ibosomal R NA)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (S odium d odecyl s ulfate)
SFB	S oro fetal b ovino
SKO	Mono nocaute (S ingle K nockout)
SL	S pliced L eader
SLTS	S pliced leader trans s plicing
snRNA	Pequeno RNA nuclear (S mall n uclear R NA)
SP/TP	S erina- P rolina/ T reonina- P rolina

Thr	Treonina (<i>Threonine</i>)
tRNA	RNA transportador (<i>Transfer RNA</i>)
tRNAi	RNA transportador iniciador (<i>Initiator transfer RNA</i>)
μM	Micromolar
UTR	Região não traduzida (<i>Untranslated region</i>)
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo
ZFD	Domínio dedo de zinco (<i>Zinc Finger Domain</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	TRIPANOSOMATÍDEOS	19
2.2	A LEISHMANIOSE	19
2.2.1	Epidemiologia	22
2.2.2	Vetores, ciclo da doença e formas do parasita	23
2.3	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS TRIPANOSOMATÍDEOS	25
2.3.1	Organização genômica e transcrição policistrônica	25
2.3.2	<i>Trans-splicing</i> e poliadenilação	26
2.3.3	Regulação pós-transcricional da expressão gênica	28
2.4	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA	29
2.4.1	Proteína de ligação à cauda poli(A) – PABP	30
2.5	SÍNTESE DE PROTEÍNAS NOS EUCARIOTOS	32
2.5.1	Complexo eIF4F nos eucariotos	34
2.6	HOMÓLOGOS DE PABP E FATORES DE TRADUÇÃO EM TRIPANOSOMATÍDEOS	35
2.6.1	eIF4F em tripanosomatídeos	36
2.7	RESULTADOS RECENTES SOBRE A PABP1 DE <i>LEISHMANIA</i>	37
2.7.1	Interação com a RBP23 e mRNAs de proteínas ribossomais	37
2.7.2	Mutagênese e identificação de motivos funcionalmente relevantes	39
3	OBJETIVOS	43
3.1	OBJETIVO GERAL	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43

4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	MUTAGÊNESE EM RRMS 3 E 4	44
4.2	CLONAGEM E SUBCLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE	46
4.3	ENSAIOS DE COMPLEMENTAÇÃO	49
4.4	CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	50
4.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL DE ENSAIOS DE <i>WESTERN BLOT</i>	51
4.6	PREPARAÇÃO DE LISADOS CITOPLASMÁTICOS DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> IMUNOPRECIPITAÇÃO	52
4.7	ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS/MS)	53
5	RESULTADOS	55
5.1	AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MOTIVOS NOS RRMS 3 E 4 DA PABP1 NA VIABILIDADE CELULAR DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	55
5.1.1	Descrição das regiões-alvo da mutagênese	55
5.1.2	Amplificação de genes mutantes através da reação em cadeia da polimerase (PCR)	55
5.1.3	Obtenção de construções mutantes em vetores de expressão	56
5.1.4	Ensaio de complementação por nocaute gênico	58
5.2	ANÁLISES DE INTERAÇÕES COM PARCEIROS FUNCIONAIS DA PABP1	64
5.2.1	Superexpressão de construções com a PABP1 nativa e mutantes fusionados ao epítipo HA	65
5.2.2	Imunoprecipitação	66
5.2.3	Análise de espectrometria de massas da PABP1 e seus mutantes.	67
5.2.4	Proteínas associadas às versões mutantes da PABP1	71

6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXOS	91
	CURRICULUM VITAE (LATTES)	98

1 INTRODUÇÃO

Dentre as diferentes espécies de protozoários incluídas na família Trypanosomatidae, possuem destaque aquelas que atuam como agentes de doenças negligenciadas de impacto na saúde pública mundial. São estas, *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi* e espécies patogênicas de *Leishmania*, causando respectivamente a doença do sono, doença de Chagas e diferentes formas de leishmaniose. Estes organismos evidenciam particularidades em parte de seus processos biológicos. Dentre eles se destacam processos que contam com a participação de proteínas de ligação a RNA (RBPs), como a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP), que tem um papel crítico na tradução dos mRNAs, em especial na sua etapa de iniciação. A iniciação da tradução envolve a montagem do complexo ribossomal 80S sobre mRNAs e a identificação do códon AUG de iniciação da tradução, contando com a participação de diferentes fatores de iniciação eucarióticos, dentre eles o complexo eIF4F. Em conjunto com a PABP, o eIF4F participa na promoção da interação entre as extremidades do mRNA, aumentando sua estabilidade e tradução.

Dos três homólogos da PABP descritos em tripanosomatídeos, a PABP1 atua na tradução de subconjuntos específicos de mRNAs. Por outro lado, as PABP2 e PABP3 estão associadas a populações distintas de mRNAs, por vezes comuns entre si. Além disso, um dos complexos eIF4F desses organismos, baseado nas subunidades EIF4E4 e EIF4G3, demonstra uma interação restrita à PABP1, também associado a aspectos próprios desses organismos. A fim de compreender melhor essas particularidades, ensaios de interação evidenciaram a participação de outra proteína de ligação ao RNA, a RBP23, de forma exclusiva com a proteína PABP1. Além disso, a interação entre a PABP1 e o EIF4E4 reflete uma interação só observada até agora em tripanosomatídeos. Quanto à regulação de sua expressão, a PABP1 apresenta isoformas fosforiladas relacionadas à tradução ativa, sugerindo que seja alvo de mecanismos regulatórios mediados por quinases.

Estruturalmente, PABPs podem ser divididas em uma região N-terminal, contendo quatro motivos de reconhecimento ao RNA (RRMs 1 a 4), uma região *linker* central de conexão e uma região C-terminal contendo um domínio denominado de MLLE, envolvido na interação com proteínas parceiras em diferentes organismos. Enquanto os RRM 1 e 2 mediam a ligação com o trato poli-A e parceiros proteicos

conhecidos, os RRM3 e 4 são menos conhecidos e parecem participar de interações menos específicas ao RNA. Em tripanosomatídeos, o domínio MLLE da PABP1 é importante na interação com o fator de iniciação EIF4E4, através de motivos já identificados em outros eucariotos, porém não em proteínas relacionadas. Estudos prévios também sugeriram que os RRM3 e 4 da PABP1 podem estar relacionados a interações com outras proteínas parceiras, como a proteína RBP23. Ainda, ensaios de mutagenese em diferentes motivos funcionais da PABP1 (RRM1, RRM2, *linker* e MLLE) em sua regulação, avaliaram o papel de cada um deles na geração de isoformas fosforiladas. No mesmo estudo, foram identificados sítios de fosforilação mediados por motivos SP/TPs contidos na região *linker* da PABP1. No entanto, este e os demais mutantes não foram avaliados quanto aos seus respectivos papéis nas interações proteicas estabelecidas pela PABP1 na iniciação da tradução. Pretendendo melhor compreender a PABP1 enquanto agente ativo na iniciação da tradução e ampliar o conhecimento acerca desse evento em tripanosomatídeos, o presente estudo avalia o papel de diferentes regiões dessa proteína frente a interações estabelecidas com seus parceiros proteicos, dentre essas, motivos localizados nos RRM3 e 4.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados pertencentes à família Trypanosomatidae da classe Kinetoplastida, com taxonomia baseada em características como ciclo de vida, parâmetros morfológicos e hospedeiros (KAUFER et al, 2017). Esta família é constituída por nove gêneros sendo que suas espécies possuem particularidades quanto às suas funções biológicas, além da presença do cinetoplasto, uma organela periflagelar única, relacionada à mitocôndria, contendo anéis próprios de DNA concatenados (kDNA) (PEREIRA; BRANDÃO, 2013; KAUFER et al, 2019). Esses organismos possuem ciclo de vida predominantemente monóxeno (um único hospedeiro) embora algumas espécies de ciclo heteróximo (hospedeiros diferentes) recebam atenção especial devido ao potencial patogênico relacionado a doenças humanas, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e espécies do gênero *Leishmania* sp. Estas são responsáveis, respectivamente, pela Doença de Chagas, Doença do Sono e Leishmaniose (LUKEŠ et al, 2018; RAJAN et al, 2019). Essas enfermidades encontram-se inseridas entre as doenças negligenciadas listadas como de alta prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS) (PARTHASARATHY; KALESH, 2020).

Até o momento, não existem vacinas para as doenças provocadas por tripanosomatídeos em humanos e o seu controle é baseado no tratamento de casos (GENOIS et al, 2014). No entanto, os quimioterápicos administrados apresentam índices altos de toxicidade, efeitos colaterais, resistência parasitária e contraindicações, além de alto custo (ALCÂNTARA et al, 2018).

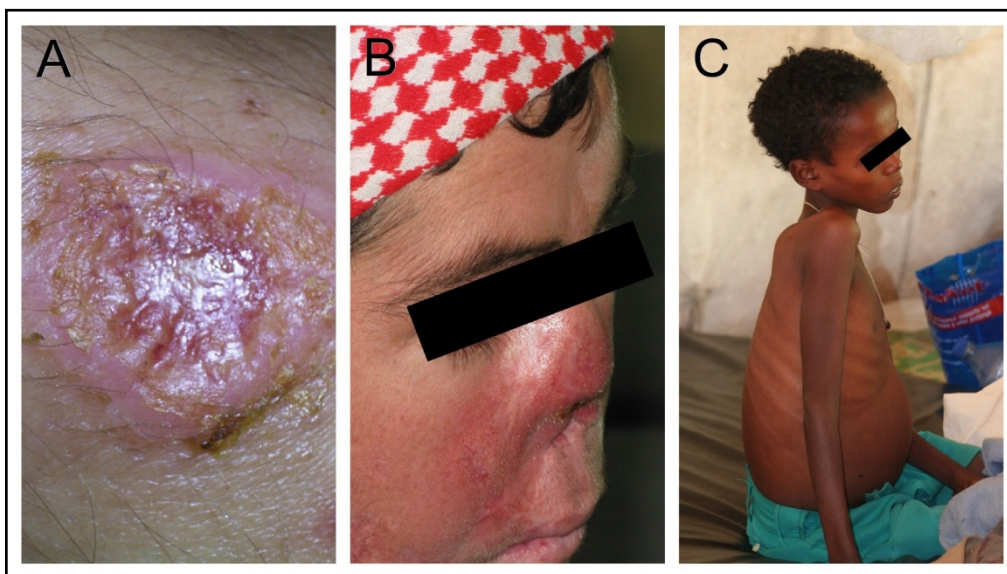
2.2 A LEISHMANIOSE

O gênero *Leishmania*, compreende cerca de 53 espécies distribuídas em quatro subgêneros: *Mundinia*, *Leishmania*, *Sauroleishmania* e *Viannia* (ESPINOSA et al, 2018). Originalmente, as espécies patogênicas ao homem foram classificadas em subgêneros de acordo com a região no intestino dos vetores colonizada. Dois

subgêneros incluem espécies patogênicas: o subgênero *Leishmania*, que abriga espécies endêmicas no Velho Mundo; e o subgênero *Viannia*, restrito a países do Novo Mundo (BATES, 2007). Sabe-se que 20 das 31 espécies que parasitam mamíferos estão envolvidas nas diferentes formas de Leishmaniose que acometem humanos. A maior parte destes parasitos são zoonóticos e podem apresentar mamíferos domésticos e selvagens como hospedeiros reservatórios. Por outro lado, espécies antroponóticas envolvem a transmissão exclusiva de humano para humano através de vetores hematófagos (AKHOUNDI et al, 2016; ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

O termo Leishmaniose compreende um conjunto de doenças causadas por infecções transmitidas por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos (WHO, World Health Organization, 2013). Encontram-se entre as sete doenças tropicais de maior impacto, apresentando um espectro de manifestações que variam de infecção assintomática ao óbito (PACE, 2014). As manifestações dependem de fatores relacionados aos parasitas envolvidos na infecção e a aspectos imunológicos do hospedeiro. De acordo com os sintomas, consequentes aos tipos de fagócitos infectados, a Leishmaniose pode ser dividida nas seguintes formas clínicas: Tegumentar ou Cutânea; Mucocutânea; e Visceral ou Kala-Azar (Figura 1) (ARENAS et al, 2017).

Figura 1. Formas clínicas da Leishmaniose.



(A) Úlcera exposta característica da forma Tegumentar/Cutânea. (B) Destruição de mucosa da cavidade nasal em caso de Leishmaniose Mucocutânea. (C) Paciente acometido por Leishmaniose Visceral com perda de peso e hepatoesplenomegalia observável. Referência (WHO, 2020).

A Leishmaniose Tegumentar (LT), forma clínica mais comum, tem manifestações envolvendo lesões ulcerativas em pele e mucosas, além do potencial desenvolvimento de deformidades em sua forma disseminada (RIBEIRO et al, 2018). Os agentes etiológicos da LT são distribuídos em espécies do Novo e Velho Mundo. As espécies do Novo Mundo são: *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. venezuelensis*, *L. lainsoni*, *L. gamhami*, *L. pifanoi*, *L. peruviana* e *L. colombiensis*. Já entre as relativas ao Velho Mundo, encontram-se: *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. killicki* (HANDLER et al, 2015).

A forma muco-cutânea da leishmaniose (LMC) pode ocorrer pós cura de lesões cutâneas da LT e envolve manifestações destrutivas associadas a congestões, sangramentos, erosões e inflamações nas mucosas que revestem o nariz, a boca e a garganta (HANDLER et al, 2015; WHO, World Health Organization, 2014). A LMC é geralmente associada à *L. braziliensis*, no entanto, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* também possuem potencial para o desenvolvimento dessa forma clínica (GOTO; LINDOSO 2012).

A Leishmaniose Visceral (LV) é a forma mais severa da doença e envolve infecção sistêmica após o inóculo das formas infectantes pela picada de insetos

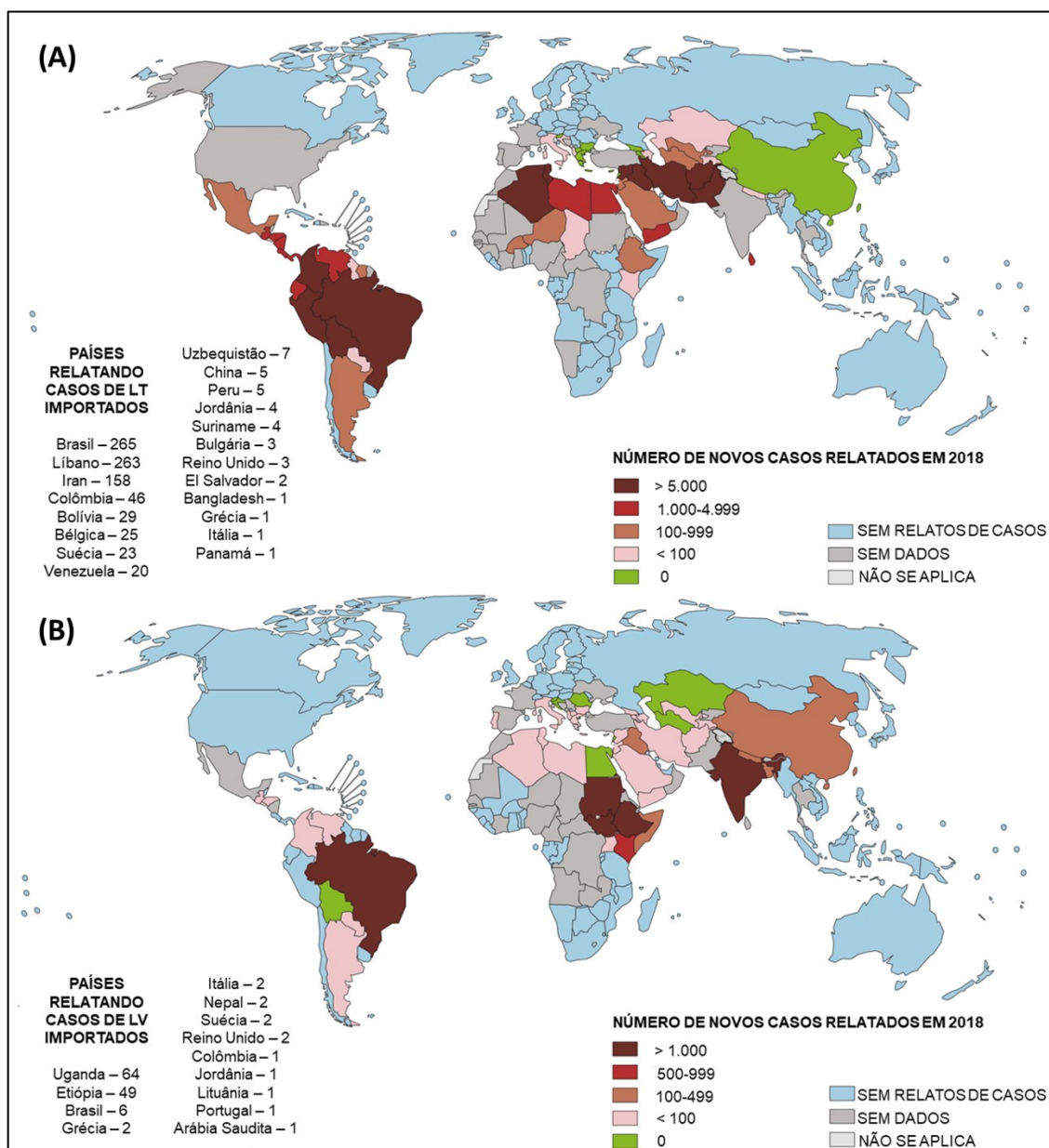
vetores. Esses parasitos migram para diferentes partes do corpo no interior de macrófagos causando febre, hepatoesplenomegalia, perda de peso, pancitopenia e hipergamaglobulinemia. As espécies *L. donovani* e *L. infantum* estão mais associadas a casos de LV no Velho Mundo, enquanto *L. infantum* é responsável pelos casos na América (REYNOLDS; BILLIOUX; QUINN, 2017).

2.2.1 Epidemiologia

A Leishmaniose está entre as doenças de maior distribuição mundial e abrange áreas tropicais e subtropicais de cerca de 89 países, sendo endêmica na África, América, Ásia e regiões do Mediterrâneo (ARENAS et al, 2017). Estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção, com cerca de 12 milhões de pacientes atualmente infectados e ocorrência de 20 a 300 mil mortes por ano (TORRES-GUERRERO et al, 2017; PAHO, Pan American Health Organization, 2022). Anualmente estão previstos aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos relacionados à forma visceral e 0,7 a 1,2 milhões referentes à LT (Figura 2) (GEORGIADOU; MAKARITSIS; DALEKOS, 2016).

Um levantamento de dados realizado pela Organização Mundial da Saúde envolvendo 102 países demonstrou que, até 2010, 90% das ocorrências de LV eram provindas de países como Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão; por outro lado, 70% dos casos de LT eram originários do Afeganistão, Algéria, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Sudão e Síria (Who. World Health Organization, 2020).

Figura 2. Situação global de endemicidade da Leishmaniose Tegumentar e Visceral.



(A) Representando os casos relativos à Leishmaniose Tegumentar e (B) Visceral. Fonte adaptada: (OMS, 2013).

2.2.2 Vetores, ciclo da doença e formas do parasita

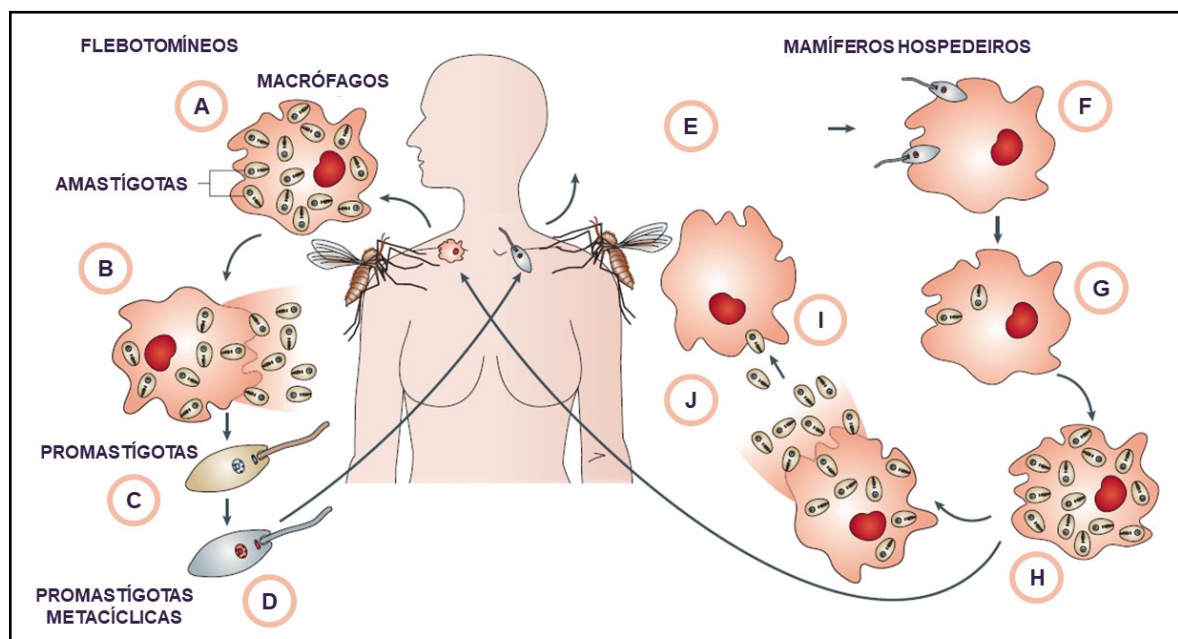
A Leishmaniose é transmitida por 98 espécies diferentes de flebotomíneos da família Psychodidae, de ordem Diptera e gêneros *Phlebotomus* (Novo Mundo) e *Lutzomya* (Velho Mundo) (MAROLI et al, 2013). A infecção ocorre através da picada de insetos fêmeas durante nutrição com sangue, etapa necessária para eventos

envolvidos no desenvolvimento de seus ovos (BRANDÃO et al, 2019; STEVERDING, 2017). O ciclo de vida desses parasitas é heteróximo, portanto, envolve a colonização do trato intestinal de flebotomíneos e fagócitos do sistema reticuloendotelial de mamíferos (AKHOUNDI et al, 2016).

Duas formas parasitárias estão envolvidas nas diferentes fases do ciclo biológico de espécies de *Leishmania*. A forma promastigota, com cerca de 12 a 20 µm de comprimento, corresponde à forma livre, flagelada e piriforme que coloniza o intestino de vetores. Já a forma amastigota, medindo entre 2,5 e 3,5 µm, apresenta conformação arredondada, aflagelar e intracelular, responsável pela replicação em células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (ARENAS et al, 2017; SUNTER; GULL, 2017).

O ciclo de vida das espécies de *Leishmania* se inicia com a inoculação de formas promastigotas metacíclicas (forma infectiva) no hospedeiro mamífero, por transmissão vetorial. Os parasitos penetram através da pele e são englobados por macrófagos, onde realizam alterações morfológicas e metabólicas para adaptação ao ambiente fagolisossômico intracelular, se diferenciando em formas amastigotas, as quais permanecem durante a infecção (FIEBIG; KELLY; GLUENZ, 2015). Uma vez que o flebotomíneo se alimenta do sangue de mamíferos infectados, ocorre a ingestão de macrófagos contendo amastigotas que, no intestino desses insetos, se diferenciam em promastigotas procíclicas extracelulares (SUNTER; GULL, 2017). Promastigotas passam, posteriormente, pelo processo de metaciclogênese, o qual corresponde a alterações no padrão de expressão gênica e resulta em mudanças metabólicas, morfológicas e sobre proteínas de superfície, promovendo um caráter infectivo às células. Promastigotas metacíclicas migram até a probóscide do artrópodo para a promoção de novas infecções (Figura 3) (GONÇALVES et al, 2018).

Figura 3. Ciclo de infecção da Leishmaniose.



(A) Flebotomíneos fêmeas alimentando-se de macrófagos infectados com formas amastigotas. (B-C) Liberação de amastigotas e diferenciação em promastigotas procíclicas no intestino do inseto. (D) Transformação de promastigotas em formas infectantes pós metaciclogênese. (E) Transmissão de formas infectantes durante a alimentação sanguínea de flebotomíneos fêmeas. (F) Promastigotas anexadas à superfície celular de um macrófago para o englobamento. (G) Modificação celular em amastigotas. (H) Replicação de amastigotas no interior de macrófagos de diferentes tecidos. (I-J) Rompimento de célula infectada e infecção de novos macrófagos. Fonte adaptada: (LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

2.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos divergiram cedo na escala evolutiva dos eucariotos, consequentemente esses organismos dispõem de particularidades quanto a aspectos celulares e biológicos, como a transcrição policistrônica e constitutiva dos mRNAs, o processamento de mRNAs via *trans-splicing*, presença do kDNA, edição do RNA mitocondrial, presença das organelas glicosoma e cinetoplasto, atividade alternativa de RNA polimerase I, vias metabólicas alternativas e regulação pós transcricional da expressão de genes codificantes de proteínas (CHOI; EL-SAYED, 2012; JACKSON, 2015; PASTRO et al, 2017; CLAYTON, 2019).

2.3.1 Organização genômica e transcrição policistrônica

A organização genômica nos tripanosomatídeos chama a atenção pelo arranjo de múltiplas fases de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Reading Frames*) codificantes de proteínas em blocos extensos ao longo de uma mesma fita de DNA. Esses blocos contêm de dezenas a centenas de unidades codificantes de proteínas (também chamadas de *cistrons*), podendo ser funcionalmente distintas, que são co-transcritas de forma policistrônica (GAUDENZI et al, 2011).

Existe uma marcante escassez de promotores de transcrição para ativação de RNA polimerase II em genomas de tripanosomatídeos. Consequentemente, seus transcritos abrigam unidades contíguas em sequências de RNA com até 100kb ou mais de comprimento (CLAYTON; MICHAELI, 2011; JACKSON; QUAIL; BERRIMAN, 2008). A maior parte dos sítios de iniciação da transcrição, consistindo em sequências ricas em G-T, se encontram em regiões abertas da cromatina localizadas entre blocos gênicos (WEDEL et al, 2017). Genes constitutivos de alta expressão contornam a ausência de sítios para a RNA-pol II pela presença de múltiplas cópias em diferentes regiões cromossômicas (CLAYTON, 2019).

Uma outra característica dos tripanosomatídeos é a presença de variações no número de cópias cromossômicas (CCNV) associada a uma plasticidade genômica ocorrente em resposta fatores ambientais (LAFFITTE et al, 2016). O padrão de aneuploidia pode variar mesmo entre populações de uma mesma espécie (ALMEIDA et al, 2018). Essas alterações estão comumente associadas a modificações nos níveis de expressão, promovendo adaptação ambiental e resistência a drogas (DUMETZ et al, 2017).

2.3.2 *Trans-splicing* e poliadenilação

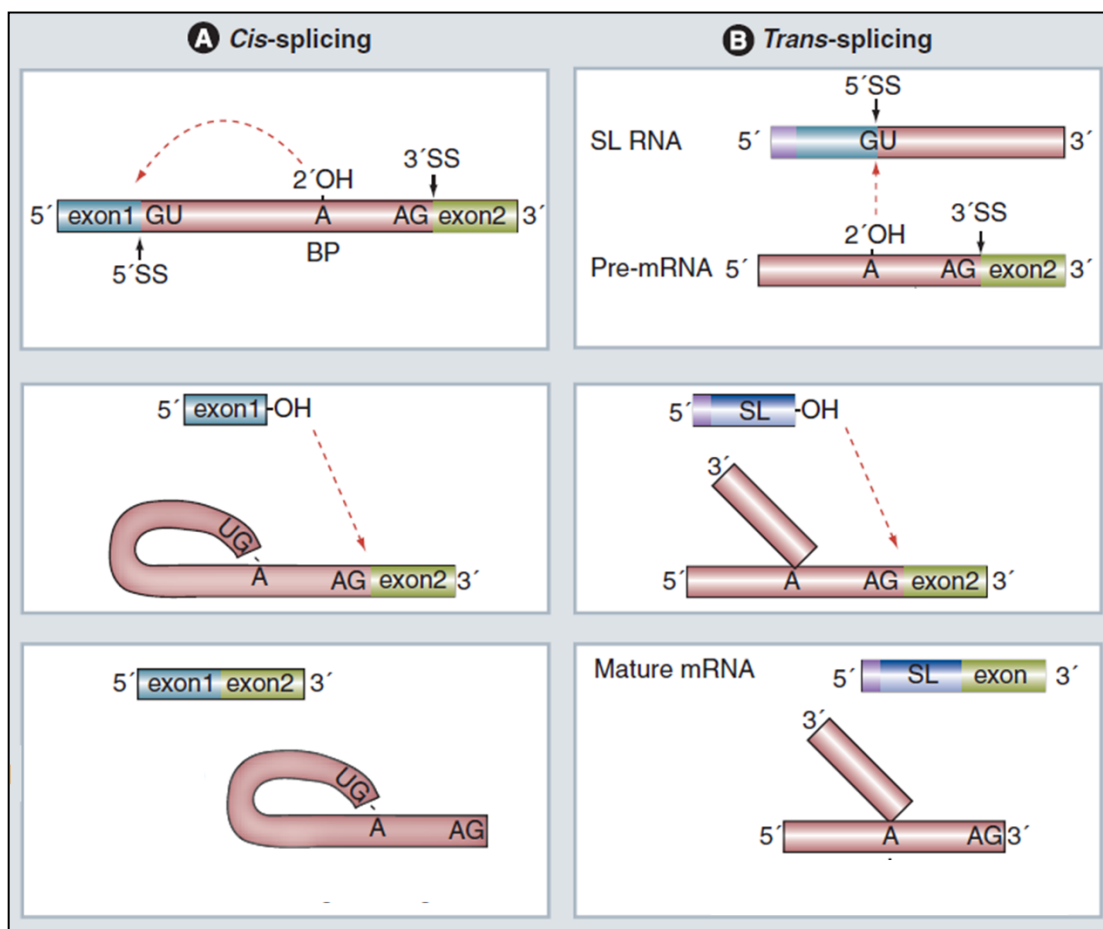
A maior parte dos organismos eucariotos contém sequências gênicas com regiões codificantes (*éxons*) intercaladas por outras não codificantes (*íntrons*). A remoção dos *íntrons* envolve um processamento, responsável por uma das principais etapas na maturação do pré-mRNA, denominado *splicing*. Em eucariotos, esse evento é mediado pela ação de um complexo de associação de ribonucleoproteínas com snRNAs (*short nuclear RNAs*), o spliceossomo (LEE et al, 2015). A combinação de snRNAs no spliceossomo às sequências consenso no pré-mRNA promove duas

reações de transesterificação que resultam na junção dos éxons e liberação do laço intrônico (SMATHERS; ROBART, 2019).

Os genes codificantes de proteínas nos tripanosomatídeos se caracterizam por uma escassez de introns, o que significa que seus mRNAs não estão sujeitos ao *splicing* convencional, também chamado de *cis-splicing*, que envolve processos de excisão que ocorrem dentro da mesma molécula de pré-mRNA. Por outro lado, seus mRNAs estão sujeitos ao *trans splicing*, que unifica dois pré-mRNAs distintos para a formação de moléculas quiméricas (LEI et al, 2016). Este processo exerce um papel essencial no processamento dos pre-mRNAs de tripanosomatídeos levando à clivagem do pre-mRNA policistrônico em mRNAs monocistrônicos (CLAYTON, 2019; GÜNZL, 2010). Nesses organismos o SL, ou miniéxon, consiste de uma sequência conservada de 39 nucleotídeos de comprimento proveniente da clivagem de um RNA não codificante (ncRNA) (GÜNZL, 2010). O processo de *trans splicing* envolve a transferência do SL, carregado de 5' cap 7-metilguanosina (m^7G), para a região 5' de mRNAs imaturos formando a extremidade 5' do mRNA maduro (Figura 4). O mesmo processo leva à formação da terminação 3' do mRNA posicionado em posição imediatamente anterior na molécula precursora. O processo é dependente de sítios de ligação para proteínas do spliceossomo que promovem sua adição em diferentes pré-mRNAs (STOVER; KAYE; CAVALCANTI, 2006). O cap adicionado pelo SL, trata-se do cap-4, uma m^7G com quatro nucleotídeos subsequentes metilados. O SL contendo cap-4, junto à maquinaria de poliadenilação, participa então na maturação e delimitação de clivagens de forma a jusante e a montante das regiões que codificam os genes (LIANG et al, 2003).

Apesar da identificação de diversos componentes referentes ao spliceossomo, não são muito descritos os componentes e funções associadas à maquinaria de poliadenilação em tripanosomatídeos (KOCH et al, 2016). No entanto, enquanto no processo de *cis splicing* a poliadenilação é acoplada à transcrição através da interação com a RNA polimerase II, nos tripanosomatídeos a poliadenilação está associada ao *trans splicing* e ambos dependem de um trato de pirimidina presente no próprio pré-mRNA que, unido a fatores de clivagens, delimitam o sítio de poliadenilação que antecede o sítio de *trans splicing* (BENZ et al, 2005; MATTHEWS; TSCHUDI; ULLU, 1994).

Figura 4. Comparação entre mecanismos de *cis* e *trans* splicing.



(A) *Cis* splicing e (B) *trans* splicing. Os dois mecanismos com os sítios GU e AG participando como sítios 5' e 3' de splicing (SS) e sítio de ramificação representado por BP. Fonte adaptada: (MICHAELI, 2011).

2.3.3 Regulação pós-transcricional da expressão gênica

Devido à ausência do controle da iniciação da transcrição pela RNA polimerase II individualmente, a regulação gênica de tripanosomatídeos depende de etapas que ocorrem a nível pós-transcricional em mRNAs, controlando eventos como: processamento, degradação e tradução (CLAYTON, 2019; GAZESTANI; LU; SALAVATI, 2014). Em concordância com isso, é possível observar uma certa homogeneidade nos níveis de diferentes transcritos mesmo com as diversas alterações nos padrões de síntese proteica. Para além dessa expressão basal, estão inclusos genes posicionados em cromossomos com números de cópias variáveis e mRNAs transcritos pela RNA polimerase I (KRAMER; CARRINGTON, 2011).

Componentes *cis* e *trans* regulatórios do mRNA estão frequentemente associados ao controle pós-transcricional, como elementos contidos em regiões da molécula do mRNA, microRNAs e proteínas de ligação ao RNA (RBPs) (NAJAFABADI et al, 2013). À medida que ocorre a transcrição no núcleo, mRNAs são cobertos por RBPs para a formação de complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) (LEE et al, 2015). mRNPs promovem eventos relacionados ao metabolismo e à exportação dos transcritos, interferindo na localização, degradação e disponibilidade para a maquinaria da tradução (KHONG; PARKER et al, 2020).

2.4 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA

As RBPs participam de diversos processos biológicos associados ao mRNA, como maturação, exportação, localização celular, controle de tradução, estabilização, degradação e edição de bases (SOHEILYPOUR; MOFRAD, 2016; TIAN et al, 2019; KHONG; PARKER, 2020). Esses polipeptídeos podem ser classificados de acordo com os seus domínios de ligação ao RNA, sendo os mais comuns: motivos de reconhecimento ao RNA (RRMs) e domínios *zinc fingers* (ZFDs) (ROMAGNOLI et al, 2020). Além disso, sob situações de estresse, proteínas com ausência de motivos de ligação específicos participam na ligação ao RNA de forma similar às RBPs, sendo denominadas de RBPs não canônicas (BALCERAK et al, 2019).

A associação de RBPs sobre o mRNA resulta na formação de complexos ribonucleoproteicos (mRNPs) que, de acordo com o padrão de proteínas associadas, direciona o RNA para diferentes processos (SINGH et al, 2015). Diferentes padrões de mRNPs podem ser associados a subconjuntos de transcritos sob efeito de alterações em estados celulares como uma forma de controle da tradução de proteínas (HARVEY et al, 2018). Etapas da tradução são usualmente controladas pela disponibilidade de acesso a fatores de tradução, como os fatores de iniciação (eIFs de *eukaryotic Initiation Factors*) e de alongamento (eEFs de *eukaryotic Elongation Factors*) (HINNEBUSCH, 2014), de forma que diferentes RBPs podem recrutar diferentes fatores de tradução (ROMANIUK, 2016). Além disso, RBPs agem sobre ambos os grupos de fatores, exibindo efeito sobre interações que medeiam etapas importantes da tradução, como: a conformação circular do mRNA, ligação do eIF4E

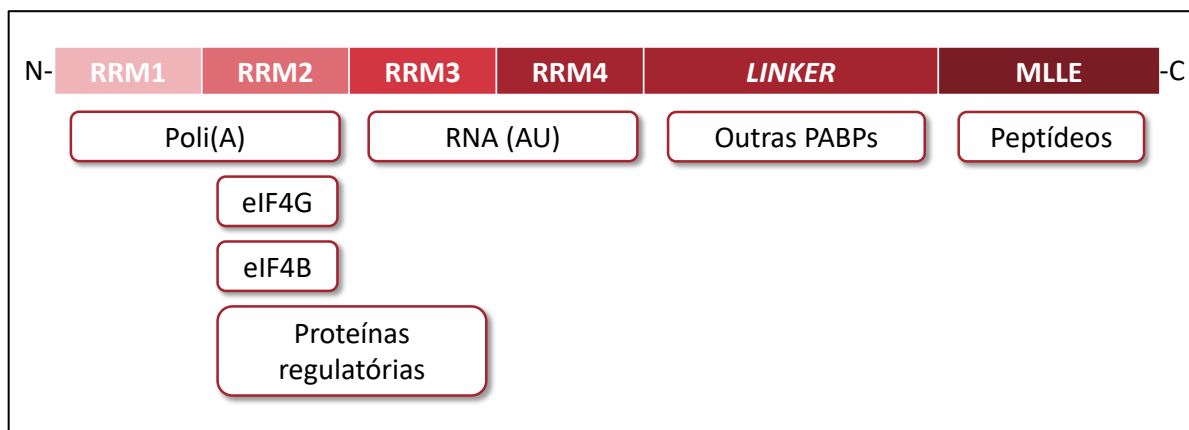
ao cap (componente do complexo eIF4F descrito mais adiante), recrutamento ribossomal e outros (SZOSTAK; GEBAUER, 2013).

2.4.1 Proteína de ligação à cauda poli(A) – PABP

Dentre as RBPs, as proteínas de ligação à cauda poli(A) (PABPs) se apresentam como uma classe de polipeptídeos altamente conservada entre diferentes espécies de eucariotos e com funções críticas para sua sobrevivência. São assim denominadas em decorrência de suas interações direcionadas ao terminal 3' poliadenilado (poli(A)) dos mRNAs (MACHIDA et al, 2018). Para além da interação com o poli(A), contatos estabelecidos entre PABP com outras sequências do RNA e proteínas parceiras permitem sua atuação sobre diferentes processos mRNA-dependentes na célula, partindo da sua síntese até o seu decaimento (ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013).

PABPs podem ser classificadas e distribuídas em diferentes conjuntos, que abrigam componentes funcionalmente e estruturalmente distintos, variantes entre espécies de eucariotos. Em humanos, sete proteínas são agrupadas dentro de quatro desses conjuntos: PABPs citoplasmáticas (PABPCs), nucleares (PABPNs), embrionárias e ligadas ao cromossomo X (DAI et al, 2012; ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013). De forma similar à boa parte das RBPs, PABPs carregam motivos de reconhecimento ao RNA (RRMs) para a interação com regiões do RNA e proteínas (WIGINGTON et al, 2014). PABPNs contém apenas um RRM de morfologia não canônica (GE et al, 2008). PABPCs são estruturalmente conservadas, compostas por um grupo de quatro RRM (1-4) posicionados em *tandem* na sua região N-terminal, uma região *linker* e o domínio C-terminal com motivo de ligação a peptídeos (Figura 5) (KÜHN; WHALE, 2004). No presente trabalho, PABPCs, foco desse trabalho, serão tratadas simplesmente como PABPs.

Figura 5. Representação linear das diferentes regiões das PABPs citoplasmáticas.



Seu N-terminal é marcado pela presença de quatro motivos de reconhecimento ao RNA (RRM1-4), uma região *linker* intermediária e o domínio C-terminal do tipo MLLE. Na figura, cada motivo associado a interações identificadas em eucariotos.

RRMs são domínios compostos por quatro folhas- β e duas α -hélices que se arquitetam em uma estrutura globular com topologia $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (CHEN; VARANI, 2013). As interações entre RRM1 e 2 da PABPC à cauda poli(A) e entre seu RRM2 e o fator de tradução eIF4G provocam alterações conformacionais em regiões que ligam esses motivos. Consequentemente, configurações mais abertas entre RRM1 e 2 agem como potenciais sítios de interação para outras proteínas (SAFAEE et al, 2012; LEE et al, 2014; HONG et al, 2017). As diferentes interações da PABP via RRM1 e 2 desempenham papéis importantes na poliadenilação, exportação, regulação da expressão, estabilidade, degradação e tradução de transcritos (ELISEEVA et al, 2013). Os RRM1 e 2 participam na ligação de alta afinidade à cauda poli(A). O RRM2 ainda estimula a tradução pela interação com o eIF4G (SAFAEE et al, 2012). A associação com eIF4G e outros fatores, como o eIF4B, estimula a atividade da RNA helicase eIF4A (GALLIE et al, 2018). Os RRM2 e 3 carregam sítios de ligação a proteínas regulatórias com motivo de interação à PABP (PAM1), que impedem associação entre PABPs e eIF4Gs (KOZLOV et al, 2010). Por outro lado, os RRM3 e 4 têm menor afinidade à cauda poli(A), se ligam a regiões ricas em AU do RNA e ainda medeiam outras interações proteína-proteína não tão bem definidas (GOSS; KLEIMAN, 2013; BROOK et al, 2012).

Entre o agrupamento de RRM1 e 2 e o domínio C-terminal das PABPs, encontra-se uma região intermediária (*linker*) não estruturada (IVANOV et al, 2016). Em

humanos, a região *linker* promove interações homofílicas entre PABPs agindo em conjunto com a cauda poli(A) (MELO et al, 2003). Já o domínio C-terminal das PABPs (PABC) estrutura-se em 5 hélices e contém o motivo conservado MLLE (que também dá nome a esse domínio), abreviação de MLLEKITG (Met-Leu-Leu-Glu-Lys-Ile-Thr-Gly), de interação a peptídeos (MUÑOZ-ESCOBAR et al, 2015). A superfície formada por esse motivo promove a interação de proteínas que interagem com a PABP através de motivos do tipo PAM2, como o fator de terminação eRF3 e a desadenilase poli(A) nuclease 3 (PAN3). Um conjunto de ligações de pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e empilhamento de cadeias aromáticas, medeia a interação entre PAM2 e o domínio PABC/MLLE nas PABPs (KOZLOV et al, 2010).

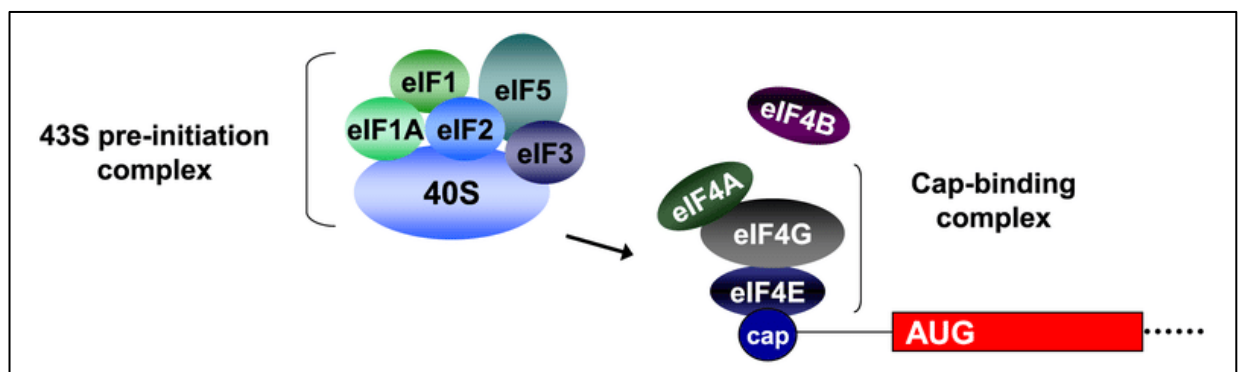
2.5 SÍNTESE DE PROTEÍNAS NOS EUCARIOTOS

A síntese de proteínas, ou tradução do mRNA, é um processo celular incluso numa série de eventos relacionados à produção de proteínas. mRNAs transcritos a partir do DNA são exportados, do núcleo ao citosol, carregando sequências ribonucleotídicas com trincas de bases (códon) correspondendo à codificação de aminoácidos específicos (LITWACK, 2017). Para além do mRNA, RNAs transportadores (tRNAs) e ribossômicos (rRNAs) também participam ativamente desse processo. Os tRNAs, sob catálise da aminoacil-tRNA sintetase, atuam como moléculas adaptadoras, contendo uma região de bases não pareadas (anticódon) responsável pela decodificação da molécula de mRNA e outra região 3' ligada covalentemente a um aminoácido (ALBERTS et al, 2017). Os rRNAs, por outro lado, participam do sítio catalítico do complexo ribossomal, destinado à formação de ligações peptídicas entre esses aminoácidos (CLARK; PAZDERNIK, 2013).

A tradução de proteínas é subdividida em iniciação, alongamento, terminação e reciclagem de ribossomos (DEVER; GREEN, 2012). Em organismos eucarióticos, a etapa de iniciação é a mais regulada e conta com a participação de muitos fatores de iniciação da tradução (os eIFs) (JAGUS et al, 2012). Em síntese, a finalidade dessa etapa consiste na montagem do complexo ribossômico 80S, a partir das subunidades menor (40S) e maior (60S), sobre o códon de iniciação (AUG) interagindo com o metionil-RNA transportador (tRNA_i) (AITKEN; LORSCH, 2012).

A tradução se inicia com o complexo ternário (CT), formado pelo fator eIF2 em sua forma ligada a GTP e Met-tRNA_i (eIF2-GTP-Met-tRNA_i), e sob ação dos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5, sendo carregado para a subunidade menor ribossomal e montando o pré-complexo de iniciação (PIC) 43S (AITKEN; LORSCH, 2012; HINNEBUSCH, 2014). Em seguida, o reconhecimento do mRNA pelo PIC 43S é mediado por fatores envolvidos na interação com o cap m⁷G na sua extremidade 5', componentes do complexo de ligação ao cap eIF4F (Figura 6). Destes, a subunidade eIF4E, liga-se diretamente ao cap e interage com uma segunda subunidade, o eIF4G que, por sua vez, possui motivos de ligação a componentes do próprio complexo e aos eIF1, eIF3, eIF5 e à proteína de ligação à cauda poli(A), essa última ligação garantindo um aumento nas taxas de tradução e estabilidade de mRNAs poliadenilados (KÜHN; WHALE, 2004; ROSS-KASCHITZA; ALTMANN, 2020; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Esse padrão de interações promove a conexão do mRNA e complexo eIF4F, através do eIF3, com a subunidade 40S, transitando do pré-complexo, para o complexo de iniciação 48S (MACHIDA et al, 2018).

Figura 6. Tradução via reconhecimento do cap e escaneamento ribossomal.



Fatores de iniciação eucarióticos do pré complexo de iniciação 43S (PIC 43S) e do complexo do tipo eIF4F. Fonte adaptada: (FITZGERALD; SEMLER, 2011).

A subunidade eIF4A, do eIF4F, sendo uma helicase da família DEAD-box, tem sua processividade aprimorada por estímulo do eIF4B. Essa prepara o sítio de ligação ao PIC no mRNA desfazendo estruturas secundárias na 5' UTR em direção ao AUG

(HILBERT et al, 2011). O reconhecimento do códon de iniciação, pela subunidade menor, detém sua movimentação (SHIROKIKH; PREISS, 2018). Essa pausa permite a estabilização da interação códon-anticódon, que afeta interações e permite liberação de parte de seus eIFs, como eIF1 e eIF2•GDP, pós hidrólise (JENNINGS et al, 2017). Subsequentemente, o contato com 60S é estimulado por eIF5B, promovendo a montagem do ribossomo competente ao alongamento (HINNEBUSCH, 2014).

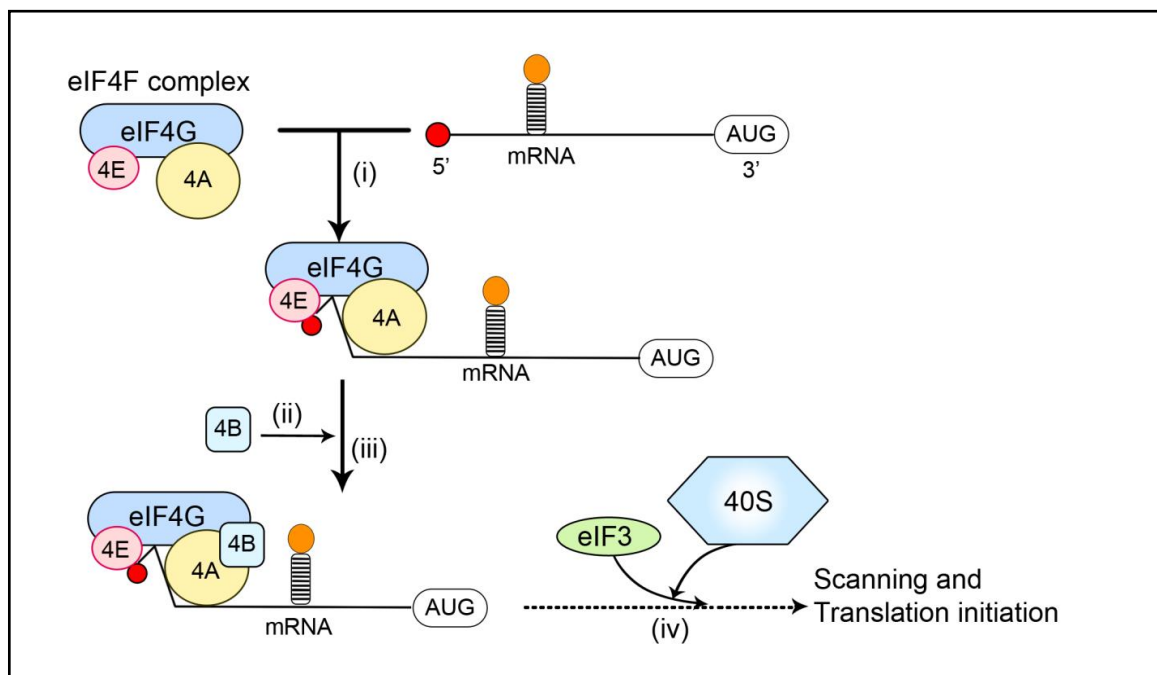
2.5.1 Complexo eIF4F nos eucariotos

Os fatores de iniciação eucarióticos podem ser agrupados em classes de acordo com suas funções. O eIF4F está incluso na classe 4 de eIFs, que abrange proteínas envolvidas na ativação do RNA mensageiro e respectiva ligação à subunidade 40S. Além deste, os fatores eIF4B e eIF4H também estão inseridos nesse grupo (MERRICK, 2004). Apesar da capacidade do PIC 43S em se ligar às terminações 5' dos mRNAs, regiões não traduzidas à montante da sequência codificante podem apresentar estruturas secundárias formadas pelas fitas da própria molécula. A ação combinada desses fatores desfaz essas estruturas e permite que o ribossomo se associe ao mRNA para a realização da leitura (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010).

O eIF4F participa como mediador da ligação entre o cap 5' do mRNA e o complexo 43S. O eIF4F apresenta três subunidades: eIF4A, uma helicase DEAD-box; eIF4E, a proteína de ligação ao cap; e eIF4G, proteína ancoradora que carrega sítios de ligação para eIF4A, eIF4E, proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) e eIF3 (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010; PARK et al, 2011). A interação do eIF4G, ligado ao eIF4E, com o eIF3 participa diretamente do recrutamento da subunidade ribossomal 40S à molécula para a formação do complexo 48S (Figura 7) (MERRICK, 2015). Além disso, a presença de PABPs, nas extremidades 3' dos mRNAs permite a união das terminações 5' e 3' do mRNA linear, por intermédio da interação simultânea do eIF4G à PABP e ao eIF4E (cap/eIF4E/eIF4G/PABP/3'). Em humanos, um motivo PAM-1, rico em aminoácidos de cadeias laterais ácidas, é responsável pela interação do eIF4G com a PABP (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010). A conformação resultante dessas interações está diretamente envolvida com a estabilidade dessas

moléculas e promoção da tradução pela formação de polissomas (ALEKHINA et al, 2020).

Figura 7. eIF4F mediando recrutamento do mRNA.



(I) Contato entre complexo eIF4F e mRNA através da interação eIF4E-5'-cap. (II) Interação entre eIF4B e eIF4G no aprimoramento da atividade helicase do eIF4A. (III) Estrutura secundária (grampo) na 5'UTR a ser desfeita por eIF4B/eIF4A. (IV) Recrutamento da subunidade 40S ao mRNA por meio da interação entre eIF4G e eIF3. Início da leitura por 40S em busca do códon de iniciação. Fonte adaptada: (HOU et al, 2012).

2.6 HOMÓLOGOS DE PABP E FATORES DE TRADUÇÃO EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Com relação a PABPs, três homólogos foram descritos em tripanosomatídeos (PABP1, PABP2 e PABP3), sendo os dois primeiros conservados na maior parte das espécies e o terceiro ausente em espécies do gênero *Trypanosoma* (DA COSTA LIMA et al, 2010; KRAMER et al, 2013). As três PABPs são predominantemente citoplasmáticas, mas apenas a PABP1 mostrou exclusividade a esta localização (DA COSTA LIMA et al, 2010). Como todas as PABPs típicas, estas três proteínas são estruturadas em: uma região N-terminal apresentando quatro RRM, uma região *linker*

mais variável e uma região C-terminal consistindo de um domínio PABC (MLLE) estruturado em um conjunto de três alfa-hélices (RODRIGUES et al, 2019).

Foi visto que, para além do sítio conservado de interação a motivos PAM2, homólogos de PABP1 em espécies distintas, exibiam similaridades maiores entre si quando comparados a homólogos de PABP2 ou PABP3 da mesma espécie (RODRIGUES et al, 2019). Também foi demonstrado que, os homólogos PABP2 e PABP3 interagem em conjunto, porém sem associação descrita com PABP1. A PABP1, por sua vez, encontra-se associado a populações de mRNAs que são distintas daquelas ligadas às PABP2 e PABP3 (DA COSTA LIMA et al, 2010; ZOLTNER et al, 2018; ASSIS et al, 2021).

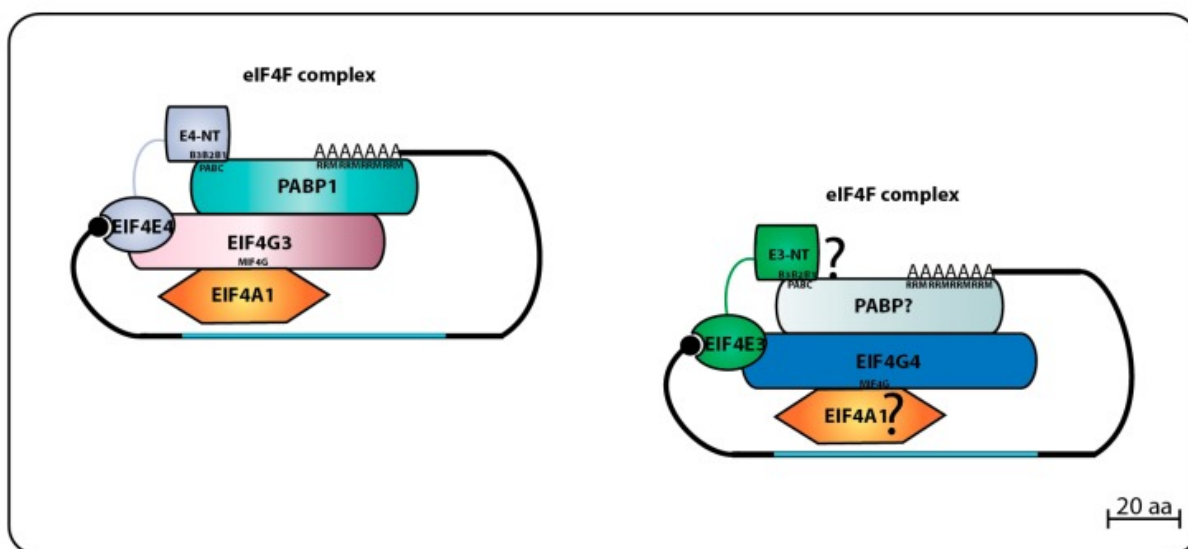
Já é bem elucidada a participação do homólogo PABP1 no complexo canônico EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI (DA COSTA LIMA et al, 2010). No entanto, estudos em *L. amazonensis* relatam a possibilidade da associação do homólogo PABP2 ao complexo secundário EIF4E3/EIF4G4/EIF4AI (ZINOVIEV, 2011). No primeiro complexo, ao contrário do convencionalmente observado em eucariotos, a interação entre EIF4E4 e PABP1 é sugerida como ainda mais importante para a iniciação da tradução que a interação EIF4E4•EIF4G3 (DA COSTA LIMA et al, 2010; DE MELO NETO et al, 2015). Essa interação, envolve o contato do motivo PAM2 contido no N-terminal do EIF4E4 com bolsos hidrofóbicos da tripla hélice do domínio C-terminal MLLE da PABP1 (ZINOVIEV, 2011; DE MELO NETO et al, 2018; RODRIGUES et al, 2019).

2.6.1 eIF4F em Tripanosomatídeos

Múltiplos homólogos de subunidades do eIF4F foram identificados em tripanosomatídeos, bem como, diferentes homólogos da proteína de ligação à cauda poli(A). Dos componentes do eIF4F de tripanosomatídeos, são descritos dois homólogos do eIF4A (DHALIA et al, 2006; YOFFE et al, 2004, 2006), seis referentes ao eIF4E (FREIRE et al, 2014) e cinco ao eIF4G (DHALIA et al, 2005). Todos esses homólogos exibem um dado grau de conservação funcional entre as diferentes espécies dessa família. Os EIF4E3 e EIF4E4 são os homólogos de eIF4E mais longos em decorrência da presença de uma extensão N-terminal não homóloga aos demais.

Esses também são capazes de participar de interações que promovem a formação de complexos eIF4F (FREIRE et al, 2011). Dois principais complexos foram caracterizados nesses organismos, envolvem estes dois homólogos de eIF4E: EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1 e EIF4E3/EIF4G4/EIF4A1 (Figura 8) (FREIRE et al, 2011; MOURA et al, 2015; FREIRE et al, 2017). O primeiro deles, demonstra um papel importante na iniciação da tradução e suas subunidades eIF4E e eIF4G associam-se a polissomass sob gradientes de sacarose (YOFFE et al, 2009). Os EIF4G3 e EIF4E4 também co-precipitam especificamente com a PABP1, o que também confirma o papel desta PABP na tradução (ASSIS et al, 2021; DA COSTA LIMA et al, 2010; DE MELO NETO et al, 2018).

Figura 8. Complexos eIF4F formado pelas subunidades EIF4E4 e EIF4E3.



O EIF4E4 compõe o principal complexo, interagindo com EIF4G3, EIF4A1 e o homólogo PABP1 através de sua extremidade N-terminal. Por outro lado, o EIF4E3 interage com o EIF4G4 em um segundo complexo. Fonte adaptada: (FREIRE et al, 2017).

2.7 RESULTADOS RECENTES SOBRE A PABP1 DE *LEISHMANIA*

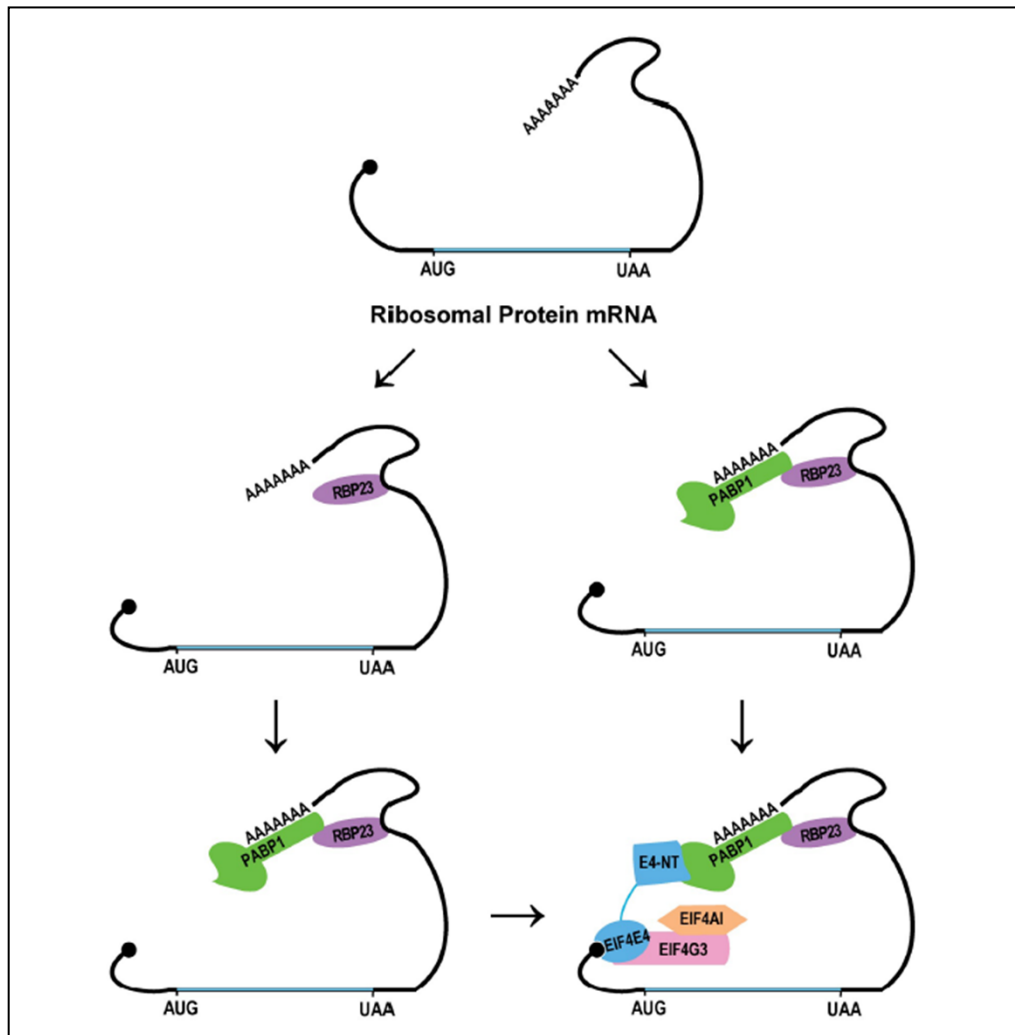
2.7.1 Interação com a RBP23 e mRNAs de proteínas ribossomais

Ainda não é clara a dinâmica de interações gerais relacionadas à PABP1 na sua participação exclusiva com o complexo canônico. Parceiros funcionais são sugeridos como componentes do processo de recrutamento do complexo

EIF4E4/EIF4G3 pela PABP1 (DE MELO NETO et al, 2018). Ensaios de imunoprecipitação (IP) e espectrometria de massas, com homólogos da PABP em *Leishmania*, foram úteis na identificação de potenciais parceiros. Os respectivos dados reafirmam a interação dos componentes EIF4E4/EIF4G3 com a PABP1, ressaltando ainda a ausência dos mesmos em ensaios relacionados às PABPs 2 e 3 (DA COSTA LIMA et al, 2010; DE MELO NETO et al, 2016). Além dessas subunidades, interações com outros homólogos referentes às subunidades do eIF4F não foram vistos interagir diretamente com a PABP1 (DA COSTA LIMA et al, 2010).

Para além dos parceiros do tipo eIF4F, também foram analisados os mRNAs co-precipitados com os diferentes homólogos da PABP através de imunoprecipitação seguida por mRNAseq. Nesse contexto, destaca-se a associação preferencial de mRNAs codificantes de proteínas ribossomais ao homólogo PABP1. O mesmo foi observado para uma RBP, a RBP23, onde mais de 90% dos seus transcritos também eram codificantes de proteínas ribossomais (ASSIS et al, 2021). A RBP23 também foi identificada como o polipeptídeo de maior enriquecimento em relação aos demais para a proteína homóloga PABP1 (DE MELO NETO et al, 2018). Adicionalmente, ensaios de imunoprecipitação em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania infantum*, reafirmam a participação da RBP23 como componente de co-precipitação preferencial para PABP1 em tripanosomatídeos (ASSIS et al, 2021; ZOLTNER et al, 2018). Esses resultados, sugerem um potencial papel à RBP23 na mediação da atividade da PABP1 sobre o recrutamento do complexo EIF4E4/EIF4G3 (Figura 9) e consequente estímulo das taxas de tradução sobre populações de mRNAs, apesar de ainda serem desconhecidas as regiões responsáveis por essa interação tanto na RBP23 quanto na PABP1 (ZOLTNER et al, 2018; ASSIS et al, 2021).

Figura 9. Papel proposto para a RBP23 na mediação da associação de mRNAs de proteínas ribossomais com a PABP1 e um dos complexos EIF4F de tripanosomatídeos.



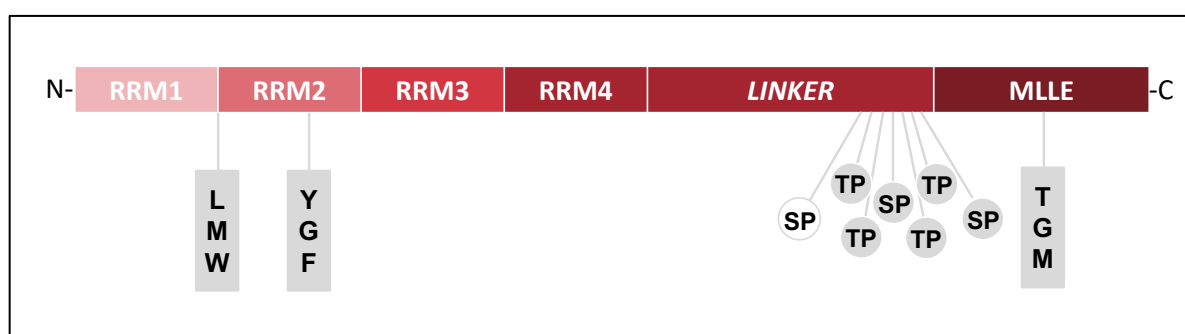
Fonte: (ASSIS et al, 2021).

2.7.2 Mutagênese e identificação de motivos funcionalmente relevantes

Estudos prévios identificaram, através de mutagênese, diferentes motivos associados a essencialidade da PABP1 ou alguns de seus processos relacionados à iniciação da tradução de tripanosomatídeos associados a regiões conservadas em seus ortólogos (Figura 10). A primeira construção mutante consistia na modificação de seis dos sete motivos de sequência, envolvendo sítios de serina-prolina (SP) e treonina-prolina (TP) na região *linker* da proteína (mutante PABP1_{TP/SP}), comuns alvos de quinases do tipo CRK (DE MELO NETO et al, 2018). Os demais mutantes obtidos,

correspondiam a motivos conservados em diferentes ortólogos da PABP1 que estariam envolvidos em outras atividades funcionais. A primeira delas, Leucina-Metionina-Triptofano (L₉₈-M₉₉-W₁₀₀) (PABP1_{LMW/AAA}), encontrava-se entre os RRM1 e 2 da PABP1, região importante para a ligação desta proteína com fatores eIF4G e eIF4B em plantas (CHENG; GALLIE 2007). A segunda, Tirosina-Glicina-Fenilalanina (Y₁₅₅-G₁₅₆-F₁₅₇) (PABP1_{YGF/AAA}), está incluída no motivo RNP2 do RRM2 e participa de ligação direta com a cauda poli-A de mRNAs (DEO, 1999). Uma terceira construção, combinando ambos os mutantes LMW/AAA e YGF/AAA também foi gerada (PABP1_{LMW/AAA-YGF/AAA}). Por fim, o quarto mutante envolve os aminoácidos Treonina-Glicina-Metionina (T₅₂₂-G₅₂₃-M₅₂₄) (PABP1_{TGM/AAA}), também encontrado em PABP2, incluso no núcleo estrutural do domínio MLLE, responsável pela interação com o EIF4E4 (KOZLOV et al, 2010; ZINOVIEV, 2011; RODRIGUES et al, 2019). Em um primeiro momento, estes mutantes levaram à identificação dos sítios mutados na PABP1_{TP/SP} como alvos para a fosforilação da proteína e dos mutantes PABP1_{LMW/AAA} e PABP1_{YGF/AAA} como incapazes de complementar a ausência da PABP1, atribuindo um papéis importantes para esses motivos (DE MELO NETO et al, 2018). Entretanto, ainda não foram avaliadas alterações no padrão de interações proteicas destes diferentes mutantes.

Figura 10. Representação esquemática de motivos funcionais mutagenizados ao longo da PABP1.

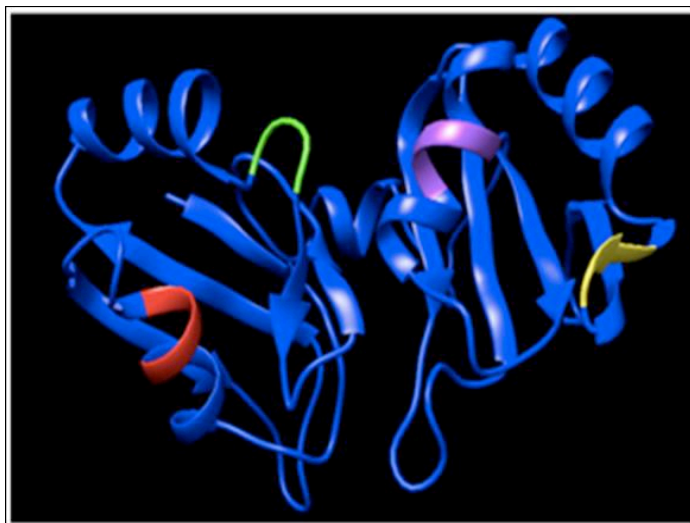


Na figura, o motivo LMW entre os RRM1 e 2, o motivo YGF no RRM2, 6 dos 7 sítios de fosforilação (SP/TP) na região linker e o motivo TGM dentro do domínio MLLE.

Ainda na PABP1, os RRM1 e 2 participam de ligação em regiões não específicas do RNA e podem participar na mediação de interações proteicas (GOSS;

Sequências separadas entre RRM3 e RRM4 pelo tracejado superior. Em verde, destacados os resíduos conservados, nas posições: K225, F226, F227, L325 E326, L327, H270, H271, I272, M371, L372, N373. Fonte adaptada: (XAVIER, 2019).

Figura 12. Estrutura do RRM34 da PABP1 de *Leishmania infantum*.



Estrutura contendo alfa-hélices, folhas betas e voltas em azul referente aos RRM3 e 4. Regiões marcadas em cores: KFF(vermelho), HHI (verde), LEL (roxo) e MLN (amarelo). Fonte adaptada: (XAVIER, 2019).

Ainda não se é amplamente compreendida a atividade da PABP1 na iniciação da tradução de tripanosomatídeos. A caracterização de seus diferentes componentes estruturais pode fornecer dados importantes para interpretação de sua participação nesse processo tanto em tripanosomatídeos quanto em eucariotos de forma geral. Conforme sejam identificadas potenciais particularidades em processos críticos envolvendo a PABP1 de parasitos dessa família, os conhecimentos obtidos através de análises desse caráter podem servir de subsídio para a determinação de novos alvos terapêuticos, em estudos posteriores, que compensem as limitações das terapias atualmente administradas para doenças causadas por tripanosomatídeos, estes podendo incluir sítios de interações envolvendo componentes do complexo eIF4F e proteínas de ligação ao RNA, como a RBP23.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar motivos funcionais da proteína de ligação à cauda poli-A 1 (PABP1) incluindo os motivos de reconhecimento ao RNA (RRMs) 3 e 4 frente aos seus papéis na iniciação da tradução de *Leishmania infantum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o efeito *in vivo* de mutantes gerados nos RRM3s 3 e 4 sobre o fenótipo e viabilidade celular na ausência do gene *PABP1* endógeno;
2. Identificar *in vivo* o impacto de mutantes previamente gerados, tendo como alvo os RRM3s 1 e 2, região *linker* e domínio MLLE da PABP1, frente à ligação a parceiros proteicos da proteína nativa;
3. Identificar *in vivo* o impacto dos novos mutantes gerados nos RRM3s 3 e 4 da PABP1 frente à ligação a parceiros proteicos da proteína nativa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MUTAGÊNESE SÍTIO-DIRIGIDA EM RRMS 3 E 4

Para as construções mutantes da PABP1, inicialmente, foi utilizada a clonagem do gene selvagem LINF_350055900 (PABP1) em pGEX-4T3 (GE Healthcare) como molde para os posteriores ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações necessárias para a realização da mutagênese contaram com a atividade das enzimas *Pfu* DNA Polymerase (Invitrogen) e Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs).

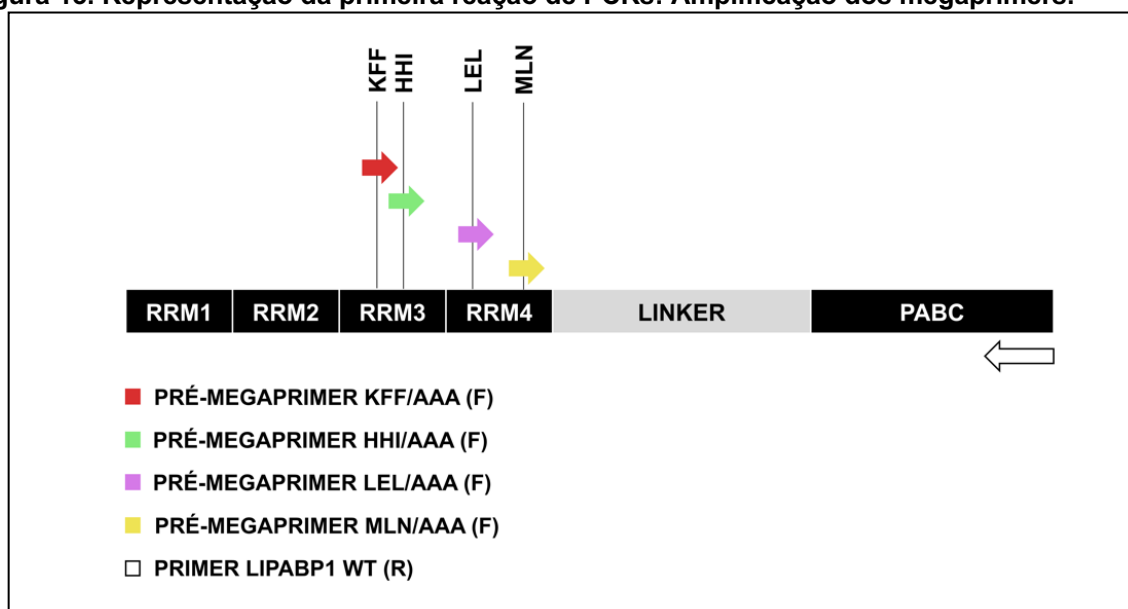
A primeira reação, compreendendo uma PCR de *touchdown*, foi composta por: *Pfu* DNA Polymerase (1,25 u), dNTP (200 µM cada), *primers* (1.0 µM), 0,3 µg do molde de DNA plasmidial, com o tampão da enzima e MgSO₄ (1.5 mM) para um volume final de 25 µL. Quatro diferentes *megaprimers*, sendo longos oligonucleotídeos contendo as substituições, foram gerados a partir desta reação de PCR, envolvendo primers 5', adicionando o sítio de restrição BamHI, e primers 3' consistindo de oligonucleotídeos que induziram as substituições de nucleotídeos correspondentes aos aminoácidos de interesse nas diferentes regiões gênicas (Figura 13) (Quadro 1). Foram utilizadas as seguintes condições de temperatura: A: desnaturação inicial a 95°C durante 4 minutos; B: 10 ciclos de 95°C por 40 segundos, anelamento decrescente de 68 a 58°C durante 30 segundos e extensão de 72°C por dois minutos; C: 25 ciclos de 95°C por 40 segundos, 58°C durante 30 segundos e 72°C durante 2 minutos; D: extensão final de 72°C por 6 minutos.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a mutagênese do gene *LiPABP1*. As bases em *itálico* indicam os sítios de restrição BamHI (GGATCC) e HindIII (AAGCTT). Sublinhadas estão os nucleotídeos referentes às substituições. Em **negrito**, destacam-se os nucleotídeos que posteriormente serão transcritos como códon de iniciação.

Gene	Sentido	Sequência
<i>LiPABP1</i>	<i>Forward</i>	GGATCC ATG GCTGCTGCTGTCCAGGAAG
<i>LiPABP1</i>	<i>Reverse</i>	AAGCTTTTACGCCGTCTGATGCGCCTTGA
<i>LiPABP1</i> <i>STOP OUT</i>	<i>Reverse</i>	AAGCTTCGCCGTCTGATGCGCCTTGA

<i>LiPABP1</i> KFF/AAA	<i>Forward</i>	ACAAGGAAGTCATCGAGG <u>CGGCCGCCG</u> CAAAGTTTCGGCGGC ATC
<i>LiPABP1</i> HHI/AAA	<i>Forward</i>	GTCGAAGCGATGCACGACG <u>CTGCCGCCG</u> ACGGCATCACGGC ACCT
<i>LiPABP1</i> LEL/AAA	<i>Forward</i>	TTCACGGGCGCGGACCTG <u>GCCGCCG</u> CCTTCAAGGAGTACGG CGAA
<i>LiPABP1</i> MLN/AAA	<i>Forward</i>	CGCGAGATGAACGGTCGCG <u>GCGGCCG</u> CGGCAAGCCCCTCAT CGTC

Figura 13. Representação da primeira reação de PCRs: Amplificação dos megaprimers.

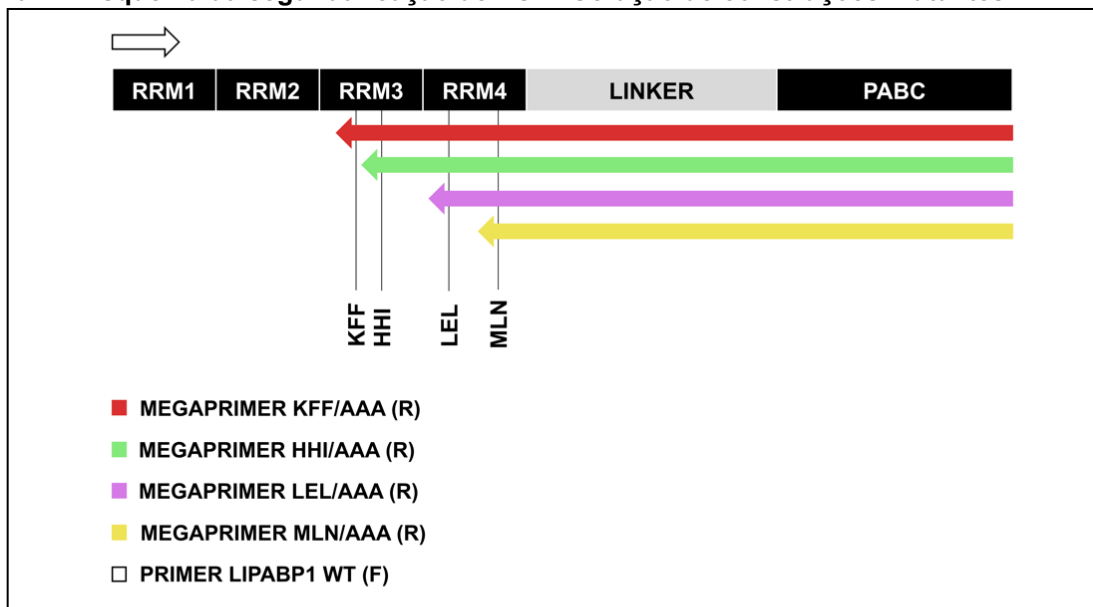


Primers 5' com substituições, na figura denominados de “pré-megaprimers”, representados em setas, posicionados nas regiões correspondentes aos sítios de mutação. Em contrapartida, o primer 3' correspondente à extremidade 3' do gene *PABP1* de *Leishmania infantum*.

Uma segunda reação de PCR foi preparada com a aplicação de 3 a 5 µL do produto da primeira reação (megaprimer) purificado. Os quatro fragmentos gerados atuaram como *megaprimers* 3' enquanto o primer 5' correspondia à extremidade 5' do gene da PABP1 (Figura 14). Para essa reação, foram utilizados: Phusion GC Buffer, dNTP (200 µM cada), 3,5 µL do megaprimer 3', primer 5' *forward* (1.0 µM), 0,1 µg do molde de DNA plasmidial, DMSO (3%), Phusion DNA Polymerase (1 ul) e água para um volume final de 50 µL. As condições envolveram: A: desnaturação inicial de 98°C durante 4 minutos; B: 35 ciclos de 98°C por 30 segundos, anelamento de 68°C por 35

segundos e 72°C de extensão por 1 minuto e 35 segundos; C: extensão final a 72°C durante 95 segundos.

Figura 14. Esquema da segunda reação de PCR: Geração de construções mutantes.



Megaprimers 3' simbolizados em setas para a mutagênese sítio dirigida da sequência codificante do gene da *PABP1* de *Leishmania infantum*.

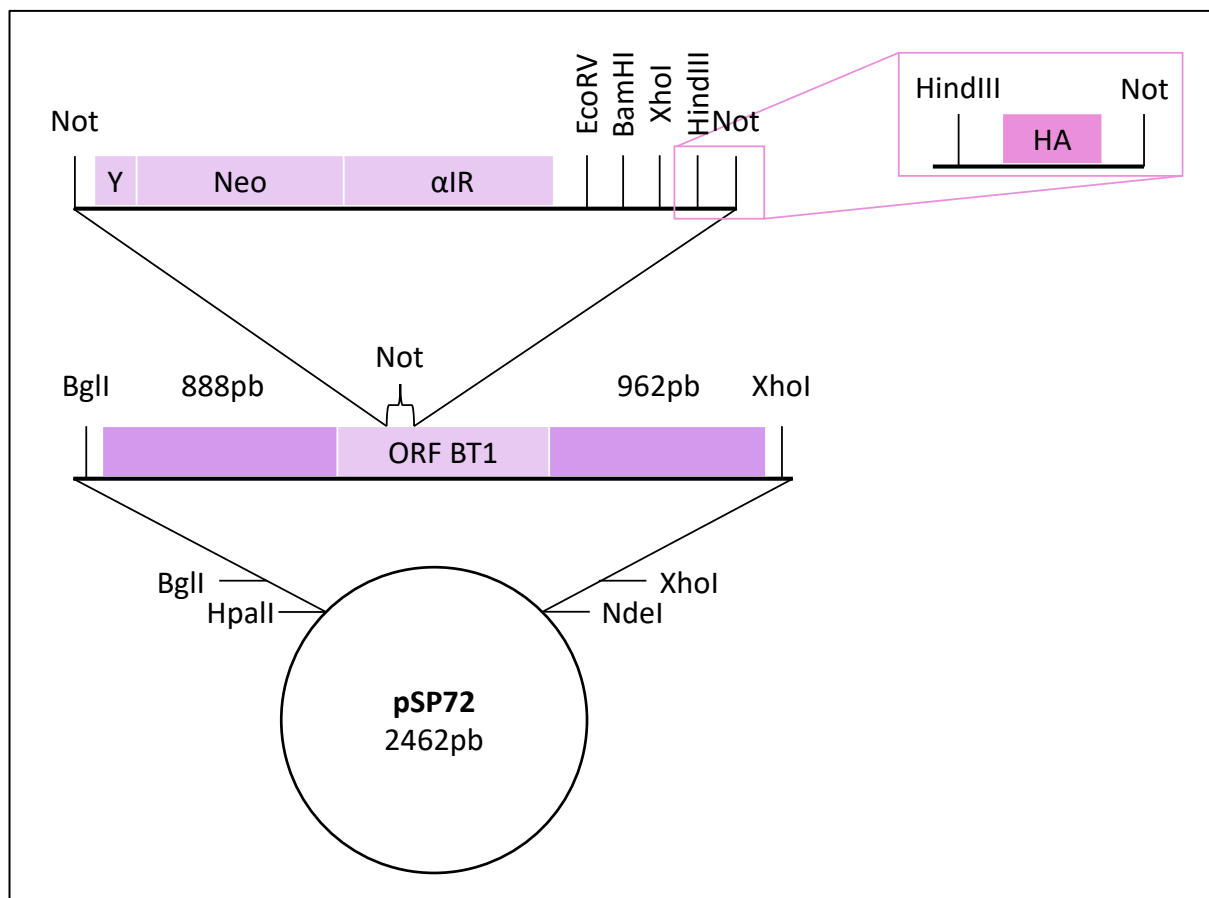
4.2 CLONAGEM E SUBCLONAGEM DOS GENES DE INTERESSE

Os materiais purificados das PCRs finais foram tratados com a enzima *Taq*TM DNA Polymerase (Invitrogen) para adição de dATPs em suas extremidades para a clonagem em pGEM-T Easy Vector Systems (Promega). As reações tiveram como componentes uma mistura com *Taq* DNA Polymerase (5 u), dATP (200 µM), MgSO₄ (1,5 mM), tampão e água miliQ para um volume final de 10 µL. A extensão para adição das adeninas ocorreu em um único ciclo de 72°C durante 30 minutos. 75 ng de cada produto tratado foi unido ao DNA plasmidial (50 ng/µL) para a ligação com o uso de 0,5 µL de T4 DNA ligase e 2X *Rapid Ligation Buffer* a 16°C durante 16 horas. Em seguida, metade do volume das ligações (5 µL) foi acrescentado a 50 µL de *One Shot*TM *TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) para a etapa de transformação por choque térmico, onde a mistura incubada no gelo durante 30

minutos foi rapidamente transferida para o choque em banho maria (37°C) durante 5 minutos. Em seguida, todo o conteúdo da transformação foi repassado para um microtubo de 1,5 mL contendo 1 mL de meio SOC (2% Bacto-triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10, mM MgSO₄ e 20 mM glicose), onde as células puderam se recuperar durante 1 hora sob agitação em agitador orbital a 37°C. O conteúdo celular foi então centrifugado a 4.000 g durante 1 minuto para a obtenção do sedimento bacteriano, posteriormente ressuspenso em 20% do volume anterior de SOC (200 µL) e semeado em LB sólido contendo ampicilina (0,1 µg/mL) revestido de X-GAL/IPTG, conforme as recomendações do fabricante (Promega). Após 16 horas de incubação em estufa a 37°C, as colônias foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina e 16 horas depois a cultura foi utilizada para a extração do DNA plasmidial através do kit *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega). Para a confirmação da clonagem, as construções foram digeridas com enzimas correspondentes aos sítios flanqueadores das construções, BamHI e HindIII. Após a confirmação, as amostras foram enviadas para o sequenciamento de DNA por eletroforese capilar através do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). Os dados do sequenciamento foram analisados em programas do pacote DNA Star (Lasergene).

Com a confirmação das construções no vetor de clonagem, cerca de 2 µg das extrações plasmidiais foram digeridas com as enzimas BamHI e HindIII para a clonagem dos fragmentos em pSP-BT1-Yneo^oIR que, além de conter o gene de resistência à neomicina como marcador de seleção, codifica o peptídeo HA (hemaglutinina) à jusante do sítio de clonagem HindIII (Figura 15). Uma extração plasmidial contendo este vetor também foi submetida à digestão de 5 µg do seu conteúdo com as mesmas enzimas utilizadas para a liberação dos insertos. Os fragmentos de ambas as digestões foram purificados por meio do kit GFX PCR DNA e purificação de gel (Cytiva®), seguindo o recomendado pelo fabricante.

Figura 15. Esquema do plasmídeo pSP-BT1-Yneo α IR. O plasmídeo pSP-BT1-Yneo α IR provém de alterações do pSP72.



As modificações envolvem a adição da ORF do BT1 contendo o gene de resistência à neomicina e de uma sequência codificante do epítipo de hemaglutinina após o sítio HindIII. Fonte adaptada: (PADMANABHAN et al, 2012; CAVALCANTI, 2018).

Para a subclonagem, o vetor linearizado e purificado foi utilizado para a ligação com os insertos pela ação da T4 DNA ligase (New England Biolabs®). A reação constou em 1 μ L de T4 DNA Ligase Buffer (1X), 50 ng do pSP-BT1-Yneo α IR, 13 ng do inserto, 0,5 μ L da T4 DNA Ligase e água deionizada para um volume final de 10 μ L. A reação de ligação passou pelos mesmos processos de extração plasmidial e confirmação por digestões e envio para o sequenciamento e as análises de sequências como previamente descrito.

4.3 ENSAIOS DE COMPLEMENTAÇÃO

Para os ensaios de complementação foram utilizados DNAs lineares (cassetes) com a região codificante da PABP1 de *L. infantum* substituída por ORFs correspondentes a genes de resistência a antibióticos. Para isso, um primeiro cassette, conferindo resistência à higromicina foi utilizado para a deleção da primeira cópia (SKO), enquanto um segundo, relativo à resistência à puromicina, foi aplicado para a deleção da segunda cópia (DKO) de células expressando diferentes construções de forma episomal. Antecedente à transfecção dessas construções, os cassetes foram liberados através da digestão com NotI, para o cassette SKO, e EcoRI para a construção responsável pelo DKO.

Para a confirmação dos eventos integrativos, diferentes primers foram utilizados (Quadro 2). PCRs foram realizadas com GoTaq® Colorless Master Mix (Promega), onde 100 ng de DNA genômico foi utilizado como molde e cada primer foi adicionado a uma concentração final de 1 mM, sendo acrescidos de 12,5 µL do Mastermix e água MiliQ para um volume final de 25 µL.

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a confirmação dos eventos integrativos. O primer *IR LiPABP1* correspondendo à região intergênica do gene-alvo e os demais, de forma reversa, atuando como indicadores específicos da integração dos cassetes.

Região	Sentido	Sequência
<i>IR LiPABP1</i>	<i>Forward</i>	GAGGCCACAGCCGCGCTATTCAGTC
<i>INTERNO PABP1</i>	<i>Reverse</i>	TCACCATCACACGGCAGCTC
<i>INTERNO HIGROMICINA</i>	<i>Reverse</i>	CCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAG
<i>INTERNO PUROMICINA</i>	<i>Reverse</i>	GTTGCGGGGCGCGGAGGTCT

Conforme as construções, expressas de forma episomal no plasmídeo pSP-BT1-Yneo Δ IR, envolvessem mutações localizadas em regiões associadas a alguma atividade crítica para a sobrevivência de tripanosomatídeos, as linhagens não seriam capazes de sobreviver ou complementar a ausência do efeito da deleção das versões

do gene *PABP1*. Para além da sobrevivência, o crescimento celular foi avaliado através de contagens diárias para a determinação de curvas de crescimento num período de 7 dias.

4.4 CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DE *LEISHMANIA INFANTUM*

Células de *Leishmania infantum* (cepa: JPCM5) foram mantidas em crescimento logarítmico através de repasses em meio Schneider pH 7,2 com suplementação de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 0,1% Penicilina e Streptomicina (Sigma-Aldrich). O crescimento se deu em estufa BOD a 26°C. As células foram transfectadas, com DNAs episomais ou cassetes lineares, e após recuperação, o seu crescimento foi acompanhado através da contagem de células a partir do inóculo de 1×10^6 células por mL. O acompanhamento diário permitiu a observação da densidade celular, motilidade, morfologia e viabilidade dessas linhagens.

A etapa de transfecção consistiu na utilização de formas promastigotas de *Leishmania infantum* durante o crescimento exponencial, onde 2×10^8 células foram centrifugadas a ~ 1000 g por 5 minutos. O sedimento gerado pela centrifugação teve seu sobrenadante removido para a sua ressuspensão em 5mL de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 6 mM glicose e pH 7,05). Uma segunda etapa de centrifugação precedeu a uma nova ressuspensão de 450 μL do tampão HEPES-NaCl para a etapa de eletroporação. Cubetas de 0,2 mm contendo 2 μg (DNA linear) ou 5 μg (DNA plasmidial) de DNA foram incubadas no gelo durante 15 minutos para que o conteúdo celular em tampão HEPES-NaCl fosse transferido. As cubetas então passaram pelo processo de eletroporação no Gene Pulser Xcell™ system (BioRad), onde um único pulso de 450 volts e capacitância de 500 μF é aplicado. Em seguida, o conteúdo de células eletroporadas foi passado para um frasco de cultura contendo 5 mL de meio Schneider (Sigma) para a recuperação. Após 24 horas, uma pré-seleção foi realizada com uma quantidade adicional de 5 mL de meio Schneider pH 7,2 aos frascos junto às quantidades de antibióticos referentes à 50% da concentração adequada para a seleção das linhagens. A seleção consistiu na passagem de 1 mL da pré-seleção, após 24 horas,

em 9 mL de meio Schneider com antibióticos em suas concentrações finais, onde as células devidamente transfectadas recuperaram-se em aproximadamente 15 dias.

Para a realização do nocaute de (uma) cópia genica (SKO – *Single Knockout*), células transfectadas com o cassete do gene de resistência à higromicina, obtido no estudo de De Melo Neto e colaboradores de 2018, foram semeadas em Schneider sólido contendo higromicina (0,08 mg/mL). O crescimento das células em colônias isoladas, permitiram a realização de uma seleção clonal dessas linhagens. Após um crescimento de aproximadamente 1×10^7 , acompanhado diariamente, as colônias foram inoculadas em meio líquido para a expansão e congelamento. As linhagens nocaute obtidas foram submetidas a novas rodadas de transfecções com diferentes construções na forma episomal que foram selecionadas com o antibiótico neomicina G418 (0,08 mg/mL) (Sigma). Para a obtenção de linhagens duplamente nocauteadas (DKO- *Double knockout*), as linhagens SKO contendo versões episomais dos genes individualmente foram transfectadas com um segundo cassete para a deleção da segunda versão do gene endógeno tendo com marca de seleção o antibiótico puromicina (0,14 mg/mL) (Sigma). Ensaios de PCR, utilizando o DNA genômico dessas linhagens como molde, também foram utilizados para confirmar os eventos integrativos do single e duplo nocaute. A extração do DNA genômico foi realizada com o uso do DNazol® Reagent (Thermo Fischer Scientific) de cada uma das linhagens.

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO TOTAL E ENSAIOS DE *WESTERN BLOT*

Para a obtenção dos extratos proteicos, as diferentes linhagens passaram por expansão com início de 1×10^6 células por mL de meio, em incubação durante 48 horas em estufa BOD 26°C, suficiente para que as células atingissem o crescimento exponencial. Em seguida, uma quantidade referente a 5×10^5 células foram centrifugadas, por ~ 1000 g durante 5 minutos, para a obtenção de um sedimento, posteriormente lavado em tampão fosfato salino (PBS). Após uma nova centrifugação, o sedimento bacteriano foi ressuspenso em tampão de amostra para gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 μ L/mL de 2-mercaptoetanol, pH 6,8), onde cerca de 5×10^6 células (10 μ L) foram aplicadas por poço.

Após a separação das proteínas dos extratos, lisados celulares ou eluição do ensaio de imunoprecipitação em SDS PAGE 15%, as mesmas foram transferidas para membrana de PVDF Immobilon-P (Merck Millipore). A membrana foi então incubada durante uma hora em solução contendo TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5), Tween-20 a 0,05% e leite desnatado 5% em temperatura ambiente. Após essa etapa, anticorpos primários anti-HA (EPR4095 - Abcam) em uma proporção de 1:3000, da mesma solução citada acima, foram incubados durante uma hora. Depois de três lavagens em TBS/Tween-20 a 0,05%, foram incubados os anticorpos secundários anti-IgG mouse (Jackson) em uma proporção de 1:10000 por uma hora. Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase, permitiram a revelação das bandas reconhecidas por meio de uma reação de quimiluminescência com a adição do Immobilon Forte Western HRP Substrate (Merck Millipore) durante 2 minutos. A reação pôde ser detectada através do equipamento iBright Imaging Systems (Thermo Fischer Scientific) com exposições, que variaram entre 10 segundos e 5 minutos, de acordo com a intensidade das reações.

4.6 PREPARAÇÃO DE LISADOS CITOPLASMÁTICOS DE *LEISHMANIA INFANTUM* E IMUNOPRECIPITAÇÃO

Lisados citoplasmáticos puderam ser obtidos através de técnica de lise por cavitação. Formas promastigotas das diferentes linhagens de *Leishmania infantum* foram expandidas com densidade inicial de 1×10^6 por mL em 30 mL, após as células atingirem o crescimento exponencial, 2×10^8 células foram centrifugadas a ~ 1000 g por 5 minutos e o sedimento resultante lavado com 1 mL de PBS a 10% do cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Posteriormente, os sedimentos lavados foram ressuspensos em 400 e 800 μ L de tampão de lise (20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 75 mM $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, 4 mM $\text{C}_4\text{H}_6\text{MgO}_4$, 2 mM de DTT e 10% do inibidor de protease). A lise foi baseada em ruptura da membrana citoplasmática através de alteração de pressão utilizando um cavitador. As amostras lisadas foram coletadas em tubos cônicos de 50 mL, centrifugadas a 4200 g durante 10 minutos. O sobrenadante resultante, onde estavam contidas as proteínas, foi aliquoteado e armazenado em 80°C negativos.

Os ensaios de imunoprecipitação foram executados com a utilização de microesferas magnéticas anti-HA (Pierce). Neste ensaio, 200 µL das amostras dos lisados foram incubados a 5 µL das microesferas, após três lavagens com tampão PBS, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. A incubação ocorreu durante 30 minutos e a amostra então precipitada em estante magnética, com o sobrenadante aliquoteado como depletado. A resina, fração contendo as microesferas, foi novamente lavada e ressuspensa em tampão de amostra para SDS-PAGE. 10 µL foram utilizados para a confirmação por *western blot*, enquanto 30 µL foram armazenados em 80°C negativos, os quais, pós confirmação, foram aplicados em SDS-PAGE e, assim que atingiram a fase de separação do gel, excisados para o envio às análises de espectrometria de massas.

4.7 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS) E SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS

As amostras foram inseridas em gel de SDS-PAGE que foi corado com azul de Coomassie Blue 250-R durante 15 minutos para que então fosse descorado com solução solvente. A partir disso, as bandas foram excisadas com bisturi de fibra cirúrgica e armazenadas em cerca de 500 µL de água deionizada em microtubos de 1,5mL. O material foi encaminhado para a análise por espectrometria de massas no núcleo de plataformas tecnológicas de Espectrometria de Massa do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR. Nesse local, as amostras passaram por tripsinização e, seus polipeptídeos foram submetidos à análise por LC-MS/MS (MS2) no Thermo Scientific Easy-nLC 1000 Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) acoplado ao espectrômetro LTQ-Orbitrap XL ETD (Thermo Fischer Scientific).

A partir do recebimento dos dados brutos das análises, os quais envolvem os peptídeos identificados e suas respectivas intensidades, foram realizadas etapas de filtragem e exclusões. Para a identificação de peptídeos co-purificados especificamente com a proteína selvagem, as intensidades das três replicatas foram normalizadas para a obtenção de suas médias. As médias, da proteína alvo selvagem e do controle negativo são obtidas junto à razão (amostra)/(controle). O controle, por sua vez, correspondeu aos dados de peptídeos identificados a partir do

imunoprecipitado de microesferas incubadas com a linhagem selvagem, sem expressão de proteínas fusionadas ao HA. Foram excluídas amostras que possuíam intensidades zeradas em pelo menos duas replicatas. Os valores foram então filtrados para a seleção dos peptídeos com pelo menos 1000 vezes mais enriquecimento em relação ao controle de acordo com as análises de Assis et al, 2021. Para as comparações com os mutantes, uma segunda normalização das intensidades, baseada na intensidade da própria proteína alvo co-purificada (PABP1), foi realizada a partir da maior intensidade entre replicatas. Após a obtenção das médias, foi calculada a razão das intensidades (médias da proteína nativa)/(médias da proteína mutante). Os peptídeos selecionados corresponderam aos enriquecidos na proteína selvagem em relação aos mutantes.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MOTIVOS NOS RRMS 3 E 4 DA PABP1 NA VIABILIDADE CELULAR DE *LEISHMANIA INFANTUM*

5.1.1 Descrição das regiões-alvo da mutagênese

A primeira parte do trabalho envolveu o estudo de quatro mutantes distintos para dois dos domínios de reconhecimento de RNAs (RRMs 3 e 4) na região N-terminal da PABP1. Estudos prévios já haviam identificado a conservação específica dos resíduos de aminoácidos selecionados em diferentes ortólogos da PABP1 de tripanosomatídeos (XAVIER, 2015). Os mutantes do gene da PABP1 gerados correspondem a construções gênicas cujas sequências, responsáveis pela codificação de seus aminoácidos-alvo, foram modificadas para a codificação de três alaninas consecutivas. Nesse contexto, devido ao caráter neutro dos resíduos de alanina, as versões mutantes das proteínas permitiram o silenciamento de potenciais sítios de clonagem sem causar grandes perturbações nas estruturas secundárias. Os dois primeiros motivos avaliados se encontravam no RRM3: lisina-fenilalanina-fenilalanina (KFF₂₂₅₋₂₂₇); e histidina-histidina-isoleucina (HHI₂₆₆₋₂₆₈). Outros dois motivos investigados se encontravam no RRM4: leucina-ácido glutâmico-leucina (LEL₃₂₂₋₃₂₄); e metionina-leucina-asparagina (MLN₃₆₉₋₃₇₁).

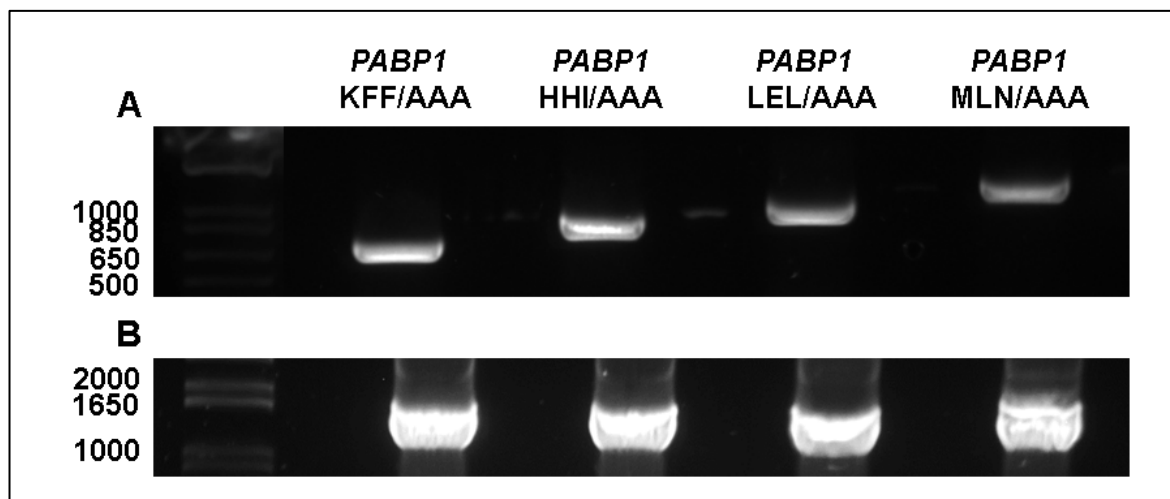
5.1.2 Amplificação de genes mutantes através da reação em cadeia da polimerase (PCR)

As primeiras reações de PCR deram origem a fragmentos correspondentes aos *megaprimers* utilizados para a mutagênese da sequência codificante do gene da PABP1. Na confirmação por gel de agarose, as bandas apresentaram tamanhos esperados, correspondentes a: 699 pb para o *Megaprimer*_{KFF/AAA}, 828 pb para *Megaprimer*_{HHI/AAA}, 996 pb no *Megaprimer*_{LEL/AAA} e 1137 pb para o *Megaprimer*_{MLN/AAA} (Figura 16A).

Em uma segunda reação, a aplicação dos megaprimers purificados evidenciou, através do gel de agarose, a amplificação de bandas nos tamanhos previstos, correspondente ao comprimento em pares de base da região codificadora da PABP1

(1683 pb) + 18 pares de bases (sendo 6 pb para o sítio BamHI, 6 pb para HindIII e 3 pb nucleotídeos da extremidade dos primers) (Figura 16B).

Figura 16. Eletroforese das PCRs dos megaprimers e sequências mutantes.

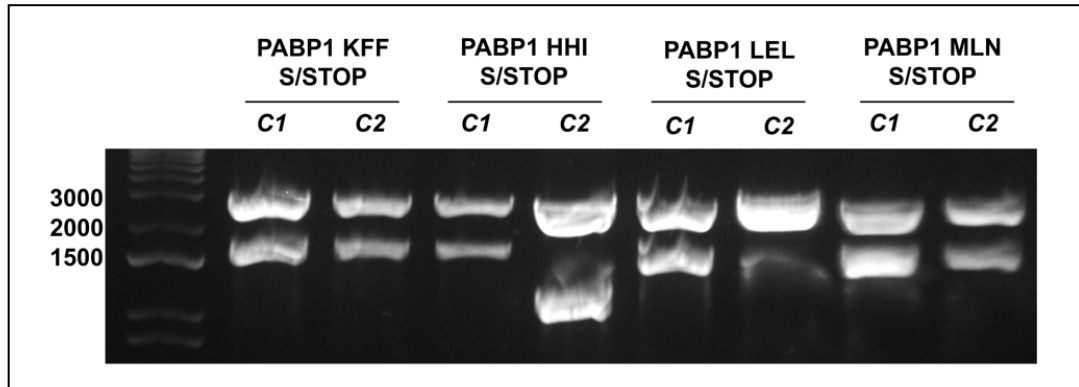


(A) Separação das amostras por eletroforese em gel de agarose a 1%, podendo-se observar das bandas amplificadas correspondentes aos *megaprimers* KFF/AAA (699 pb), HHI/AAA (828 pb), LEL/AAA (996 pb) e MLN/AAA (1137 pb). **(B)** Amostras bandas no tamanho correspondente à construção contendo o gene *PABP1* (1701 pb). Marcador de controle correspondente ao 1kb Ladder (Invitrogen®).

5.1.3 Obtenção de construções mutantes em vetores de expressão

Os fragmentos, após a remoção do códon de parada, foram ligados ao vetor plasmidial pGEM-T Easy Vector Systems (Figura 15) (Promega). Em seguida, foram realizadas as extrações dos DNA plasmidiais e cada clone resultante foi submetido a provas de digestão com as enzimas BamHI e HindIII (Figura 17). As amostras foram sequenciadas e verificadas quanto à presença das substituições nucleotídicas em cada uma delas através de alinhamento ClustalW, utilizando o a sequência codificante do gene *PABP1* de *Leishmania infantum* como referência (Figura 18).

Figura 17. Digestão das construções mutantes sem códon de parada do gene *PABP1* em pGEM-T Easy.



Amostras migradas por eletroforese em gel de agarose 1%, demonstrando bandas correspondentes ao vetor de 3016 pb e uma segunda, mais abaixo, correspondendo às construções mutantes do gene da PABP1 livre de códon de parada (1701 pb). Marcador de controle correspondente ao 1kb Ladder (Invitrogen®).

Figura 18. Alinhamento das sequências selvagem e mutantes do gene *PABP1*.

	660	670	680	690	700
LiPABP1WT		GCCGACAGTGAACAAGGAAGTCATCGAGAAGTTCTTCGCAAAGTTCGGCG			
LiPABP1 KFF/AAA		GCCGACAGTGAACAAGGAAGTCATCGAG	CGGCG	CGCAAAGTTCGGCG	
LiPABP1 HHI/AAA		GCCGACAGTGAACAAGGAAGTCATCGAGAAGTTCTTCGCAAAGTTCGGCG			
LiPABP1 LEL/AAA		GCCGACAGTGAACAAGGAAGTCATCGAGAAGTTCTTCGCAAAGTTCGGCG			
LiPABP1 MLN/AAA		GCCGACAGTGAACAAGGAAGTCATCGAGAAGTTCTTCGCAAAGTTCGGCG			
	810	820	830	840	850
LiPABP1WT		GCACGACCATCACATCGACGGCATCACGGCACCTGGTGAGAAGCTGTACG			
LiPABP1 KFF/AAA		GCACGACCATCACATCGACGGCATCACGGCACCTGGTGAGAAGCTGTACG			
LiPABP1 HHI/AAA		GCACGAC	CGGCG	CGACGGCATCACGGCACCTGGTGAGAAGCTGTACG	
LiPABP1 LEL/AAA		GCACGACCATCACATCGACGGCATCACGGCACCTGGTGAGAAGCTGTACG			
LiPABP1 MLN/AAA		GCACGACCATCACATCGACGGCATCACGGCACCTGGTGAGAAGCTGTACG			
	960	970	980	990	1000
LiPABP1WT		CCCTGAGTTCACGGGCGCGGACCTGCTCGAGCTCTTCAAGGAGTACGGCG			
LiPABP1 KFF/AAA		CCCTGAGTTCACGGGCGCGGACCTGCTCGAGCTCTTCAAGGAGTACGGCG			
LiPABP1 HHI/AAA		CCCTGAGTTCACGGGCGCGGACCTGCTCGAGCTCTTCAAGGAGTACGGCG			
LiPABP1 LEL/AAA		CCCTGAGTTCACGGGCGCGGACCTG	CGGCG	CTTCAAGGAGTACGGCG	
LiPABP1 MLN/AAA		CCCTGAGTTCACGGGCGCGGACCTGCTCGAGCTCTTCAAGGAGTACGGCG			
	1110	1120	1130	1140	1150
LiPABP1WT		CGAGATGAACGGTCGCATGCTGAACGGCAAGCCCTCATCGTCAACATTG			
LiPABP1 KFF/AAA		CGAGATGAACGGTCGCATGCTGAACGGCAAGCCCTCATCGTCAACATTG			
LiPABP1 HHI/AAA		CGAGATGAACGGTCGCATGCTGAACGGCAAGCCCTCATCGTCAACATTG			
LiPABP1 LEL/AAA		CGAGATGAACGGTCGCATGCTGAACGGCAAGCCCTCATCGTCAACATTG			
LiPABP1 MLN/AAA		CGAGATGAACGGTCGC	CGGCG	CGGCAAGCCCTCATCGTCAACATTG	
	1660	1670	1680	1690	
LiPABP1WT		GAGGCGCTATGCGTGCTCAAGGCGCATCAGACGGCG	TAA		
LiPABP1 KFF/AAA		GAGGCGCTATGCGTGCTCAAGGCGCATCAGACGGCG			
LiPABP1 HHI/AAA		GAGGCGCTATGCGTGCTCAAGGCGCATCAGACGGCG			
LiPABP1 LEL/AAA		GAGGCGCTATGCGTGCTCAAGGCGCATCAGACGGCG			
LiPABP1 MLN/AAA		GAGGCGCTATGCGTGCTCAAGGCGCATCAGACGGCG			

Em vermelho, destacam-se os nucleotídeos substituídos em suas respectivas posições: A678G, A679C, T682G, T683C, T685G e T686C para o mutante KFF. C808G, A809C, C811G, A812C, A814G e T815C para HHI. C976G, T977C, A980C, C982G e T983C para LEL e A1116G, T1117C, C1120G,

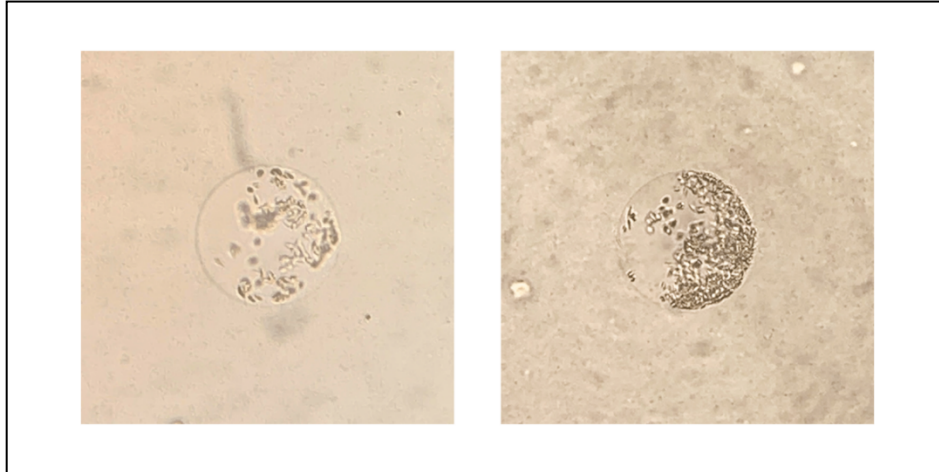
T1121C, A1123G e A1124C para MLN. Além disso, os códons de parada “TAA” nas posições 1687-1689 também foram removidos das sequências mutagenizadas.

Cerca de 2 µg das construções do vetor de clonagem, com as construções livres de códons de parada, foram utilizadas para uma segunda digestão, onde foram purificados os fragmentos liberados para a ligação (subclonagem) no vetor de expressão pSP-BT1-YneoαIR. A clonagem foi confirmada por gel de agarose, demonstrando a liberação de insertos de tamanhos próximos a 1683 pares de bases.

5.1.4 Ensaios de complementação por nocaute gênico

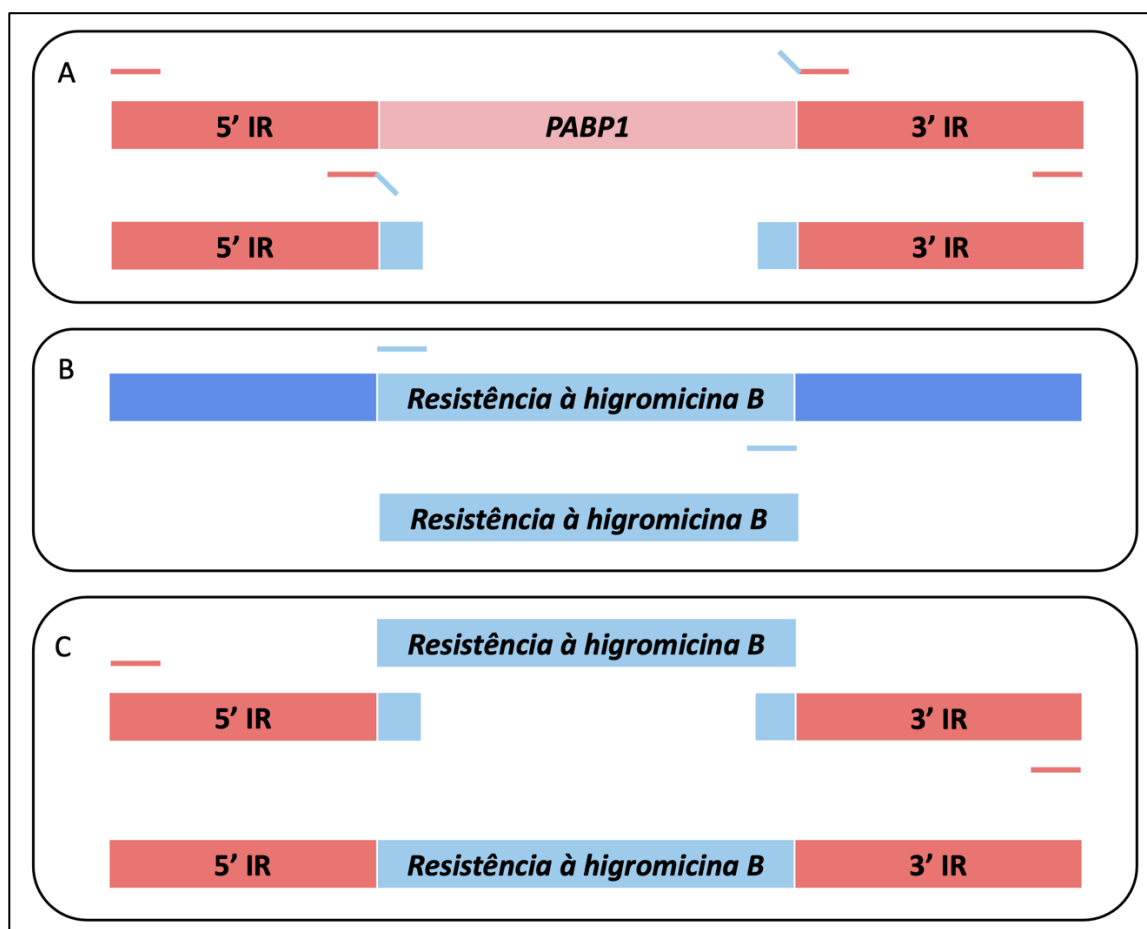
A presença do gene da PABP1 já foi vista ser indispensável para a viabilidade de células de *Leishmania infantum* (DE MELO NETO et al, 2018). Com o intuito de verificar a capacidade de cada construção da proteína mutante na complementação na ausência da proteína endógena, foram executados os nocautes gênicos. No ensaio da primeira deleção, utilizando o cassete com o gene de resistência à higromicina, as linhagens nocauteadas em primeira cópia (SKO) foram selecionadas em meio sólido, onde 25 mL do produto da transfecção foi plaqueado para a seleção de células crescidas a partir de um único clone (Figura 19). As construções utilizadas foram geradas por PCR de fusão no trabalho de DE MELO NETO et al, 2018 (Figura 20). Ambas, clonadas em pGEM-T Easy (Promega), possuem as ORFs dos genes de resistência flanqueadas por regiões intergênicas da PABP1 de *L. infantum*, permitindo que, por recombinação homóloga, o gene endógeno da PABP1 seja substituído pelos genes marcadores de resistência citados acima.

Figura 19. Colônias de linhagens nocauteadas para o gene *PABP1* de *Leishmania infantum*.



À direita, uma colônia formada a partir de um clone transfectado com cassetes de deleção para o gene da PABP1 em meio sólido. À direita, a mesma colônia após incubação por 24 horas. Fonte: Elaborado pelo autor.

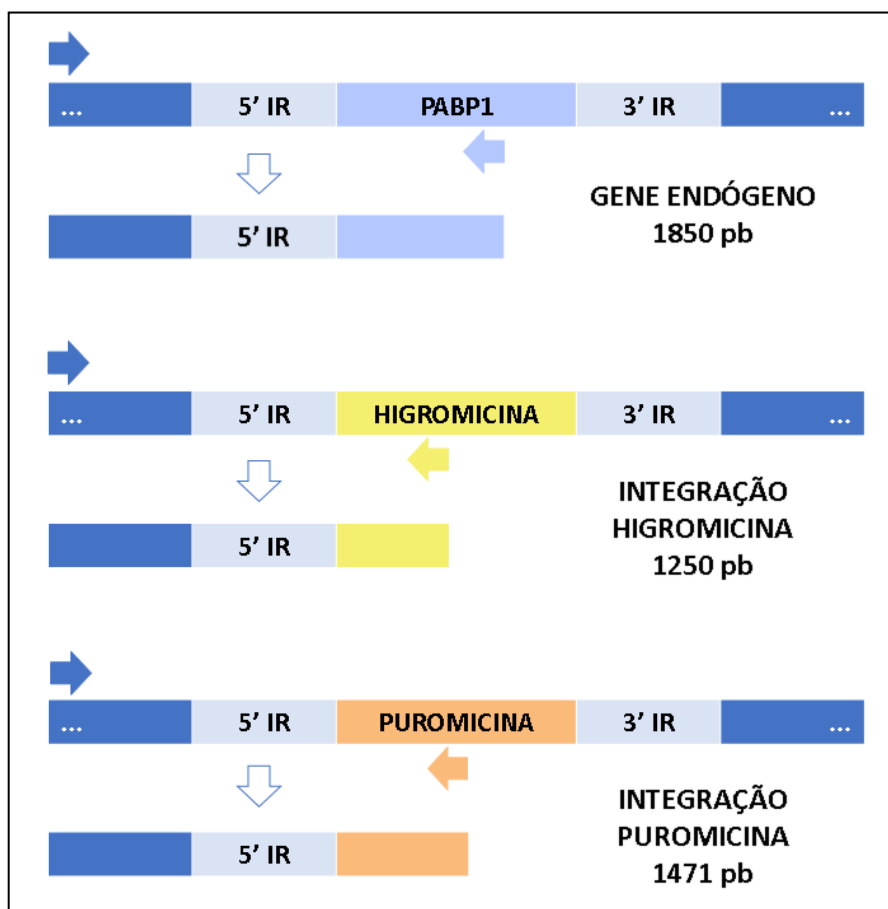
Figura 20. Esquema da geração de cassetes por PCR de fusão.



O processo é descrito em três etapas. Na primeira delas (A), regiões intergênicas 5' e 3' do gene da PABP1 são amplificadas com fragmentos homólogos às marcas de resistência. Posteriormente, na etapa B, as sequências codificantes dos genes de resistência são amplificadas. Por último, em C, os produtos das primeiras reações são unidos pela amplificação mediada por primers 5' *forward* e 3' *reverse* das regiões intergênicas do gene alvo.

As confirmações dos eventos de integração são realizadas através de ensaios de PCR, onde se utilizou primers que anelam às regiões intergênicas de forma 5' e outros 3' com alvo no interior das sequências codificantes dos genes da PABP1 e marcadores de seleção. Diferentes condições foram padronizadas para a confirmação de cada evento integrativo, cada uma amplificando tamanhos específicos de acordo com as sequências codificantes presentes entre as regiões intergênicas. A presença do gene endógeno resulta na amplificação de uma banda de 1850 pb, a presença do gene de resistência à higromicina em uma de 1250 pb e, à puromicina, 1471 pb (Figura 21).

Figura 21. Representação dos ensaios de PCR para a confirmação dos eventos integrativos.

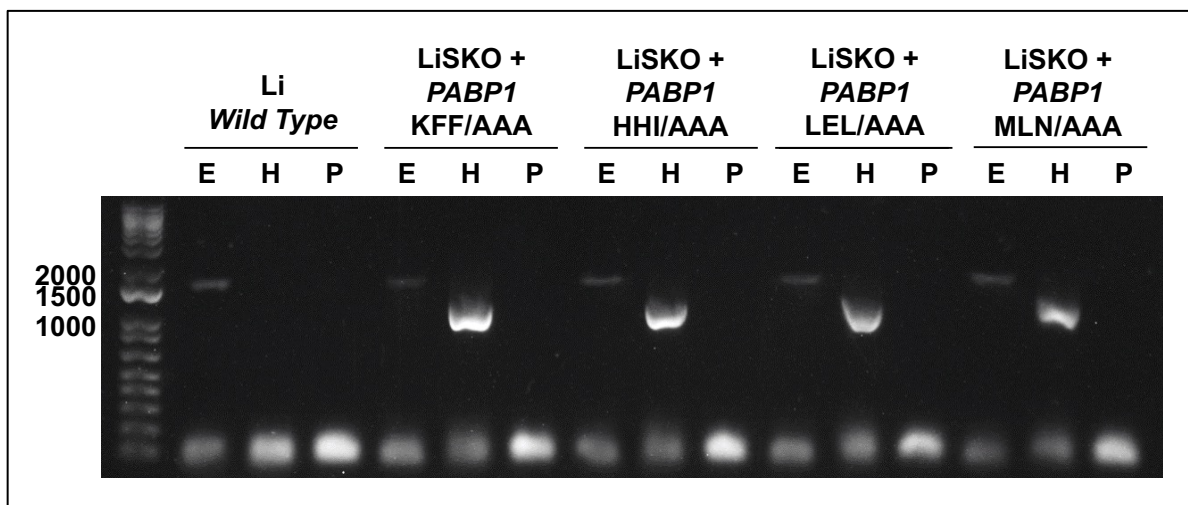


O primers se anelam em posições que permitem a confirmação da integração dos genes de resistência e/ou presença do gene da PABP1 entre as regiões intergênicas do gene da PABP1. Fonte: (MERLO, 2018).

Cinco colônias foram inoculadas para a expansão dos clones em meio líquido. Cada uma delas, ao atingir o crescimento exponencial, tiveram seus DNAs genômicos extraídos para a confirmação dos nocautes por PCR. Os clones amplificaram bandas específicas relativas à confirmação da presença da PABP1 endógena e à integração do gene de resistência à higromicina, com ausência do gene de resistência à puromicina, indicando sucesso do SKO.

As linhagens clonais SKO foram submetidas à transfecção com os diferentes mutantes da PABP1 clonados em pSP-BT1-YneoαIR. Seus DNAs genômicos também foram extraídos para a confirmação da manutenção do perfil de amplificação de cada uma das linhagens (Figura 22).

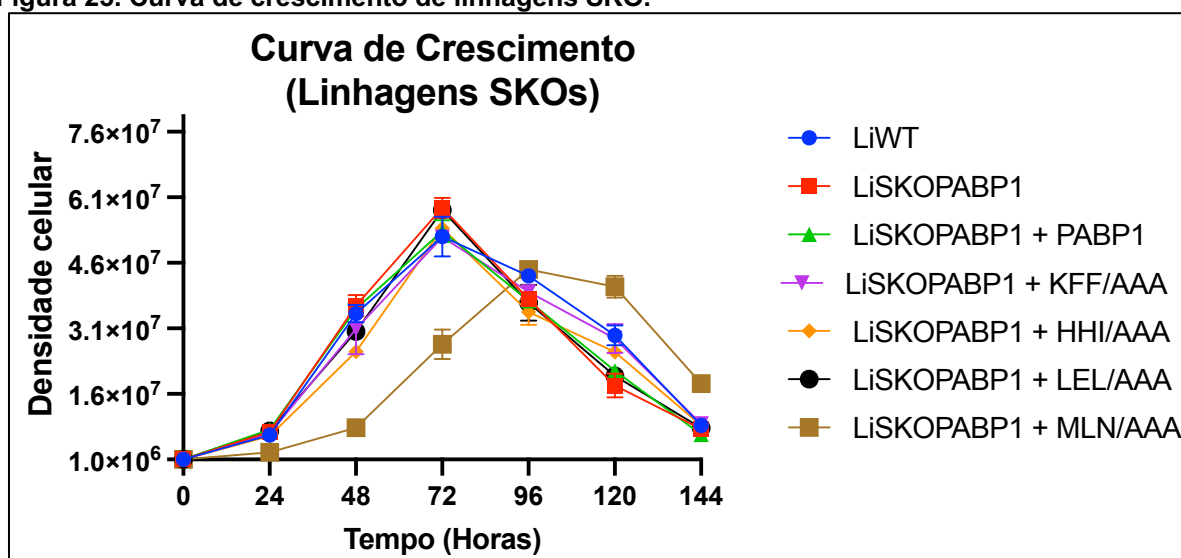
Figura 22. PCRs para confirmação dos eventos integrativos de linhagens nocauteadas pós transfecção com mutantes.



(E = gene endógeno ou nativo; H = gene de resistência à higromicina; P = gene de resistência à puromicina). Produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose 1% confirmando a presença do gene endógeno para a linhagem nativa (1850 pb), bem como a ausência das integrações dos genes de resistência à higromicina e puromicina. À direita, cada uma das linhagens transfectadas com os diferentes mutantes, amplificando bandas de 1850 pb para a confirmação da presença do gene endógeno e bandas de 1250 pb demonstrando a manutenção do gene de resistência à higromicina no locus deletado. Ainda, a ausência da amplificação dos genes de resistência à puromicina (1471 pb) em todas as linhagens. Marcador de controle correspondente ao 1kb Ladder (Invitrogen®).

As linhagens SKO complementadas com os genes mutantes foram avaliadas quanto ao crescimento celular e comparadas com a linhagem selvagem através de contagens diárias para determinação da densidade celular. Foi possível verificar um atraso no crescimento das linhagens complementadas com gene mutante *PABP1*_{MLN} (Figura 23).

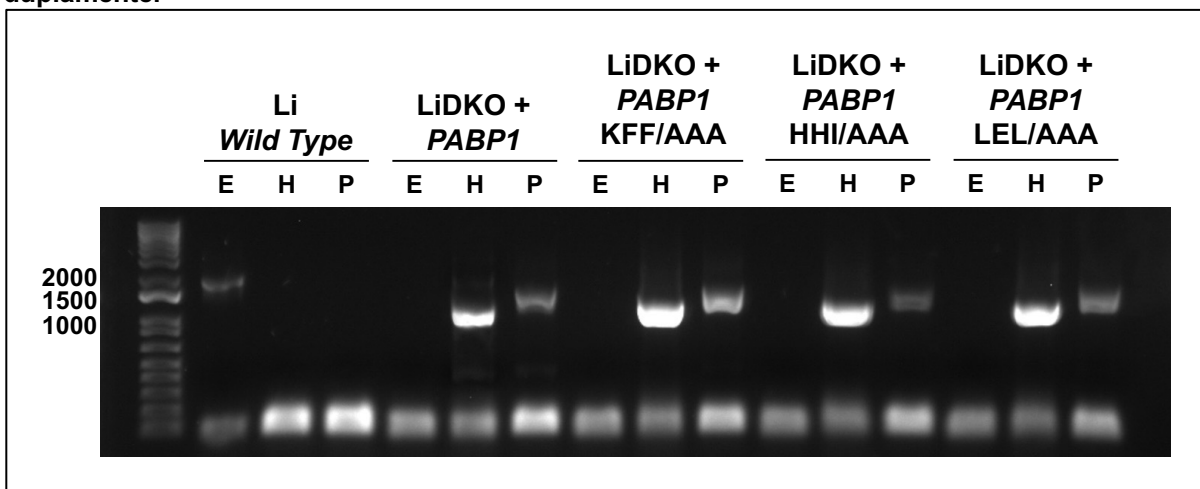
Figura 23. Curva de crescimento de linhagens SKO.



Curvas das duplicatas com valores de densidade celular plotados a partir de contagem a cada 24 horas, do horário 0 ao 144. Cada uma das linhagens é representada por suas respectivas cores e formas, descritas na imagem.

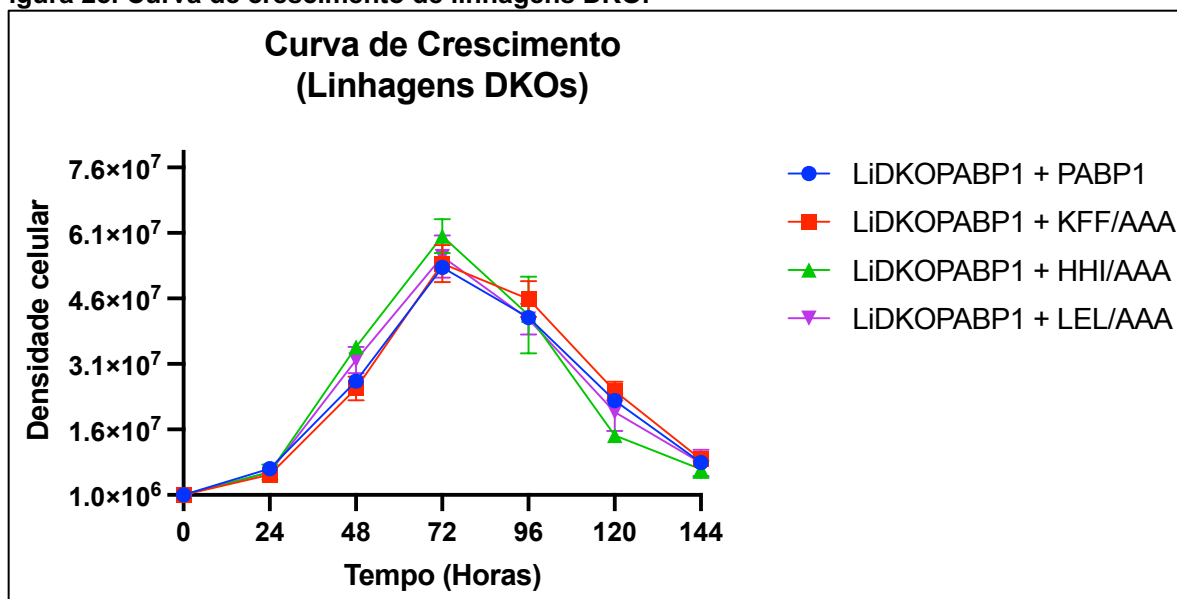
Novas transfecções, em duplicata, com os cassetes de puromicina para o duplo nocaute foram utilizadas para transfecções nas linhagens SKO complementadas. As linhagens tiveram seus DNAs genômicos extraídos para a confirmação do DKO através de PCR, evidenciando a presença das duas construções com genes de resistência da higromicina e puromicina e a ausência do gene endógeno (Figura 24). As células foram então selecionadas com os antibióticos higromicina, puromicina e neomicina, para o posterior acompanhamento da densidade celular das mesmas através de novas contagens. Os resultados das transfecções destacam a incapacidade do mutante *PABP1*_{MLN} em complementar o efeito deletério da remoção do gene *PABP1*, por outro lado, os demais mutantes demonstraram estabilidade quanto aos seus respectivos crescimentos (Figura 25).

Figura 24. PCRs para confirmação dos eventos integrativos de linhagens nocauteadas duplamente.



Realizada como descrito para a Figura 19. A presença do gene endógeno, confirmada pela amplificação de uma banda de 1850pb presente apenas na linhagem selvagem (Li *Wild Type* ou nativa) e ausente nas demais. Todas as linhagens pós DKO demonstrando a integração dos genes de resistência à higromicina (1250pb) e puromicina (1471pb), incluindo uma linhagem controle complementada com o gene selvagem (LiDKO + PABP1). Marcador de controle correspondente ao 1kb Ladder (Invitrogen®).

Figura 25. Curva de crescimento de linhagens DKO.



Curvas das duplicatas com valores de densidade celular plotados a partir de contagem a cada 24 horas, do horário 0 ao 144. Cada uma das linhagens é representada por suas respectivas cores e formas, descritas na imagem.

5.2 ANÁLISES DE INTERAÇÕES COM PARCEIROS FUNCIONAIS DA PABP1

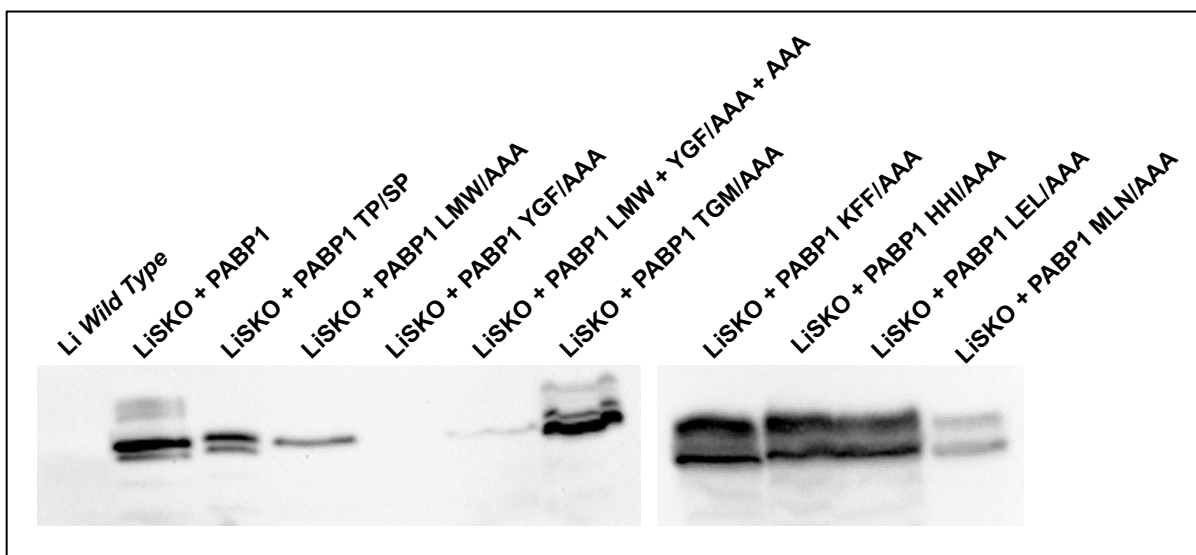
Além das construções mutantes dos RRM3 e 4 na PABP1, as demais construções com mutantes em motivos funcionais conhecidos da PABP1, foram

transfectadas em linhagens SKO para a expressão epissomal e aplicação a ensaios de interações proteicas *in vivo*. Sendo estes: o mutante de fosforilação PABP1_{TP/SP}, PABP1_{LMW/AAA}, PABP1_{YGF/AAA}, PABP1_{LMW/AAA-YGF/AAA} e PABP1_{TGM/AAA} (DE MELO NETO et al, 2018).

5.2.1 Superexpressão de construções com a PABP1 nativa e mutantes fusionados ao epítipo HA

As linhagens expressando as diferentes construções do gene *PABP1* tiveram seus extratos totais obtidos para a verificação, por *western blot*, da expressão das proteínas recombinantes fusionadas com o epítipo HA de tamanhos preditos de ~63 kDa. Todas as linhagens transfectadas com as construções em pSP-BT1-YneoαIR, com exceção da linhagem contendo pSP-BT1-YneoαIR + *PABP1*_{YGF/AAA}, revelaram bandas de tamanho esperado na etapa de imunodeteção com anticorpos anti-HA. Ainda, a detecção de proteínas mutantes para motivos nos RRM3 ou 4 demonstrou a presença de bandas, de tamanhos superiores, correspondentes às suas isoformas fosforiladas (Figura 26).

Figura 26. Extrato total de linhagens SKO de *Leishmania infantum* expressando os diferentes mutantes.



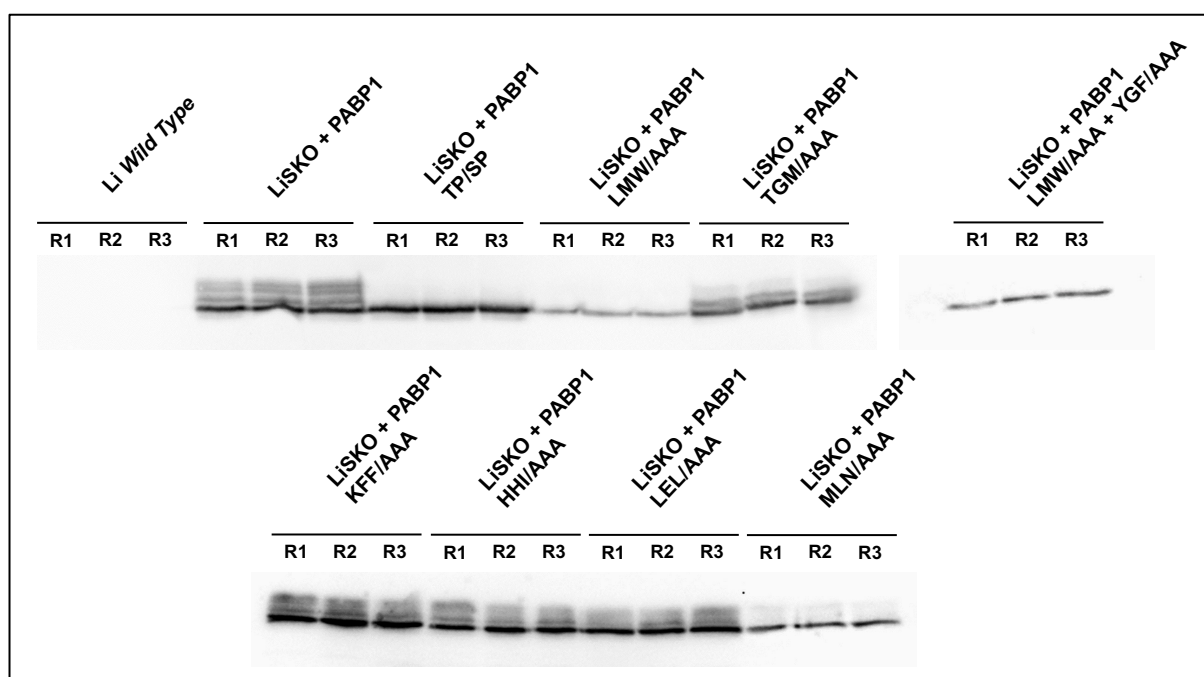
Revelação dos ensaios de *western blot*, com anticorpo anti-HA a partir de detecção de quimioluminescência. Na imagem, são evidenciadas bandas próximas a 66 kDa correspondentes aos diferentes mutantes do gene *PABP1* expressos, com exceção da linhagem original (*wild type*). É

possível observar a presença de bandas mais altas referentes às isoformas fosforiladas apresentadas pela proteína. Linhagens SKO expressando o mutante YGF/AAA não foram capazes de expressar a proteína recombinante de forma detectável.

5.2.2 Imunoprecipitação

Após a confirmação da expressão epissomal das construções selvagens e mutantes, foram obtidas as frações solúveis citoplasmáticas através da lise por cavitação. Alíquotas de cada lisado celular foram fracionadas em gel SDS-PAGE para a verificação da presença da proteína recombinante nas mesmas (Figura 27).

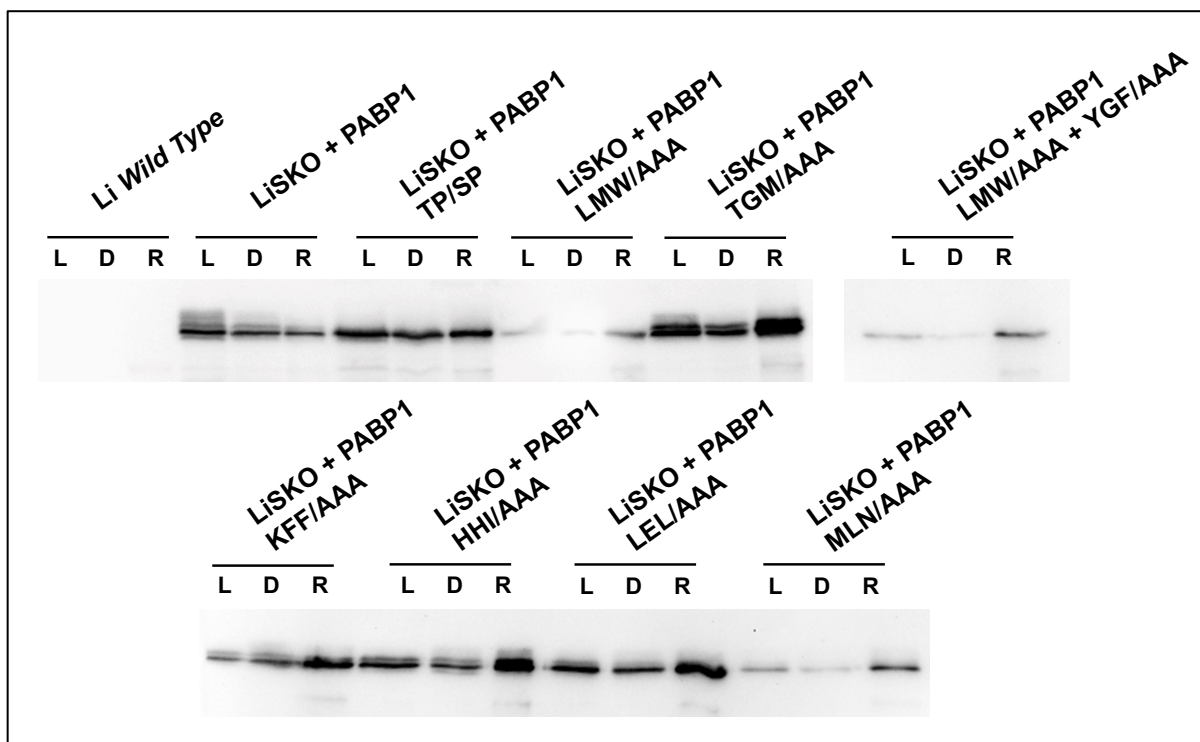
Figura 27. Lisados celulares referentes aos mutantes.



Revelação de bandas por quimioluminescência pós *western blot* e incubação com anti-HA. Triplicatas das frações solúveis contendo as proteínas recombinantes das linhagens transfectadas com os mutantes relacionados aos motivos funcionais. Ainda, a confirmação da ausência de reconhecimento de bandas pelo anti-HA na linhagem original (*wild type*).

A confirmação nos lisado permitiu a utilização das amostras para o ensaio de imunoprecipitação. Nessa etapa, foi possível detectar, ainda com o uso do anticorpo anti-HA, a presença da proteína recombinante na fração das microesferas precipitadas (Figura 28).

Figura 28. Ensaios de imunoprecipitação dos mutantes.



Linhagens selvagens e mutantes tendo separadas por eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana PVDF e detecção de anticorpos anti-HA sobre proteínas recombinantes por quimioluminescência. Em ordem lisados (L), depletados (D) e resina com esferas magnéticas (R) referentes a uma replicata do ensaio de imunoprecipitação demonstrando bandas de tamanhos próximos a 66 kDa.

5.2.3 Análise de espectrometria de massas da PABP1 e seus mutantes

Através dos dados provenientes das análises das imunoprecipitações por espectrometria de massa, foram identificadas diferentes proteínas que co-precipitaram com a proteína PABP1 fusionada com o epítipo de hemaglutinina (HA) sob o critério de um enriquecimento mínimo de 1.5 vezes acima do observado no controle de beads magnéticas.

Para a proteína selvagem, foram identificadas proteínas enriquecidas em relação ao controle negativo. Relativo ao observado por De Melo Neto e colaboradores em 2018, um quantitativo maior de proteínas pôde ser identificado nesse estudo, em consequência das diferenças metodológicas para a seleção de peptídeos. Antes, baseada na quantificação sem marcador ou LFQ (do inglês, *Label-*

free quantification) de dados da espectrometria de amostras em duplicata e, atualmente, comparando médias de intensidades das amostras em triplicata com razão mínima entre elas e o controle negativo de 1.5x para o corte. As proteínas puderam então ser classificadas em diferentes grupos envolvendo fatores de iniciação eucarióticos (eIFs), proteínas de ligação ao RNA (RBPs), proteínas envolvidas em processos de fosforilação, ribossomais, helicases e proteínas hipotéticas. As proteínas, esumidas na Tabela 1, dispostas com suas respectivas intensidades e razões, sendo as razões de peptídeos ausentes no controle negativo representadas por “DIV/0!”.

Tabela 1. Peptídeos co-purificados com a proteína PABP1 fusionada com HA. *Demarcando os polipeptídeos que igualmente co-purificaram no estudo de De Melo Neto et al, 2018.

CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
Fatores de iniciação eucarióticos	EIF4G3*	LINF_160022100	7,14E+07	#DIV/0!
	EIF4E4*	LINF_300009600	6,65E+07	#DIV/0!
	EIF5B	LINF_330036700	1,55E+08	26,7723162
	EIF2 α	LINF_030014900	1,59E+08	14,9777856
	EIF2 β	LINF_080010700	2,11E+07	8,53283603
	EIF3C	LINF_360081900	1,14E+07	6,94617326
	EIF5	LINF_340008600	5,38E+07	6,7623149
	EIF2 γ -1	LINF_090018100	1,60E+08	6,33732517
	EIF4AI	LINF_010012800	4,51E+08	1,77449274
	EIF4G1	LINF_150005500	1,08E+07	1,63614099
Proteínas de ligação ao RNA	RBP23*	LINF_170011800	2,01E+08	#DIV/0!
	PABP1*	LINF_350055900	5,40E+09	224,339874
	ZC3H41*	LINF_270019700	1,06E+09	31,0625636
	PUF6	LINF_330019100	2,00E+07	22,2618165
	ALBA3	LINF_340031800	8,67E+07	6,5455249
	ALBA1	LINF_130009400	8,23E+07	6,02071866
	GBP21	LINF_270017500	3,67E+07	2,89912491
	RBSR4	LINF_030010000	7,30E+06	2,41003624
	DRBD3	LINF_040016900	5,64E+07	2,32401042
	PABP3	LINF_250005800	8,93E+07	2,03569866
	NRBD	LINF_320013000	2,11E+08	1,9371739
	PABP2	LINF_350047100	4,71E+08	1,7507044
Proteínas associadas à fosforilação	CRK3	LINF_360011000	8,66E+06	6,58871319
	Casein kinase Serin/Threonine kinase	LINF_350014800	1,08E+07	5,5535746
		LINF_290033500	4,73E+07	1,87075141
RNA helicases	DBP2	LINF_070008800	5,37E+07	15,160205
	RNA Helicase	LINF_350036300	5,98E+06	7,13591438
	RNA helicase nucleolar	LINF_050006300	8,60E+06	3,26002736
	L40 (60S)	LINF_360011600	3,49E+07	10,6065852

Proteínas ribossomais	L31 (60S)	LINF_350038300	5,43E+07	3,21924005
	S13 (40S)	LINF_190008800	8,75E+07	3,19601387
	S10 (40S)	LINF_360015600	1,04E+08	3,05164547
	S9 (40S)	LINF_070012400	8,20E+07	2,80879602
	P2 (60S)	LINF_300043100	8,26E+07	2,7953544
	S7 (40S)	LINF_010009200	1,01E+08	2,58772641
	S6 (40S)	LINF_210027600	9,39E+07	2,42118458
	S5 (40S)	LINF_110015600	1,29E+08	2,38748705
	L38 (40S)	LINF_030007300	2,08E+07	2,18983498
	L17 (60S)	LINF_320009400	1,27E+08	2,14621707
	L28 (60S)	LINF_110017300	5,27E+07	1,95631546
	S25 (40S)	LINF_340009500	8,27E+07	1,87221749
	S27-1 (40S)	LINF_180011200	2,31E+07	1,80602027
	S12 (40S)	LINF_130010600	3,69E+07	1,79385542
	L10 (60S)	LINF_040012600	6,87E+07	1,76949736
	S3a-2 (40S)	LinJ35.0510	1,84E+08	1,76038187
	S18 (40S)	LINF_360015100	2,90E+08	1,7429876
	L9 (60S)	LINF_210018100	2,13E+08	1,71307113
	L18a (60S)	LINF_320014400	2,41E+08	1,71195999
	L27A (60S)	LINF_350043000	4,60E+07	1,69509856
	S15A (60S)	LINF_110017900	1,09E+08	1,65439792
	L6 (80S)	LINF_150018200	2,09E+08	1,64610049
	L23 (40S)	LINF_060011400	1,43E+08	1,5921977
	L5 (60S)	LINF_350023700	2,45E+08	1,59017872
	P0 (60S)	LINF_270020500	2,72E+08	1,58968248
Proteínas hipotéticas	Proteína hipotética	LINF_270018600	5,52E+06	#DIV/0!
	Proteína hipotética	LINF_330037300	5,60E+06	#DIV/0!
	Proteína hipotética	LINF_080015800	6,53E+06	#DIV/0!
	Proteína hipotética	LINF_200021500	5,21E+07	#DIV/0!
	POMP10	LINF_090016900	8,42E+06	#DIV/0!
	Proteína hipotética	LINF_230005800	9,88E+06	#DIV/0!
	Uncharacterized protein having NTF2 and RRM-like* domains	LINF_180008000	2,02E+08	#DIV/0!
	Proteína hipotética	LINF_330033600	4,73E+07	#DIV/0!
	SKP1-like*	LINF_050009500	3,23E+07	31,4766517
	Proteína hipotética	LINF_190017000	3,95E+07	21,2434278
	Proteína hipotética	LINF_220008000	6,47E+07	7,9661751
	Proteína hipotética	LINF_310005700	1,02E+07	4,49616329
	Proteína hipotética	LINF_300034100	2,35E+07	4,43004103
	Proteína hipotética	LINF_330014600	8,25E+06	4,39251444
	Proteína hipotética	LINF_320041400	7,23E+06	4,21500275
	Proteína hipotética	LINF_260024900	3,34E+07	2,53357619
	Proteína hipotética	LINF_210009700	1,20E+08	1,9459319

Relativo aos fatores de iniciação da tradução, pôde-se observar a co-purificação da PABP1 com componentes do complexo eIF4F canônico de tripanosomatídeos, EIF4E4, EIF4G3 e com menor intensidade com seu parceiro EIF4AI. O EIF4G1, proteína componente de um outro complexo eIF4F, também foi identificado com a menor das intensidades relativo aos demais fatores de iniciação.

Juntos a esses resultados, verificou-se a co-precipitação de outros fatores de iniciação da tradução, o EIF2 α , EIF2 β , EIF2 γ -1, EIF3C, EIF5 e EIF5B.

Para além da própria PABP1, outras proteínas de ligação ao RNA co-precipitaram com o produto desse homólogo. Dentre elas, sua parceira proteica RBP23 apresentando maior razão relativa, uma proteína com domínio de dedos de zinco (*zinc finger*), a ZC3H41, PUF6, duas RBPs do tipo ALBA (ALBA1 e 3), GBP21, DRBD3, a proteína ribossomal NRBD, a RBP denominada de RBSR4, de localização nuclear e possivelmente envolvida com processamento de mRNAs, além das próprias PABP2 e PABP3.

Algumas proteínas com atividade enzimática foram identificadas. No que diz respeito a quinases envolvidas em processos de fosforilação, observa-se a presença da CRK3 de forma mais intensa, seguida da enzima Caseína quinase e uma outra quinase cujos alvos também envolvem sítios de serina e treonina (LINF_290033500). Por outro lado, três helicases relacionadas a RNAs foram identificadas na análise, duas delas, a DBP2B e uma outra RNA helicase dependente de ATP (LINF_350036300) sendo ambas componentes da família de helicases do tipo DEAD-box. A terceira helicase (LINF_050006300) é de predominância nucleolar.

Um conjunto de vinte e seis proteínas ribossomais também foram identificadas co-precipitando com a PABP1, com destaque para a proteína de maior razão, a L40, reforçando a associação da PABP1 ao ribossomo. A L40 é uma proteína ribossomal essencial que se integra à subunidade 60S nos últimos estágios de sua montagem e garante o funcionamento correto do processo de alongamento (FÉRNANDEZ-PEVIDA et al, 2012; MARTÍN-VILLANUEVA et al, 2020).

Relativo às proteínas hipotéticas, uma proteína contendo domínio NFT2 e RRM (LINF_180008000) e a SKP1-*like* (LINF_050009500), relacionada à mediação de proteínas para o processo de ubiquitinação, foram identificadas conforme o observado no estudo de DE MELO NETO et al, 2018. Além destas, recebem destaque outras 15 proteínas hipotéticas que co-purificaram com a PABP1: LINF_270018600, LINF_330037300, LINF_080015800, LINF_200021500, POMP10, LINF_230005800, LINF_330033600, LINF_190017000, LINF_220008000, LINF_310005700,

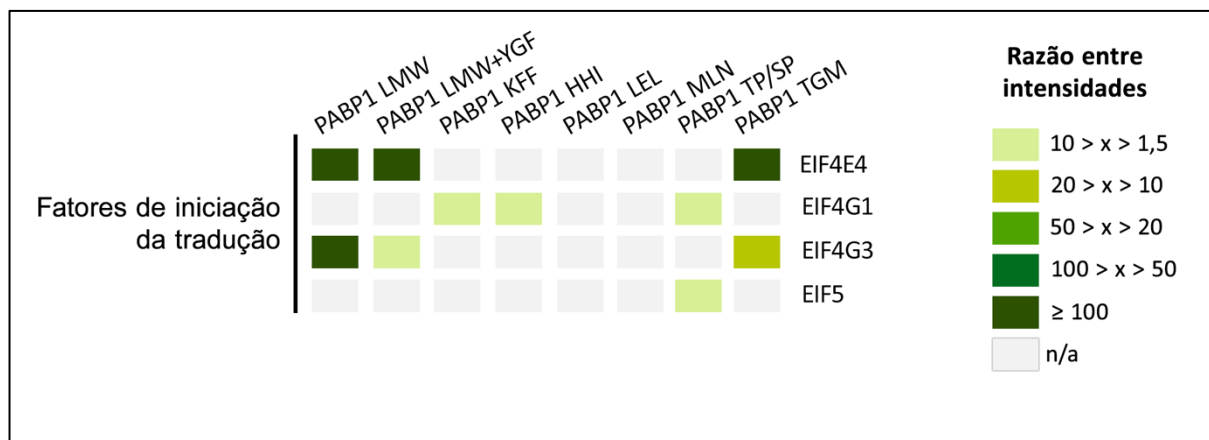
LINF_300034100, LINF_330014600, LINF_320041400, LINF_260024900 e LINF_210009700. Como proteína mais caracterizada deste grupo, destacam-se a POMP10 envolvendo uma proteína de membrana mitocondrial.

5.2.4 Proteínas associadas às versões mutantes da PABP1

Os resultados das análises com as proteínas mutantes permitem a demarcação *in vivo* de potenciais regiões, ao longo da proteína, associadas a interações com seus diferentes parceiros proteicos. Após a filtragem e seleção de peptídeos, diferentes proteínas tiveram suas intensidades diminuídas de acordo com as regiões mutagenizadas, correspondendo à atenuação da capacidade de co-purificação respectivamente.

Relativo ao efeito das mutações na PABP1 sobre suas interações estabelecidas com fatores de iniciação da tradução (Figura 29), foi possível observar uma diminuição expressiva da intensidade de interação com parceiros componentes de complexos eIF4F, o eIF4E4 e eIF4G3 em mutantes de regiões correspondentes aos motivos LMW, LMW + YGF e TGM, posicionados nos RRM1s 1, 2 e no domínio C-terminal da proteína. O homólogo eIF4G4, por outro lado, teve sua co-precipitação aumentada especialmente associado ao mutante LMW/AAA + YGF/AAA, também de forma menos intensa a mutantes HHI/AAA e MLN/AAA nos RRM1s 3 e 4 respectivamente (Anexo 9.1). Unido a esses resultados, um decréscimo perceptível dos fatores eIF4G1 e eIF5 estiveram ligados às substituições em sítios TP/SP no mutante correspondente às mesmas, sendo o primeiro deles também diminuído para os mutantes KFF/AAA e HHI/AAA.

Figura 29. Comparação de enriquecimento de fatores de iniciação eucarióticos para versões mutantes da PABP1.



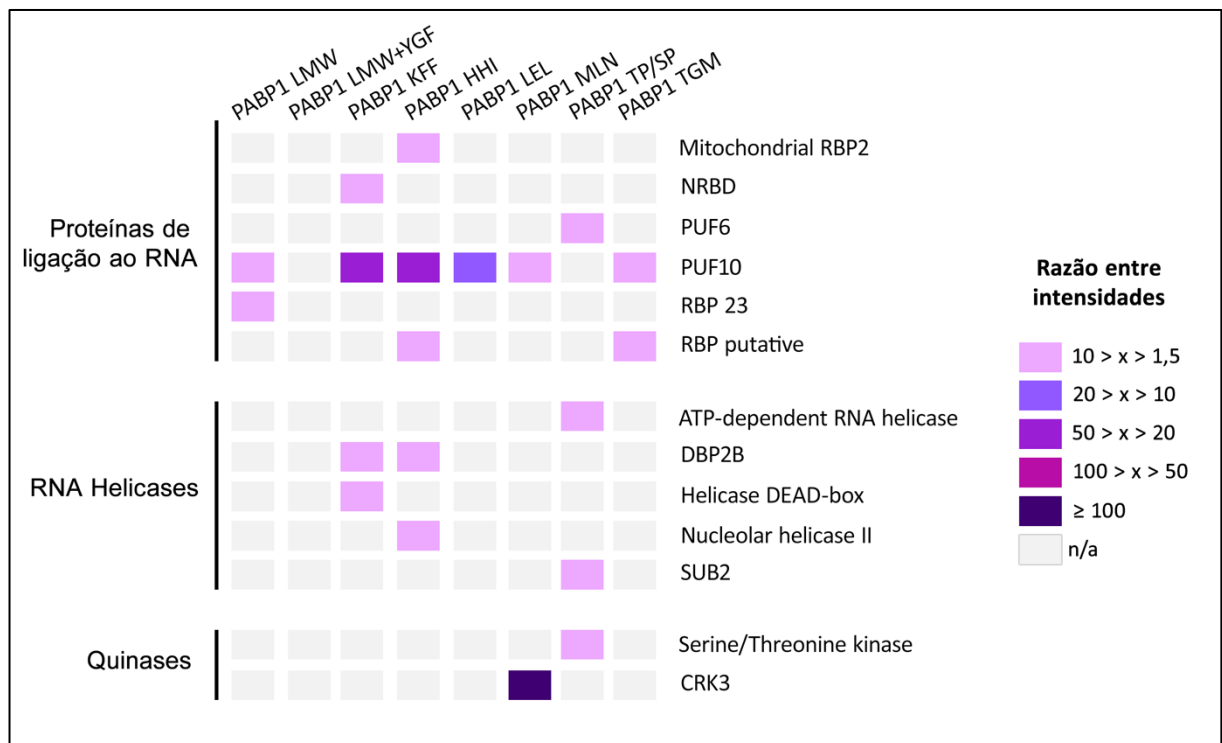
Associação de diferentes linhagens (colunas) com peptídeos (linhas) coloridos de acordo com as razões entre intensidades quando comparadas ao observado na PABP1 selvagem. As variações de verde correspondem às intensidades da razão (proteína selvagem/proteína mutante), correspondendo a uma diminuição da co-purificação.

Para as RBPs, um impacto negativo associado à PUF6 foi observado para a mutação no motivo de reconhecimento ao RNA 3, referente à região KFF/AAA. Outra proteína com domínio pumílio, a PUF10, apresentou uma diminuição envolvendo principalmente os motivos KFF e HHI além, de forma menos intensa, dos motivos LMW (RRM12), LEL e MLN (RRM4) e TGM (MLLE). A RBP23, parceira direta da PABP1, apresentou diminuição nas intensidades relativas ao mutante na região LMW da proteína. Também se destacam impactos negativos direcionados à co-purificação com a NRBD pelo mutante KFF/AAA, RBP mitocondrial 2 no mutante HHI/AAA e a uma RBP com motivos de reconhecimento ao RNA (*RBP putative*, LINF_030010000) para os mutantes HHI/AAA e TGM/AAA (Figura 30).

No tocante a helicases, mutações nos resíduos de TP/SP foram responsáveis pela diminuição da associação de uma helicase dependente de ATP (LINF_350036300) e da SUB2. A DBP2B esteve associada a motivos presentes no RRM3 (KFF e HHI). Ainda nesses motivos, uma RNA helicase da família DEAD-box (LINF_350008800) e a Helicase nucleolar II tiveram suas intensidades diminuídas para os mutantes KFF/AAA e HHI/AAA respectivamente (Figura 30).

O mutante KFF/AAA esteve associado a um impacto marcante da co-purificação de uma enzima envolvida no processo de fosforilação, a CRK3. Além disso, a região TP/SP associou-se de forma menos intensa à co-purificação de uma quinase com sítios alvos de serina/treonina (LINF_290033500) (Figura 30).

Figura 30. Comparação de enriquecimento de proteínas de ligação ao RNA, RNA helicases e quinases para versões mutantes da PABP1.

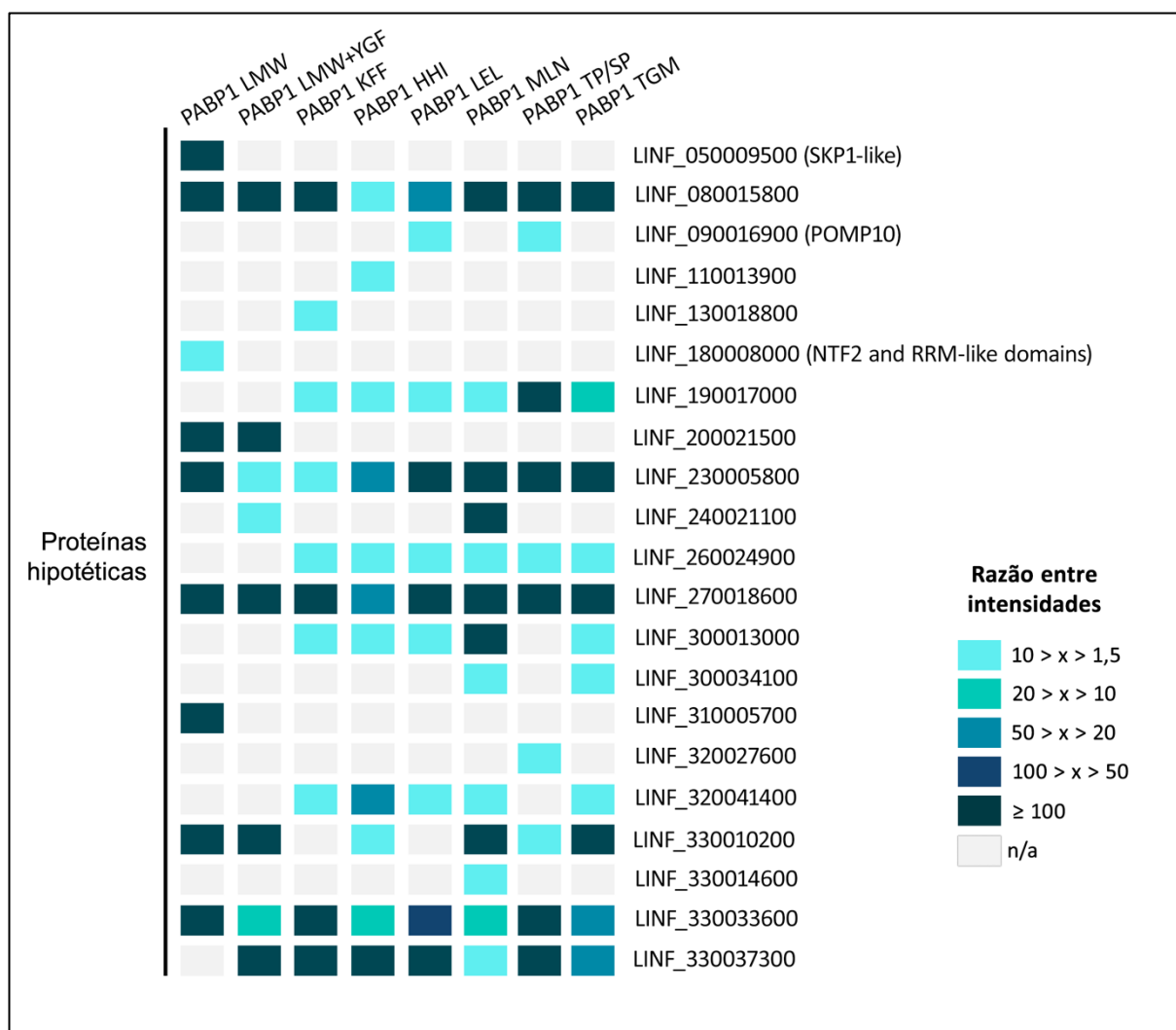


Associação de diferentes linhagens (colunas) com peptídeos (linhas) coloridos de acordo com as razões entre intensidades quando comparadas ao observado na PABP1 selvagem. As variações de violeta correspondem às intensidades da razão (proteína selvagem/proteína mutante), correspondendo a uma diminuição da co-purificação. Fonte: Elaborado pelo autor.

Como resultados envolvendo proteínas hipotéticas, destacando às melhores caracterizadas, o motivo LMW (RRM12) teve sua mutação associada à uma queda marcante da proteína SKP1-like e, de forma mais tênue, à proteína carreadora de domínios NFT e RRM (LINF_180008000). A co-purificação da POMP10 pareceu estar relacionada aos resíduos de TP/SP (*linker*) e ao motivo LEL (RRM4). Algumas outras proteínas hipotéticas estiveram associadas a motivos específicos, como a

LINF_310005700 ao LMW (RR12), a LINF_320027600 ao TP/SP (*linker*), LINF_130018800 para KFF (RRM3) e LINF_110013900 para HHI (RRM3) (Figura 31).

Figura 31. Comparação de enriquecimento de fatores de proteínas hipotéticas para versões mutantes da PABP1.



Associação de diferentes linhagens (colunas) com peptídeos (linhas) coloridos de acordo com as razões entre intensidades quando comparadas ao observado na PABP1 selvagem. As variações de azul correspondem às intensidades da razão (proteína selvagem/proteína mutante), correspondendo a uma diminuição da co-purificação. Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

Proteínas de ligação à cauda poli(A) citoplasmáticas, em eucariotos, podem contribuir para a formação de uma conformação fechada do mRNA promovendo um aumento da tradução e uma reiniciação desse processo (CHEN et al, 2014; ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013). Essa atividade está associada à sua interação com o complexo de iniciação do tipo eIF4F, que contata o cap de mRNAs através da subunidade eIF4E, parceiro indireto da PABP (ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013). Dos três homólogos de PABPs em tripanosomatídeos, a PABP1 se apresenta como uma proteína de atividade crítica para o processo de tradução, bem como parece estar associada a mecanismos de regulação envolvendo fosforilação em sítios de serina e treonina (DA COSTA LIMA et al, 2010).

Nos tripanosomatídeos, a PABP1 encontra-se associada ao complexo EIF4F canônico, composto pelas subunidades EIF4EA1, EIF4E4 e EIF4G3. Para além dessa especificidade, também é notável a vinculação dessa proteína a populações de RNAs mensageiros distintos dos observados para PABP2 (em *Trypanosoma* apenas) ou PABP2 e 3 (ASSIS et al, 2021). Esses mRNAs envolvem, em sua maioria, moléculas codificantes de proteínas ribossomais, sendo um processo ainda pouco compreendido (ASSIS et al, 2021; DA COSTA LIMA et al, 2010; KRAMER et al, 2013; ZOLTNER et al, 2018). No entanto, sugere-se que ocorra através da mediação de proteínas de ligação ao RNA que, quando ligadas a sequências comuns nessas populações, possam recrutar a PABP1 e consequentemente o complexo canônico sobre as mesmas. Uma proteína de ligação ao RNA, a RBP23 se associa de forma específica ao complexo canônico e à PABP1, demonstrando interação direta com esse homólogo, além de estar associada a mRNAs de proteínas ribossomais tal qual é observado para PABP1 (ASSIS et al, 2021; ZOLTNER et al, 2018). É proposto então que, a RBP23 possa estar interagindo com sequências na 3' UTR desses mRNAs e recrutando, posteriormente, o homólogo PABP1 e componentes do complexo EIF4F.

O conjunto de dados desse estudo associa características a diferentes regiões da PABP1 que possam estar associadas à iniciação da tradução. Dentre os diferentes motivos presentes em PABPs de eucariotos superiores, os RRM's mediam interações importantes para o seu funcionamento, como a ligação com a cauda poli-A e ao eIF4G,

através dos RRM4s 1 e 2 (KHALEGHPOUR et al, 2001; DA COSTA LIMA et al, 2010; HONG et al, 2017). Os RRM4s 3 e 4, por sua vez, encontram-se comumente associados ao reconhecimento de estruturas não poli-A (BROOK; SMITH; GRAY, 2009; BURGESS). Os resultados do presente estudo demonstram uma menor expressão da PABP1 recombinante de *Leishmania infantum*, relativa à construção com mutações no motivo MLN do RRM4 em linhagens com uma das cópias do gene nocauteadas, ligada a um atraso no crescimento em comparação às demais linhagens. Para o duplo nocaute, a linhagem expressando o mesmo mutante é incapaz de suprir o efeito deletério do nocaute do gene *PABP1*, se apresentando como indispensável para alguma atividade desse gene associada à manutenção da sobrevivência celular nesses organismos. Estudos prévios, em leveduras, indicam uma menor afinidade à poli(A) do RRM4 em relação aos RRM4s 1-3 à cauda poli(A) e o associa como potencial ligante de 3' UTRs de seus transcritos (TUCK; TOLLERVEY, 2013; WEBSTER et al, 2018). Em *Xenopus laevis*, os RRM4s 3 e 4 demonstraram estimular a tradução em níveis similares ao da proteína PABP1 completa (GRAY, 2000). Além disso, análises estruturais do RRM4 em mamíferos, apontam uma região dorsal contrária ao seu sítio de ligação ao RNA, estruturalmente favorável para a mediação de interações proteína-proteína, similar ao observado nos RRM4s 1 e 2 que já demonstram interações dessa natureza (BROOK et al, 2012). Essa região, pode se apresentar um potencial candidato para interações com parceiros proteicos da PABP1. Portanto, interações importantes para a manutenção celular podem estar associadas à integridade do domínio RRM4.

Precedendo aos ensaios de interação proteica com as diferentes construções do gene PABP1, a avaliação da expressão da proteína recombinante em linhagens SKO foi confirmada. Nesse contexto, uma notável ausência do reconhecimento da expressão da PABP1 recombinante, em linhagens SKO, foi evidenciada em três réplicas para o mutante YGF/AAA. Junto a isso, também foi observada uma redução drástica no crescimento celular. Em *Leishmania infantum*, o motivo de tirosina-glicina-fenilalanina (YGF), parte do domínio RNP2 do RRM2, é apontado como crítico para interações necessárias para a função da proteína PABP1 (DE MELO NETO et al, 2018). Em eucariotos superiores, o RNP2 atua como um dos componentes chave para o reconhecimento da cauda poli-A através do estabelecimento de interações

hidrofóbicas com resíduos aromáticos (NAGATA et al, 2008; DOMINGUES et al, 2015). Portanto, apesar da presença do gene endógeno da PABP1 em uma cópia, a superexpressão em pSP-BT1-Yneo^{dr}, pode ocasionar uma sobreposição do mutante na participação das interações estabelecidas pela PABP1 selvagem, fazendo com que funções dependentes da mesma possam ser prejudicadas junto ao crescimento celular.

Corroborando com estudos prévios, os dados de espectrometria de massa nesse estudo reforçaram a participação da PABP1 no complexo canônico formado por EIF4A1, EIF4E4 e EIF4G3. Relativo aos mutantes, diferentes regiões ao longo da proteína estiveram associadas à co-precipitação da PABP1 com seu parceiro direto EIF4E4 e com o homólogo EIF4G3. Três mutantes em motivos LMW (RRM1-2), LMW + YGF (RRM1-2 + RRM2) e TGM (MLLE) demonstraram diminuir o potencial de co-precipitação dos fatores EIF4E4 e EIF4G3 com a PABP1. Em eucariotos superiores o RRM2 está diretamente associado à interação com a subunidade eIF4G (SAFAEE et al, 2012). Esse dado corrobora com os resultados de De Carli em 2010, onde foi constatada a co-purificação da PABP1 com o EIF4G3 em *Leishmania major* e contrasta com outros resultados em tripanosomatídeos que sugerem uma ausência de interações diretas *in vitro* entre EIF4G3 e PABP1 (YOFFE et al, 2009; ZINOVIEV et al, 2011). No tocante ao motivo TGM, responsável pela interação com o EIF4E4 em tripanosomatídeos De Melo Neto em 2018, o mutante dessa região foi capaz de reduzir de forma mais intensa a associação com o EIF4E4 quando comparado ao EIF4G3, considerando que o mesmo pode co-purificar indiretamente através da interação com o seu parceiro EIF4E4.

No que diz respeito a proteínas de ligação ao RNA, recebe destaque a Proteína com domínio Pumílio – 6 (PUF6), impactada pela mutação localizada no RRM3 no motivos KFF (RRM3). A interação com a PUF6 corrobora com os dados de espectrometria de Assis et al, 2021. Essa RBP foi associada, em *Leishmania*, ao decaimento de mRNAs carreadores de sequências regulatórias do tipo SIDER2 (AZIZI; DUMAS; PAPADOPOULOU, 2017). A RBP23, sugerida neste estudo estar associada à especificidade da PABP1 às suas populações de mRNAs, pareceu ter

sua co-purificação associada ao motivo LMW (RRM2), com diminuição não observada em nenhum dos demais motivos estudados.

Outra diminuição marcante envolve uma quinase relacionada a ciclina Cdc2, a CRK3 no motivo MLN (RRM4), proteína essencial em espécies de tripanosomatídeos com atividade ligada à progressão do ciclo celular, da fase G2 para M (HASSAN et al, 2001; SANTORI et al, 2002). Estudos prévios também relacionam à interação de outra quinase relacionadas a ciclinas, a CRK1, na fosforilação das proteínas PABP1 e EIF4E4 promovendo a associação ao poli(A) pela e a ligação com o m⁷G cap, respectivamente (AN et al, 2018). O motivo TP/SP também esteve associado de forma mais sutil à co-purificação com uma quinase de serina/treonina (LINF_290033500), correspondente aos resíduos substituídos.

Os resultados desse estudo apontam que a PABP1 promove interações importantes com diferentes grupos de proteínas, incluindo fatores de iniciação da tradução. As análises de interações utilizando mutantes, para além de determinar regiões críticas nessa proteína, associam motivos a diferentes papéis desempenhados pela PABP1 incluindo sua participação na iniciação da tradução. A informação obtida aqui pode dar subsídio ao entendimento de regiões críticas para interações proteicas na PABP1 e, conseqüentemente a posteriores análises de identificação de alvos de inibidores que possam agir de forma específica sobre interações relacionadas à tradução de tripanosomatídeos.

7 CONCLUSÕES

1. As linhagens de *L. infantum* submetidas ao nocaute individual para o gene da PABP1 com superexpressão de proteínas mutantes não demonstraram alterações de morfologia, no entanto, é possível observar uma diminuição do crescimento para o mutante MLN/AAA.

2. Em duplo nocaute, o mutante MLN/AAA não compensa a deleção do gene *PABP1* endógeno, sugerindo que essa região exerce um papel importante em alguma atividade da PABP1 associada a sobrevivência de tripanosomatídeos.

3. As versões das proteínas contendo mutações nos RRM3 e 4 ainda mantêm o aparecimento de isoformas fosforiladas, implicando que pelos menos os resíduos modificados não estão envolvidos diretamente ou completamente no processo de fosforilação da PABP1.

4. O mutante LMW/AAA no RRM2 foi o único mutante que demonstrou diminuição significativa da co-purificação com a RBP23, sugerindo-o como um possível sítio de interação para essa proteína.

5. Os ensaios de interação *in vivo*, atribuem uma potencial participação do motivo LMW no RRM2 a interações com componentes do complexo EIF4F canônico de tripanosomatídeos, EIF4E4 e/ou EIF4G3.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, C. E.; LORSCH, J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nature Structural & Molecular Biology**, Jun. 2012. v. 19, n. 6, p. 568–576.
- AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Mar. 2016. v. 10, n. 3, p. e0004349.
- ALBERTS, B. *et al.* **Analisando células, moléculas e sistemas**. [S.l.]: [s.n.], 2017.
- ALCÂNTARA, L. M. *et al.* Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, Dez. 2018. v. 8, n. 3, p. 430–439.
- ALEKHINA, O. *et al.* Functional Cyclization of Eukaryotic mRNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, Fev. 2020. v. 21, n. 5, p. 1677.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, 2017. v. 11, n. 4.
- ALMEIDA, L. V. *et al.* Chromosomal copy number variation analysis by next generation sequencing confirms ploidy stability in Trypanosoma brucei subspecies. **Microbial Genomics**, Out. 2018. v. 4, n. 10.
- AN, T. *et al.* CDK Phosphorylation of Translation Initiation Factors Couples Protein Translation with Cell-Cycle Transition. **Cell Reports**, Dez. 2018. v. 25, n. 11, p. 3204–3214.e5.
- ARENAS, R. *et al.* Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, 2017. v. 6, n. 1, p. 1–15.
- ASSIS, L. A. *et al.* Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the Leishmania Poly(A) Binding Proteins reveals a direct association between PABP1, the RNA-binding protein RBP23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Out. 2021. v. 15, n. 10, p. e0009899.
- AZIZI, H.; DUMAS, C.; PAPADOPOULOU, B. The Pumilio-domain protein PUF6 contributes to SIDER2 retroposon-mediated mRNA decay in Leishmania. **RNA**, Dez. 2017. v. 23, n. 12, p. 1874–1885.
- BALCERAK, A. *et al.* RNA–protein interactions: disorder, moonlighting and junk contribute to eukaryotic complexity. **Open Biology**, Jun. 2019. v. 9, n. 6, p. 190096.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, Ago. 2007. v. 37, n. 10, p. 1097–1106.
- BENZ, C. *et al.* Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Out. 2005. v. 143, n. 2, p. 125–134.

BRANDÃO *et al.* Trypanosomatids in Small Mammals of an Agroecosystem in Central Brazil: Another Piece in the Puzzle of Parasite Transmission in an Anthropogenic Landscape. **Pathogens**, Out. 2019. v. 8, n. 4, p. 190.

BROOK, M.; SMITH, J. W. S.; GRAY, N. K. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. **REPRODUCTION**, Abr. 2009. v. 137, n. 4, p. 595–617.

BROOK, M. *et al.* The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. **Biochemical Journal**, Jan. 2012. v. 441, n. 3, p. 803–816.

BURGESS, H. M.; GRAY, N. K. mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins. **Biochemical Society Transactions**, Dez. 2010. v. 38, n. 6, p. 1517–1522.
CAVALCANTI, T. Y. V. L. **Identificação de parceiros funcionais e propriedades do fator EIF4E5, homólogo do fator de iniciação EIF4E (EIF4E5) de Leishmania infantum.** Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética. Recife, p. 94. 2018.

CHEN, Y.; VARANI, G. Engineering RNA-binding proteins for biology. **FEBS Journal**, 5 Jul. 2013. v. 280, n. 16, p. 3734–3754.

CHEN, Z. *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor eIFiso4G Is Required to Regulate Violaxanthin De-epoxidase Expression in Arabidopsis. **Journal of Biological Chemistry**, Mai. 2014. v. 289, n. 20, p. 13926–13936.

CHENG, S.; GALLIE, D. R. eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B Bind the Poly(A)-binding Protein through Overlapping Sites within the RNA Recognition Motif Domains. **Journal of Biological Chemistry**, Ago. 2007. v. 282, n. 35, p. 25247–25258.

CHOI, J.; EL-SAYED, N. M. Functional genomics of trypanosomatids. **Parasite Immunology**, Fev. 2012. v. 34, n. 2–3, p. 72–79.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. Protein Synthesis. **Molecular Biology**, 2013. p. e250–e255.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biology**, Jun. 2019. v. 9, n. 6, p. 190072.

_____; MICHAELI, Shula. 3' processing in protists. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, Mar. 2011. v. 2, n. 2, p. 247–255.

COSTA LIMA, T. D. DA *et al.* Functional Characterization of Three Leishmania Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. **Eukaryotic Cell**, Out. 2010. v. 9, n. 10, p. 1484–1494.

DAI, L. *et al.* Poly(A) Binding Protein C1 Is Essential for Efficient L1 Retrotransposition and Affects L1 RNP Formation. **Molecular and Cellular Biology**, Nov. 2012. v. 32, n. 21, p. 4323–4336.

DE MELO NETO, O. P. *et al.* Phosphorylation and interactions associated with the control of the Leishmania Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. **RNA Biology**, Mar. 2018. p. 1–17.

MELO NETO, O. P. DE *et al.* The unique Leishmania EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. **RNA Biology**, Set. 2015. v. 12, n. 11, p. 1209–1221.

DEO, R. C. *et al.* Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein. **Cell**, 17 Set. 1999. v. 98, n. 6, p. 835–845.

DEVER, T. E.; GREEN, R. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Jul. 2012. v. 4, n. 7.

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

DHALIA, R. *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and biochemical parasitology*, Mar. 2005, v. 140, n. 1, p. 23–41.

DOMINGUES, M. N. *et al.* Structure and Mechanism of Dimer-Monomer Transition of a Plant Poly(A)-Binding Protein upon RNA Interaction: Insights into Its Poly(A) Tail Assembly. **Journal of molecular biology**, Jul. 2015, v. 427, n. 15, p. 2491–2506.

DUMETZ, F. *et al.* Modulation of aneuploidy in *leishmania donovani* during adaptation to different in vitro and in vivo environments and its impact on gene expression. **mBio**, Mai. 2017. v. 8, n. 3.

ELISEEVA, I. A.; LYABIN, D. N.; OVCHINNIKOV, L. P. Poly(A)-binding proteins: Structure, domain organization, and activity regulation. **Biochemistry (Moscow)**, Dez. 2013. v. 78, n. 13, p. 1377–1391.

ESPINOSA, O. A. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, Abr. 2018. v. 145, n. 4, p. 430–442.

FERNÁNDEZ-PEVIDA, A. *et al.* Yeast ribosomal protein L40 assembles late into precursor 60 S ribosomes and is required for their cytoplasmic maturation. **The Journal of biological chemistry**, Set. 2012, v. 287, n. 45, p. 38390–38407.

FIEBIG, M.; KELLY, S.; GLUENZ, E. Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. **PLoS Pathogens**, Out. 2015. v. 11, n. 10, p. 1–28.

FITZGERALD, K. D.; SEMLER, B. L. Re-localization of cellular protein SRp20 during poliovirus infection: bridging a viral IRES to the host cell translation apparatus. ***PLoS pathogens***, Jul. 2011, v. 7, n. 7, p. e1002127.

FREIRE, E. R. et al, eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. ***RNA (New York, N.Y.)***, Ago. 2014, v. 20, n. 8, p. 1272–1286.

FREIRE, E. R. et al, The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. ***Molecular and biochemical parasitology***, Nov. 2011, v. 176, n. 1, p. 25–36.

FREIRE, E. *et al*, The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. ***Pathogens***, Out. 2017. v. 6, n. 4, p. 55.
GAUDENZI, J. G. DE *et al*, Gene expression regulation in trypanosomatids. ***Essays in Biochemistry***, 2011. v. 51, n. 1, p. 31–46.

GAZESTANI, V. H.; LU, Z.; SALAVATI, R. Deciphering RNA regulatory elements in trypanosomatids: One piece at a time or genome-wide? ***Trends in Parasitology***, Mar. 2014. v. 30, n. 5, p. 234–240.

GE, H. *et al*, Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. ***Proteins: Structure, Function and Genetics***, Mai. 2008. v. 71, n. 3, p. 1539–1545.

GENOIS, M.-M. *et al*, DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. ***Microbiology and Molecular Biology Reviews***, Mar. 2014. v. 78, n. 1, p. 40–73.

GEORGIADOU, S. P.; MAKARITSIS, K. P.; DALEKOS, G. N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. ***Journal of Translational Internal Medicine***, Dez. 2016. v. 3, n. 2, p. 43–50.

GONÇALVES, C. S. *et al*, Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. ***Parasites and Vectors***, Fev. 2018. v. 11, n. 1, p. 1–14.

GORODKIN, J. ***RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods***. [S.l.]: [s.n.], 2014. V. 1097.

GOSS, D. J.; KLEIMAN, F. E. Poly(A) binding proteins: are they all created equal?. ***Wiley interdisciplinary reviews. RNA***, Dez. 2013, v. 4, n. 2, p. 167–179.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. ***Infectious Disease Clinics of North America***, Jun. 2012. v. 26, n. 2, p. 293–307.

GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: Complex or simplified?

Eukaryotic Cell, Jun. 2010. v. 9, n. 8, p. 1159–1170.

Gray, N. K. *et al*, Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. **The EMBO journal**, Set. 2000, v. 19, n. 17, p. 4723–4733.

GURAMRIT, S. *et al*, The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. **Annual review of biochemistry**, Mar. 2015. p. 229–262.

HANDLER, M. Z. *et al*, Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Dez. 2015. v. 73, n. 6, p. 897–908.

HARVEY, R. F. *et al*, Trans-acting translational regulatory RNA binding proteins. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, Mai. 2018. v. 9, n. 3, p. 1–19.

HASSAN, P. *et al*, The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. **Molecular and biochemical parasitology**, Abr. 2001, v. 113, n. 2, p. 189–198.

HILBERT, M. *et al*, eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism. **Nucleic Acids Research**, Mar. 2011. v. 39, n. 6, p. 2260–2270.

HINNEBUSCH, A. G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. **Annual Review of Biochemistry**, Jan. 2014. v. 83, n. 1, p. 779–812.

HONG, K. Y. *et al*, The bent conformation of poly(A)-binding protein induced by RNA-binding is required for its translational activation function. **RNA Biology**, Mar. 2017. v. 14, n. 3, p. 370–377.

HOU, J. *et al*, Targeting Mnks for cancer therapy. **Oncotarget**, Fev. 2012, v. 3, n. 2, p. 118–131.

IVANOV, A. *et al*. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. **Nucleic Acids Research**, Jul. 2016. v. 44, n. 16, p. 7766–7776.

JACKSON, A. P. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**. [S.l.]: [s.n.], 2015, V. 142, p. S40–S56.

JACKSON, A. P.; QUAIL, M. A.; BERRIMAN, M. Insights into the genome sequence of a free-living kinetoplastid: *Bodo saltans* (kinetoplastida: Euglenozoa). **BMC Genomics**, Dez. 2008. v. 9, p. 1–11.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation Initiation and principles of its regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, Fev. 2010. v. 11, n. 2, p. 113–127.

JAGUS, R. *et al*, Diversity of eukaryotic translational initiation factor eIF4E in protists. **Comparative and Functional Genomics**, Jun. 2012. v. 2012, p. 134839.

JENNINGS, M. D. *et al*, Fail-safe control of translation initiation by dissociation of eIF2 α

phosphorylated ternary complexes. **eLife**, Mar. 2017. v. 6, p. 1–19.

KAUFER, A. *et al*, The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, Jun. 2017. v. 10, n. 1, p. 1–17.

_____; STARK, D.; ELLIS, J. Evolutionary insight into the trypanosomatidae using alignment-free phylogenomics of the kinetoplast. **Pathogens**, Set. 2019. v. 8, n. 3.

KHALEGHPOUR, K. *et al*, Dual Interactions of the Translational Repressor Paip2 with Poly(A) Binding Protein. **Molecular and Cellular Biology**, Ago. 2001. v. 21, n. 15, p. 5200–5213.

KHONG, A.; PARKER, R. The landscape of eukaryotic mRNPs. **RNA (New York, N.Y.)**, Mar. 2020, v. 26, n. 3, p. 229–239.

KOCH, H. *et al*, The polyadenylation complex of *Trypanosoma brucei* : Characterization of the functional poly (A) polymerase. **RNA Biology**, 2016. v. 13, n. 2, p. 221–231.

KOZLOV, G. *et al*, Molecular Determinants of PAM2 Recognition by the MLLE Domain of Poly(A)-Binding Protein. **Journal of Molecular Biology**, Mar. 2010. v. 397, n. 2, p. 397–407.

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

_____; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, Jan. 2011. v. 27, n. 1, p. 23–30.

KÜHN, U.; WAHLE, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, Mai. 2004. v. 1678, n. 2–3, p. 67–84.

LAFFITTE, Marie-Claude N *et al*, Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, Set. 2016. v. 5, p. 2350.

LEE, Y.; RIO, D. C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. **Annual Review of Biochemistry**, Jun. 2015. v. 84, n. 1, p. 291–323.

LEI, Q. *et al*, Evolutionary Insights into RNA trans-Splicing in Vertebrates. **Genome Biology and Evolution**, Mar. 2016. v. 8, n. 3, p. 562–577.

LIANG, X. *et al*. trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, Out. 2003. v. 2, n. 5, p. 830–840.

LIPOLDOVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. **Nature reviews. Genetics**, Abr. 2006, v. 7, n. 4, p. 294–305.
LITWACK, G. **Human biochemistry**. [S.l.]: Elsevier, 2017.

- LUKEŠ, J. *et al*, Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. **Trends in Parasitology**, Jun. 2018. v. 34, n. 6, p. 466–480.
- MACHIDA, K. *et al*, Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. **Scientific Reports**, Nov. 2018. v. 8, n. 1, p. 1–11.
- MAROLI, M. *et al*, Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, Jun. 2013. v. 27, n. 2, p. 123–147.
- MARTÍN-VILLANUEVA, S. *et al*, The Ubiquitin Moiety of Ubi1 Is Required for Productive Expression of Ribosomal Protein eL40 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cells**, Ago. 2019, v. 8, n. 8, p. 850.
- MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes & Development**, Fev. 1994. v. 8, n. 4, p. 491–501.
- MELO, E. O. *et al*, Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain: role in cooperative binding to poly (A) and efficient cap distal translational repression. **The Journal of biological chemistry**, Nov. 2003. v. 278, n. 47, p. 46357–68.
- MERLO, K. C. **Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de Leishmania infantum**. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, p. 130, 2018.
- MERRICK, W. C. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. **Gene**, Mai. 2004. v. 332, n. 1–2, p. 1–11.
- MERRICK, W. C. eIF4F: A retrospective. **Journal of Biological Chemistry**, Out. 2015. v. 290, n. 40, p. 24091–24099.
- MICHAELI, Shulamit. Trans -splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, Abr. 2011. v. 6, n. 4, p. 459–474.
- MOURA, D. M. *et al*, Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA biology**, 2015, v. 12, n. 3, p. 305–319.
- MUÑOZ-ESCOBAR, J. *et al*, The MLLE domain of the ubiquitin ligase UBR5 binds to its catalytic domain to regulate substrate binding. **The Journal of biological chemistry**, Set. 2015, v. 290, n. 37, p. 22841–22850.
- NAGATA, T. *et al*, The RRM domain of poly(A)-specific ribonuclease has a noncanonical binding site for mRNA cap analog recognition. **Nucleic acids research**, Ago. 2008, v. 36, n. 14, p. 4754–4767.

- NAJAFABADI, H. S. *et al*, Global identification of conserved post-transcriptional regulatory programs in trypanosomatids. **Nucleic Acids Research**, Out. 2013. v. 41, n. 18, p. 8591–8600.
- OLIVEIRA, R. P. L. DE; BRANDÃO, A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitology International**, Ago. 2013. v. 62, n. 4, p. 397–403.
- PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, 2014. v. 69, n. S1, p. S10–S18.
- PAHO, Pan American Health Organization. **Leishmaniasis. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>**. Acesso em: 21 de Janeiro de 2022
- PADMANABHAN, P. K. *et al*, Novel features of a PIWI-like protein homolog in the parasitic protozoan Leishmania. **PloS one**, Dez. 2012, v. 7, n. 12, p. e52612.
- PARK, E. H. *et al*, Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide. **BMC Genomics**, Jan. 2011. v. 12, n. 1, p. 68.
- PARTHASARATHY, A.; KALESH, K. Defeating the trypanosomatid trio: proteomics of the protozoan parasites causing neglected tropical diseases. **RSC Medicinal Chemistry**, Jun. 2020. v. 11, n. 6, p. 625–645.
- PASTRO, L. *et al*, Nuclear Compartmentalization Contributes to Stage-Specific Gene Expression Control in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Fev. 2017. v. 5.
- PEREIRA, L. O. R.; BRANDÃO, A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitology international**, Ago. 2013, v. 62, n. 4, p. 397–403.
- RAJAN, K. S. *et al*, Unique Aspects of rRNA Biogenesis in Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, Out. 2019. v. 35, n. 10, p. 778–794.
- REYNOLDS, S. J.; BILLIOUX, A. C.; QUINN, T. C. **HIV/AIDS-Related Problems in Low- and Middle-Income Countries**. Fourth Edi ed. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2017.
- RIBEIRO, P. A. F. *et al*, A conserved Leishmania hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nov. 2018. v. 92, n. 3, p. 196–203.
- RODRIGUES, F. H. S. R. *et al*, The Leishmania PABP1-eIF4E4 interface: a novel 5'-3' interaction architecture for trans-spliced mRNAs. **Nucleic acids research**, Fev. 2019, v. 47, n. 3, p. 1493–1504.
- ROMAGNOLI, B. A. A. *et al*, RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Fev. 2020. v. 10, n.

February, p. 1–17.

ROMANIUK, M. A. Regulation of RNA binding proteins in trypanosomatid protozoan parasites. **World Journal of Biological Chemistry**, Fev. 2016. v. 7, n. 1, p. 146.

ROSS-KASCHITZA, D.; ALTMANN, M. eIF4E and interactors from unicellular eukaryotes. **International Journal of Molecular Sciences**, Mar. 2020. v. 21, n. 6.

SAFAEE, N. *et al*, Interdomain Allostery Promotes Assembly of the Poly(A) mRNA Complex with PABP and eIF4G. **Molecular Cell**, Nov. 2012. v. 48, n. 3, p. 375–386.

SHIROKIKH, N. E.; PREISS, T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, Jul. 2018. v. 9, n. 4, p. 1–45.

SINGH, G. *et al*, The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion. **Annual review of biochemistry**, Mar. 2015, v.84, p. 325–354.

SMATHERS, C. M.; ROBART, A. R. The mechanism of splicing as told by group II introns: Ancestors of the spliceosome. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, Dec. 2019. v. 1862, n. 11–12, p. 194390.

SOHEILYPOUR, M.; MOFRAD, M. R. K. Regulation of RNA-binding proteins affinity to export receptors enables the nuclear basket proteins to distinguish and retain aberrant mRNAs. **Scientific Reports**, Nov. 2016. v. 6, p. 1–11.

SONENBERG, N; HINNEBUSCH, A G. Regulation of translation initiation in eukaryotes. **Cell**, Fev. 2009. v. 136, n. 4, p. 731–745.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, Fev. 2017. v. 10, n. 1, p. 1–10.

STOVER, N. A.; KAYE, M. S.; CAVALCANTI, A. R. O. Spliced leader trans-splicing. **Current Biology**, Jan. 2006. v. 16, n. 1, p. 8–9.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, Set. 2017. v. 7, n. 9.

SZOSTAK, E.; GEBAUER, F. Translational control by 3'-UTR-binding proteins. **Briefings in Functional Genomics**, Jan. 2013. v. 12, n. 1, p. 58–65.

TIAN, L. *et al*, Targeted endoplasmic reticulum localization of storage protein MRNAS requires the RNA-binding protein rbp-l. **Plant Physiology**, Mar. 2019. v. 179, n. 3, p. 1111–1131.

TORRES-GUERRERO, E. *et al*, Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, Mai. 2017, v. 6, n. 750.

TUCK, A. C.; TOLLERVEY, D. A Transcriptome-wide Atlas of RNP Composition Reveals Diverse Classes of mRNAs and lncRNAs. **Cell**, Ago. 2013. v. 154, n. 5, p. 996–1009.

WEBSTER, M. W. *et al*, mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. **Molecular Cell**, Jun. 2018. v. 70, n. 6, p. 1089–1100.e8.

WEDEL, C. *et al*, GT -rich promoters can drive RNA pol II transcription and deposition of H2A.Z in African trypanosomes . **The EMBO Journal**, Set. 2017. v. 36, n. 17, p. 2581–2594.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is leishmaniasis? **What is leishmaniasis?**, 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION.. Clinical forms of the leishmaniasis. **Clinical forms of Leishmaniasis**, 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological situation. **WHO**, 2020.

WEBSTER, M. W. *et al*, mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. **Molecular cell**, Jun. 2018, v. 70, n. 6, p. 1089–1100.e8.

WIGINGTON, C. P. *et al*, Poly(A) RNA-binding proteins and polyadenosine RNA: New members and novel functions. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, Set. 2014. v. 5, n. 5, p. 601–622.

XAVIER, C. C. **Análise cinética e caracterização de interações entre proteínas de complexos do tipo eIF4F e PABP em *Leishmania sp.*** - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, p. 113. 2019.

XAVIER, C. C. **Caracterização de interações entre subunidades do complexo de iniciação da tradução EIF4F e homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania sp.*** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, p. 92. 2015.

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

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

YOFFE, Y. *et al*, Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E–eIF4G interactions. **Nucleic Acids Research**, Jun. 2009. v. 37, n. 10, p. 3243–3253.

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

ZOLTNER, M. *et al*, Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, Jul. 2018. v. 12, n. 7, p. e0006679.

ANEXOS

ANEXO A - TABELAS DA CO-PURIFICAÇÃO DE PEPTÍDEOS COM DIFERENTES MUTANTES. Classe correspondendo ao grupo proteico aos quais os peptídeos pertencem. Intensidade média correspondente à intensidade do numerador da análise. Razão correspondentes às intensidades. As diminuições e aumentos correspondem às razões entre intensidades (PABP1 Selvagem/PABP1 Mutante) e (PABP1 Mutante/PABP1 Selvagem) respectivamente.

A. Análises de peptídeos para o mutante TP/SP

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE TP/SP				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF5	LINF_340008600	1E+08	2,698731
	EIF4G1	LINF_150005500	2E+07	1,741069
RBP	PUF6	LINF_330019100	5E+07	1,72375
Fosforilação	Serine/Threonine kinase	LINF_290033500	1E+08	1,671699
Helicase	SUB2	LINF_210024300	6E+08	1,867325
	ATP-dependent RNA helicase	LINF_350036300	1E+07	1,597827
Ribossomais	L40 (60S)	LINF_360011600	7E+07	4,585057
	L18 (60S)	LINF_130010500	5E+07	1,792949
Hipotéticas		LINF_080015800	1E+07	#DIV/0!
		LINF_190017000	9E+07	#DIV/0!
		LINF_230005800	3E+07	#DIV/0!
		LINF_270018600	1E+07	#DIV/0!
		LINF_330037300	1E+07	#DIV/0!
		LINF_330033600	1E+08	#DIV/0!
		LINF_330010200	6E+06	8,59746
		LINF_090016900	2E+07	7,403203
		LINF_320027600	6E+06	2,832167
		LINF_260024900	8E+07	2,357209
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE TP/SP				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
RBP	PUF1	LINF_360005400	6,00E+07	4,72483
Fosforilação	CRK3	LINF_360011000	6,00E+07	4,72483
Hipotéticas		LINF_330019800	2,00E+07	4,52822

B. Análises de peptídeos para o mutante LMW/AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE LMW/AAA				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4G3	LINF_160022100	1E+08	#DIV/0!
	EIF4E4	LINF_300009600	1E+08	#DIV/0!
RBP	RBP23	LINF_170011800	3E+08	3,177312
	PUF10	LINF_110009600	1E+07	2,301561

Hipotéticas		LINF_200021500	9E+07	#DIV/0!
		LINF_050009500	5E+07	#DIV/0!
		LINF_080015800	1E+07	#DIV/0!
		LINF_230005800	3E+07	#DIV/0!
		LINF_270018600	1E+07	#DIV/0!
		LINF_310005700	2E+07	#DIV/0!
		LINF_330010200	6E+06	#DIV/0!
		LINF_330033600	1E+08	#DIV/0!
		LINF_180008000	4E+08	2,470919
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE LMW/AAA				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF3L	LINF_360007700	3,00E+08	39,06226
	EIF3A	LINF_170005000	4,00E+08	61,33823
	EIF2β	LINF_080010700	9,00E+08	19,2112
Hipotéticas		LINF_020010800	3,00E+08	#DIV/0!
		LINF_350051300	6,00E+08	90,06405

C. Análises de peptídeos para o mutante LMW+YFG/AAA+AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE LMW + YGF				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4E4	LINF_300009600	1E+08	#DIV/0!
	EIF4G3	LINF_160022100	1E+08	5,406389
Hipotéticas		LINF_080015800	1E+07	#DIV/0!
		LINF_200021500	9E+07	#DIV/0!
		LINF_270018600	1E+07	#DIV/0!
		LINF_330010200	6E+06	#DIV/0!
		LINF_330037300	1E+07	#DIV/0!
		LINF_330033600	1E+08	10,50841
		LINF_230005800	3E+07	2,08128
		LINF_240021100	9E+06	1,537408
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE LMW + YGF				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4G4	LINF_360070500	2,00E+08	118,4724
	EIF3I	LINF_360047700	3,00E+08	41,57239
	EIF2β	LINF_080010700	1,00E+09	25,14535
	EIF5	LINF_340008600	3,00E+09	20,81782
	EIF4A1	LINF_350036300	2,00E+08	12,99326
RBP	RBP38	LINF_240017400	7,00E+07	#DIV/0!
Ribossomais	L40 (60S)	LINF_360011600	3,00E+09	32,31126
Hipotéticas		LINF_130011300	1,00E+08	#DIV/0!
		LINF_150014300	5,00E+08	#DIV/0!
		LINF_300040300	2,00E+08	#DIV/0!
		LINF_320012700	9,00E+07	#DIV/0!
		LINF_040006400	6,00E+08	197,7863
		LINF_360049500	5,00E+07	141,7017
		LINF_350051300	3,00E+08	49,4638
		LINF_360015500	1,00E+08	19,86202
+	cytoplasmic translation	LINF_110006700	2,00E+08	137,0388

	machinery associated			
	importin beta-1	LINF_340010100	1,00E+08	17,35939

D. Análises de peptídeos para o mutante TGM/AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE TGM				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4E4	LINF_300009600	1E+08	147,6512
	EIF4G3	LINF_160022100	1E+08	24,94895
RBPs	PUF10	LINF_110009600	1E+07	9,520077
	RBP putative	LINF_030010000	2E+07	1,672694
Ribossomais	L31 (60S)	LINF_350038300	1E+08	5,920644
	S10 (40S)	LINF_360015600	2E+08	2,282054
	L1a (60S)	LINF_290016800	5E+08	2,214385
	L10 (60S)	LINF_040012600	1E+08	2,050675
	60S acidic protein	LINF_150009100	4E+07	1,99429
	L13a (60S)	LINF_150007100	2E+08	1,948368
Hipotéticas		LINF_080015800	1E+07	#DIV/0!
		LINF_230005800	3E+07	#DIV/0!
		LINF_270018600	1E+07	#DIV/0!
		LINF_330010200	6E+06	#DIV/0!
		LINF_300034100	3E+07	7,38386
		LINF_330037300	1E+07	31,325
		LINF_330033600	1E+08	46,20342
		LINF_320041400	1E+07	4,285293
		LINF_300013000	3E+06	3,379242
		LINF_190017000	9E+07	10,91459
		LINF_260024900	8E+07	3,891611
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE TGM				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF3A	LINF_170005000	3,00E+07	5,496995
RBPs	Mitochondrial RBP	LINF_310012100	1,00E+07	7,238565
	ZPR1	LINF_170021500	5,00E+06	4,792601
Fosforilação	Serine threonine protein phosphatase	LINF_050005900	3,00E+06	#DIV/0!
Helicases	RNA helicase FAL1	LINF_280021300	1,00E+07	33,66774
	KPAF1	LINF_180005000	9,00E+06	26,20131
+	cleavage and polyadenylation specificity factor	LINF_340041200	4,00E+07	6,186474

E. Análises de peptídeos para o mutante KFF/AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE KFF				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4G1	LINF_150005500	2,4E+07	2,021103
RBPs	PUF10	LINF_110009600	1,4E+07	47,26588
	NRBD	LINF_320013000	4,1E+08	2,853935
Helicases	DBP2B	LINF_070008800	1,1E+08	4,271556
	Helicase DEAD-box	LINF_350008800	7,8E+08	1,748915

Ribossomais	L31 (60S)	LINF_350038300	1E+08	8,415642
	L40 (60S)	LINF_360011600	7,5E+07	6,671162
	L7a (60S)	LINF_070010600	2,2E+08	5,120045
	L7 (60S)	LINF_260006700	3,5E+08	3,411901
	L10 (60S)	LINF_040012600	1,3E+08	3,320722
	L28 (60S)	LINF_110017300	9,6E+07	3,116479
	L6 (60S)	LINF_150018200	4,3E+08	2,657646
	S23 (40S)	LINF_210018200	4,7E+07	2,556634
	S8 (40S)	LINF_240026900	4,8E+07	2,555819
	L26 (60S)	LINF_240026700	6,1E+07	2,419629
	L18a (60S)	LINF_320014400	4,3E+08	1,607898
Hipotéticas		LINF_080015800	1,5E+07	#DIV/0!
		LINF_270018600	1,4E+07	#DIV/0!
		LINF_330037300	1,2E+07	#DIV/0!
		LINF_330033600	1,2E+08	122,9284
		LINF_320041400	1,1E+07	8,784815
		LINF_190017000	9,1E+07	6,153823
		LINF_230005800	2,7E+07	5,308176
		LINF_300013000	3E+06	3,417748
		LINF_260024900	7,6E+07	3,18033
		LINF_130018800	1,5E+07	2,185253
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE KFF				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
Fosforilação	Serine threonine kinase	LINF_360021400	6,10E+07	13,27944
		LINF_150014300	1,10E+07	#DIV/0!
Hipotéticas		LINF_250016900	2,60E+07	#DIV/0!
		LINF_310005700	1,50E+08	10,02717

F. Análises de peptídeos para o mutante HHI/AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE HHI				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4G1	LINF_150005500	2,4E+07	1,83785
RBPs	PUF10	LINF_110009600	1,4E+07	37,71046
	Mitochondrial RBP2	LINF_090018500	1,3E+08	1,851746
	RBP putative	LINF_030010000	1,6E+07	1,710371
Helicases	DBP2B	LINF_070008800	1,1E+08	2,635873
	Nucleolar helicase II	LINF_050006300	1,7E+07	2,126946
Ribossomais	L40 (60S)	LINF_360011600	7,5E+07	8,944116
	L18 (60S)	LINF_130010500	4,6E+07	4,856339
	L31 (60S)	LINF_350038300	1E+08	3,415529
	S10 (40S)	LINF_360015600	2E+08	2,356367
	L28 (60S)	LINF_110017300	9,6E+07	2,339963
	60S acidic protein	LINF_150009100	3,9E+07	1,724791
	L11 (60S)	LINF_040009700	9,6E+07	1,723589
	P2 (60S)	LINF_300043100	1,5E+08	1,579878
	L23 (60S)	LINF_350043300	3,1E+08	1,538598
Hipotéticas		LINF_330037300	1,2E+07	#DIV/0!
		LINF_320041400	1,1E+07	34,50221
		LINF_230005800	2,7E+07	22,04892
		LINF_270018600	1,4E+07	19,76277
		LINF_330033600	1,2E+08	17,39252

		LINF_080015800	1,5E+07	9,738498
		LINF_190017000	9,1E+07	4,516432
		LINF_260024900	7,6E+07	3,966232
		LINF_300013000	2814143	3,098934
		LINF_110013900	1,7E+07	2,559423
		LINF_330010200	6039005	1,695425
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE HHI				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF3A	LINF_170005000	3,40E+07	5,98129
Fosforilação	MAP kinase	LINF_350045500	1,80E+07	17,88459
	Serine threonine kinase	LINF_360021400	2,90E+07	6,321626
	Rac serine threonine kinase	LINF_300013400	1,40E+07	5,236655
Hipotéticas		LINF_020010800	4,50E+07	#DIV/0!
		LINF_250027100	2,00E+07	#DIV/0!
		LINF_300040300	1,20E+07	#DIV/0!
+	Scavenger mRNA deccaping enzyme	LINF_140007400	1,10E+07	#DIV/0!

G. Análises de peptídeos para o mutante LEL/AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE LEL				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
RBP	PUF10	LINF_110009600	1,4E+07	13,38227
	RBP putative	LINF_030010000	1,6E+07	2,533554
Ribossomais	L31 (60S)	LINF_350038300	1E+08	1,843544
	60S acidic protein	LINF_150019500	6,1E+07	1,687509
Ribossomais		LINF_270018600	1,4E+07	#DIV/0!
		LINF_330037300	1,2E+07	#DIV/0!
		LINF_230005800	2,7E+07	#DIV/0!
		LINF_330033600	1,2E+08	70,13576
		LINF_080015800	1,5E+07	26,13449
		LINF_260024900	7,6E+07	6,938255
		LINF_190017000	9,1E+07	6,888501
		LINF_320041400	1,1E+07	4,452675
		LINF_090016900	1,8E+07	3,281705
		LINF_300013000	2814143	2,692907
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE LEL				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4G4	LINF_360070500	1,50E+07	8,768742
	EIF3I	LINF_360047700	3,20E+07	4,236382
	EIF3L	LINF_360007700	3,40E+07	4,158718
RBP	Mitochondrial RBP	LINF_310012100	3,70E+07	19,46744
Fosforilação	Serin theronine phosphatase	LINF_050005900	4554242	#DIV/0!
	Serin threonine kinase	LINF_360021400	4,90E+07	10,77609
	CRK3	LINF_360011000	5,80E+07	4,371036
Helicases	RNA helicase FAL1	LINF_280021300	9,00E+06	22,5412
Hipotéticas		LINF_020010800	2,00E+07	#DIV/0!
		LINF_300040300	2,00E+07	#DIV/0!
		LINF_320012700	1,00E+07	#DIV/0!

		LINF_350051300	4,00E+07	5,721006
		LINF_310005700	8,00E+07	5,463633
		LINF_360015500	3,00E+07	5,006928
+	Scavenger mRNA deccaping enzyme	LINF_140007400	9,00E+06	#DIV/0!

H. Análises de peptídeos para o mutante MLN/AAA

O QUE DIMINUIU PARA O MUTANTE MLN				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
RBP	PUF10	LINF_110009600	1E+07	9,605158
Fosforilação	CRK3	LINF_360011000	1E+07	#DIV/0!
Hipotéticas		LINF_230005800	3E+07	#DIV/0!
		LINF_270018600	1E+07	#DIV/0!
		LINF_300013000	3E+06	#DIV/0!
		LINF_330010200	6E+06	#DIV/0!
		LINF_240021100	9E+06	#DIV/0!
		LINF_080015800	1E+07	#DIV/0!
		LINF_330033600	1E+08	17,23799
		LINF_300034100	3E+07	7,669821
		LINF_330037300	1E+07	4,448748
		LINF_190017000	9E+07	3,495201
		LINF_320041400	1E+07	3,350442
		LINF_330014600	1E+07	2,605455
		LINF_260024900	8E+07	2,369394
O QUE AUMENTOU PARA O MUTANTE MLN				
CLASSE	NOME DA PROTEÍNA	ID DO GENE	INTENSIDADE MÉDIA	RAZÃO
eIFs	EIF4G5	LINF_100017900	1,00E+07	#DIV/0!
	EIF3L	LINF_360007700	5,00E+08	63,87533
	EIF3B	LINF_170020200	2,00E+08	63,15886
	EIF4G4	LINF_360070500	8,00E+07	48,37871
	EIF3I	LINF_360047700	3,00E+08	41,91487
	EIF3C	LINF_360081900	6,00E+08	31,20942
	EIF3E	LINF_280029900	2,00E+08	22,03623
	EIF2B	LINF_080010700	5,00E+08	9,875286
	EIF5	LINF_340008600	1,00E+09	8,242066
	EIF3A	LINF_170005000	5,00E+08	88,01207
	EIF3H	LINF_070012000	2,00E+08	54,51099
RBPs	RBP puative	LINF_340033000	2,00E+08	#DIV/0!
	ZFD RBP	LINF_360013000	6,00E+07	#DIV/0!
Fosforilação	Protein Kinase A	LINF_130006500	5,00E+07	#DIV/0!
	Serine threonine kinase	LINF_360021400	2,00E+08	43,27263
Ribossomais	S25 (40S)	LINF_340009500	1,00E+09	129,0393
Hipotéticas		LINF_020010800	6,00E+07	#DIV/0!
		LINF_150014300	3,00E+08	#DIV/0!
		LINF_250027100	9,00E+07	#DIV/0!
		LINF_300040300	6,00E+07	#DIV/0!
		LINF_320012700	2,00E+07	#DIV/0!
		LINF_330029400	1,00E+08	#DIV/0!
		LINF_140009200	7,00E+07	#DIV/0!
		LINF_230018300	5,00E+07	71,50733
		LINF_040006400	1,00E+08	35,01927
		LINF_020005900	1,00E+08	32,50492
		LINF_350051300	7,00E+07	10,1896

		LINF_360015500	5,00E+07	8,469619
+	Scavenger mRNA			
	decapping	LINF_140007400	1,00E+08	#DIV/0!
	enzyme			
	Importin1	LINF_350028600	1,00E+08	#DIV/0!

Curriculum vitae (Lattes)

Guilherme Santana Barbosa

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Guilherme Santana Barbosa

Dados pessoais

Filiação Marcos Antônio Barbosa e Michelle Santana Marques Barbosa

Nascimento 30/11/1998 - Caruaru/PE - Brasil

Carteira de Identidade 9719540 SDS - PE - 09/06/2014

CPF 113.875.314-92

Formação complementar

2020 - 2020 Curso de curta duração em BIOSSEGURANÇA EM FOCO. (Carga horária: 45h).
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Brasil

2020 - 2020 Introduction to Genetics and Evolution. (Carga horária: 22h).
Duke University, DUKE, Durham, Estados Unidos

2020 - 2020 Extensão universitária em Soluções biotecnológicas aplicadas às ações de enfrentamento à COVID-19. (Carga horária: 45h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Prêmios e títulos

2021 Melhor apresentação do trabalho, Universidade Federal de Pernambuco

Produção bibliográfica

Apresentação de trabalho e palestra

1. **BARBOSA, G. S.; XAVIER, C. C.; REIS, C. R. S.; MELO NETO, O. P. Avaliação do Efeito de Mutações em Motivos de Reconhecimento ao RNA na Proteína de Ligação à Poli-A (PABP1) Frente a Interações com RBP23 em Leishmania infantum**, 2021. (Outra, Apresentação de Trabalho)

2. **BARBOSA, G. S.; XAVIER, C. C.; BRITO, A. N. A. L. M.; REIS, C. R. S.; MELO NETO, O. P. Mutações em RRM's da proteína PABP1 para análises de interação com RBPs em Leishmania infantum**, 2021. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

3. **BARBOSA, G. S.; XAVIER, C. C.; REIS, C. R. S.; MELO NETO, O. P. Avaliação de parceiros proteicos e motivos de interação da PABP1, Proteína de Ligação ao Poli-A, de Leishmania infantum**, 2020. (Outra, Apresentação de Trabalho)