

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

AMARANTA MUNIZ MALVEZZI

**Estudo de novas propriedades associadas à regulação e
função de complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma
brucei***

**Recife
2015**

Amaranta Muniz Malvezzi

**Estudo de novas propriedades associadas à regulação e
função de complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma
brucei***

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

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientadora: Danielle Maria Nascimento Moura

Recife

2015

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

Malvezzi, Amaranta Muniz

Estudo de novas propriedades associadas à regulação e função de complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma brucei* / Amaranta Muniz Malvezzi. – Recife: O Autor, 2015.
116 f.: il.

Orientadores: Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Daniele Maria Nascimento Moura

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2015.

Inclui referências

1. Protozoário 2. Proteínas – Síntese I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orient.) II. Moura, Danielle Maria Nascimento III. Título.

579.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-148

Amaranta Muniz Malvezzi

**Estudo de novas propriedades associadas à regulação e função
de complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma brucei***

Aprovada em 09/03/2015

Banca Examinadora:

**Oswaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

**Antônio Mauro Rezende
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

**Lindomar José Pena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

**Constância Flávia Junqueira Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

**Tercílio Calsa Júnior
Universidade Federal de Pernambuco**

Recife

2015

**Dedico este trabalho aos meus pais, que são
minha fonte de sabedoria, inspiração e força.**

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, profissional exemplar, pela oportunidade concedida a mim e pelas orientações e ensinamentos repassados. E também à minha co-orientadora, Dr^a Danielle Moura, por me guiar constantemente e pela solicitude durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. David Campbell e à Dra Nancy Sturm por todo o suporte, atenção e fortalecimento da minha formação profissional e aos demais integrantes do departamento de microbiologia da UCLA, por toda a ajuda na realização de diversos experimentos e, também, pela amizade.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Microbiologia e demais departamentos do CPqAM por toda colaboração e amizade ao longo desse trabalho e também a todos os funcionários da instituição, pois é através da ajuda deles que a execução do nosso trabalho torna-se possível.

Aos órgãos fomentadores de pesquisa CAPES, FACEPE e CNPq pelo financiamento e suporte na execução das pesquisas científicas.

Ao meu noivo, pelo companheirismo, paciência e atenção e por todo o incentivo e ajuda, principalmente durante a realização do doutorado sanduíche.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, pois nunca pouparam esforços para que eu seguisse meu caminho e sempre me incentivaram, apoiaram e fizeram de tudo que estava ao alcance deles para que eu obtivesse sucesso em minha vida.

A Deus, por permitir e me dar forças para chegar até aqui e poder alcançar meus objetivos.

“Uma criança, um professor, um livro e uma caneta podem mudar o mundo. Educação é solução.”

Malala Yousafzai

Resumo

A iniciação da tradução é a etapa mais complexa de um processo crítico para a sobrevivência dos seres vivos, onde se destaca a atuação do complexo eIF4F, formado pelas subunidades eIF4E, eIF4A, e eIF4G. Seis homólogos de eIF4E (EIF4E1 a 6) e cinco de eIF4G (EIF4G1 a 5) foram identificados no protozoário *Trypanosoma brucei*. Este trabalho buscou contribuir no estudo de complexos do tipo eIF4F neste patógeno, inicialmente analisando a expressão de subunidades de complexos já definidos, formado pelos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4. Observou-se que, à exceção do EIF4G3, essas subunidades são representadas por isoformas originárias de eventos de fosforilação. No caso do EIF4E4, esses eventos estão associados às fases de crescimento do microorganismo e as fosforilações dos EIF4E3 e EIF4E4 são direcionadas às suas extremidades N-terminais. A etapa seguinte compreendeu o estudo de duas proteínas hipotéticas, encontradas com novos complexos baseados nos EIF4E5/EIF4G1 e EIF4E6/EIF4G5 (Tb117.5 e TbG5-IP). Essas são homólogas de enzimas associadas a formação da extremidade 5' dos mRNAs, porém apresentaram localização citoplasmática. Sua associação aos referidos complexos foi investigada e enquanto a Tb117.5 se associa com uma subpopulação do complexo EIF4E5/EIF4G1, a TbG5-IP se mostrou parte integrante do complexo EIF4E6/EIF4G5. A depleção por RNA interferência dessas proteínas não alterou a viabilidade celular apesar do insucesso na obtenção de deleção dupla dos seus genes. Os dados obtidos sugerem uma divergência funcional nesses complexos ainda não encontrada em outros eucariotos.

Palavras-chave: EIF4G; EIF4E; síntese proteica; *Trypanosoma brucei*.

Abstract

The initiation of translation is the most complex stage of a critical process required for the survival of all living beings and which requires the activity of the eIF4F complex, formed by the eIF4E, eIF4A, and eIF4G subunits. Six homologues of eIF4E (EIF4E1 to 6) and five of eIF4G (EIF4G1 to 5) were identified in the protozoan *Trypanosoma brucei*. This study aimed to contribute to the study of eIF4F-like complexes within this pathogen, initially analyzing the expression of subunits found in already defined complexes, formed by EIF4E4/EIF4G3 and EIF4E3/EIF4G4. Except for EIF4G3, all these subunits are represented by multiple isoforms originating from phosphorylation events. For EIF4E4, these events are associated with the microorganism's growth phase and the phosphorylations of both EIF4E3 and EIF4E4 are directed to their N- terminal ends. The next step included the study of two hypothetical proteins found within new complexes based on EIF4E5/EIF4G1 and EIF4E6/EIF4G5 (Tb117.5 and TbG5-IP). These are homologous to enzymes associated with the formation of the mRNAs' 5' end but showed cytoplasmic localization. Their association with the new complexes was investigated and while Tb117.5 is associated with a subset of the EIF4E5/EIF4G1 complex, TbG5-IP proved to be an integral part of the EIF4E6/EIF5G5 complex. The depletion by RNA interference of these proteins did not affect cell viability despite the failure to achieve a double deletion of their genes. The data suggest a functional divergence in these complexes that is not found in other eukaryotes.

Key words: EIF4G; EIF4E; Protein synthesis; *Trypanosoma brucei*.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Fotomicrografia mostrando a presença do <i>Trypanosoma brucei</i> no sangue.....	3
Figura 2. Número total de novos casos de HAT reportados à Organização Mundial da Saúde, 1940-2013.....	4
Figura 3. Diagrama esquemático do ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i>	7
Figura 4. Regiões SSR e áreas de iniciação da transcrição.....	12
Figura 5. Esquema representativo do processamento de mRNA em tripanossomatídeos.....	13
Figura 6. Via convencional de capeamento do RNA.....	15
Figura 7. Estrutura do cap4 de tripanossomatídeos.....	18
Figura 8. Esquema simplificado da iniciação da tradução em eucariotos.....	23
Figura 9. Ilustração do complexo EIF4F típico dos eucariotos superiores.....	25
Figura 10. Modelo tridimensional do eIF4E murino.....	27
Figura 11. Esquema do eIF4GI humano e seus principais sítios de ligação a outras proteínas.....	30
Figura 12. Ilustração da composição do complexo eIF4F de promastigotas de <i>Leishmania</i>	37
Figura 13. Análise da expressão de homólogos de eIF4A (EIF4A1), eIF4E (EIF4E3 e EIF4E4) e eIF4G (EIF4G3 e EIF4G4) durante a curva de crescimento de células procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i>	59
Figura 14. Análise das proteínas nativas EIF4E3 e EIF4E4 por gel bidimensional.....	60
Figura 15. Ensaio de purificação de fosfoproteína utilizando extrato total de células procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i> na fase exponencial de crescimento.....	62
Figura 16. Subclonagem dos fragmentos gênicos do EIF4E3 (EIF4E3ΔN) e EIF4E4 (EIF4E4ΔN) de <i>Trypanosoma brucei</i> no vetor p2477-177.....	63
Figura 17. Análise da expressão das proteínas completas EIF4E3 e EIF4E4 (EIF4E3-HA e EIF4E4-HA) e as suas equivalentes contendo deleção da região N-terminal (EIF4E3ΔN-HA e EIF4E4ΔN-HA).....	64
Figura 18. Análise por gel bidimensional das proteínas EIF4E3-HA, EIF4E4-HA e os seus equivalentes com suas extremidades N-terminais truncadas.....	65
Figura 19. Representação esquemática da localização de sítios de fosforilação preditos para MAP/cdk quinases nos fatores EIF4E3 e EIF4E4.....	66
Figura 20. Localização esquemática dos domínios de metiltransferases presentes nas metiltransferases de capeamento do mRNA e na Tb117.5, como predito pelo PHYRE2.....	68
Figura 21. Obtenção da linhagem celular de <i>T. brucei</i> geneticamente modificada para expressão da proteína Tb117.5 fusionada ao tag PTP.....	70
Figura 22. Localização subcelular da proteína Tb117.5.....	71
Figura 23. Eletroforese de gel nativo do extrato celular da linhagem Tb117.5 ^{-/PTP}	72

Figura 24. <i>Western blot</i> para confirmação da expressão da proteína <i>Tb117.5-PTP</i> nas células da linhagem 29-13.....	74
Figura 25. Análise do efeito da indução do RNAi na viabilidade celular e nos níveis de expressão da proteína <i>Tb117.5</i>	76
Figura 26. Localização esquemática dos domínios estruturais nas enzimas envolvidas no capeamento do mRNA e na <i>TbG5-IP</i>	78
Figura 27. Obtenção da linhagem celular de <i>T. brucei</i> geneticamente modificada para expressão da proteína <i>TbG5-IP</i> fusionada ao <i>tag PTP</i>	79
Figura 28. Localização subcelular da proteína <i>TbG5-IP</i>	80
Figura 29. Eletroforese de gel nativo do extrato celular da linhagem <i>TbG5-IP^{-/PTP}</i>	81
Figura 30. <i>Western blot</i> para confirmação da expressão da proteína <i>TbG5-IP-PTP</i> nas células da linhagem 29-13.....	83
Figura 31. Análise do efeito da indução do RNAi na viabilidade celular e nos níveis de expressão da proteína <i>TbG5-IP</i>	84
Figura 32. Modelo dos complexos envolvendo o EIF4E5 e as proteínas que co-purificam com o mesmo.....	93
Figura 33. Ilustração dos componentes que co-purificam com o EIF4E6.....	94

Lista de Tabelas

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos utilizados na obtenção das sequências de interesse.....	44
Tabela 2. Proteínas que co-purificam consistentemente com Tb117.5-PTP.....	73
Tabela 3. Identificação por MudPIT das proteínas que co-purificam com TbG5-IP-PTP.....	82

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
4E-BP	<i>eIF4E Binding Protein</i> – Proteína de ligação ao eIF4E
BARP	(<i>brucei Alanine Rich Protein</i>)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina bovina sérica
Dcp	<i>Decapping protein</i> – Proteína de decapeamento
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> – Ácido etilenodiaminotetraacético
eIF	<i>eukaryotic Initiation Factor</i> – Fator de iniciação eucariótico
GPEET	(<i>Gly-Pro-Glu-Glu-Thr</i>)
HA	<i>Human influenza Hemagglutinin</i>
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i> – Tripanossomíase africana humana
HEAT	<i>Huntinting, EF3, PR/65A, e Target of rapamicin 1</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i> – Proteína de choque térmico
IEF	<i>Isoelectric Focusing</i>
IgG	Imunoglobulina G
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
m ⁷ GTP	<i>cap 7-metilguanosine-triphosphate</i> – cap 7-metilguanosina-trifosfato
Met-tRNA _i ^{Met}	Metionil-tRNA iniciador
MIF4G	<i>Middle domain of eukaryotic Initiation Factor 4G</i> – Domínio medial do fator de iniciação eucariótico 4G
Mnk	<i>MAP-kinase signal-integrating kinases</i> – Proteína MAP quinase de integração de sinal
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MudPIT	<i>Multi-Dimensional Protein Identification Technology</i>
PABP	<i>Poli(A) Binding Protein</i> – Proteína de Ligação à Cauda Poli(A)
PARP	<i>Procyclic Acidic Repetitive Protein</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Tampão Fosfato Salino
PCF	<i>Procyclic Form</i> – Forma procíclica
PI	Ponto Isoelétrico
PVDF	<i>Polyvinylidene Fluoride</i> – Fluoreto de Polivinilideno
RNA pol	RNA polymerase – RNA polimerase
RNA SL	RNA <i>spliced leader</i>
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis – Eletroforese em gel de poliácridamida com dodecil sulfato de sódio
SDM-79	Schwarz Differential Medium – Meio diferencial Schwarz
SSR	Strand Switch Region – Região de troca de fita
TBS	Tris-Buffered Saline – Tampão salino de tris
TriTryps	Tri-Trypanosomatidae (os três tripanossomatídeos de maior destaque: <i>Leishmania spp</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>)
VSG	Variant Surface Glycoprotein - Glicoproteína variante de superfície
WHO	World Health Organization – Organização Mundial da Saúde
Xrn1	exorribonuclease 1
ZPMF	Zimmerman Post Fusion Medium – Meio pós-fusão Zimmerman

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Ilustrações	ix
Lista de Tabelas	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	3
2.1 O <i>Trypanosoma brucei</i> e a tripanossomíase africana	3
2.2 O ciclo evolutivo do <i>T. brucei</i>	6
2.3 Características moleculares do <i>T. brucei</i> e outros tripanossomatídeos.....	9
2.3.1 Regulação da expressão gênica	9
2.3.2 Organização do genoma, transcrição e <i>trans-splicing</i>	10
2.3.3 Compartimentalização e degradação de mRNAs	13
2.3.4 Formação do <i>cap4</i>	14
2.3.5 Fosforilação de proteínas em tripanossomatídeos	19
2.4 Biossíntese proteica em eucariotos	21
2.4.1 Complexo eIF4F e PABP	24
2.4.2 eIF4A	25
2.4.3 eIF4E	26
2.4.4 eIF4G.....	28
2.5 Mecanismos de regulação da iniciação da tradução	30
2.6 Iniciação da tradução em tripanossomatídeos	32
2.6.1 eIF4A de tripanosomatídeos	33
2.6.2 eIF4E de tripanosomatídeos	33
2.6.3 eIF4G de tripanosomatídeos.....	35
2.6.4 Complexos eIF4F em tripanossomatídeos	36
2.6.5 Eventos de fosforilação direcionados a fatores de tradução em tripanosomatídeos.	39
3. OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral.....	41
3.2 Objetivos específicos	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1 Cultivo de células de <i>Trypanosoma brucei</i>	42
4.2 Construção dos plasmídeos efetores.....	42
4.3 Transfecção estável de células de <i>T. brucei</i>	45
4.4 Interferência de RNA	46

4.5 Purificação dos anticorpos por imunoadsorção	46
4.6 Ensaio de <i>Western blot</i>	47
4.7 Curvas de crescimento de <i>T. brucei</i> na fase procíclica	48
4.8 Purificação de fosfoproteínas.....	49
4.9 Eletroforese bidimensional.....	50
4.10 Investigação de possíveis sítios de fosforilação para Map quinases nos EIF4E3 e EIF4E4 de <i>T. brucei</i>	51
4.11 <i>Southern Blot</i>	51
4.12 Microscopia de fluorescência.....	52
4.13 Eletroforese em gel nativo	53
4.14 Purificação por afinidade em <i>tandem</i>	54
4.15 MudPIT	55
5. RESULTADOS	57
5.1 Caracterização de modificações pós-traducionais direcionadas aos complexos formados pelos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4	57
5.1.1 Caracterização do perfil de expressão dos membros dos complexos EIF4E4/EIF4G3 E EIF4E3/EIF4G4	58
5.1.2 Identificação das modificações pós-traducionais.....	60
5.1.3 Mapeamento dos domínios fosforilados nos EIF4E3 e EIF4E4	62
5.1.4 Predição de sítios de fosforilação para MAP/cdk quinases nos EIF4E3 e EIF4E4	65
5.2 Estudo da proteína Tb117.5:.....	67
5.2.1 Identificação de elementos conservados por meio de análises de bioinformática	67
5.2.2 Expressão e localização subcelular da proteína de fusão Tb117.5-PTP	68
5.2.3 Análise do envolvimento da proteína Tb117.5 em complexos multiproteicos através de eletroforese em gel nativo:	71
5.2.4 Identificação dos integrantes dos complexos contendo Tb117.5-PTP por Mud PIT:.....	72
5.2.5 Análise da viabilidade celular na ausência da proteína Tb117.5	73
5.3 Estudo da proteína TbG5-IP:	77
5.3.1 Caracterização preliminar por análises de bioinformática.....	77
5.3.2 Expressão e localização subcelular da proteína de fusão TbG5-IP-PTP.....	78
5.3.3 Análise do envolvimento da proteína TbG5-IP-PTP em complexos multiproteicos através de eletroforese em gel nativo:	80
5.3.4 Identificação dos integrantes dos complexos contendo TbG5-IP-PTP por MudPIT:	81
5.3.5 Análise da viabilidade celular na ausência da proteína TbG5-IP	82
6. DISCUSSÃO.....	86
6.1 O papel da fosforilação na regulação dos complexos formados pelos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4	86

6.2 Dinâmica dos novos complexos do tipo eIF4F baseados nos EIF4E5 e EIF4E6.....	91
6.3 O papel de proteínas hipotéticas com possível atividade enzimática de formação do <i>cap</i> na função dos novos complexos baseados nos EIF4E5 e EIF4E6.....	95
7. CONCLUSÕES.....	100
8. BIBLIOGRAFIA.....	101

1. Introdução

O *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*), protozoário unicelular e patógeno responsável pela doença do sono, é uma das espécies mais conhecidas de tripanossomatídeos, organismos que se destacam por possuir uma série de particularidades nos seus processos biológicos, as quais os distinguem dos demais eucariotos. Nesses organismos, há uma ausência de regulação da expressão gênica ao nível transcricional e a biossíntese de proteínas (também conhecida por tradução) parece ser uma das etapas mais sujeitas a eventos regulatórios. Além disso, análises de bioinformática identificaram um número consideravelmente grande de proteínas quinases e fosfatases no proteoma predito de *T. brucei*, o que sugere que a fosforilação de proteínas, dentre as modificações pós-traducionais, também seja um mecanismo fundamental para eventos dessa regulação.

Em eucariotos, a etapa da iniciação é a mais complexa do processo de tradução e aquela mais sujeita a mecanismos de regulação. Nessa etapa participa um número elevado de fatores de iniciação da tradução, denominados de eIFs (*eukaryotic initiation factors*). Entre os eIFs merece destaque o complexo eIF4F, que atua no reconhecimento do mRNA e facilita o recrutamento do ribossomo para iniciar a síntese de proteínas. Esse complexo heterotrimérico é formado por três subunidades: eIF4E, a proteína de ligação ao *cap*, que reconhece o mRNA na sua extremidade 5'; eIF4A, uma RNA helicase; e eIF4G, a proteína que estrutura o complexo e medeia sua interação com parceiros funcionais. Em estudos prévios, foram identificados em tripanossomatídeos seis homólogos de eIF4E (EIF4E1 a 6) e cinco de eIF4G (EIF4G1 a 5), todos conservados em diferentes espécies dessa família, sendo dois complexos do tipo eIF4F

inicialmente identificados, baseados nas interações entre os EIF4E3 e EIF4E4 com os EIF4G4 e EIF4G3, respectivamente.

Portanto, a primeira parte do presente trabalho buscou analisar o perfil de expressão das subunidades dos dois primeiros complexos do tipo eIF4F originalmente identificados em *T. brucei*, visando identificar e caracterizar mecanismos associados ao controle da sua atividade na tradução. Modificações pós-traducionais em diferentes subunidades foram caracterizadas e parecem estar associadas ao controle da função desses complexos durante diferentes fases de crescimento do *T. brucei*. A etapa subsequente envolveu a análise de homólogos de enzimas formadoras do *cap* que foram encontrados em associação com novos complexos do tipo eIF4F recentemente identificados, envolvendo os EIF4E5 e EIF4E6 e os EIF4G1, EIF4G2 e EIF4G5. A análise dos constituintes desses complexos dá indícios de que estes estão envolvidos em outros processos celulares e não na tradução. O entendimento da ação desses complexos poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas ferramentas de combate às doenças causadas por tripanossomatídeos.

2. Revisão da Literatura

2.1 O *Trypanosoma brucei* e a tripanossomíase africana

A Tripanossomíase africana humana (HAT, do inglês: *Human African Trypanosomiasis*), ou doença do sono, é causada pela infecção com o parasita protozoário *Trypanosoma brucei* (Figura 1) e é transmitida por moscas tsé-tsé do gênero *Glossina* que habitam as áreas rurais empobrecidas da África subsaariana. (Simarro *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2014). O *T. brucei* pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidae e ao gênero *Trypanosoma*. A família Trypanosomatidae inclui também outras espécies de importância médica do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, que causam as leishmanioses (*Leishmania spp*) e a doença de chagas (*Trypanosoma cruzi*) (Stuart *et al.*, 2008; Kennedy, 2008; Gadelha *et al.*, 2011).

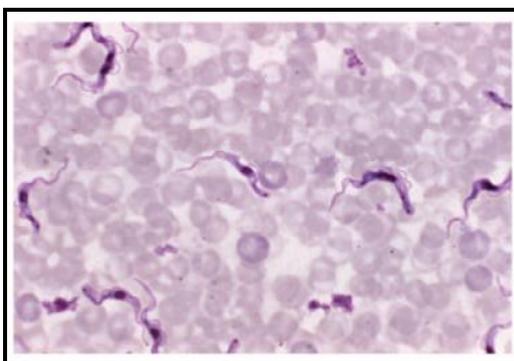


Figura 1. Fotomicrografia mostrando a presença do *Trypanosoma brucei* no sangue. Fonte: Kennedy, 2008.

A HAT é uma ameaça para pessoas de 36 países na África subsaariana. Muitas das populações afetadas vivem em áreas remotas e de acesso limitado aos serviços de saúde adequados, o que complica a vigilância e até o diagnóstico

e tratamento dos casos. Em 2009, depois de continuados esforços de controle, o número de casos reportados caiu para menos de 10.000 (9.878) (Figura 2). Essa redução no número de casos tem continuado e ~7.000 novos casos foram reportados em 2012. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas estão em áreas de risco (WHO, 2014).

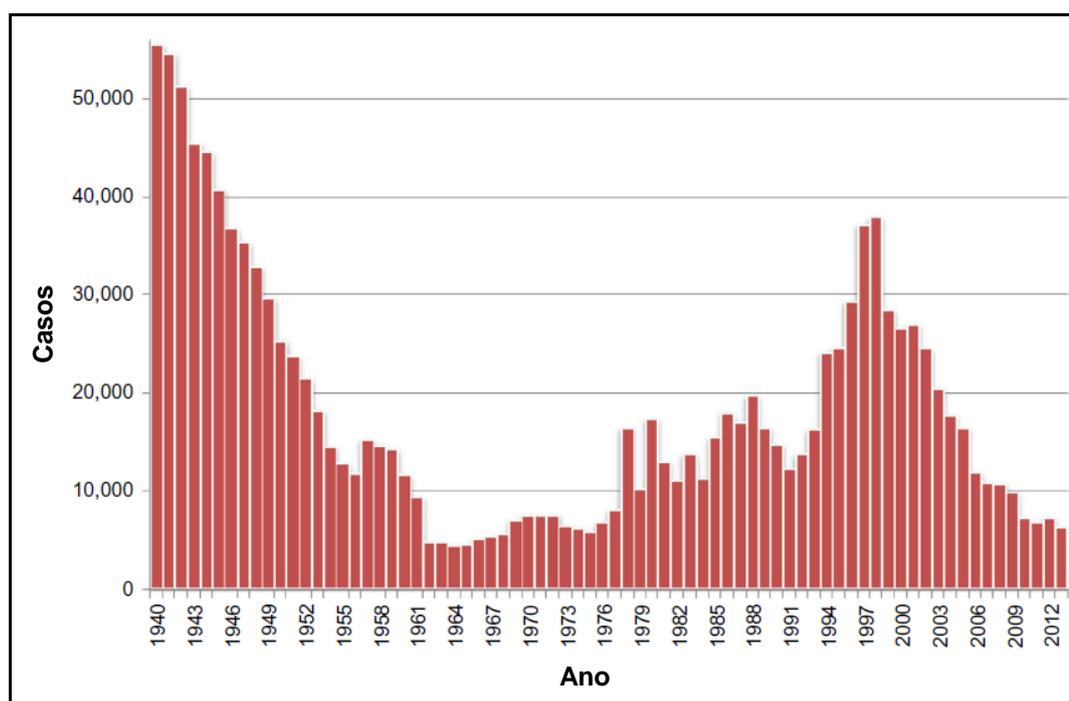


Figura 2. Número total de novos casos de HAT reportados à Organização Mundial da Saúde, 1940-2013. FONTE: adaptado de Franco et al., 2014.

Existem três subespécies do *T. brucei* denominadas de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, porém apenas as duas últimas são causadoras de doenças no homem. A maioria dos casos é causada pelo *T. b. gambiense*, o qual dá origem à doença crônica endêmica antroponótica na África Ocidental e Central. A infecção com *T. b. rhodesiense* leva à forma aguda e zoonótica da África Oriental e Austral (Simarro et al., 2013). Os parasitas vivem e se multiplicam extracelularmente no sangue e fluidos do tecido de seu hospedeiro

humano. Eles têm elaborado uma variedade de estratégias para invadir os hospedeiros, para escapar do sistema imune e para ganhar proveito dos fatores de crescimento dos hospedeiros. A HAT é uma doença desafiadora e mortal, devido à sua epidemiologia e apresentação clínica complexa e, se não tratada, pode resultar em altas taxas de mortalidade (Franco *et al.*, 2014).

A HAT faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, juntamente com as diferentes formas de leishmaniose e a doença de chagas. Essas doenças são caracterizadas pela disponibilidade limitada de ferramentas de controle seguras e com uma relação custo-benefício vantajosa. Nenhuma vacina contra essas enfermidades está disponível e a toxicidade dos medicamentos antigos impede a adoção de estratégias de controle baseadas em quimioterapia preventiva. Como resultado, o fortalecimento das intervenções contra essas doenças tem se baseado na detecção precoce dos novos casos, seguido de tratamento, controle de vetores e gestão do reservatório animal (no caso da HAT e leishmaniose). Novos métodos para diagnosticar e tratar os pacientes e controlar a transmissão são necessários para atingir a meta de eliminação global dessas doenças (Malvy e Chappuis, 2011).

Apesar da gravidade das doenças causadas pelos tripanossomatídeos, os tratamentos disponíveis para elas são geralmente inadequados e os governos e a indústria farmacêutica até recentemente têm demonstrado pouco interesse em desenvolver novas drogas para tratamento (Kennedy, 2008). Diante desse cenário, a utilização do *T. brucei* como modelo de estudo tem se revelado um recurso valioso para o combate das doenças causadas pelas diferentes espécies de tripanossomatídeos patogênicos, uma vez que boa parte de seus processos

biológicos se assemelham e o *T. brucei* possui o mais avançado repertório de ferramentas para análises de genética reversa (Kelly *et al.*, 2007).

2.2 O ciclo evolutivo do *T. brucei*

A infecção do *T. brucei* no hospedeiro mamífero é iniciada quando formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas pela picada do seu vetor, a mosca tsé-tsé, infectado. Essas formas se desenvolvem em tripomastigotas sanguíneas do tipo alongadas (*slender forms*), que se multiplicam no sangue para estabelecer a infecção. À medida que o seu número aumenta, um fator derivado do parasita promove a parada da divisão celular e a geração de formas mais curtas e espessas (*stumpy forms*). Uma vez que essas células são ingeridas pelas moscas tsé-tsé, elas se transformam em formas tripomastigotas procíclicas (Figura 3) (Fenn e Matthews, 2007).

As formas procíclicas do *T. brucei* desenvolvem-se inicialmente como tripomastigotas procíclicas, que expressam como proteínas de superfície prociclinas do tipo GPEET (Gly-Pro-Glu-Glu-Thr). Através de uma divisão assimétrica, essas células originam formas epimastigotas longas e curtas, sendo essas últimas capazes de aderir nas glândulas salivares e se transformar em formas epimastigotas proliferativas, as quais expressam na superfície o antígeno BARP (*brucei Alanine Rich Protein*). Eventualmente, células epimastigotas sofrem maturação gerando formas tripomastigotas metacíclicas, que expressam a proteína VSG (*Variant Surface Glycoprotein* – Glicoproteínas Variantes de Superfície) e estão prontas para serem transmitidas para um novo hospedeiro mamífero (Figura 3) (Fenn e Matthews, 2007; Kramer, 2012).

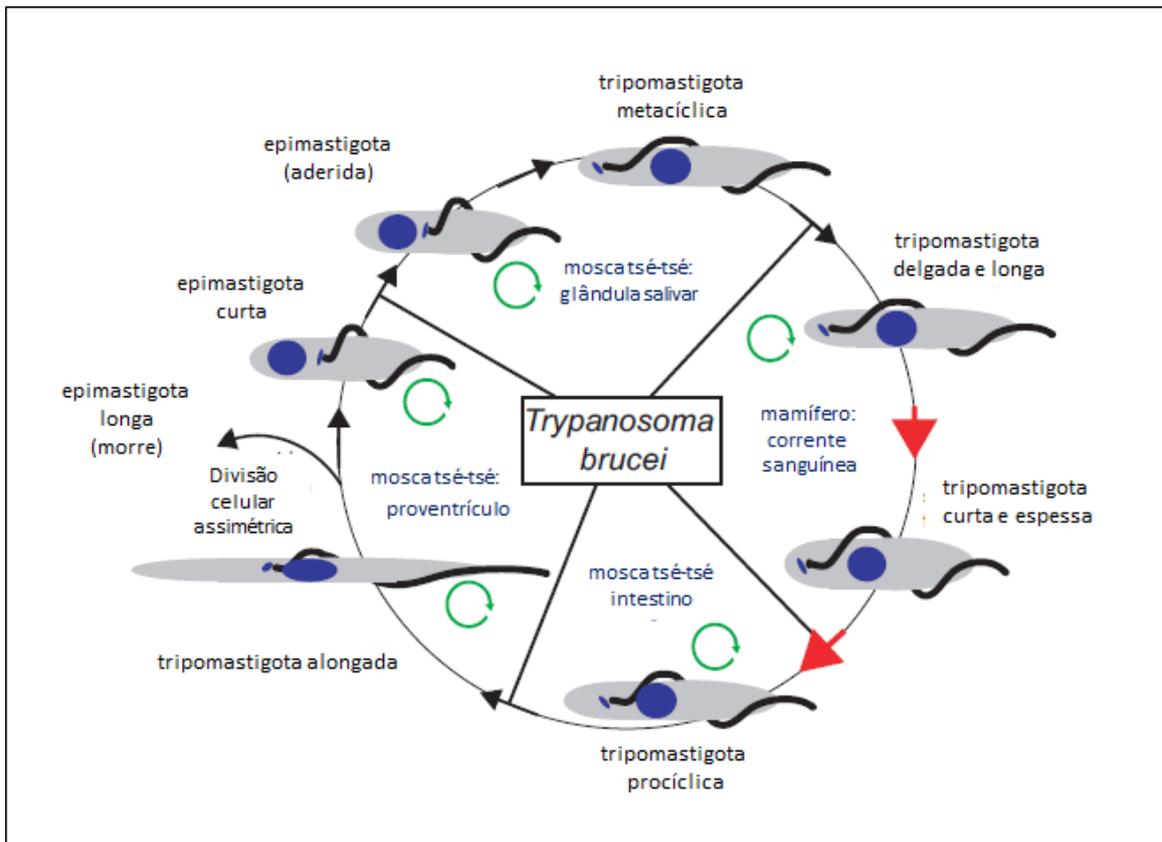


Figura 3. Diagrama esquemático do ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*. As setas circulares verdes representam as fases proliferativas e as setas vermelhas marcam os processos de diferenciação que foram melhor estudados. O parasita *T. brucei* apresenta diferentes formas celulares durante a transição entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado. No homem, as formas sanguíneas se iniciam como tripomastigotas alongadas que se dividem e diferenciam para formas menores intermediárias e infectivas do hospedeiro invertebrado. Na mosca tsé-tsé, o parasita ingerido se diferencia em formas tripomastigotas procíclicas, capazes de divisão e então, após migrar para as glândulas salivares do inseto, em epimastigotas. Posteriormente, essas se modificam em tripomastigotas metacíclicas infectivas, capazes de reiniciar o ciclo durante o próximo repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. Fonte: adaptado de Kramer, 2012.

O processo de diferenciação do *T. brucei* de formas sanguíneas em formas procíclicas também pode ser reproduzido *in vitro*, mediante a redução da temperatura e exposição dos parasitas a citrato/cis-aconitato (CCA) (Czichos *et*

al., 1986). Outros fatores também podem atuar estimulando a diferenciação, como a exposição da superfície dos parasitas a tratamento com protease (Sbicego *et al.*, 1999) e submissão dos parasitas a condições de estresse, como a redução do pH (Rolin *et al.*, 1998).

Durante a diferenciação entre suas duas principais formas proliferativas, a forma sanguínea dos mamíferos e as formas procíclica e epimastigota dos insetos, ocorre um remodelamento substancial de muitos processos celulares do *T. brucei* que é acompanhado de mudanças morfológicas (Fenn e Matthews, 2007). Esses estágios de proliferação rápida são intercalados com estágios intermediários adicionais do ciclo de vida, onde parece haver uma pausa na divisão celular para que ocorram pré-adaptações essenciais para o próximo hospedeiro (Barry *et al.*, 1998). Como exemplo, ao invadir o hospedeiro mamífero, o parasita deve responder a aumentos de temperatura, ativar os mecanismos de evasão do sistema imune e estar preparado para mudanças significativas da composição bioquímica do meio ambiente, ativando mecanismos necessários para a aquisição de nutrientes. Além disso, a arquitetura geral da célula e o posicionamento de organelas mudam durante a transição entre estágios específicos do seu ciclo de vida, o que só é possível através de alterações significativas na sua expressão gênica (Gadelha *et al.*, 2011).

Assim, durante todo o seu ciclo de vida, o *T. brucei* alterna-se de uma maneira bem regulada entre células proliferativas e células em diferenciação. Esses eventos ocorrem em resposta aos diferentes ambientes dos hospedeiros e envolvem cascatas coordenadas de vias de sinalização e um preciso controle da expressão gênica.

2.3 Características moleculares do *T. brucei* e outros tripanossomatídeos

2.3.1 Regulação da expressão gênica

A regulação da expressão gênica é um processo central que define o fenótipo de uma célula ou organismo. Na grande maioria dos eucariotos esse processo é controlado através de regulação da transcrição, no qual sequências do DNA, geralmente promotores, juntamente com proteínas de ligação ao DNA direcionam a transcrição de genes codificadores de proteínas pela RNA polimerase (RNA pol) II (De Gaudenzi *et al.*, 2011; Clayton, 2014).

A peculiaridade mais marcante na regulação da expressão gênica dos tripanossomatídeos é a escassez de promotores clássicos para RNA pol II, o que determina que a regulação da sua expressão gênica não ocorra no nível da iniciação da transcrição, diferentemente da maioria dos demais eucariotos. Os únicos genes codificantes de proteínas reconhecidamente regulados ao nível transcricional são aqueles que codificam as proteínas de superfície, prociclinas e VSGs, de *T. brucei*. Esses genes, contudo, são transcritos pela RNA Pol I, que é usada exclusivamente para a transcrição de DNA ribossomal em outros organismos (De Gaudenzi *et al.*, 2011; Clayton, 2014).

Até o presente momento, o único promotor para Pol II que foi caracterizado em tripanossomatídeos é aquele que conduz a expressão do RNA *spliced leader* (RNA SL), descrito mais adiante (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). Todas as evidências indicam que a transcrição de todos os genes codificadores de proteínas feita pela RNA polimerase II ocorre em taxas similares. No entanto, grandes diferenças são encontradas na abundância de mRNAs associados a diferentes genes ou para o mesmo gene em diferentes condições. Essas

diferenças são devidas aos mecanismos de controle pós-transcricionais que desempenham um papel crucial nos tripanossomatídeos (Kramer e Carrington, 2011). Exemplos desse tipo de controle nos tripanossomatídeos já foram observados controlando a estabilidade e/ou degradação de mRNAs específicos. Sequências na região não traduzida 3' (3'-UTR) dos mRNAs também desempenham um papel-chave na expressão do gene (Clayton, 2014). Múltiplas evidências, entretanto, apontam que a síntese proteica é um componente importante na regulação da sua expressão gênica. Da mesma forma o controle da atividade de proteínas, via modificações pós-traducionais, também parece exercer um papel relevante nessa regulação destes organismos (Clayton e Shapira, 2007).

2.3.2 Organização do genoma, transcrição e *trans-splicing*

O *T. brucei* possui um genoma de 26 Mb organizado em 11 cromossomos grandes. Do ponto de vista de sua organização, os genes do *T. brucei* encontram-se posicionados nos cromossomos em grandes blocos de regiões codificadoras arranjados em sequência (em *tandem*), isto é, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas dispostos consecutivamente na mesma fita de DNA. A publicação dos genomas completos de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi*, demonstrou que a maioria dos genes em todos os cromossomos de tripanosomatídeos está organizada nesses grandes blocos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Apesar do fato de que os principais grupos de tripanosomatídeos divergiram há mais de 200 milhões de anos, a forte conservação da ordem dos genes codificadores de proteínas (sintenia) observada nos genomas das espécies

sequenciadas é notável (Figura 4) (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010). A grande maioria desses genes não possui íntrons e, na verdade, o processamento convencional de mRNAs (*cis-splicing*) apenas foi demonstrado para o gene que codifica a poli-A polimerase. Os tripanosomatídeos são diplóides, apesar de algumas espécies apresentarem cromossomos aneuplóides. Além disso, as extremidades dos cromossomos em tripanosomatídeos contêm a repetição GGGTTA telomérica, enquanto que as regiões subteloméricas são compostas por elementos repetitivos variáveis, que são responsáveis pela maior parte dos tamanhos dos polimorfismos observados entre cromossomos homólogos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010).

Devido à escassez de promotores para a RNA pol II, os blocos de genes codificadores de proteínas dos tripanosomatídeos são transcritos de forma policistrônica por essa polimerase (Kramer e Carrington, 2011). A transcrição pela Pol II inicia-se em regiões de troca de fitas (SSR, do inglês *Strand Switch Region*), onde as fitas de DNA onde estão codificados os genes se alternam, e prossegue bidirecionalmente e em sentidos opostos para os telômeros (Figura 4). Essas regiões são ricas em guanina ou citosina, mas não contêm as características canônicas dos promotores típicos (Martínez-Calvillo *et al.*, 2010; Daniels *et al.*, 2010).

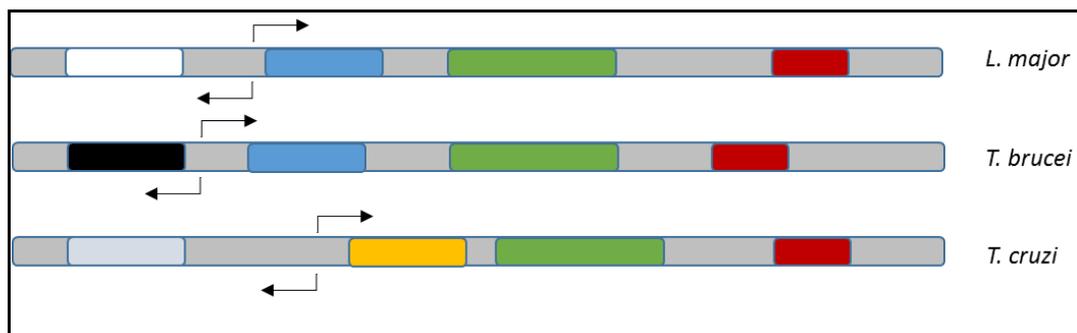


Figura 4: Regiões SSR e áreas de iniciação da transcrição. A partir das regiões de troca de fitas (SSR, as setas pretas indicam o início e a direção da transcrição), a RNA Pol II transcreve dezenas de genes em policístrons. O esquema ressalta também a sintonia apresentada pelos tripanossomatídeos (genes ortólogos são representados com a mesma cor). Fonte: Figura reproduzida com permissão de Lima, 2014.

Diferentemente dos operons bacterianos, a maioria dos genes em uma unidade policitrônica nos kinetoplastídeos não é funcionalmente relacionada. Esses policístrons formam mRNAs monocitrônicos maduros através de um mecanismo de processamento em *trans*, o *trans-splicing*, que é um processo similar ao *cis-splicing*, mas que ocorre entre dois RNAs precursores transcritos a partir de diferentes locais do genoma (De Gaudenzi *et al.*, 2011; Preußner *et al.*, 2012).

O *trans-splicing* atua nos tripanossomatídeos separando as regiões codificantes do RNA policitrônico através da adição de um mini-éxon conservado de 39 nucleotídeos, chamado de RNA *spliced leader* (RNA SL), à extremidade 5' de cada sequência codificante. Concomitantemente e de forma acoplada, ocorre o processo de poliadenilação nas extremidades 3', possibilitando a formação de mRNAs passíveis de serem traduzidos (Figura 5). O RNA SL ainda confere um *cap* (7-metil guanosina invertida) ao mRNA resultante que, no caso dos

tripanosomatídeos, é hiper metilado e denominado de *cap4* (Preußner et al, 2012; Zinoviev e Shapira, 2012).

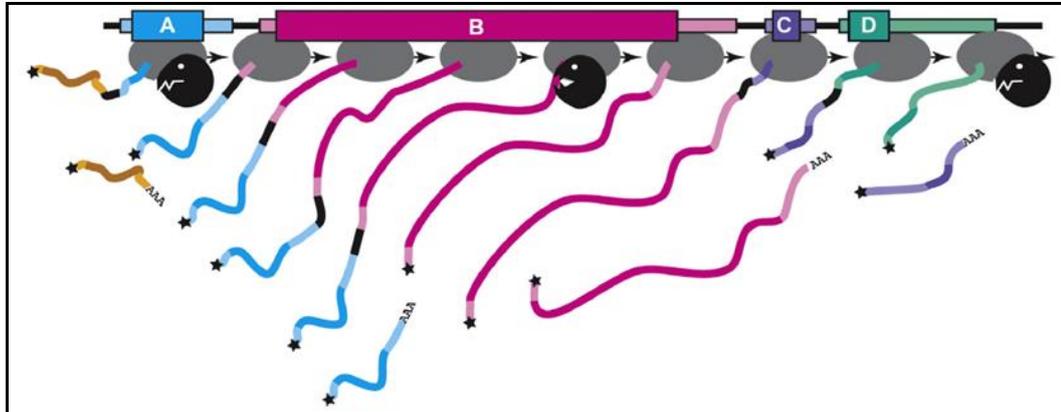


Figura 5. Esquema representativo do processamento de mRNA em tripanosomatídeos. Os genes (A, B, C e D) são transcritos em unidades policistrônicas e a maturação destes transcritos é realizada através do *trans-splicing*, no qual é adicionada uma sequência líder (SL) contendo o *cap* na extremidade 5' (estrela preta) e uma cauda poli A na extremidade 3' do mRNA imediatamente anterior. Fonte: Clayton, 2014.

2.3.3 Compartimentalização e degradação de mRNAs

Para a maioria dos mRNAs de tripanosomatídeos, como em outros eucariotos, o primeiro passo para sua degradação é a remoção da cauda poli (A). Esses organismos contêm três tipos diferentes de complexo de deadenilação: PAN2/PAN3 (Schwede *et al.*, 2009); três proteínas relacionadas com a poli-(A) ribonuclease (PARN) (Utter *et al.*, 2011); e um complexo CAF1/NOT, que é o responsável pela maior parte da sua deadenilação (Erben *et al.*, 2014; Clayton, 2014). Uma vez que o comprimento da cauda poli (A) seja reduzido para menos de 20 nucleotídeos, a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP), responsável pelo reconhecimento da cauda poli-A dos mRNAs eucarióticos, já não pode se ligar a extremidade 3' dos mRNAs. Dessa forma, a interação entre as

extremidades 3' e 5' dos mRNAs, através do complexo de iniciação da tradução (descrito em detalhes mais a seguir), é conseqüentemente perdida. Nessa situação, o *cap* dos mRNAs é então removido e as moléculas afetadas são destinadas à degradação 5'-3' através da exoribonuclease citosólica XRNA (Clayton, 2014). Além da degradação 5'-3', o mRNA deadenilado é sujeito a degradação 3'-5' através de um complexo denominado exossomo (Estévez *et al.*, 2001; Estévez *et al.*, 2003). Outra via alternativa de degradação prossegue sem deadenilação: trata-se do decapeamento direto seguido por degradação 5'-3' através da exoribonuclease citosólica XRNA (Li *et al.*, 2006). Essa via é importante na destruição rápida de mRNAs (Clayton, 2014).

Outra possibilidade de regulação do metabolismo dos mRNAs de eucariotos é a sua compartimentalização temporária em grânulos enquanto há um estímulo estressante para o organismo. Nessa situação, os mRNAs podem ser retirados das maquinarias de tradução e degradação e só enviados de volta quando o fator estressante for removido. A existência desses grânulos em tripanossomatídeos também já foi comprovada, embora seu papel nesse sentido não tenha ficado ainda muito claro (Kramer *et al.*, 2008; Clayton, 2014).

2.3.4 Formação do *cap*4

Em todas as células eucarióticas analisadas até agora, a adição do *cap* (m^7G ou *cap* 0) representa o primeiro evento na modificação da extremidade 5' dos transcritos da RNA pol II (Ghosh e Lima, 2010). O capeamento ocorre co-transcricionalmente quando o RNA atinge um comprimento de cerca de 30 nucleotídeos (Mair *et al.*, 2000). A formação do *cap* 0 (m^7GpppN) compreende

três reações enzimáticas (Figura 6): primeiramente, a extremidade 5' trifosfato do RNA recém sintetizado é hidrolisada pela RNA trifosfatase dando origem a uma extremidade 5' difosfato, a qual, então, recebe o GMP por uma RNA guanililtransferase. Finalmente, a guanosina do *cap* (GpppN) é metilada por uma RNA (guanina-N7) metiltransferase (Ghosh e Lima, 2010; Sturm *et al.*, 2012). Cada uma das atividades de formação do *cap* é essencial em levedura (Shibagaki *et al.*, 1992; Mao *et al.*, 1995; Tsukamoto *et al.*, 1997).

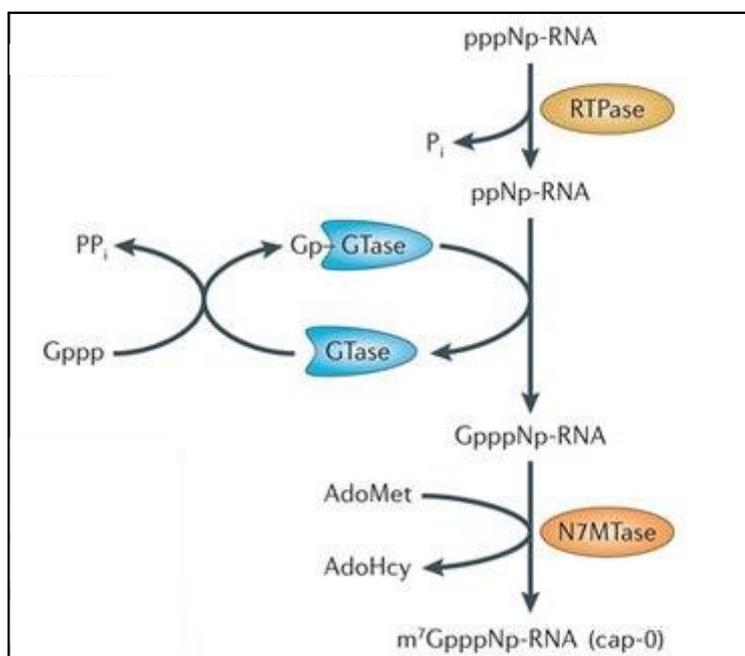


Figura 6. Via convencional de capeamento do RNA. As etapas na reação de capeamento do mRNA compreendem a remoção de fosfato da extremidade 5' do RNA nascente, seguida pela adição de um resíduo de GMP e, por último, a metilação da guanosina. pppNp-RNA= extremidade 5' do transcrito nascente; RTPase= RNA trifosfatase; GTase= RNA guanililtransferase; N7MTase= N7-metiltransferase; AdoMet= S-adenosil metionina; e AdoHcy= homocisteína S-adenosil. **FONTE:** adaptado de Decroly *et al.*, 2012.

Apesar dos eucariotos dependerem das mesmas três reações enzimáticas para a formação do *cap* do mRNA, a organização física das enzimas

responsáveis é bastante diversificada em diferentes organismos (Shuman, 2001; Shuman, 2002; Shuman e Lima, 2004). Um sistema enzimático consistindo de dois componentes, um polipeptídeo bifuncional com atividades de trifosfatase/guanililtransferase e um polipeptídeo separado para metiltransferase, está presente em plantas e metazoários. Em contraste, em fungos, no microsporídeo *Encephalitozoon cuniculi*, e nos protozoários *Plasmodium falciparum* (Ho e Shuman, 2001a) e *Giardia lamblia* (Hausmann *et al.*, 2005), é encontrado um sistema de três componentes, com polipeptídeos separados para trifosfatase, guanililtransferase e metiltransferase (Ghosh e Lima, 2010).

Análises de cristalografia e extensas análises mutacionais revelaram que as RNA guanililtransferases estão relacionadas à ligases de DNA e RNA (Shuman, 2001; Shuman, 2002; Shuman e Lima, 2004), e são estrutural e mecanicamente conservadas entre todas as espécies eucarióticas, encontradas ainda em muitos vírus. As guanililtransferases catalisam a transferência de nucleotídeos através de uma ligação covalente intermediária de enzima-(lisil-N)-GMP e são definidas por um conjunto de seis motivos de assinatura conservados (Håkansson *et al.*, 1997). Por outro lado, as RNA trifosfatases dividem-se em duas famílias estrutural e mecanicamente distintas. Trifosfatases de fungos, microsporidia, protozoários (incluindo o *T. brucei*) e vírus *Chlorella* pertencem à família das NTP fosfohidrolases dependentes de metais, definidas por um distinto sítio ativo com arquitetura de túnel (Lima *et al.*, 1999; Gong e Shuman, 2002). Já as trifosfatases de metazoários e plantas são parte da superfamília de cisteína fosfatases (Takagi *et al.*, 1997; Changela *et al.*, 2001). A estrutura de cristal da (guanina-N7) metiltransferase de *E. cuniculi* destacou a especificidade bioquímica

conhecida da enzima (Fabrega *et al.*, 2004) e completou o catálogo de estruturas proteicas das três enzimas necessárias para a formação do *cap* m7GpppN.

Nos tripanosomatídeos, incluindo o *T. brucei*, a molécula do *cap* é sintetizada na extremidade 5' do RNA SL precursor, quando da sua transcrição pela RNA Pol II mediada por seu promotor específico. A sua adição propriamente ao mRNA ocorre de forma pós-transcricional, pelo processo de *trans-splicing*, que implica na transferência dos primeiros 39 nt do RNA SL, incluindo a estrutura do *cap* já montada, para a extremidade 5' de todos os mRNAs (Murphy *et al.*, 1986; Sutton e Boothroyd, 1986; Laird *et al.*, 1987). O *cap* do SL RNA dos tripanosomatídeos é único e contém a estrutura hiper modificada denominada de *cap* 4 (Figura 7). Essa é derivada da metilação de sete sítios dentro dos primeiros quatro nucleotídeos do RNA SL, composta de 2'-O-metilações na ribose dos primeiros quatro nucleotídeos (AACU), com metilações adicionais sobre as bases do primeiro (m^{6,6}A) e do quarto (m³U) nucleotídeos, resultando na estrutura: m7guanosina-ppp-N6,N6,2'-O-trimetiladenosina-p-2'-O-metiladenosina-p-2'-O-metilcitosina-p-N3,2'-O-metiluridina (Bangs *et al.*, 1992).

Em tripanosomatídeos, as proteínas que adicionam o *cap* 0 co-transcricionalmente ao RNA SL precursor foram identificadas como TbCet1, uma trifosfatase, e a enzima bifuncional TbCgm1, com atividade de guanililtransferase e metiltransferase (Takagi *et al.*, 1997; Changela *et al.*, 2001; Fabrega *et al.*, 2004). Com relação as metilações subsequentes que caracterizam o *cap* 4, a 2'-O-metiltransferase TbMtr1 metila a ribose do primeiro nucleotídeo transcrito (Zamudio *et al.*, 2007), enquanto a TbMtr2 é responsável pela metilação do segundo nucleotídeo e a TbMtr3 tem sido implicada na metilação das riboses dos nucleotídeo nas posições 3 e 4 (Arhin *et al.*, 2006a; Hall e Ho, 2006; Arhin *et al.*,

2006b; Zamudio *et al.*, 2006; Zinoviev e Shapira, 2012). Cada uma dessas metiltransferases compartilha similaridade de sequência com a VP39 de vaccinia e presume-se que atuem de uma maneira análoga. Em adição as quatro metilações de 2'-O-ribose no *cap*, o SL recebe três metilações adicionais, duas na base do primeiro nucleotídeo ($m^{6,6}A$), e uma na base do quarto nucleotídeo, que é única para kinetoplastídeos (m^3U). A identidade das metiltransferases que realizam estas modificações, todavia, é desconhecida (Sturm *et al.*, 2012). Acredita-se que as metilações subsequentes nas riboses dos nucleotídeos adjacentes ao *cap* 0, que formam o *cap* 1, *cap* 2, e *cap* 4, podem aumentar os níveis de tradução (Zamudio *et al.*, 2009).

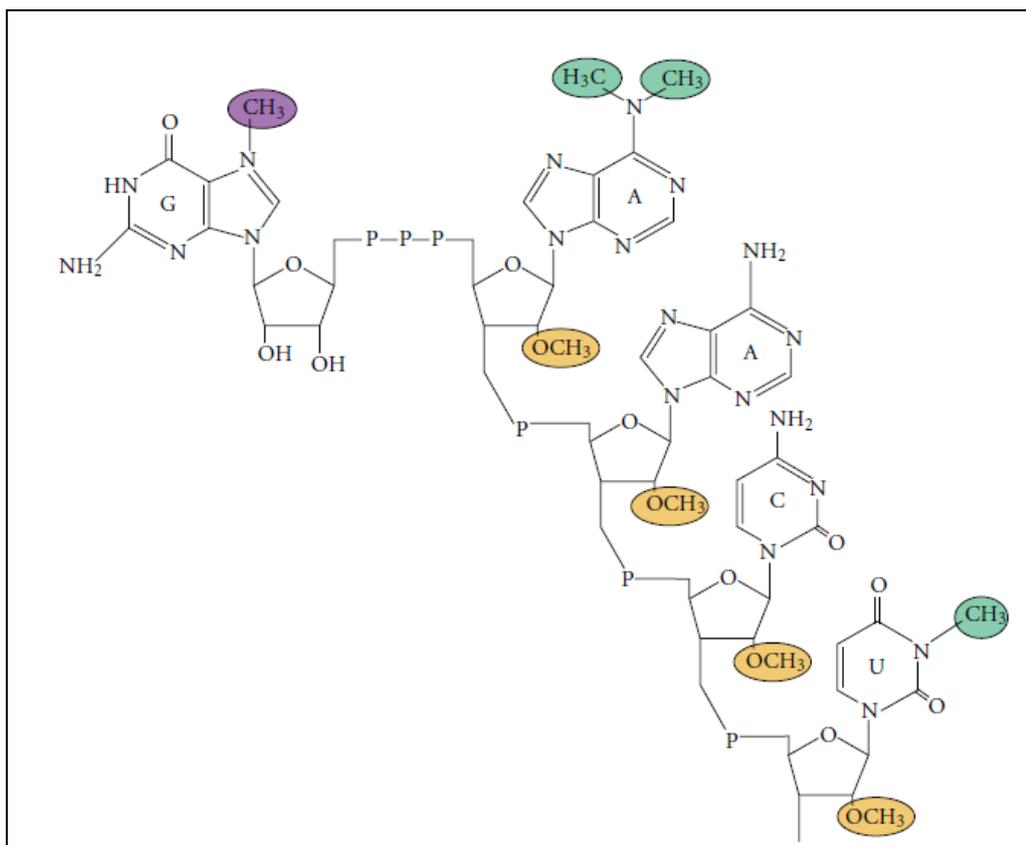


Figura 7. Estrutura do *cap* 4 de tripanossomatídeos. Na figura, observam-se todas as metilações que ocorrem na formação do *cap* 4. As metilações em amarelo, são as quatro metilações do carbono 2' das riboses que ocorrem nos primeiros 4 nucleotídeos (AACU) do SL-

RNA dos tripanossomatídeos. Além destas metilações, os tripanossomatídeos possuem mais dois nucleotídeos que possuem metilações diretamente nas bases nitrogenadas (o primeiro e o quarto), ressaltadas em verde. A metilação do *cap* propriamente dito, o m⁷GTP, adicionado ao primeiro nucleotídeo através de uma ponte trifosfato, está indicada em roxo, e é realizada por meio da enzima guanina N-7 metiltransferase. Fonte: Modificado de Zinoviev e Shapira, 2012.

2.3.5 Fosforilação de proteínas em tripanossomatídeos

As modificações pós-traducionais, como a fosforilação, representam o mecanismo mais comum pelo qual as funções das proteínas podem ser alteradas. A fosforilação ocorre predominantemente em resíduos de serina, treonina e tirosina, e tem sido demonstrada como um mecanismo chave para regular uma variedade de processos celulares, tais como o ciclo celular e diferenciação, motilidade e desenvolvimento (Tarrant e Cole, 2009). Aproximadamente um terço de todas as proteínas eucarióticas é modificado por fosforilação durante seu tempo de atividade na célula, de forma que os eventos de fosforilação controlam um enorme número de funções celulares (Roach, 1991; Cohen, 2000; Holmberg *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005). Não é de se surpreender, então, que eventos de fosforilação anormais sejam observados em muitas doenças humanas, incluindo câncer, diabetes, hipertensão, ataques cardíacos e artrite reumatóide (Cohen, 2001). Conseqüentemente, proteínas quinases e fosfatases tornaram-se alvos fortes na descoberta de drogas nos últimos anos. Vários inibidores de quinases têm sido identificados exibindo seletividade e, no caso de patógenos, atividade antiparasitária, podendo representar candidatos promissores para drogas antiparasitárias (Kutuzov e Andreeva, 2008).

A capacidade dos tripanossomatídeos de perceber e adaptar-se às mudanças no seu ambiente hospedeiro é essencial para a sua virulência e

sobrevivência, e há evidências crescentes de que a modificação de proteínas por fosforilação desempenha um papel importante no controle de sua diferenciação (Szöör, 2010; Tonelli *et al.*, 2011) e no seu ciclo celular (Hammarton *et al.*, 2007). Muitos dos importantes participantes desse processo já foram identificados: análises de bioinformática do genoma revelaram inúmeras quinases e fosfatases no parasita (Parsons *et al.*, 2005; Szöör, 2010), enquanto que análises de fosfoproteoma catalogaram a fosforilação de centenas de proteínas (Morales *et al.*, 2008; Rosenzweig *et al.*, 2008; Nett *et al.*, 2009b; Morales *et al.*, 2010; Hem *et al.*, 2010; Marchini *et al.*, 2011; Urbaniak *et al.*, 2013). Além disso, a ferramenta de deleção genética permitiu identificar muitas proteínas quinases como alvos potenciais de drogas (Naula *et al.*, 2005; Alsford *et al.*, 2011; Mackey *et al.*, 2011), e há esforços em curso para desenvolver inibidores de quinases como agentes terapêuticos (Urbaniak *et al.*, 2012). Apesar desses avanços, a elucidação das vias de sinalização desses parasitas continua a ser um grande desafio.

A tendência geral da distribuição de fosforilação entre resíduos de serina, treonina e tirosina nos fosfoproteomas de *Leishmania* (Morales *et al.*, 2008; Rosenzweig *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010; Hem *et al.*, 2010), *T. brucei* (Nett *et al.*, 2009a; Nett *et al.*, 2009b; Urbaniak *et al.*, 2013) e *T. cruzi* (Nakayasu *et al.*, 2009; Marchini *et al.*, 2011) espelha o que é encontrado em eucariotos superiores. Um pequeno, mas significativo, número de resíduos de tirosina fosforilados foi identificado em todas as três espécies, apesar da ausência de identificação de quinases dedicadas a tirosina. No entanto, continua a haver, pelo menos, outra possibilidade formulada de que um ou mais novos sítios específicos para quinases de tirosina nos tripanossomas existam e que não podem ser identificados por simples semelhança de sequências (Urbaniak, 2014).

A comparação direta dos fosfoproteomas das três espécies de tripanossomatídeos estudadas é complicada devido às diferenças no processamento de amostras, aquisição e análise de dados dos estudos, entre outros. Apesar dos enormes avanços, a cobertura atual dos fosfoproteomas está longe de ser completa, e tem se direcionado às proteínas mais abundantes. Como muitas moléculas de sinalização ocorrem em baixa abundância, tanto um maior aprofundamento da cobertura quanto a quantificação da dinâmica do fosfoproteoma são necessários para fazer avançar o presente entendimento da biologia do tripanossoma. Apesar destas limitações, os atuais estudos demonstraram claramente que a fosforilação de proteínas é um evento difundido e que a fosforilação ocorre diferencialmente entre as fases do ciclo de vida de *T. brucei* (Urbaniak, 2014).

2.4 Biossíntese proteica em eucariotos

Nos eucariotos, de uma forma geral, a expressão gênica é regulada em múltiplos estágios, incluindo durante o processo da tradução de mRNAs em proteínas. Comparado com a regulação transcricional, o controle traducional de RNAs existentes permite mudanças mais rápidas na concentração de proteínas específicas, facilitando a manutenção da homeostase celular (Sonenberg e Hinnebusch, 2009; Jung *et al.*, 2014). Em tripanossomatídeos, com a ausência de mecanismos regulando sua transcrição, o controle desse processo parece ter ainda mais destaque.

O processo de tradução pode ser dividido de uma forma geral em iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos (Acker e Lorsch, 2008; Sonenberg e Hinnebusch, 2009). Dentre estes, o alvo principal de regulação é a

etapa da iniciação, o que permite um controle rápido, reversível e espacial da síntese de proteínas (Jackson *et al.*, 2010; Hershey *et al.*, 2012). A iniciação da tradução é um processo biológico multifacetado, altamente regulado, o qual requer, no mínimo, nove fatores denominados eIFs (eIFs - *eukaryotic initiation factors*) e que são formados por aproximadamente 30 subunidades polipeptídicas individuais. Esse processo pode ser separado em três estágios distintos: 1) ligação de fatores de iniciação do complexo eIF4F ao mRNA transcrito; 2) ligação do complexo ribossomal 43S (que inclui a subunidade menor ribossomal 40S, o complexo ternário eIF2-GTP-tRNA-Metⁱ e os eIF3, eIF1, eIF1A e eIF5) ao mRNA, formando o complexo de iniciação 48S; 3) ligação da subunidade maior ribossomal 60S à subunidade 40S do ribossomo, uma vez que esta última esteja devidamente alinhada no códon de iniciação da tradução (Hinnebusch e Lorsch, 2012; Aitken e Lorsch, 2012).

Para a maioria dos mRNAs, a ligação do complexo ribossomal 43S ocorre na sua extremidade 5', através do reconhecimento do *cap*. Nesse momento, o complexo de pré-iniciação 43S é direcionado a se ligar na extremidade 5' através da ajuda do complexo de iniciação eIF4F (Pestova *et al.*, 2007; Sonenberg e Hinnebusch, 2009). Após se ligar na extremidade 5' do mRNA, a subunidade 40S começa a rastrear a região 5' não traduzida (5'-UTR) em direção à extremidade 3', até que o códon de iniciação apropriado seja alcançado (Gingras *et al.*, 1999; Hinnebusch, 2014). Identificado o codon de iniciação da tradução, os fatores eIF5 e eIF5B usam a energia da hidrólise de duas moléculas de GTP para ajudar a desligar os eIFs e a posicionar a subunidade 60S, formando o ribossomo 80S competente para a etapa seguinte (Figura 8) (Hinnebusch e Lorsch, 2012; Aitken e Lorsch, 2012).

A etapa de alongamento da tradução que se segue é caracterizada pela adição de aminoácidos no peptídeo crescente e pela translocação dos ribossomos ao longo do mRNA. Finalmente, a terminação da tradução é associada com a liberação do peptídeo sintetizado e pela dissociação das subunidades 60S e 40S do ribossomo que são recicladas para novo ciclo de tradução (Hershey *et al.*, 2012).

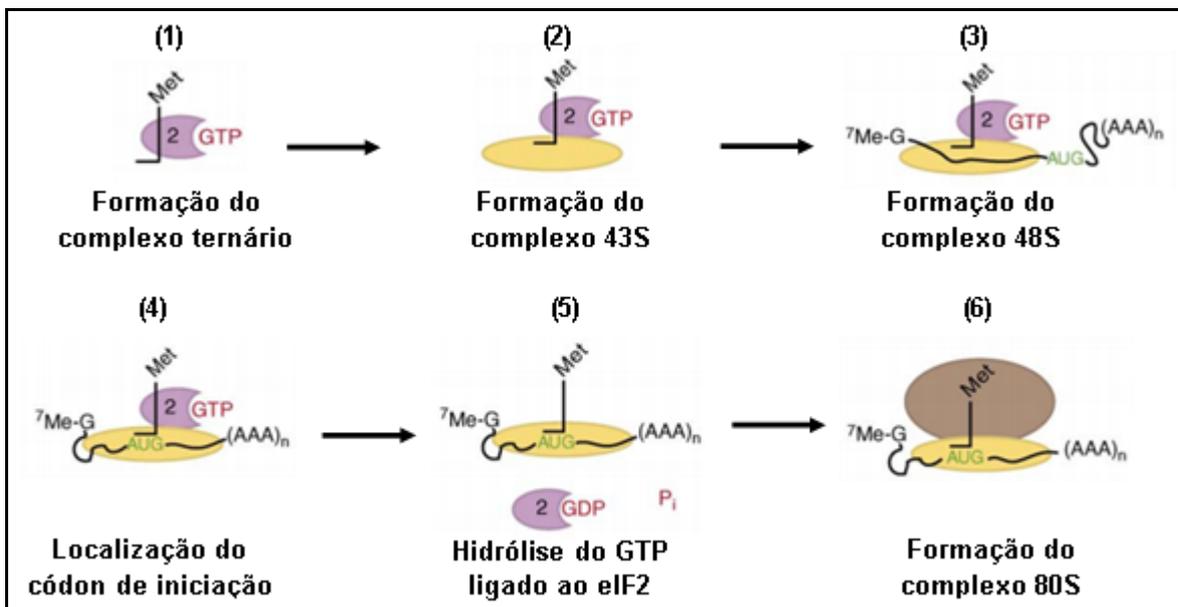


Figura 8. Esquema simplificado da iniciação da tradução em eucariotos. (1) Formação do complexo ternário entre o eIF2, GTP e o Met-tRNA_i; (2) Formação do complexo 43S através da ligação da subunidade 40S do ribossomo ao complexo ternário; (3) Ancoramento do complexo 43S ao mRNA, formando o complexo 48S; (4) Identificação do códon inicial e pareamento do Met-tRNA_i; (5) Hidrólise do GTP ligado ao eIF2 com consequente dissociação dos demais fatores (não representados na figura); (6) Ligação da subunidade 60S do ribossomo com formação do complexo 80S. Fonte: adaptado de Algire e Lorsch, 2006.

2.4.1 Complexo eIF4F e PABP

Como foi visto, os fatores de iniciação do complexo eIF4F, auxiliados por outros fatores da tradução, permitem o reconhecimento do mRNA pela subunidade ribossomal 40S e o início do processo da tradução (Hinnebusch, 2014). O eIF4F é composto por três polipeptídeos (Figura 9): (1) eIF4A, uma RNA helicase ATP-dependente que remove as estruturas secundárias ao longo da região 5' não traduzida (5'UTR) do mRNA, permitindo o recrutamento da subunidade ribossomal 40S e seu deslocamento até o códon de iniciação da tradução; (2) eIF4E, responsável pelo reconhecimento específico do *cap* na extremidade 5' do mRNA e (3) eIF4G, proteína moduladora que possui sítios de ligação para o eIF4E, eIF4A, PABP e eIF3. Desta forma, o eIF4F interage tanto com o *cap* (através do eIF4E) quanto com o eIF3 associado a subunidade 40S ribossomal (através do eIF4G), o que permite a ligação entre o mRNA e o ribossomo (Hinnebusch e Lorsch, 2012; Aitken e Lorsch, 2012).

A PABP, responsável pelo reconhecimento da cauda poli-A na extremidade 3' dos mRNAs, apesar de não ser considerada um fator de iniciação da tradução clássico, tem um papel de destaque nesse processo, através da sua ligação ao mRNA e sua interação com o eIF4G, promovendo a circularização do mRNA, evento que parece potencializar o processo de tradução (Jackson *et al.*, 2010).

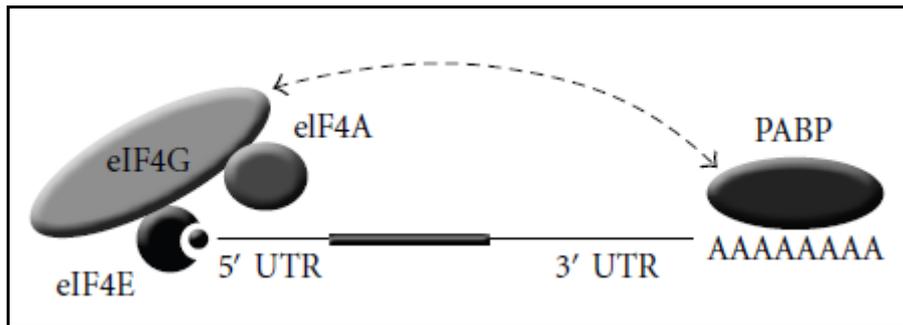


Figura 9. Ilustração do complexo EIF4F típico dos eucariotos superiores. O complexo eIF4F é composto pela junção dos fatores eIF4E, eIF4A e eIF4G e é essencial para a tradução *cap* dependente. Fonte: Zinoviev e Shapira, 2012.

2.4.2 eIF4A

O fator eIF4A pertence à grande família DEAD-box de RNA helicases, cujos membros estão envolvidos em muitos aspectos do metabolismo do RNA, em virtude da capacidade de ligação ao RNA e da sua atividade de ATPase (Lu *et al.*, 2014). A função do membro arquétipo da família eIF4A, eIF4A1, foi caracterizada pela primeira vez através da sua exigência na tradução (Grifo *et al.*, 1982) e depois foi identificado como sendo um componente do complexo de iniciação da tradução eIF4F (Conroy *et al.*, 1990). Subsequentemente, mostrou-se ser a proteína responsável pela atividade de RNA helicase do complexo eIF4F (Rogers *et al.*, 1999). Assim, o eIF4A atua desfazendo estruturas secundárias na região 5'UTR do mRNA como parte do complexo eIF4F, durante a etapa de ligação do complexo de pré-iniciação 43S ao mRNA e durante o rastreamento na busca pelo códon AUG de iniciação da tradução (Cordin *et al.*, 2006).

Três parálogos do eIF4A existem nos mamíferos, denominadas de eIF4A1, eIF4A2 e eIF4A3. Todas as três proteínas partilham um elevado grau de similaridade na sua sequência de aminoácidos (Nielsen e Trachsel, 1988; Weinstein *et al.*, 1997). As proteínas eIF4A1 e eIF4A2 são citoplasmáticas e

altamente semelhantes, mostrando cerca de 90% de identidade, ao passo que o eIF4AIII é uma proteína nuclear um pouco mais divergente (Nielsen e Trachsel, 1988; Li *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2004). Apesar de partilhar 60% de similaridade, o eIF4AIII é funcionalmente distinto dos eIF4AI e eIF4AII (Li *et al.*, 1999). Foi demonstrado que o eIF4AIII interage fracamente com eIF4G, comparado com seus parálogos, e que falha em complementar a função de helicase do eIF4AI *in vitro* (Li *et al.*, 1999). Por outro lado, eIF4AI e eIF4AII podem ser intercambiados livremente dentro do complexo eIF4F *in vitro* (Yoder-Hill *et al.*, 1993).

2.4.3 eIF4E

O fator eIF4E é encontrado virtualmente em todos os eucariotos, sendo parte de uma família de proteínas capazes de se ligar ao *cap* na extremidade 5' dos mRNAs. Possuindo 25 kDa, ele apresenta a característica incomum de ter um alto conteúdo de triptofanos, alguns dos quais estão envolvidos com a ligação ao *cap* e ao eIF4G (Rhoads, 2009). Em murinos, este fator apresenta a forma de mão em concha, sendo a parte côncava responsável pelo reconhecimento e ligação ao *cap* e a parte convexa a que interage com o eIF4G. O reconhecimento específico do *cap* acontece através de interações entre a guanosina metilada e os anéis aromáticos de dois triptofanos conservados (W56 e W102). Já na face convexa do eIF4E, liga-se a maioria dos seus parceiros funcionais, como o eIF4G, e essa ligação envolve outro triptofano conservado, o W73 (Figura 10) (Goodfellow e Roberts, 2008; Marcotrigiano *et al.*, 1997;).

Além de atuar no processo de iniciação da tradução, o eIF4E também atua no controle da estabilidade e no processo de exportação nuclear de alguns

mRNAs. Este fator também foi implicado na formação da memória em roedores, podendo estar ligado a alterações na força das conexões sinápticas entre os neurônios (plasticidade sináptica). Também é interessante ressaltar novas descobertas no estudo da síntese proteica no envelhecimento especificamente mediada pelo eIF4E. O *knockdown* específico da principal isoforma do eIF4E em *Caenorhabditis elegans* resultou num aumento da expectativa de vida do organismo (Goodfellow e Roberts, 2008).

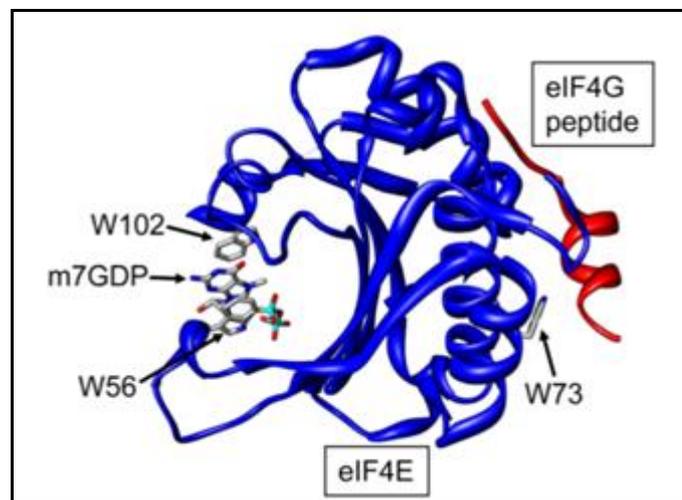


Figura 10. Modelo tridimensional do eIF4E murino. A estrutura do eIF4E lembra uma mão em forma de concha, cuja parte côncava abarca os triptofanos 56 e 102, responsáveis pela ligação ao *cap* de 7-metil-guanosina; e na parte convexa está presente o triptofano 73, sítio de ligação ao eIF4G. Fonte: adaptado de Goodfellow e Roberts, 2008.

A maioria dos eucariotos expressa múltiplos membros da família eIF4E. O número de cópias do fator eIF4E varia entre os organismos, incluindo os protistas (Joshi *et al.*, 2005; Jagus *et al.*, 2012). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui um único homólogo de eIF4E (Clarkson *et al.*, 2010); os seres humanos apresentam quatro homólogos do eIF4E (Joshi *et al.*, 2004); o nematóide *C.*

elegans, em contraste, possui cinco eIF4Es (Keiper, 2000), que exibem preferências distintas para o *cap* (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998). As variantes do eIF4E podem mostrar regulação ao longo do desenvolvimento, como é o caso da *Drosophila melanogaster* que possui oito homólogos que mostram padrões distintos de expressão durante a embriogênese (Hernández *et al.*, 2005).

Tendo em vista a multiplicidade de membros da família 4E em diversas espécies, interações distintas de diferentes homólogos de eIF4E/eIF4G são, portanto, esperadas e observadas (Ptushkina *et al.*, 2001). Entretanto, nem todos os homólogos do eIF4E desempenham um papel na iniciação da tradução (Rhoads, 2009). Alguns podem funcionar como inibidores competitivos de recrutamento do eIF4G e como suporte para interações com outras potenciais proteínas reguladoras (Blewett e Goldstrohm, 2012; Gosselin *et al.*, 2013; Groppo e Richter, 2009). Assim, algumas proteínas de ligação ao eIF4E, como as 4E-BP (4E *binding proteins* - proteínas de ligação ao 4E), reprimem a tradução inibindo a formação do complexo eIF4F, ao passo que outras proteínas de ligação ao eIF4E, como a *Cup* e *Maskin*, utilizam interações proteína-3' UTR alternativas para a repressão seletiva da tradução (Topisirovic *et al.*, 2011; Groppo e Richter, 2009). Além disso, a tradução seletiva de mRNAs pode ocorrer através da ligação ao *cap* de uma proteína homóloga ao eIF4E, a 4E-HP (Topisirovic *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2005).

2.4.4 eIF4G

Em mamíferos, a família eIF4G é composta por três grandes proteínas (eIF4GI, eIF4GII e p97) que têm papéis críticos na iniciação da tradução *cap*-dependente e *cap*-independente. eIF4GI e eIF4GII parecem ser funcionalmente

equivalentes, pois as duas proteínas se ligam aos mesmos fatores de tradução e as duas possuem atividade estimulatória da tradução *in vitro* e *in vivo* (Gradi *et al.*, 1998). A p97, por sua vez, só possui homologia com a região carboxi-terminal dos dois eIF4Gs, e não possui os sítios de ligação para o eIF4E e a PABP na sua região amino-terminal. Ensaio de tradução *in vitro* demonstraram que p97 ativa a tradução *cap*-independente (Hundsdoerfer *et al.*, 2005). Outro estudo observou que a depleção de p97, ao contrário de eIF4GI, não impediu a tradução de certos mRNAs contendo uORFs (*upstream Open Reading Frames*), sugerindo que esse fator promove a iniciação da tradução de diferentes classes de mRNAs (Ramírez-Valle *et al.*, 2008).

As proteínas eIF4GI e eIF4GII exibem discreta similaridade entre espécies diferentes, mas mostram atividades bioquímicas semelhantes (Tarun *et al.*, 1997; Gallie e Browning, 2001). O eIF4GI humano possui aproximadamente 1600 aminoácidos de extensão e se divide em três regiões: N-terminal, central e C-terminal, de acordo com um padrão de clivagem gerado por proteases virais (Figura 11) (Prévôt *et al.*, 2003). Na região N-terminal há domínios para interações com as proteínas PABP e eIF4E, associando as regiões 5' e 3' do mRNA. O domínio central inclui repetições conservadas *HEAT* (*Huntingtin*, *EF3*, *PR/65A*, e *Target of rapamicin 1*), comuns em proteínas envolvidas na formação de complexos multiméricos e constituídas por arranjos de cinco pares de alfa-hélices antiparalelas. Esse domínio constitui a região mais conservada evolutivamente em homólogos do eIF4G em diferentes organismos (Figura 11). Na região central, ligam-se o eIF3 e o eIF4A (LeFebvre *et al.*, 2006) e existe um motivo para ligação de RNA (Pestova *et al.*, 2001). A região C-terminal, em mamíferos, contém um segundo sítio de ligação ao eIF4A (Imataka e Sonenberg,

1997) e um sítio de ligação à proteína quinase que atua sobre o eIF4E, a Mnk1 (Pyronnet *et al.*, 1999).

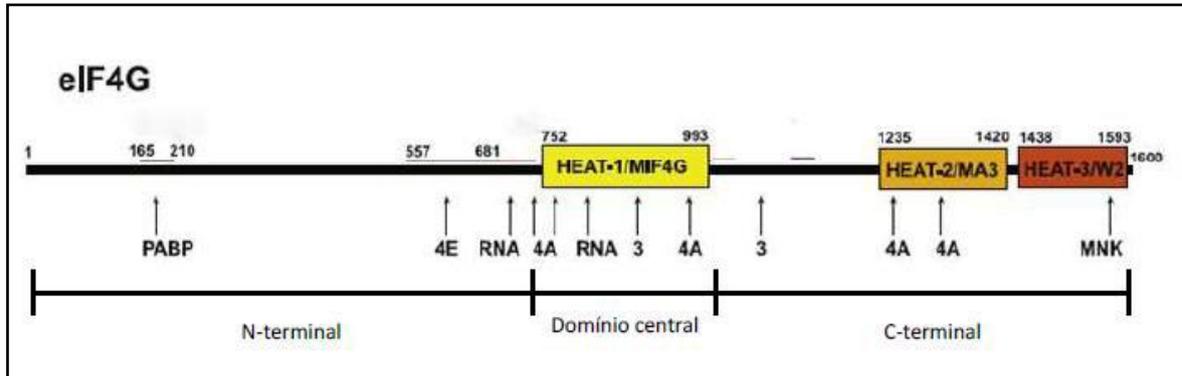


Figura 11. Esquema do eIF4GI humano e seus principais sítios de ligação a outras proteínas. O eIF4G possui na sua região N-terminal os sítios de ligação à PABP e eIF4E. Na região central desta proteína encontra-se o domínio central de ligação ao eIF4A, além de uma região de ligação a RNA (RRM) e do sítio de ligação ao eIF3. Já na sua porção C-terminal se encontram um segundo sítio de ligação ao eIF4A (apenas em mamíferos) e o sítio de ligação da proteína Mnk1 (quinase de eIF4E). O eIF4G humano, proteína protótipo da família, é formada por três domínios HEAT: HEAT-1/MIF4G, HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2. Fonte: Modificado de Marintchev *et al.*, 2010.

2.5 Mecanismos de regulação da iniciação da tradução

Os mecanismos de regulação da iniciação da tradução podem ser separados em duas grandes categorias: 1) aqueles que afetam os eIFs ou ribossomos, e interferem com os eventos de iniciação dependentes do mecanismo de rastreamento do mRNA, e 2) aqueles que afetam diretamente o mRNA, através de proteínas de ligação ao RNA ou microRNAs (miRNAs), os quais podem ser potencialmente seletivos para certas subpopulações de mRNAs. Os exemplos mais estabelecidos do primeiro tipo de controle são a

disponibilidade de eIF2 e eIF4F ativos através da fosforilação reversível dessas proteínas (Jackson *et al.*, 2010).

Na tradução, a fosforilação de proteínas, tais como as proteínas ribossomais (Roux e Blenis 2004), eIFs (Topisirovic *et al.*, 2004; Rush *et al.*, 2005), fatores de alongamento (Knebel *et al.*, 2002) e a PABP (Pierrat *et al.*, 2007), contribuem para a regulação geral da expressão gênica ao nível da síntese proteica. Um dos exemplos bem estabelecidos é a modulação dos níveis do complexo ternário ativo através da fosforilação da subunidade alfa do fator eIF2 (eIF2 α). Na tradução, a fosforilação do eIF2 α por quinases específicas leva ao bloqueio do processo (Dever *et al.*, 2007).

A fosforilação também afeta a concentração intracelular do complexo eIF4F, de forma indireta, através das proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BP's), as quais possuem três homólogos funcionais equivalentes em mamíferos (4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3). Quando hipofosforilada, a 4E-BP se liga ao eIF4E, formando um complexo binário, o qual impede a associação do eIF4E com eIF4G, mas a fosforilação da 4E-BP em múltiplos sítios, principalmente pela mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), libera o eIF4E para se ligar ao eIF4G, favorecendo a formação do complexo eIF4F (Topisirovic *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2014; Proud, 2014).

O eIF4E, por sua vez, também pode ser alvo de fosforilação pelas quinases MNK1 e MNK2 (MNK - *MAPK-Interacting Kinase*) (Ueda *et al.*, 2004; Topisirovic *et al.*, 2011; Proud, 2014). O eIF4E tem sido implicado na tumorigênese (Lazaris-Karatzas *et al.*, 1990; Mamane *et al.*, 2004) e sua fosforilação foi mostrada como sendo necessária para seu potencial oncogênico (Wendel *et al.*, 2007; Furic *et al.*, 2010; Ueda *et al.*, 2010). A assinatura para a sinalização do efeito oncogênico é a

fosforilação do eIF4E na Serina 209, através da ativação de ERK1/2 ou MAPKs p38, que convergem para a quinase MNK, a única capaz de catalisar a fosforilação do eIF4E (Ueda *et al.*, 2004). Curiosamente, MNKs não formam um complexo binário estável com o eIF4E para realizar a sua fosforilação na Ser 209. Ao invés disso, elas interagem com a proteína eIF4G, levando a quinase e seu substrato até a proximidade física (Pyronnet *et al.*, 1999). Conseqüentemente, a associação da Mnk com o eIF4G é essencial para a fosforilação do eIF4E.

A fosforilação de vários outros eIFs (eIF1, eIF2 β , eIF2B ϵ , várias subunidades do eIF3, eIF4G, eIF4B, eIF4H, eIF5 e eIF5B) também já foi descrita e, em muitos casos, eleva-se em condições em que a tradução é ativada (Rough e Gingras, 2007). Esses mecanismos de regulação ressaltam a importância do *status* de fosforilação no controle da atividade dos fatores da tradução.

2.6 Iniciação da tradução em tripanossomatídeos

Com o avanço da biologia molecular e a finalização dos genomas dos TriTryps (*T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major*), foram encontradas nos tripanossomatídeos sequências homólogas à maioria das proteínas envolvidas na tradução eucariótica e sua caracterização tem sido alvo constante de pesquisas. Um ponto chave foi a identificação em *L. major* e *T. brucei* de homólogos aos fatores canônicos do complexo eIF4F: dois para o eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII – numerados assim pela similaridade funcional com os fatores equivalentes de humanos); cinco para o eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5) e seis para o eIF4E (EIF4E1 a EIF4E6) (Dhalia *et al.*, 2005; Dhalia *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2014b).

2.6.1 eIF4A de tripanosomatídeos

Apesar de terem sido identificados dois homólogos de eIF4A, tanto em *T. brucei* como em *L. major*, apenas o EIF4AI parece estar envolvido na iniciação da tradução. Em *L. major*, o EIF4AI foi capaz de interagir com o domínio HEAT do fator EIF4G3 e, em *T. brucei*, essa proteína apresentou localização citoplasmática, e a redução no seu nível intracelular reduziu drasticamente a síntese proteica (Dhalia *et al.*, 2006). Já o EIF4AIII, embora essencial à célula quando submetido a depleção por RNAi, tem localização nuclear e a eliminação de sua função de helicase não leva à diminuições no crescimento celular, ao contrário do observado para o EIF4AI, sugerindo que sua função seja outra que não de fator da iniciação da tradução (Dhalia *et al.*, 2006).

2.6.2 eIF4E de tripanosomatídeos

Nos tripanossomatídeos, a descrição inicial de um único homólogo putativo do eIF4E (Yoffe *et al.*, 2004), foi seguida pela identificação de quatro homólogos (EIF4E1 a EIF4E4) no genoma de *L. major*, sendo todos também conservados nas espécies de *Trypanosoma* (Dhalia *et al.*, 2005). Posteriormente, mais dois homólogos ao eIF4E foram identificados em *Leishmania* e em *T. brucei* e foram denominados de EIF4E5 e EIF4E6 (Freire *et al.*, 2014a; Freire *et al.*, 2014b).

Em *L. major*, ensaios foram realizados onde se avaliou a capacidade dos quatro primeiros homólogos de eIF4E de reconhecer diferentes análogos sintéticos do *cap* e estes mostraram diferentes especificidades para a molécula ligante. Foi constatado que dentre as isoformas estudadas, os fatores EIF4E1 e EIF4E4 ligaram-se ao *cap* 4 e ao *cap* 0 com maior eficiência, sendo por isso

considerados os candidatos mais prováveis a serem ativos na tradução (Yoffe *et al.*, 2006). Por outro lado, nenhum dos fatores estudados conseguiu realizar a complementação em uma levedura mutante que não expressa o eIF4E (Yoffe *et al.*, 2006). Em estudos realizados em *Leishmania* e em *T. brucei* acerca do nível de expressão dessas proteínas, foi visto que as quatro proteínas são expressas constitutivamente (Yoffe *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2011). Ainda em ambas as espécies, o EIF4E3 é o mais abundante embora seja o único que não é capaz de se ligar ao *cap* 4 (Yoffe *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2011). Em *T. brucei*, os fatores EIF4E1 e EIF4E2 distribuem-se por toda a célula enquanto que os EIF4E3 e EIF4E4 são estritamente citoplasmáticas. Experimentos para acessar a essencialidade desses fatores na forma procíclica através de RNAi revelaram que o EIF4E3 é o único homólogo essencial à viabilidade celular (Freire *et al.*, 2011).

Os genes EIF4E5 e EIF4E6 foram os últimos membros da família eIF4E a serem identificados nos tripanossomatídeos, e as análises para suas caracterizações foram iniciadas recentemente. Em *T. brucei*, ambas as proteínas carregam as características geralmente conservadas nos eIF4Es, incluindo o núcleo típico de homólogos de eIF4E e aminoácidos sugestivos de ligação ao *cap* 0. Entretanto, são os menores membros da família, com pesos moleculares estimados de 21,9 e 20,8 kDa, respectivamente. Análises filogenéticas e BLAST sugerem que EIF4E5 e EIF4E6 são mais estreitamente relacionados entre si do que com outros EIF4Es e podem, portanto, representar uma categoria distinta dentro desta família de proteínas de ligação ao *cap* de RNA (Freire *et al.*, 2014a; Freire *et al.*, 2014b).

Análises experimentais dos fatores EIF4E5 e EIF4E6, concluíram que ambas as proteínas se ligam a análogos do *cap in vitro*, são citosólicas e se

associam com complexos multiproteicos, incluindo homólogos do EIF4G. A depleção por RNAi em *T. brucei* do EIF4E5 resultou na perda de movimento ativo do parasita, o que sugere que uma via envolvida na motilidade celular é afetada, direta ou indiretamente, através de um dos complexos do qual o EIF4E5 faz parte (Freire *et al.*, 2014b). Já a depleção do EIF4E6 acarretou numa anomalia fenotípica, fazendo o flagelo se desligar do corpo celular do parasita, causando também uma notável redução no seu comportamento de motilidade social (Freire *et al.*, 2014a).

2.6.3 eIF4G de tripanosomatídeos

A semelhança observada entre os cinco homólogos do eIF4G de tripanossomatídeos (EIF4G1 a 5) e os de outros eucariotos limita-se ao domínio central de ligação ao eIF4A, eIF3 e RNA. A semelhança entre os cinco homólogos existentes também é baixa e apenas os EIF4G3 e EIF4G4 exibem elevada similaridade entre si ao longo de toda sua sequência (Dhalia *et al.*, 2005).

Em *L. major*, os EIF4G3 e EIF4G4 também possuem tamanhos similares (o *LmEIF4G3* possui 635 aminoácidos e o *LmEIF4G4*, 765 aminoácidos) e os domínios HEAT-MIF4G localizam-se na região anterior das proteínas, deixando apenas uma pequena extensão nas extremidades amino-terminais. Já os EIF4G1 e EIF4G2 destacam-se por serem os maiores membros da família de eIF4Gs em tripanossomatídeos (em *L. major*, 1016 aminoácidos para o EIF4G1 e 1425 para o EIF4G2) e pela localização central do domínio HEAT-MIF4G, assim como o EIF4G5 (Dhalia *et al.*, 2005).

Uma característica incomum das sequências dos EIF4G3 e EIF4G4 de tripanossomatídeos então é a curta região N-terminal, de 50-51 resíduos para

homólogos de EIF4G3 e de 74 a 77 resíduos para os de EIF4G4 de diferentes espécies (Moura *et al*, 2015) comparados com quase 600 resíduos em levedura e mais de 700 resíduos no eIF4G de humano. Isto é muito relevante uma vez que essa região engloba os motivos de ligação ao eIF4E e PABP e ~100 resíduos da região N-terminal do eIF4G são necessários para a interação eIF4G/eIF4E em levedura (Gross *et al.*, 2003).

Em *T. brucei* foi verificado que os EIF4G3, EIF4G4 e EIF4G5 possuem localização citoplasmática e são essenciais para a viabilidade dos parasitas (Moura, 2010; Moura *et al*, 2015). Já a depleção do EIF4G1 não afeta o crescimento ou morfologia celular e a depleção do EIF4G2 causa uma redução no seu crescimento. De forma diferente dos demais homólogos de eIF4G, a abundância do EIF4G1 sofre diminuição em situações de estresse, nutricional ou por choque térmico, mas se recupera após a cessão do estímulo estressante (Lima, 2014).

2.6.4 Complexos eIF4F em tripanossomatídeos

Devido à existência de diversos homólogos para os fatores eIF4A, eIF4E e eIF4G, diferentes interações entre essas proteínas podem ocorrer durante a formação de complexos do tipo eIF4F ativos. De fato, pesquisas voltadas à elucidação da formação do complexo eIF4F durante a iniciação da tradução em tripanossomatídeos geraram dados que apontam para a formação de mais de um tipo de complexo eIF4F nesses organismos. Assim, candidatos a subunidades de complexos do tipo eIF4F de *Leishmania* foram examinados através de ensaios de interação proteína/proteína e do monitoramento de seus perfis de migração em gradientes de sacarose. Estas análises levaram à conclusão de que o EIF4E4 é o

candidato mais provável a atuar como o eIF4E convencional em promastigotas, e é parte do complexo eIF4F de ligação ao *cap* do parasita. Foi demonstrado que o EIF4E4 interage com o EIF4G3, que é responsável pelo recrutamento do EIF4A1 (Figura 12) (Yoffe *et al.*, 2009). Essa interação também foi demonstrada para o órtologo de *Trypanosoma brucei* (Freire *et al.*, 2011). As três subunidades eIF4F co-migraram em gradientes de densidade de sacarose e são encontrados nas frações que provavelmente contém o complexo de pré-iniciação (Yoffe *et al.*, 2009; Zinoviev e Shapira, 2012).

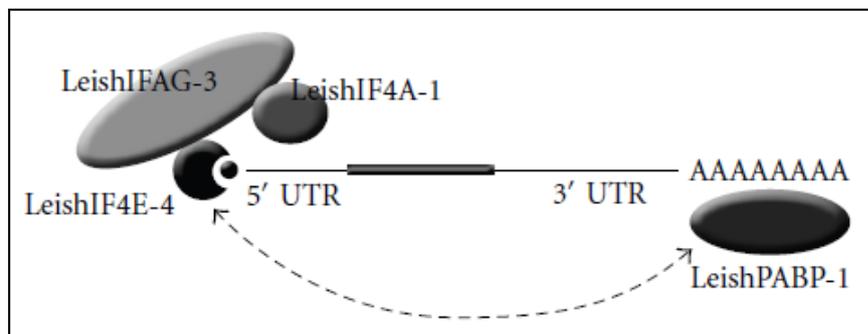


Figura 12. Ilustração da composição do complexo eIF4F de promastigotas de *Leishmania*.

FONTE: Zinoviev e Shapira, 2012.

Em *T. brucei*, é notório também o fato de que o EIF4E3 interage com o EIF4G4 e o EIF4E4 interage com o EIF4G3, indicando que em tripanossomatídeos pode haver a formação de dois complexos EIF4F distintos (Freire *et al.*, 2011). A interação adicional entre o EIF4G3 e o EIF4E3 parece ser específica desta espécie (Freire *et al.*, 2011). Também foi verificado *in vitro* que os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 interagem com o EIF4A1, entretanto, apenas o EIF4G3 foi capaz de interagir com o homólogo da PABP de tripanosomatídeos

mais diretamente implicado no processo de tradução, a PABP1 (Moura *et al.*, 2015).

Em *T. brucei*, mais recentemente, novos complexos do tipo eIF4F foram identificados a partir da identificação dos parceiros dos EIF4E5 e EIF4E6. Assim, através de identificação por espectrometria de massa (MudPIT) das proteínas que co-precipitaram juntamente com o EIF4E5, as seguintes proteínas foram detectadas em maior abundância: o EIF4G1; o EIF4G2; uma proteína hipotética de 47,5-kDa (código de acesso no TriTrypDB: Tb927.11.350) com dois domínios de ligação do tipo *zinc finger*; outra proteína hipotética com motivos de guanililtransferase e metiltransferase, designada de Tb117.5 (Tb927.11.6720); as proteínas regulatórias 14-3-3I e 14-3-3II, que se ligam a resíduos fosforilados e controlam uma enorme variedade de processos celulares; e a proteína hipotética de 17,9-kDa (Tb927.11.6010), para a qual não foi identificado nenhum domínio sugestivo de sua possível atividade celular (Freire *et al.*, 2014b).

Outro complexo recentemente identificado foi o baseado no EIF4E6. As proteínas identificadas com maior número de peptídeos na purificação de proteínas utilizando o EIF4E6 foram as seguintes (em ordem decrescente de abundância): o próprio EIF4E6; um homólogo de eIF4G, o EIF4G5; e uma proteína hipotética de 70,3-kDa, designada de TbG5-IP (Tb927.11.14590), predita como guanililtransferase através do programa de predição de estruturas proteicas, PHYRE2 (Freire *et al.*, 2014a).

2.6.5 Eventos de fosforilação direcionados a fatores de tradução em tripanosomatídeos.

Devido ao fato do ciclo de vida dos tripanosomatídeos abranger uma grande variedade de ambientes, frequentemente ocorrem mudanças adaptativas necessárias em muitos processos celulares, resultando em alterações na expressão gênica, nos níveis proteicos e em modificações pós-traducionais de proteínas (Brenchley *et al.*, 2007; Haile e Papadopoulou, 2007). De fato, muitas alterações no perfil de fosforilação de proteínas durante o ciclo de vida desses parasitas têm sido relatadas e acredita-se que eles contam com a fosforilação de muitas moléculas que atuam em funções estágio-específicas no seu ciclo de vida.

A fosforilação reversível do eIF2 α , que causa uma redução na síntese global de proteínas, é uma via de resposta ao estresse que é bem conservada desde leveduras a seres humanos. Um estudo que explorou a função do controle traducional no contexto da diferenciação da *Leishmania* demonstrou que a síntese de proteínas é geralmente reduzida durante o processo de diferenciação de promastigotas em amastigotas, e que essa redução coincide com a fosforilação do eIF2 α . A reconversão de amastigotas de volta às formas promastigotas resulta em uma diminuição drástica dos níveis de fosforilação do eIF2 α e uma regulação positiva de tradução (Cloutier *et al.*, 2012). Mais importante, a ausência de fosforilação no eIF2 α em um mutante negativo dominante superexpressando uma versão truncada do homólogo da quinase PERK nitidamente retardou o processo de diferenciação de amastigotas em *Leishmania* (Chow *et al.*, 2011).

Outro trabalho realizado em *T. cruzi* demonstrou que neste organismo o eIF2 α é fosforilado *in vitro* no resíduo Thr169 durante a privação nutricional. Este resíduo corresponde a Ser51 do eIF2 α que é fosforilado em outros eucariotos.

Além disso, esta fosforilação atua no controle traducional, pois acarreta a inibição da iniciação da tradução neste organismo. Também foi determinado que essa fosforilação controla a metaciclogênese, uma vez que a mutação do resíduo Thr169 por uma Ala (Tc-eIF2 α Thr169Ala) comprometeu a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas. A via de fosforilação do eIF2 α é, então, proposta a participar da resposta adaptativa do *T. cruzi* ao estresse nutricional, contribuindo para a diferenciação do parasita (Tonelli *et al.*, 2011).

Em *L. amazonensis*, a partir da análise da expressão dos homólogos de eIF4E, foi observado que algumas das respectivas proteínas podiam se apresentar através de duas ou mais isoformas (EIF4E3 e EIF4E4). Posteriormente foi comprovado que esses fatores são alvos de fosforilação, gerando múltiplas isoformas. Curvas de sincronização celular apontaram para uma associação de isoformas específicas com determinados estágios do ciclo celular do parasita. Tendo em vista a ausência de regulação ao nível transcricional da expressão gênica, é provável que esses eventos de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução possam ter um papel importante no controle da tradução e da própria expressão gênica em tripanossomatídeos (Pereira, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para a caracterização funcional de complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma brucei*, através do estudo de modificações pós-traducionais do tipo fosforilação direcionadas a complexos conhecidos, bem como da caracterização de proteínas hipotéticas encontradas em novos complexos recém identificados.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar o perfil de expressão e investigar eventos de modificação pós-traducional agindo sobre isoformas das subunidades dos complexos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 de *T. brucei*, na sua forma procíclica.
2. Mapear os sítios alvo de proteínas quinases nos fatores EIF4E3 e EIF4E4 mediante a análise de proteínas truncadas e/ou mutantes e identificando, *in silico*, possíveis resíduos fosforilados nesses fatores.
3. Identificar domínios funcionais e determinar a localização subcelular das proteínas hipotéticas TbG5-IP e Tb117.5, identificadas a partir de sua associação aos novos complexos EIF4E5/EIF4G1 e EIF4E6/EIF4G5.
4. Analisar a composição e dinâmica dos complexos proteicos onde estão presentes as proteínas TbG5-IP e Tb117.5.
5. Avaliar a viabilidade de células de *T. brucei* submetidas a silenciamento gênico por RNA de interferência e/ou deleção dupla das proteínas TbG5-IP e Tb117.5.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo de células de *Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei* da cepa selvagem 427 e da linhagem 29-13 (Wirtz *et al.*, 1999) foram cultivadas em meio SDM-79 (LgcBio), suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução de ampicilina/estreptomicina (Sigma). Para a manutenção dos transgenes da T7 RNA polimerase e do repressor de tetraciclina na linhagem 29-13, foram adicionados ao meio SDM-79 os antibióticos G418 (15 µg/mL) e higromicina (25 µg/mL). A linhagem selvagem 427 foi utilizada em todas as curvas de crescimento para análise do perfil de expressão dos fatores em estudo e para a caracterização das fosforilações. A linhagem 29-13 foi utilizada para superexpressão de proteínas com o *tag* HA e para a geração das linhagens com o vetor de RNAi.

Para a obtenção das linhagens com o *tag* PTP e também para a geração de duplo *knockout* foi utilizada a forma procíclica da linhagem selvagem YTAT de *T. brucei*, que foi cultivada a 27 °C em meio SM (Cunningham, 1977) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os parasitas foram monitorados por microscopia óptica e contados em câmara de Neubauer ou contador automático de células, quando disponível.

4.2 Construção dos plasmídeos efetores

Os genes codificando as proteínas EIF4E3 e EIF4E4 de *T. brucei* (contendo deleções parciais ou totais da região N-terminal), bem como as sequências codificadoras, regiões não traduzidas (3'UTR e 5'UTR) e as porções 3'-terminais dos genes TbG5-IP e Tb 117.5 foram amplificados utilizando

oligonucleotídeos flanqueados por sítios de restrição de enzimas específicas e clonados no vetor pGEM-T *Easy*[®] (Promega). A lista dos oligonucleotídeos utilizados para as amplificações está descrita na tabela 1. A construção dos plasmídeos efetores foi feita a partir de eventos de subclonagem dessas sequências do pGEM-T *Easy* para os plasmídeos de interesse. Para superexpressão com o *tag* de HA, os fragmentos dos genes EIF4E3 e EIF4E4 foram recuperados por digestão parcial com *Hind*III e *Bam*HI e subclonados nos mesmos sítios do vetor p2477-177, uma versão modificada do vetor p2477 (Kelly *et al.*, 2007). As construções para deleção (*knockout*) de alelos específicos dos genes TbG5-IP e Tb 117.5 foram feitas através de subclonagens para inserção das regiões flanqueadoras 5' e 3' UTR no vetor PKO (Lamb *et al.*, 2001). Os fragmentos resultantes da amplificação da região 3' terminal dos genes TbG5-IP e Tb 117.5 foram subclonados no plasmídeo pC-PTP-Neo e no pC-PTP-Puro, que foram utilizados para a inserção do tag PTP *in situ* na região carboxi-terminal do gene. Para a depleção (*knockdown*) condicional por RNAi, fragmentos internos das ORFs dos genes TbG5-IP e Tb 117.5 foram subclonados no vetor p2T7-177 (Wickstead *et al.*, 2002).

Tabela 1. Relação dos oligonucleotídeos utilizados na obtenção das seqüências de interesse. Os nucleotídeos sublinhados correspondem a regiões de sítios de restrição que foram escolhidas para permitir a inserção nos vetores citados no texto.

Gene	Plasmídeo	Emprego	Direção	Seqüência (5'→3')
EIF4E3	p2477-177	Obter deleção parcial da região N-terminal e clonar em vetor de expressão ectópica	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGTCGTCCAAGTTCCCAG
			3'	GGATCC <u>GAGAACCAAGCGTGAAGTCGGGTGTTATC</u>
EIF4E3	p2477-177	Obter deleção total da região N-terminal e clonar em vetor de expressão ectópica	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGCTTCCCAGTTTGTTC
			3'	GGATCC <u>GAGAACCAAGCGTGAAGTCGGGTGTTATC</u>
EIF4E4	p2477-177	Obter deleção parcial da região N-terminal e clonar em vetor de expressão ectópica	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGCCACTGCCAACATC
			3'	GGATCC <u>GAGAACCCCAAAGCCGACGATTGCC</u>
EIF4E4	p2477-177	Obter deleção total da região N-terminal e clonar em vetor de expressão ectópica	5'	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGACGAAACCCTC
			3'	GGATCC <u>GAGAACCCCAAAGCCGACGATTGCC</u>
Tb117.5	PKO	Clonar a região 5'UTR em plasmídeo utilizado para <i>knockout</i>	5'	<u>CTCGAG</u> GGGTGATGGGTGTGTTCTGAG
			3'	GAATTC <u>ACTTATCCACTCCGATCTAACC</u>
Tb117.5	PKO	Clonar a região 3'UTR em plasmídeo utilizado para <i>knockout</i>	5'	<u>TCTAGATAAGCGCATGAGTGCAA</u> ACTCG
			3'	GCGGCC <u>GCCCAACTAGACTCAACAATACGCAG</u>
Tb117.5	pC-PTP-Neo e pC-PTP-Puro	Clonar o gene em vetor de expressão endógena	5'	<u>GGGCC</u> CTGCTGTCGTTGCTTCTTCCTAC
			3'	CAGCGGCC <u>GCAAATCCCTGTTAAGGTCAACGTTTTGTG</u>
TbG5-IP	PKO	Clonar a região 5'UTR em plasmídeo utilizado para <i>knockout</i>	5'	<u>CTCGAGAACAAGATGGAC</u> TTTTCGGAATGC
			3'	GAATTC <u>ACAACAAGAAAGGTCCCTTCCCTTTGA</u>
TbG5-IP	PKO	Clonar a região 3'UTR em plasmídeo utilizado para <i>knockout</i>	5'	<u>TCTAGAGGGAAGGGAGAGAAGGAAGAAAGG</u>
			3'	GCGGCC <u>GCTTACACACACACACACACTCAC</u>
TbG5-IP	pC-PTP-Neo e pC-PTP-Puro	Clonar o gene no vetor de expressão endógena	5'	<u>GGGCC</u> TTTCATATTCGAGGCCACTTTTGCC
			3'	CAGCGGCC <u>GCAACCCAGAAGCTTCATTCTGCACT</u>

4.3 Transfecção estável de células de *T. brucei*

Para as transfecções, alíquotas de 2×10^7 células procíclicas de *T. brucei*, da linhagem 29-13 ou YTAT, foram lavadas e ressuspensas em 450 μL de tampão ZPFM (NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na_2HPO_4 8mM, KH_2PO_4 1,5 mM, $\text{Mg}(\text{CH}_2\text{COO})_2$ 0,5 mM e $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{COO})_2$ 0,09 mM), juntamente com 20 μg de DNA plasmidial linearizado, e para o controle negativo foram utilizados 50 μL de água estéril. Para a transfecção, foi utilizado o eletroporador ECM 830 (BTX Molecular Delivery Systems), utilizando cuveta de 4 mm e três pulsos de 1,7 kV e 100 μs de duração, com intervalo de 200 ms entre os pulsos. Em seguida, os parasitas foram transferidos para 4,5 mL do meio de manutenção, suplementado com 10-20% de soro fetal bovino, e mantidos a 27°C por 16 horas para recuperação. Após a recuperação, foi acrescentado o antibiótico de seleção: fleomicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para os plasmídeos derivados dos vetores p2T7-177, p2477-177 e PKO; puromicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou neomicina G418 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para os vetores de PTP (pC-PTP-NEO, pC-PTP-PURO); e higromicina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o vetor PKO utilizado para gerar a deleção dupla. A seleção ocorreu num período de 07 a 12 dias.

Após a transfecção e o tempo de recuperação e seleção, as culturas superexpressando o tag HA foram avaliadas por *western blot* para confirmação da expressão das proteínas. As linhagens do PTP, deleção dupla e RNAi, após a seleção regular, foram submetidas também a seleção clonal através de diluição limitante em placas de cultura de 96 poços. Cerca de três clones eram selecionados para avaliação do sucesso da transfecção, sendo um selecionado para ser utilizado nos experimentos necessários.

4.4 RNA de Interferência

Após a transfecção e seleção dos parasitas com as construções para RNAi, o efeito sobre a viabilidade celular foi analisado através de curvas de crescimento na ausência (-TET) e presença (+TET) do indutor tetraciclina (1 µg/mL). As curvas de crescimento foram realizadas através da contagem do número de parasitas, a cada 24 horas, em contador automático (Beckman Coulter) e a avaliação do fenótipo foi monitorada através da análise das células em câmara de Neubauer. A expressão das proteínas foi avaliada por ensaios de *Western blot*, utilizando extratos celulares coletados ao longo da curva de crescimento.

4.5 Purificação dos anticorpos por imunoadsorção

Com o objetivo de aumentar a especificidade dos soros utilizados nos ensaios de *Western blot*, alguns dos anticorpos dirigidos contra as proteínas analisadas de *T. brucei* (EIF4E3, EIF4E4, EIF4G3 e EIF4G4) foram purificados por imunoadsorção. A produção de soro policlonal específico para cada homólogo já havia sido realizada (Freire *et al.*, 2011). Estes soros foram retirados por meio de uma punção cardíaca de coelhos imunizados e permaneceram conservados a -80°C.

Para realizar a purificação dos soros, cerca de 100 a 200 µg das proteínas recombinantes foram fracionados individualmente por eletroforese em gel SDS-PAGE para posterior transferência para membrana de PVDF (Immobilon-P Millipore). Em seguida, a membrana foi corada com solução de Rouge Ponceau 0,2% em TCA 1%, para a visualização da banda referente à proteína de interesse.

A região dessa banda foi excisada da membrana e fragmentada. Após três lavagens de 10 minutos com PBS, os fragmentos foram incubados durante 30 minutos a 4°C numa solução de leite 5% em PBS / Tween-20 0,05%. Em seguida, os fragmentos foram incubados, sob agitação, com o soro policlonal contra as respectivas proteínas recombinantes, por um período de 18 h a 4°C. Após esta etapa, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com PBS e posterior tratamento com solução ácida de glicina 0,1 M (pH 2,5), para a eluição dos anticorpos específicos. A solução foi então separada dos fragmentos da membrana e neutralizada com Tris-HCl pH 8,0 e PBS duas vezes concentrado. Os anticorpos purificados foram armazenados a -80 °C.

4.6 Ensaio de *Western blot*

Amostras das proteínas recombinantes e dos extratos dos parasitas diluídas em tampão de proteína foram fracionadas em gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF ou nitrocelulose. Após a transferência, a membrana foi incubada inicialmente em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 0,1% por 1 hora e em seguida foi incubada em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 0,1%, com seu respectivo anticorpo purificado, em diluições variadas, durante 1 a 16 horas. Para os ensaios realizados para detecção das proteínas fusionadas ao *tag* HA ou ao PTP, foram utilizados os anticorpos comerciais anti-HA monoclonal (Invitrogen) e anti-proteína A (PAP soluble complex/Sigma), respectivamente. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com TBS Tween-20 0,1% (10 minutos cada) e incubada por 1 hora em solução de leite 5%/ TBS Tween-20 0,1% com o segundo anticorpo necessário: anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:10.00) para os anticorpos purificados dos EIF4E3,

EIF4E4, EIF4G3 e EIF4G4 e para o soro bruto anti-EIF4A1; anti-IgG de camundongo para os anticorpos monoclonais comerciais (1:3000). Após três lavagens de 10 minutos com TBS Tween-20 0,1%, foi adicionada à membrana uma solução de luminol 1,2 mM, iodofenol 0,4 mM (em DMSO) e peróxido de hidrogênio 0,03% para a reação de quimioluminescência (ECL). Após incubação de 1 minuto nessa mistura, a membrana foi seca e exposta a filmes fotográficos (Hyperfilm/Amersham Biosciences) por 1 e 10 minutos, que então foram revelados por uma solução de Dektol (KODAK) (1:2) e fixado em solução de ácido acético.

4.7 Curvas de crescimento de *T. brucei* na fase procíclica

Para realização das curvas de crescimento de *T. brucei* na fase procíclica (linhagem selvagem 427), inicialmente foi feito um pré-inóculo de 20 a 30 mL de cultura com uma concentração inicial de 2 a 4×10^6 células/mL, utilizando para isso alíquotas da cultura de manutenção. Estas culturas foram acompanhadas diariamente até que fosse atingida a fase estacionária de crescimento (em torno de 8×10^6 células/mL), quando foi então retirada a amostra do ponto de 0h da curva de crescimento para produção de extrato contendo 5×10^5 células/ μ L. Outra alíquota do pré-inóculo foi utilizada para realizar a expansão da cultura para um volume de 300 mL no respectivo meio de cultura, de forma a ajustar a concentração inicial da cultura para 5×10^5 células/mL. Após esse momento, alíquotas contendo um número equivalente de células foram retiradas a cada 24 horas até a ocorrência da morte celular. Estas alíquotas foram utilizadas para a produção de extratos proteicos totais, sendo as células coletadas através de centrifugação durante cinco minutos (1000 g a 4°C), lavadas com PBS e o

sedimento ressuspensionado em tampão de proteína SDS-desnaturante. Em seguida, os extratos foram fracionados em SDS-PAGE e utilizados nos experimentos de *Western blot* com os soros contra as diferentes proteínas alvo.

4.8 Purificação de fosfoproteínas

Utilizando-se o sistema *PhosphoProtein Purification Kit* (Qiagen), para purificação de fosfoproteínas, foi possível obter a separação da fração de proteínas fosforiladas das proteínas não fosforiladas de lisados da forma procíclica de *T. brucei* (linhagem selvagem 427). Inicialmente, uma alíquota da cultura com 5×10^8 células foi centrifugada a 5000 g a 4°C e lavada com solução de HEPES 50 mM pH 7,0. O sedimento foi ressuspensionado em 5 mL do tampão de lise do *kit* (25 mM MES, 1M NaCl, 0.25% CHAPS) contendo inibidores de proteases e a nuclease benzonase (utilizada para a degradação de ácidos nucléicos) e então incubado por 30 minutos a 4°C, sendo brevemente agitado a cada 10 minutos. Após o período de incubação, o lisado celular foi centrifugado a 10.000 g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e a concentração proteica foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976). Após o equilíbrio da coluna de purificação de fosfoproteínas, um volume de lisado contendo 0,1 mg/mL foi passado pela mesma, permitindo que todas as proteínas fosforiladas ficassem retidas na coluna de afinidade. Em sequência, a coluna foi lavada com tampão de lise e a fração não ligada foi coletada e armazenada para avaliação da eficiência da purificação e para análise das proteínas não fosforiladas. Para obtenção da fração proteica fosforilada foram realizadas quatro eluições utilizando o tampão de eluição de fosfoproteínas (fosfato de potássio 50 mM e NaCl 50 mM). A concentração proteica de todas as eluições foi determinada

através do método de Bradford. Amostras das eluições e da fração não ligada foram fracionadas em SDS-PAGE e transferidas para membranas de PVDF para detecção das proteínas de interesse através de ensaios de *Western blot*.

4.9 Eletroforese bidimensional

De uma cultura de *T. brucei* da forma procíclica (linhagem selvagem 427 e das culturas de superexpressão do HA) na fase exponencial de crescimento, foram coletados 5×10^8 parasitas por centrifugação a 2000 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com PBS e homogeneizado a 4°C em tampão de lise (uréia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 4%, Tris base 40mM), adicionado de um coquetel de inibidores de protease (*Complete, EDTA-free* - Roche). Para favorecer a lise, as amostras foram submetidas a um ciclo de congelamento em nitrogênio líquido seguido de descongelamento a 30°C, e então foram centrifugadas a 14000 g por 2 minutos a 4°C, para remover os restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e alíquotas foram utilizadas para quantificar as proteínas através do método de Bradford. Depois de quantificadas, as amostras foram alíquotadas e estocadas em freezer -80°C. Para a focalização isoeletrica, os extratos proteicos foram purificados por precipitação com o sistema *2-D clean-up* (GE-Healthcare) seguido de solubilização em tampão IEF (*Isoelectric focusing*; uréia 8 M, CHAPS 4%, 2 M tiouréia e traços de azul de bromofenol) e aplicação em fitas *immobiline dry-strips* (GE-HealthCare) de 11 cm, com faixas de pH entre 3-10 ou 6-11. Para isso, as fitas foram hidratadas com a solução de proteínas solubilizadas contendo cerca de 75-100 ug de proteína. A focalização isoeletrica foi feita com base nas condições recomendadas pelo fabricante, de acordo com as características de cada fita, no equipamento. Para a segunda dimensão as fitas foram equilibradas

em tampão de equilíbrio (6 M uréia, glicerol 30%, SDS 2%, 50 mM Tris-HCl pH 8,8 e traços de azul de bromofenol), sendo a primeira etapa na presença de 10 mg/mL de DTT e a segunda com 25 mg/mL de iodoacetamida. Em seguida as fitas foram montadas na parte superior de géis SDS PAGE a 12,5% para se realizar a segunda dimensão em condições convencionais. Na busca pelas isoformas de fatores selecionados, foram realizadas duplicatas de géis, onde um destes foi utilizado para ensaios de *Western blot*, visando observar os fatores de interesse e suas isoformas, enquanto o outro foi corado com nitrato de prata para que fosse possível identificar os *spots* correspondentes àqueles observados no *Western blot*.

4.10 Investigação de possíveis sítios de fosforilação para MAP quinases nos EIF4E3 e EIF4E4 de *T. brucei*

As sequências de cada proteína foram analisadas individualmente de forma manual, com auxílio do software BioEdit, buscando-se detectar a presença dos sítios de MAP quinases, definidos por um aminoácido serina ou treonina seguido pela presença de uma prolina.

4.11 Southern Blot

Em torno de 1 a 5 µg de DNA genômico de *T. brucei* foram digeridos com a enzima de restrição apropriada, e os produtos das digestões foram aplicados em gel de agarose 0,8% e submetidos a eletroforese durante 16 horas a 30 V. Em seguida, o gel foi submetido a um tratamento para permitir a transferência do DNA para uma membrana de nylon (Hybond nylon membrane/Amersham), através de

incubações em agitador por 15 minutos em HCL 0,25 M, 30 minutos em tampão de desnaturação (NaOH 0,5M/NaCl 1 M) e 15 minutos em tampão de neutralização (Tris-HCL 1 M pH 7,5/ NaCl 3 M), sendo que entre as trocas dessas soluções o gel foi lavado por duas vezes com água deionizada. Após o tratamento do gel, foi realizado o processo de transferência do DNA para a membrana por 16 horas, através de capilaridade com auxílio do tampão SSC 20x (NaCl 3 M; Citrato de sódio 300 mM). Após a transferência, a membrana foi rapidamente incubada em tampão SSC 5X, seca e submetida a *crosslink* utilizando-se radiação UV (*autocrosslink* a 254nm com 1200 microJoules x 100: UV light). Em sequência, a membrana foi bloqueada em solução Blotto (leite desnatado 0,5%, SSC 1,5X, SDS 1%) por 4 horas a 65°C e, posteriormente, incubada 16 horas com 50 ng da sonda específica para detectar determinada sequência do genoma. Essa sonda foi previamente linearizada, desnaturada a 100°C por 2 minutos, marcada radioativamente com [α -³²] dCTP (*Kit Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (-dCTP)/Amersham) e purificada com o kit de purificação *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit*/Invitrogen. Após a hibridização com a sonda, a membrana foi lavada com tampão SSC 2x / SDS 0,1% a temperatura ambiente por 15 minutos, tampão SSC 2x / SDS 0,1% a 65°C por 1 hora e tampão SSC 1x / SDS 0,1% a 65°C por uma hora. Por último, a membrana foi seca e exposta em filme radiográfico por três horas.

4.12 Microscopia de fluorescência

Culturas de *T. brucei* expressando o *tag* PTP na fase *log* de crescimento ($5 \times 10^6 - 10^7$ cels/mL) foram utilizadas para a realização desse ensaio. Alíquotas de 1 mL da cultura foram lavadas duas vezes em 1mL de PBS, ressuspensas

em PBS/paraformaldeído 0,01%, incubadas no gelo por 5 minutos e então centrifugadas e ressuspensas em 0,5 mL de PBS. Aproximadamente 20 µl da suspensão celular foram espalhados em uma lamínula e seca em temperatura ambiente (TA), seguido por fixação em acetona e depois em metanol (ambos a – 20 °C por 5 minutos). As lamínulas foram secas a temperatura ambiente e, em seguida, as células foram reidratadas com 1 mL de PBS por 15 minutos e incubadas por 1,5 horas a temperatura ambiente com solução de bloqueio (PBS, soro de cabra 5% e BSA 5%). Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas por 1,5 horas com o anticorpo Anti-Proteína C (Sigma) diluído 1:3000 em solução de bloqueio, submetidas a três lavagens consecutivas com PBS-T (PBS/Tween 20 0,05%) e, na sequência, incubadas com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho (Alexa 488/Invitrogen[®]), por 1 hora. Posteriormente, foram feitas mais três lavagens com PBS-T e, por último, uma com PBS. As lamínulas foram montadas em lâminas com *Vectashield* (Vector Laboratories[®]) contendo DAPI (marcador de DNA) e então visualizadas em microscópio de fluorescência.

4.13 Eletroforese em gel nativo

Esses experimentos foram realizados como descrito por Schägger e von Jagow, 1991. Para o preparo das amostras, culturas contendo de $2-5 \times 10^6$ células expressando o *tag* PTP na fase *log* de crescimento foram lavadas duas vezes em PBS, ressuspensas em 24 µl de tampão de extração [HEPES 25 mM, sacarose 150 mM, glutamato de potássio 20 mM, MgCl₂ 3 mM, NP40 a 0,5%, KCl 150 mM, DTT 0,5 mM, e coquetel de Inibidor de Protease SIGMAFAST™ isento de EDTA, (Sigma-Aldrich)], incubadas no gelo por 20 minutos e centrifugadas a 14000 g por 10 minutos a 4 °C. A 18 µl do sobrenadante foram adicionados 6,25 µl de tampão

de gel nativo quatro vezes concentrado (NativePAGE™ Sample Buffer (4X)/Invitrogen) e 1 µl de tampão de amostra contendo azul de Coomassie G-250. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis pré-montados de 4 a 16% (NativePAGE™ Novex® Bis-Tris), seguindo as especificações do fabricante (Life Technologies™). O marcador de proteínas *NativeMark™ Unstained Protein Standard* (Life Technologies™) foi utilizado para estimar os tamanhos dos complexos. As proteínas foram transferidas para membranas de PVDF de 0,2 µm (BioRad). Na sequência, as membranas foram fixadas em ácido acético 8% por 15 minutos, lavadas com água e o resultado foi acessado através de ensaios de *western blot* com anticorpo anti-proteína A. A faixa correspondendo ao poço do marcador foi removida antes da incubação com o anticorpo, seca em temperatura ambiente, equilibrada com metanol e corada com azul de Coomassie para visualização das bandas do marcador.

4.14 Purificação por afinidade em *tandem*

Para a purificação por afinidade em *tandem*, foram utilizadas as células expressando o *tag* PTP e a purificação foi realizada como descrito por Schimanski *et al.*, 2005. A partir de uma cultura de 400 mL de parasitas na fase exponencial de crescimento, as células foram coletadas através de centrifugação a 5600 g por 10 minutos a 4°C. O sedimento foi lavado com 10 mL de tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl [pH 7,4]; NaCl 100 mM; MgCl₂ 3 mM; EDTA 1 mM) gelado e depois com 10 mL de tampão TrxnB (sacarose 150 mM, L-glutamato de potássio 20 mM, MgCl₂ 3 mM, 20 mM de HEPES-KOH [pH 7,7], DTT 1 mM e 10 µg /mL de leupeptina). Após as lavagens, o sedimento foi ressuscitado em 2 mL de tampão TrxnB 1,5X e incubado no gelo por 10 minutos. A essa mistura foi

acrescentado NP-40 para 0,5% e as células foram lisadas com o auxílio de um pistão por cinco minutos. Após a lise, foi adicionado 200 µL do tampão TrxnB suplementado com KCL a 1,5 M a essa suspensão, que foi incubada no gelo durante 20 minutos. O extrato foi centrifugado a 1800 g por 60 minutos e o sobrenadante foi coletado para ser utilizado na purificação. Ao sobrenadante foi acrescentado 7,5 µl de CaCl₂ 1 M para ajustar a concentração de EDTA e inibidor de protease (*Complete Mini, EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets* - Roche). Cerca de 400 µl da resina anti-ProtC [*Anti-Protein C (anti-ProtC) affinity matrix* - Roche] foram transferidos para uma coluna do tipo Poly-Prep (*Poly-Prep chromatography columns* - Bio-Rad)] e a resina foi equilibrada com 50 mL de tampão PC-150 (KCl 150 mM, 20 mM Tris-Cl, pH 7,7; MgCl₂ 3 mM; DTT 0,5 mM; CaCl₂ 1 mM, 0,1% (v / v) de Tween-20). Após o equilíbrio da resina, o sobrenadante foi transferido para a coluna, a qual foi incubada em um agitador do tipo orbital em velocidade baixa por 2 horas a 4°C. A fração não-ligada foi coletada e armazenada a -80°C. A coluna foi lavada com 60 ml do tampão PC-150 e posteriormente foram realizadas 3 eluições com tampão de eluição (5 mM Tris-Cl, pH 7,7; 5 mM de EDTA, 10 mM de EGTA, 0,1% (v / v) de Tween 20).

Uma alíquota da eluição foi submetida à eletroforese em gel SDS-PAGE e visualizada através de coloração de prata (*Biorad Silver Staining plus*®) e o restante foi precipitado com TCA 20% e submetido a espectrometria de massa (MudPIT).

4.15 MudPIT

As proteínas precipitadas com TCA 20% foram enviadas para identificação dos peptídeos digeridos com tripsina através de espectrometria de massa

(MudPIT: *Multi-Dimensional Protein Identification Technology*- Tecnologia de Identificação de Proteínas Multidimensional), como descrito em ZAMUDIO *et al.*, 2009. Os dados proteômicos foram analisados utilizando os algoritmos SEQUEST e DTASelect2 contra o banco de dados do proteoma predito de *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005), filtrando os peptídeos através de um nível de falso positivos a uma taxa de 5% e um mínimo de dois peptídeos por proteína (Peng *et al.*, 2003).

5. RESULTADOS

Diferentes enfoques foram utilizados para contribuir no estudo de diferentes complexos do tipo eIF4F identificados em *Trypanosoma brucei*. Em um primeiro momento, o foco foi em complexos previamente identificados, EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4, onde procuramos avaliar a expressão dos constituintes desses complexos em *T. brucei* e caracterizar modificações pós-traducionais do tipo fosforilação que pudessem estar associadas ao controle de suas funções. Em um segundo momento, este trabalho foi direcionado para as proteínas hipotéticas TbG5-IP e Tb117.5, que fazem parte dos novos complexos do tipo eIF4F recentemente identificados, envolvendo os EIF4E5 e EIF4E6, e das quais muito pouco se conhecia até o início desta Tese.

5.1 Caracterização de modificações pós-traducionais direcionadas aos complexos formados pelos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4

Em *Leishmania amazonensis* alguns homólogos de eIF4E (EIF4E3 e EIF4E4) exibiram um padrão de migração em gel compatível com a existência de isoformas originárias de modificações pós-traducionais, possivelmente fosforilação. Além disso, para um mesmo homólogo, a expressão de isoformas distintas se mostrou variável de acordo com as fases de crescimento do parasita, sugerindo que modificações pós-traducionais poderiam estar relacionadas ao ciclo de vida desses parasitas (Pereira 2008; Zinoviev *et al.* 2011).

Tendo como referência os resultados obtidos a partir de espécies de *Leishmania*, o presente trabalho fez uso de soros disponíveis (Freire *et al.*, 2011) contra os membros dos complexos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 de *T.*

brucei, para verificar se este tipo de regulação seria conservada nos complexos formados em *T. brucei*.

5.1.1 Caracterização do perfil de expressão dos membros dos complexos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4

Com o intuito de confirmar a caracterização do padrão de expressão dos homólogos de eIF4E, EIF4E3 e EIF4E4, e de eIF4G, EIF4G3 e EIF4G4, constituintes dos complexos em estudo, partimos para a análise da expressão das respectivas proteínas em extratos de células obtidos ao longo de curvas de crescimento de *T. brucei*, na sua fase procíclica (a Figura 13A ilustra de forma representativa uma dessas curvas). Nestes experimentos, extratos proteicos totais derivados de células de pontos específicos da curva foram utilizados em ensaios de *Western blot* onde anticorpos específicos purificados contra os EIF4E3, EIF4E4, EIF4G3 e EIF4G4 foram utilizados na análise de sua expressão.

Como mostrado na Figura 13B, os EIF4E3, EIF4G3 e EIF4G4 apresentaram um padrão constante de expressão ao longo de toda a curva de crescimento analisada. O EIF4G3 foi detectado como apenas uma banda bem definida, ao passo que os EIF4E3 e EIF4G4 apresentaram mais de uma isoforma de tamanhos bem próximos. Já o EIF4E4, representado por múltiplas isoformas em diferentes estágios da curva de crescimento, foi a única proteína estudada com uma variação no perfil de expressão ao longo desta curva, expressando apenas uma banda (a de menor peso molecular) na fase estacionária.

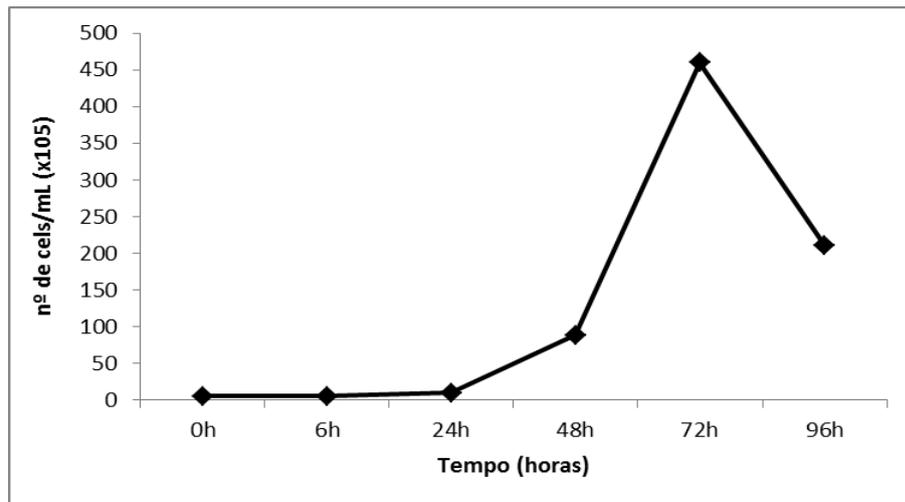
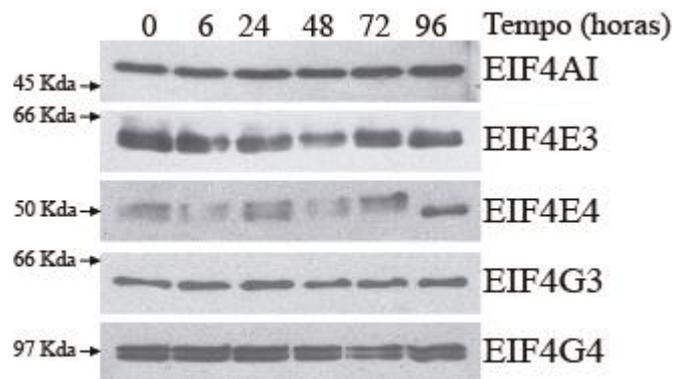
A**B**

Figura 13. Análise da expressão de homólogos de eIF4A (EIF4AI), eIF4E (EIF4E3 e EIF4E4) e eIF4G (EIF4G3 e EIF4G4) durante a curva de crescimento de células procíclicas de *Trypanosoma brucei*. A) Curva de crescimento de *T. brucei* na fase procíclica. B) Alíquotas foram retiradas imediatamente após o repasse (0h), nos pontos 6 e 24 horas e, depois disso, a cada 24 horas. Para todas as amostras quantidades iguais de 10^6 células foram fracionadas em géis SDS-PAGE para a realização de *western blot* utilizando soros específicos. Como controle do número de parasitas presentes em cada amostra foi utilizada a proteína EIF4AI, uma vez que já foi descrito que essa proteína é expressa de maneira constitutiva ao longo do ciclo de vida de *Trypanosoma brucei* (Dhalia *et al.*, 2006).

Para melhor compreender as múltiplas isoformas observadas e obter uma melhor separação entre as bandas das proteínas em estudo, optamos por investigar o perfil de expressão das proteínas EIF4E3 e EIF4E4, que eram o foco inicial desse trabalho, também através de géis bidimensionais. Esta técnica é capaz de detectar modificações pós-traducionais, uma vez que essas modificações podem alterar tanto o peso molecular como o ponto isoelétrico (pI) das proteínas.

Para as análises nos géis bidimensionais das proteínas selvagens, foram utilizados cerca de 100 microgramas de proteínas de extratos proteicos totais. Ensaios de *Western blot* utilizando anticorpos específicos dirigidos contra as proteínas em questão revelaram que as proteínas EIF4E3 (pI= 8,34) e EIF4E4 (pI= 9,44) apresentaram uma multiplicidade de isoformas. Além disso, os vários *spots* detectados geralmente apresentaram um aumento de tamanho em paralelo a uma pequena redução no pI (Figura 14), e essas alterações observadas são consistentes com sucessivos eventos de fosforilações.

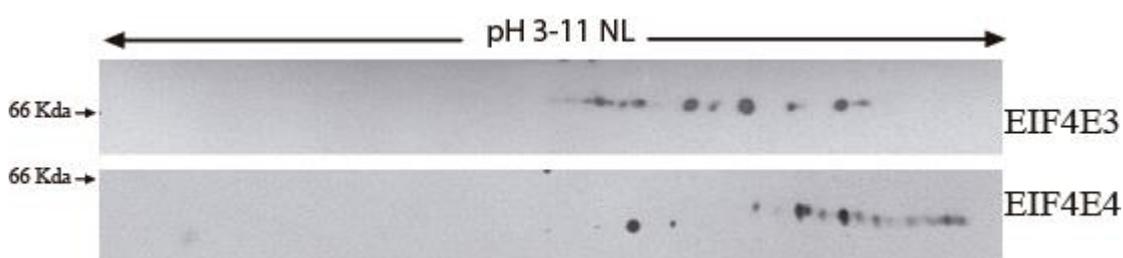


Figura 14. Análise das proteínas nativas EIF4E3 e EIF4E4 por gel bidimensional. Extratos proteicos totais foram processados através da eletroforese bidimensional utilizando fitas (*strips*) de pH 3 a 11. As proteínas foram detectadas com anticorpos específicos contra as proteínas de *T. brucei*.

5.1.2 Identificação das modificações pós-traducionais

Como as modificações pós-traducionais são extensas em *T. brucei*, principalmente a fosforilação, aliado às análises por géis 2-D, partimos do pressuposto que as proteínas em estudo estavam sendo fosforiladas, e, por isso, apresentaram-se como mais de uma isoforma. Para confirmar essa possibilidade, partiu-se para a obtenção e análise do fosfoproteoma do *T. brucei*, utilizando para isso o *Phosphoprotein Purification Kit* da Qiagen, o qual permite purificar as proteínas fosforiladas de uma dada amostra. Alíquotas desta purificação foram analisadas através de *Western blot* para identificar em quais das frações as proteínas em estudo estariam presentes. Como controle para as proteínas não fosforiladas, foi utilizado o EIF4AI, por ser uma proteína constitutiva, apresentar apenas uma única isoforma nos géis convencionais e, na época da realização dos experimentos, não ter sido descrito como fosforilado em outros eucariotos ou em *T. brucei*. Através dessa purificação, foi possível detectar, como esperado, os fatores EIF4E3 e EIF4E4 nas eluições (Figura 15) enquanto que o EIF4AI não foi detectado nas eluições, comprovando que, ao menos nas condições analisadas neste experimento, esse fator não faz parte do fosfoproteoma do parasita. Ambos os homólogos de eIF4G analisados também foram detectados nas eluições, confirmando a fosforilação dessas duas proteínas.

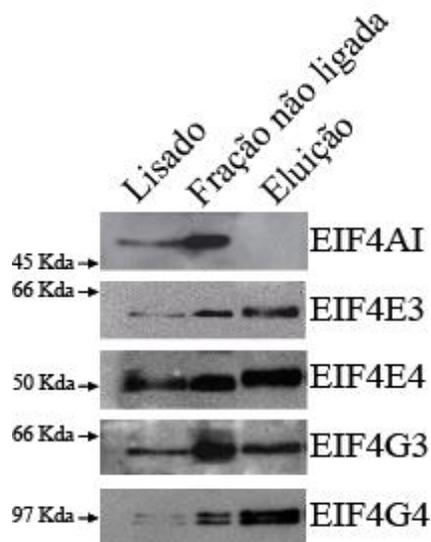


Figura 15. Ensaio de purificação de fosfoproteína utilizando extrato total de células procíclicas de *T. brucei* na fase exponencial de crescimento. As frações não- ligadas e as eluições (correspondente às proteínas fosforiladas) foram analisadas através de *Western blot*.

5.1.3 Mapeamento dos domínios fosforilados nos EIF4E3 e EIF4E4

Essa abordagem foi utilizada na tentativa de identificar domínios importantes que são alvo de proteínas quinases nas sequências das proteínas de interesse desse trabalho. Os possíveis sítios de fosforilação foram investigados nos fatores EIF4E3 (1326 pb) e EIF4E4 (1281 pb), na forma procíclica de *T. brucei*, uma vez que havia mais dados disponíveis sobre a fosforilação do eIF4E de outros eucariotos e que poderiam dar indícios da localização dos sítios fosforilados nessas proteínas. Vale ressaltar que o fator eIF4E é fosforilado no resíduo de Ser-209 em humanos, mas não há conservação desse resíduo nos homólogos de eIF4E de tripanossomatídeos. Por outro lado, a região N-terminal do EIF4E3 de *T. brucei* (forma sanguínea) e *T. cruzi* foi mapeada como alvo de fosforilação, em resíduos de serina e treonina, em um motivo parcialmente conservado no EIF4E4 (Nakayasu *et al.*, 2009; Nett *et al.*, 2009b).

Os produtos gênicos que codificam para as proteínas truncadas, que contêm deleção da região N-terminal, denominadas de EIF4E3ΔN e EIF4E4ΔN (EIF4E3₂₂₁₋₄₄₂ e EIF4E4₂₂₅₋₄₂₇), foram clonados no vetor pGEM-T *Easy* e subclonados no vetor p2477-177, o qual permite a expressão das proteínas em fusão a uma etiqueta de purificação constituída por seis epítomos HA (*Human influenza hemagglutinin*) em *tandem* (6xHA) (Figura 16). Os DNAs obtidos foram utilizados na transfecção de células de *T. brucei*. Adicionalmente, também foram transfectadas células com DNAs dos genes completos do EIF4E3 e EIF4E4 fusionados à mesma etiqueta de HA, cujas construções já haviam sido realizadas anteriormente, como previamente descrito (Freire *et al.*, 2011).

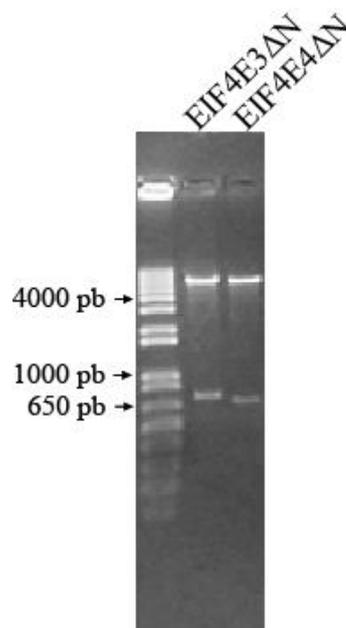


Figura 16. Subclonagem dos fragmentos gênicos do EIF4E3 (EIF4E3ΔN) e EIF4E4 (EIF4E4ΔN) de *Trypanosoma brucei* no vetor p2477-177. Os fragmentos gênicos foram subclonados no vetor p2477-177 e a confirmação foi realizada através da visualização do perfil de digestão com as enzimas de restrição *HindIII* e *BamHI*.

Após o período de seleção, foram obtidas linhagens celulares de *T. brucei* expressando as proteínas truncadas e as proteínas completas fusionadas à etiqueta de HA, após indução com tetraciclina. A confirmação da expressão das

proteínas foi feita através de *Western blot*, utilizando o anticorpo anti-HA (Figura 17). Nesta primeira análise, já foi possível observar diferenças entre as proteínas completas e suas equivalentes truncadas, sendo as primeiras representadas por bandas mais espessas, indicativo de múltiplas isoformas, enquanto as últimas foram representadas por bandas únicas mais finas, sugerindo uma redução no número de isoformas.

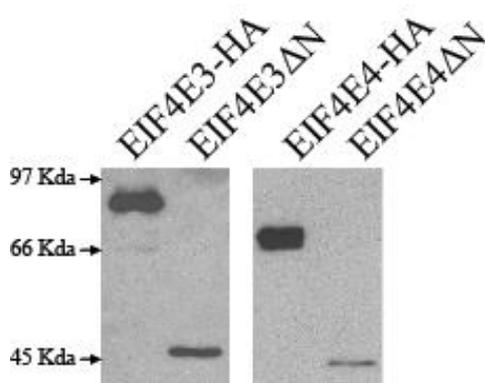


Figura 17. Análise da expressão das proteínas completas EIF4E3 e EIF4E4 (EIF4E3-HA e EIF4E4-HA) e as suas equivalentes contendo deleção da região N-terminal (EIF4E3ΔN-HA e EIF4E4ΔN-HA). Extratos de células procíclicas da fase exponencial transfectadas com os plasmídeos codificando as diferentes proteínas foram fracionados em SDS-PAGE e submetidos a ensaios de *Western blot* utilizando anticorpo monoclonal dirigido contra o epitopo HA.

Os perfis das proteínas completas fusionadas ao *tag* HA, EIF4E3-HA (pI= 5,75) e EIF4E4-HA (pI= 8,12), também foram comparados com os das construções truncadas dessas proteínas, EIF4E3ΔN-HA (pI= 6,69) e EIF4E4ΔN-HA (pI= 5,1), através da eletroforese bidimensional (Figura 18). As análises em géis bidimensionais demonstraram que as proteínas EIF4E3-HA e EIF4E4-HA também apresentaram uma multiplicidade de isoformas, compatíveis com os perfis observados para as proteínas nativas. De modo similar, os *spots* também foram detectados com o mesmo padrão de migração das proteínas selvagens, com um pequeno aumento de tamanho progressivo aliado a uma pequena redução no pI (Figura 18). As proteínas truncadas foram, então, avaliadas e o

número de isoformas visualizadas foi significativamente reduzido para ambas as proteínas, apesar de ainda ser possível a visualização de quatro isoformas para cada proteína.

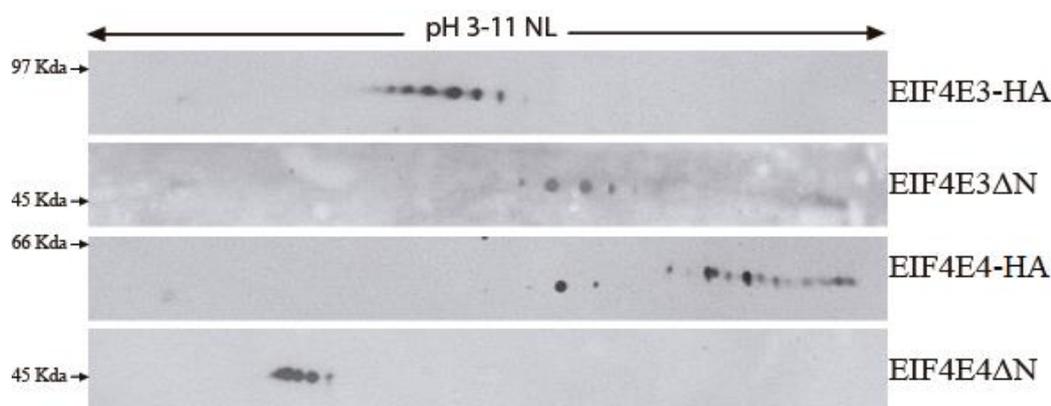


Figura 18. Análise por gel bidimensional das proteínas EIF4E3-HA, EIF4E4-HA e os seus equivalentes com suas extremidades N-terminais truncadas. Extratos proteicos totais foram processados através da eletroforese bidimensional utilizando fitas (*strips*) de pH 3 a 11. As proteínas foram detectadas com anticorpo monoclonal comercial dirigido contra o epítipo HA

5.1.4 Predição de sítios de fosforilação para MAP/cdk quinases nos EIF4E3 e EIF4E4

MAP quinases ou cdk quinases foram recentemente implicadas em eventos de fosforilação do EIF4E4 em *Leishmania* (de Melo Neto, manuscrito em preparação). Outro dado importante é que os EIF4E3 e EIF4E4 possuem uma região N-terminal básica e rica em resíduos de prolina, sendo muitos deles flanqueados por resíduos de serina ou treonina. Utilizando essas informações, foram realizadas análises manuais *in silico para* identificar potenciais sítios de fosforilação para MAP/cdk quinases, cujos sítios preferencias de fosforilação são serinas ou treoninas, seguidas imediatamente por um resíduo de prolina. A grande maioria dos sítios preditos localizam-se no segmento N-terminal de ambas as proteínas: o EIF4E3 possui 8 sítios preditos e seis desses estão localizados na

região N-terminal; o EIF4E4 possui 13 sítios preditos, sendo 11 desses localizados no segmento N-terminal (Figura 19). Estes dados reforçam os resultados dos géis bidimensionais observados para o EIF4E4 e EIF4E3 e seus equivalentes truncados. Em conjunto, esses resultados sugerem que eventos de fosforilação semelhantes estão envolvidos na regulação da atividade destas duas proteínas.

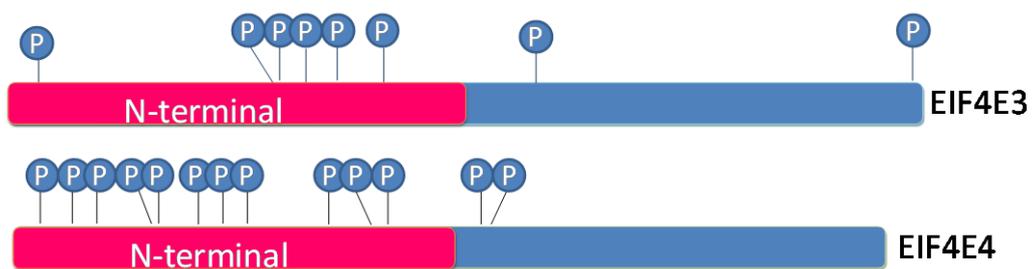


Figura 19. Representação esquemática da localização de sítios de fosforilação preditos para MAP/cdk quinases nos fatores EIF4E3 e EIF4E4. A maior parte dos sítios de fosforilação preditos está localizada na região N-terminal de ambas as proteínas. Estes sítios de fosforilação potenciais são formados por um resíduo de serina ou treonina imediatamente seguido por uma prolina.

5.2 Estudo da proteína Tb117.5:

Como relatado anteriormente, a proteína hipotética denominada de Tb117.5 (número de acesso no TriTrypDb: Tb927.11.350) é uma proteína de 117,5-kDa que foi encontrada associada ao complexo formado pelo eIF4E divergente, denominado de EIF4E5, com um dos homólogos de eIF4G de *T. brucei*, o EIF4G1, e uma outra proteína hipotética de 47,5-kDa. Ao contrário das demais proteínas identificadas nestes complexos, a Tb117.5 parece ter algum tipo de atividade enzimática ainda não identificada. Seu grande tamanho e a presença de possíveis múltiplos domínios funcionais indica ainda uma maior complexidade no seu modo de ação e que pode estar diretamente associada à função ainda não definida do complexo EIF4E5/EIF4G1. Por esses motivos essa proteína foi selecionada para uma maior caracterização durante este trabalho de Tese.

5.2.1 Identificação de elementos conservados por meio de análises de bioinformática

A proteína Tb117.5 está anotada como hipotética nos bancos de dados de sequências. Entretanto, análises utilizando o programa Phyre2 (Kelley e Sternberg, 2009) identificaram na região central da proteína Tb117.5 um domínio de guanililtransferase com 99.4% de confiança e na região C-terminal um domínio de m7G metiltransferase com 100% de confiança. Entre esses dois domínios, também foram identificados dois domínios de ligação do tipo *zinc finger*, que são domínios que, dependendo da sua estrutura, atuam na ligação a moléculas de RNA, DNA ou proteínas e, por conseguinte, podem ter papéis críticos em várias funções celulares (Figura 20). Duas outras proteínas com domínio de

metiltransferase já foram identificadas e caracterizadas previamente: a enzima bifuncional TbCgm1, que possui atividade catalítica de guanililtransferase e de (guanina-N7) metiltransferase (Ruan *et al.*, 2007; Takagi *et al.*, 2007); e outra (guanina-N7) metiltransferase separada, TbCmt1 (Hall e Kiong, 2007). Entretanto, apesar de ambas as TbCmt1 e TbCgm1 terem demonstrado atividade catalítica, alguns experimentos demonstraram que a enzima que participa na etapa da metilação durante a formação do *cap* 0 é a TbCgm1. A proteína Tb117.5 apresentou uma baixa similaridade com a enzima formadora do *cap* 0 do SL RNA, TbCgm1 no domínio de N7-metiltransferase.

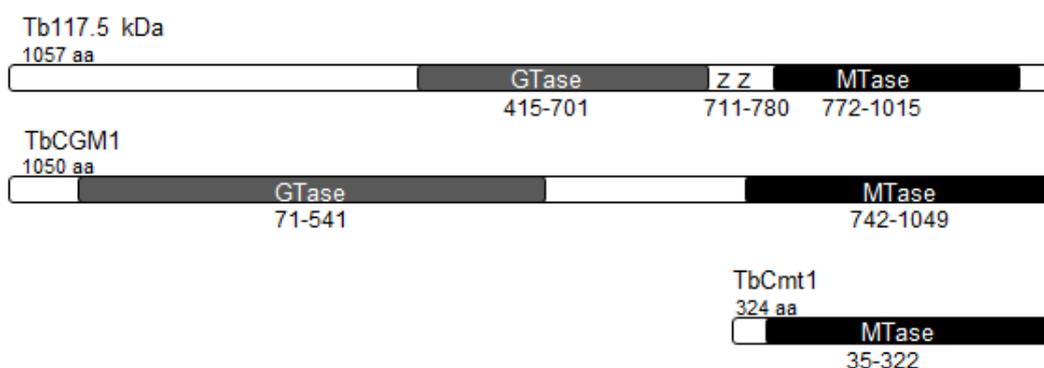


Figura 20. Localização esquemática dos domínios de metiltransferases presentes na metiltransferase envolvida na formação do *cap* dos mRNAs de *T. brucei* e na Tb117.5, como predito pelo programa PHYRE2. A proteína Tb117.5 possui domínios preditos de guanililtransferase, *zinc fingers* (dois) e de metiltransferase. Já a TbCgm1 carrega as atividades que acredita-se estarem envolvidas na formação do *cap* 0 no SL RNA. GTase: guanililtransferase; ZZ: *zinc fingers* ; MTase: m⁷G metiltransferase.

5.2.2 Expressão e localização subcelular da proteína de fusão Tb117.5-PTP

Inicialmente, para realização dos trabalhos experimentais, modificamos linhagens celulares, a fim de se obter a expressão da proteína Tb117.5 fusionadas ao *tag* do PTP no *locus* endógeno do gene, uma vez que não dispunhamos de anticorpos dirigidos às proteínas em estudo.

Primeiramente, para obtenção da linhagem de deleção (*knockout*) simples/PTP (-/PTP), as células de *T. brucei* YTAT foram transfectadas com o vetor PKO para a deleção de um dos alelos do gene. A confirmação desta deleção simples foi verificada através de *Southern blot* para detecção da sequência 3' localizada imediatamente após sua sequência codificadora (3'UTR no mRNA). Através da estratégia delineada, a banda detectada do gene selvagem é de 3125 pb e de 5476 pb para a cópia que foi substituída pela marca de resistência a fleomicina (Figura 21A). Em seguida, essas células foram submetidas a uma segunda transfecção com o vetor pC-PTP-Neo, para substituição da outra cópia selvagem do gene, pelo gene fusionado ao *tag* do PTP. Experimentos de *Western blot*, confirmaram a correta expressão da proteína Tb117.5 fusionada ao epítipo do PTP (19 Kda), gerando uma proteína de fusão de aproximadamente 136,5 Kda (Figura 21B). Com o sucesso dessas etapas de transfecção, foi obtida a linhagem celular Tb117.5^{-/PTP}.

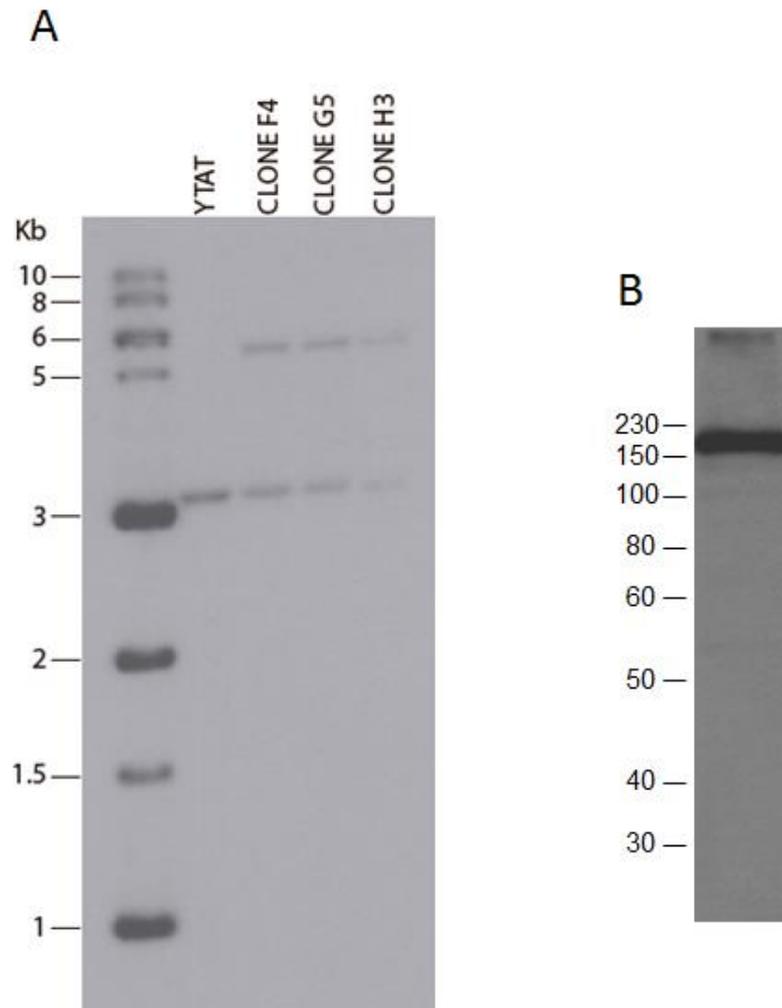


Figura 21. Obtenção da linhagem celular de *T. brucei* geneticamente modificada para expressão da proteína Tb117.5 fusionada ao tag PTP. A) Análise por *southern blot* de três clones para estabelecer *knockout* simples do gene Tb117.5 em células selvagens de *T. brucei*. O DNA genômico dos clones selecionados foi digerido com a enzima KPN I e incubado com sonda radioativa para detecção da região 3' UTR do gene. A banda do gene selvagem é de 3125 pb e de 5476 pb para a cópia substituída pela marca de resistência a fleomicina. B) *Western blot* do extrato celular feito a partir da linhagem celular Tb117.5^{-/PTP}. Para a eletroforese foi utilizado gel de poliacrilamida 10% e para o *Western blot*, anticorpo contra a proteína A.

Com a linhagem celular disponível, o primeiro alvo a ser investigado foi a localização subcelular dessa proteína nas células. Ensaio de imunofluorescência foram realizados utilizando o anticorpo anti-proteína C, que faz parte do tag do PTP, o qual revelou uma localização citosólica para a proteína (Figura 22), similar à distribuição vista para as fusões dos EIF4E5 e EIF4E6 com PTP (Freire *et al.*,

2014a; Freire *et al.*, 2014b) e para o controle citosólico, EIF4AI (Dhalia *et al.*, 2006). As células YTAT foram usadas como controle negativo não transfectado.



Figura 22. Localização subcelular da proteína Tb117.5. A localização subcelular foi determinada utilizando a linhagem Tb117.5^{-/PTP}. As imagens foram obtidas através de imunofluorescência indireta utilizando anticorpo contra a proteína C. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram visualizados através de coloração com DAPI.

5.2.3 Análise do envolvimento da proteína Tb117.5 em complexos multiproteicos através de eletroforese em gel nativo:

Extratos da cultura da linhagem Tb117.5^{-/PTP} foram fracionados através de gel nativo e visualizados através de *Western blot*, utilizando o anticorpo anti-proteína A. Uma banda de ~300 kDa (migrando entre as bandas de 242 e 480 kDa do marcador), outra de ~500 kDa e rastros acima de 480 kDa e abaixo da banda de 1048 kDa foram detectados (Figura 23), indicando a existência de múltiplos complexos, substancialmente maiores do que o tamanho predito para a proteína livre, e que devem conter o E5 e/ou outros membros identificados na purificação. Entretanto, o complexo pode possuir uma dinâmica com respeito à composição de proteínas, causando uma aparente anomalia na migração devido aos efeitos da estrutura quaternária. A proteína livre Tb117.5-PTP, de aproximadamente 136,5 kDa, não foi detectada no ensaio ou então apresentou padrão de migração em tamanho diferente do predito. Outras alterações que poderiam afetar a migração através do sistema de gel não desnaturante incluem

proteínas que podem permanecer em associação ao complexo fusionado ao *tag* PTP no sistema de gel nativo, mas que são perdidas durante a purificação por afinidade.

O perfil visto aqui para a proteína Tb117.5 foi diferente do perfil apresentado pelo EIF4E5 em gel nativo (Freire *et al.*, 2014b). Apesar de ambas compartilharem uma banda ou rastro na altura de 720 Kda, o EIF4E5 só apresenta mais uma banda entre 66 e 146 Kda. Já o perfil do EIF4G1 é mais similar ao da Tb117.5, também apresentando um grande rastro entre as bandas de maior peso molecular.

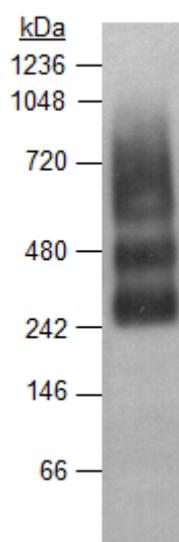


Figura 23. Eletroforese de gel nativo do extrato celular da linhagem Tb117.5^{-PTP}. A partir de células de *T. brucei* transfectadas para a expressão de proteínas fusionadas ao *tag* PTP, foi comprovado que a proteína Tb117.5 está presente em complexos multiproteicos de alto peso molecular. O lisado foi submetido à eletroforese em gel nativo, transferido para membrana de PVDF e incubado com anticorpo direcionado ao domínio da proteína A do *tag* PTP. A migração das bandas do marcador de peso molecular utilizado é indicada em kDa.

5.2.4 Identificação dos integrantes dos complexos contendo Tb117.5-PTP por Mud PIT:

Para uma melhor compreensão do complexo envolvendo a proteína Tb117.5, foi feita uma purificação de proteínas utilizando a linhagem Tb117.5^{-/PTP} e resina com afinidade pelo *tag* PTP, cujo produto foi submetido a análises de espectrometria de massa (MudPIT). Análises dessa purificação revelaram a presença do EIF4E5, da proteína hipotética de 47,5 kDa (Tb927.11.350) e do EIF4G1, sendo que esses dois últimos também co-purificam com o EIF4E5-PTP (Tabela 2), juntamente com outras proteínas. Também é importante destacar que esse resultado revela que a proteína 14-3-3II, que está presente nas purificações do EIF4E5-PTP e EIF4G1-PTP, não co-purifica com a Tb117.5. Esses dados corroboram o resultado obtido com a purificação do EIF4E5 e reforça a ideia da existência de um complexo dinâmico envolvendo essas proteínas.

Tabela 2. Proteínas que co-purificam consistentemente com Tb117.5-PTP:

Gene	GeneDB ID ^a	NSAF ₅ ^b	kDa	# Peptídeos
Hypothetical '117.5'	Tb927.11.6720	2107.168	117.5	53
Hypothetical '47.5'	Tb927.11.350	963.474	47.5	13
EIF4G1	Tb927.5.1490	728.330	122.1	11
EIF4E5	Tb927.10.5020	368.449	21.9	3

Uma preparação foi analisada por MudPIT. O extrato foi tratado com 300mM de KCl.

^a: Número de acesso no GeneDB , www.genedb.org e www.tritrypdb.org.

^b: NSAF (*normalized spectral abundance factor*), fator de abundância espectral normalizado.

5.2.5 Análise da viabilidade celular na ausência da proteína Tb117.5

Para avaliar a viabilidade celular dos parasitas, na ausência da proteína de Tb117.5, foi aplicada a técnica de interferência de RNA. As células 29-13 foram

transfectadas com o plasmídeo pC-PTP-puro, substituindo uma das cópias do gene e mantendo a outra intacta, e analisadas para confirmar a expressão da proteína com o *tag* PTP (Figura 24). Em seguida, foram transfectadas com o plasmídeos de RNAi p2T7-177, sob o controle de dois promotores da T7 RNA polimerase dispostos em orientação reversa (ambos regulados por tetraciclina), e selecionadas com fleomicina, gerando a linhagem celular Tb117.5^{+/PTP}RNAi. Posteriormente, o efeito da interferência de RNA foi analisado através de curvas de crescimento do parasita na presença e ausência de tetraciclina.

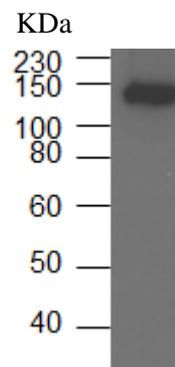


Figura 24. Western blot para confirmação da expressão da proteína Tb117.5-PTP nas células da linhagem 29-13. O extrato proteico total foi utilizado para a eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e, para o *Western blot*, anticorpo contra a proteína A.

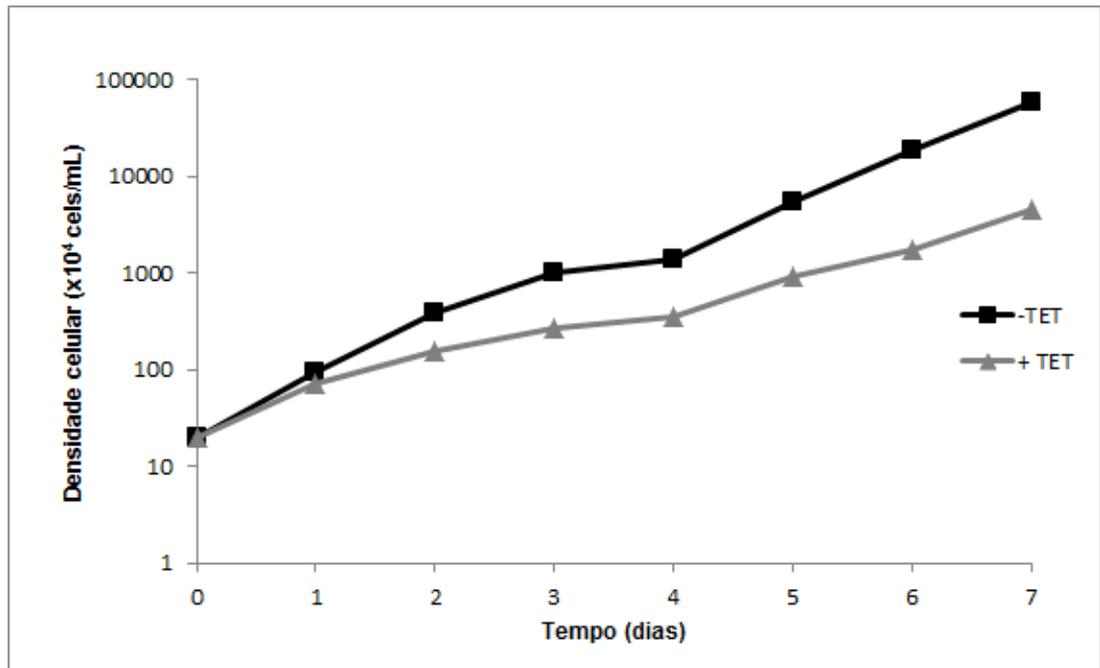
Os experimentos de RNAi dirigidos contra os transcritos do Tb117.5^{+/PTP} em células procíclicas demonstraram um efeito de diminuição no crescimento celular, mas as células permaneceram viáveis (Figura 25A). O nível de expressão do Tb117.5-PTP foi reduzido para menos de 12,5% por volta do 3º dia com indução com tetraciclina (Figura 25B). A redução não foi tão brusca e rápida, mas afetou a morfologia e o crescimento celular logo nesses primeiros dias da indução, até o momento do primeiro repasse para um novo meio. Durante esse período inicial, a indução do RNAi para as células Tb117.5^{+/PTP} teve como

consequências o surgimento de várias células com morfologia alterada, células arredondadas e muitas vezes aparentando ter vários flagelos (resultados não mostrados).

Logo após o primeiro repique, no quarto dia da curva, as células da linhagem Tb117.5^{+PTP}RNAi, começavam a recuperar a morfologia padrão e a se aproximar do nível de crescimento da cultura não induzida. Já depois do segundo repique sob a indução do RNAi, em torno de 7 dias após o início do experimento, a cultura passava a apresentar um fenótipo normal.

Uma vez que a linhagem de RNAi não demonstrou um grande impacto no crescimento celular, o próximo passo experimental foi criar uma linhagem com duplo *knockout* para que a ausência da proteína de interesse pudesse ser examinada. Para isso, foi realizada a tentativa de deleção da segunda cópia do gene selvagem da linhagem Tb117.5^{-/+}, que já tinha uma das cópias do gene deletada. Ao menos duas tentativas de obter uma linhagem com duplo *knockout* do gene foram realizadas. Entretanto, após a transfecção para o duplo *knockout* do gene Tb117.5, não foi possível recuperar as células em nenhuma das tentativas, e ocorreu morte celular completa de toda a cultura durante o período de seleção.

A



B

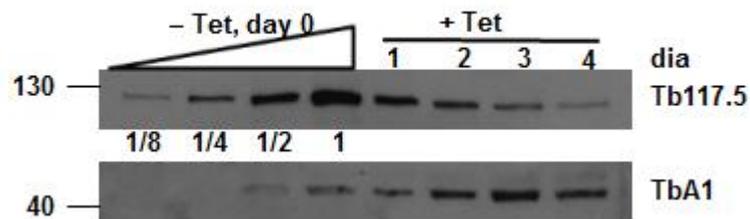


Figura 25. Análise do efeito da indução do RNAi na viabilidade celular e nos níveis de expressão da proteína Tb117.5. A) Gráfico da curva de crescimento: durante a realização das curvas de crescimento, as culturas celulares induzidas com tetraciclina (+Tet) e o controle não induzido (-Tet) foram acompanhadas diariamente para monitoramento de fenótipo e densidade celular. B) Os *Westerns blots* feitos a partir de culturas de RNAi induzidas foram incubados com o anticorpo que detecta a proteína A, componente do *tag* PTP. Diluições seriadas da cultura não induzida (-Tet) foram aplicadas em paralelo para indicar os níveis relativos das proteínas. Essas membranas foram reincubadas com o anticorpo contra a proteína EIF4A1 (Dhalia *et al.*, 2006) de *T. brucei* para controle de quantidade do extrato aplicado.

5.3 Estudo da proteína TbG5-IP:

A segunda proteína selecionada para ser melhor caracterizada nesta Tese é uma proteína de 70,3-kDa (Tb927.11.14590) que aparece em ensaios de imunoprecipitação analisados por espectrometria de massa tanto do EIF4E6 como do EIF4G5. Esta proteína foi denominada de TbG5-IP pelo fato de ter sido identificada em maior proporção nos ensaios com o EIF4G5 de *T. brucei* e por uma interação direta com esta proteína ter sido identificada, ao contrário do EIF4E6. Como também apresenta um tamanho significativo e possível atividade enzimática, esta proteína foi selecionada para uma maior caracterização, junto com a Tb117.5, pelas informações que seu estudo pode vir a fornecer sobre a função do complexo formado pelos EIF4E6/EIF5G5.

5.3.1 Caracterização preliminar por análises de bioinformática

Análises de bioinformática da proteína TbG5-IP utilizando o programa Phyre2, revelaram dois domínios associados com a formação do *cap* 5' no mRNA (Figura 26). A parte amino-terminal da TbG5-IP apresentou similaridade à estrutura secundária de um domínio conservado em uma ampla família de enzimas, que inclui a enzima trifosfatase (envolvida na primeira etapa da formação do *cap* 0 nos transcritos primários) com 99.1% de confiança. A parte carboxil da proteína consiste quase que inteiramente de um domínio de guanililtransferase (99.8 de confiança). Adjacente ao gene para a TbG5-IP (Tb927.11.14590), no cromossomo 11, está um gene para uma proteína que foi previamente identificada (Tb927.11.14580) com base na atividade guanililtransferase e que foi nomeada de *capping enzyme* 1 ou TbCe1 (Silva *et al.*, 1998). TbG5-IP possui os mesmos domínios que TbCe1, cada um com 100%

de confiança como designado pelo PHYRE2, e diferem primariamente na extensão da região NH-terminal da TbG5-IP. O alto nível de similaridade entre as sequências indica que esses genes vizinhos podem ter derivado através de eventos de duplicação no genoma. A adição do *cap 0* ao SL RNA não é atribuída a TbCe1, entretanto, sendo essa tarefa desempenhada pela trifosfatase TbCet1 e pela bifuncional TbCgm1 (Ruan *et al.*, 2007; Takagi *et al.*, 2007).

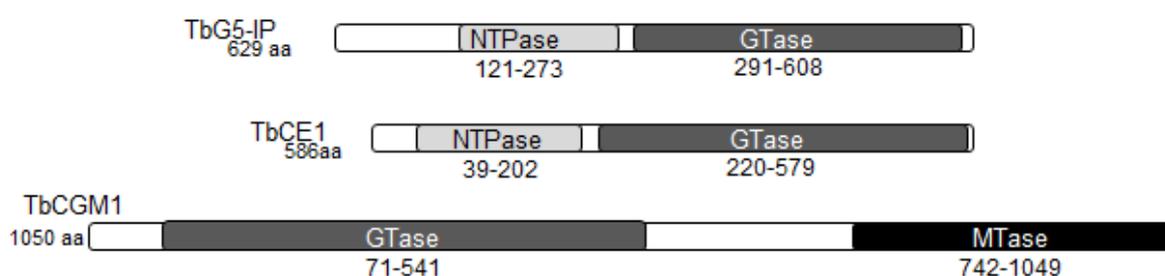


Figura 26. Localização esquemática dos domínios estruturais nas enzimas envolvidas no capeamento do mRNA e na TbG5-IP. Como predito pelo PHYRE2, a parte amino-terminal da TbG5-IP inclui o domínio de nucleosídeo trifosfatase e a parte carboxil da proteína consiste quase que inteiramente do domínio de guanililtransferase. O gene TbCe1 está posicionado adjacente ao gene de TbG5-IP; TbCgm1 carrega as atividades de GTase e MTase que acredita-se estarem envolvidas na formação do *cap 0* no SL RNA. NTPase: NTP hidrolase; GTase: guanililtransferase; ; MTase: m⁷G metiltransferase.

5.3.2 Expressão e localização subcelular da proteína de fusão TbG5-IP-PTP

Assim como foi feito para a proteína Tb117.5, confeccionamos a linhagem TbG5-IP^{-/PTP} para utilizarmos nos experimentos de caracterização dessa proteína. A análise através de *Southern blot* utilizando sonda para detecção da região 3' UTR do gene, detectou a presença da banda do gene selvagem com 2500 pb e da cópia que foi substituída pela marca de resistência a fleomicina com 3184 pb, confirmando a deleção de uma das cópias do gene (Figura 27A). Em seguida,

essas células foram submetidas a uma segunda transfecção com o vetor pC-PTP-Neo. Experimentos de *Western blot*, confirmaram a correta expressão da proteína TbG5-IP-PTP, com tamanho de 104 Kda (Figura 27B).

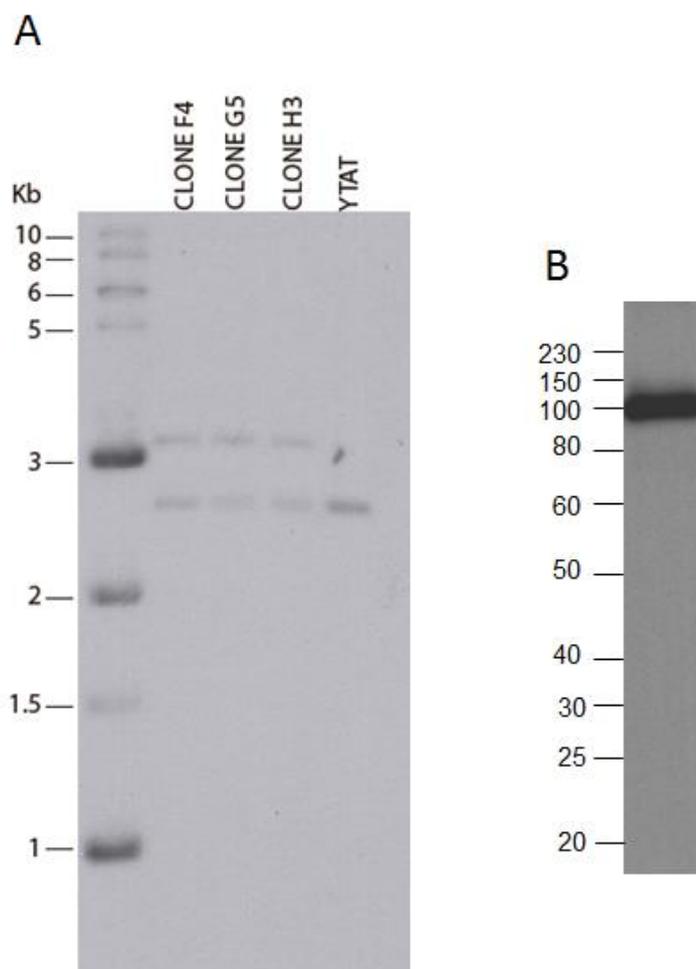


Figura 27. Obtenção da linhagem celular de *T. brucei* geneticamente modificada para expressão da proteína TbG5-IP fusionada ao tag PTP. A) *Southern blot* para estabelecer a deleção simples do gene TbG5-IP em células selvagens de *T. brucei*. O DNA genômico de clones selecionados foi digerido com a enzima EcoRI e incubado com sonda radioativa para detecção da região 3' UTR do gene. A banda esperada para detecção do gene selvagem é 2500 pb e de 3184 pb para a cópia que foi substituída pela marca de resistência a fleomicina. B) *Western blot* do extrato celular feito a partir da linhagem celular TbG5-IP^{-/PTP}. Para a eletroforese foi utilizado gel de poliacrilamida 10% e para o western blot, anticorpo contra a proteína A.

Ensaio de imunofluorescência utilizando as células da linhagem TbG5-IP^{-/PTP} revelaram a localização citosólica para a proteína TbG5-IP-PTP (Figura 28),

de maneira análoga ao que foi visto para o controle citosólico EIF4AI (Dhalia *et al.*, 2006). As células YTAT foram usadas como controle negativo não transfectado.



Figura 28. Localização subcelular da proteína TbG5-IP. A localização subcelular foi determinada utilizando a linhagem TbG5-IP-^{PTP}. As imagens foram obtidas através de imunofluorescência indireta utilizando anticorpo contra a proteína C, componente do *tag* PTP na proteína de fusão. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram visualizados através de coloração com DAPI.

5.3.3 Análise do envolvimento da proteína TbG5-IP-PTP em complexos multiproteicos através de eletroforese em gel nativo:

A investigação da migração do TbG5-IP-PTP através do sistema de gel nativo, revelou uma larga banda migrando acima da banda de 242-kDa do marcador (Figura 29). O tamanho predito para o complexo envolvendo o TbG5-IP-PTP, EIF4E6 e EIF4G5 é de ~194.7 KDa, quando se inclui o *tag* PTP. Os dados combinados desses experimentos são consistentes com a predição de que essas proteínas formam complexos de alto peso molecular *in vivo*, e indicam a presença de componentes adicionais nos complexos que envolvem essas proteínas. De modo semelhante a Tb117.5, a proteína livre também não foi detectada nesse ensaio, ou então apresentou padrão de migração diferente do predito. O perfil de bandas apresentado pela TbG5-IP em gel nativo coincide com aquele observado para os EIF4E6 e EIF4G5. Essas duas últimas proteínas apresentaram uma larga

banda de ~300 Kda que se estendem até um pouco abaixo da banda de 242 Kda, além de apresentarem rastros maiores próximos de 700 Kda (Freire *et al.*, 2014a).

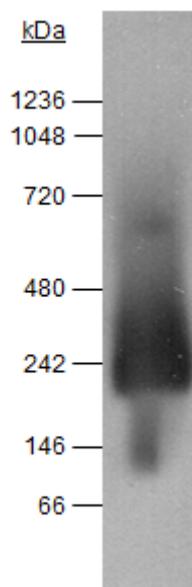


Figura 29. Eletroforese de gel nativo do extrato celular da linhagem TbG5-IP^{-PTP}. A partir de células de *T. brucei* transfectadas para a expressão de proteínas fusionadas ao *tag* PTP foi comprovado que a TbG5-IP está presente em complexos multiproteicos de alto peso molecular. O lisado foi submetido a eletroforese em gel nativo, transferido para membrana de PVDF e incubado com anticorpo direcionado ao domínio da proteína A do *tag* PTP. A migração das bandas do marcador de peso molecular utilizado é indicada em kDa.

5.3.4 Identificação dos integrantes dos complexos contendo TbG5-IP-PTP por MudPIT:

Com o intuito de complementar os estudos dos complexos da TbG5-IP e identificar seus parceiros funcionais que possam dar indícios de sua função, foi realizada purificação de proteínas utilizando a linhagem TbG5-IP^{-PTP}, as quais foram enviadas para a análise em espectrometro de massas (MudPIT). As análises através de MudPIT das proteínas purificadas juntamente com TbG5-IP-PTP, resultou na identificação do EIF4G5 e EIF4E6, em ordem decrescente de abundância (tabela 3). Diversas outras proteínas que não co-purificaram com os

outros membros do suposto complexo também foram identificadas. Juntos esses dados são indicativos de uma associação primária entre o EIF4G5 e a proteína hipotética TbG5-IP, com uma forte associação desse par com o EIF4E6. Isto provavelmente é uma reminiscência do fato do homólogo de eIF4G atuar como uma plataforma que interage com proteínas acessórias uma vez que esteja associado a um RNA através do homólogo de eIF4E. Estes dados corroboram o resultado do gel nativo, como citado acima

Tabela 3. Identificação por MudPIT das proteínas que co-purificam com TbG5-IP-PTP:

Gene	GeneDB # ^a	MW (kDa)	AvUniPepts ^b	% coverage	NSAF ^c
hypothetical protein--TbG5-IP	Tb927.11.14590 ^d	70.30	33	51.70	1627.54
EIF4G5	Tb927.8.4500	84.60	52	51.70	7113.24
EIF4E6	Tb927.7.1670	20.90	9	41.40	2163.60
UMSBP	Tb927.10.6070	14.60	6	37.90	499.91
RBP16	Tb927.11.7900 ^d	15.11	7	42.60	496.37
GAPDH	Tb927.6.4280	39.04	9	33.70	487.38
ALBA3	Tb927.4.2040	20.80	8	38.40	460.45
UMSBP	Tb927.10.6060	21.83	8	33.80	451.80
cyclophilin a	Tb927.11.880 ^d	18.71	3	19.20	395.41
hypothetical protein	Tb927.9.4960 ^d	7.60	2	31.20	364.52

^a: Número de acesso no GeneDB , www.genedb.org e www.tritrypdb.org.

^b: Número de peptídeos identificados

^c: NSAF (*normalized spectral abundance factor*), fator de abundância espectral normalizado.

5.3.5 Análise da viabilidade celular na ausência da proteína TbG5-IP

Buscando mais indícios da função celular da proteína TbG5-IP, avaliamos a viabilidade celular e o fenótipo dos parasitas por meio da técnica de RNAi. As

células da linhagem 29-13 foram transfectadas com o plasmídeo pC-PTP-puro, substituindo uma das cópias do gene e mantendo a outra intacta e analisadas para confirmar a expressão da proteína com o *tag* PTP (Figura 30). Em seguida, foram transfectadas com o plasmídeo de RNAi p2T7-177, gerando a linhagem celular TbG5-IP^{+/PTP}RNAi. Posteriormente, o efeito da interferência de RNA foi analisado através de curvas de crescimento do parasita na presença e ausência de tetraciclina.

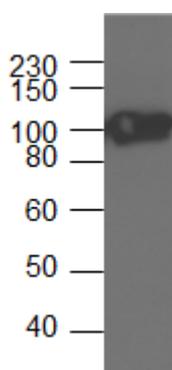


Figura 30. Western blot para confirmação da expressão da proteína TbG5-IP-PTP nas células da linhagem 29-13. O extrato proteico total foi utilizado para a eletroforese em gel de poli-acrilamida 10% e para o *western blot*, anticorpo contra a proteína A.

Para a cultura de TbG5-IP^{+/PTP}, sob a indução de RNAi, as células apresentaram fenótipo estressado, porém em menor proporção quando comparado com Tb117.5^{+/PTP}, e muitos parasitas alongados, além de uma diminuição do crescimento (Figura 31A). O nível de expressão da TbG5-IP-PTP foi reduzido para menos de 12.5% por volta do 3^o dia sob indução do RNAi (Figura 31B). Do mesmo modo que a linhagem Tb117.5^{+/PTP}RNAi, logo após o primeiro repique, no quarto dia da curva, as células começavam a restaurar o perfil de morfologia e crescimento padrão. Esse fenômeno pode ter ocorrido devido a um insucesso na seleção clonal das linhagens, que é realizada através

de diluição limitante, ou então porque as células tenham escapado prematuramente da maquinaria de RNAi.

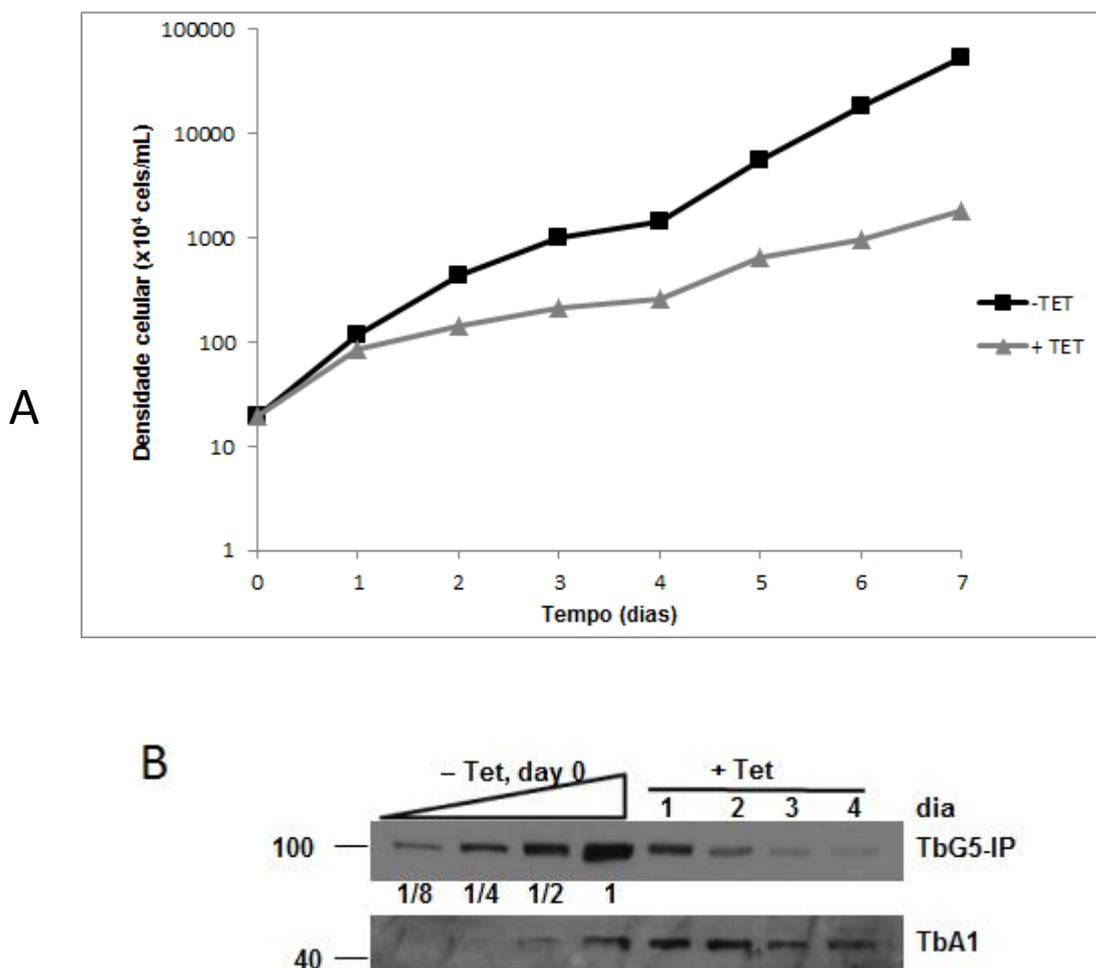


Figura 31. Análise do efeito da indução do RNAi na viabilidade celular e nos níveis de expressão da proteína TbG5-IP. A) Gráfico da curva de crescimento: durante a realização das curvas de crescimento, as culturas celulares induzidas com tetraciclina (+Tet) e o controle não induzido (-Tet) foram acompanhadas diariamente para monitoramento de fenótipo e densidade celular. B) Os *Westerns blots* feitos a partir de culturas de RNAi induzidas foram incubados com o anticorpo que detecta a proteína A, componente do tag PTP. Diluições seriadas da cultura não induzida (-Tet) foram aplicadas em paralelo para indicar os níveis relativos das proteínas. Essas membranas foram reincubadas com o anticorpo contra a proteína EIF4A1 (Dhalia *et al.*, 2006) de *T. brucei* para controle de quantidade de extrato aplicado.

Seguindo no objetivo de analisar concretamente o efeito da ausência da proteína de interesse na viabilidade celular, foi realizada a tentativa de deleção da segunda cópia do gene selvagem da linhagem TbG5-IP^{+/+}, que já tinham uma das cópias do gene deletada. Duas tentativas de obter uma linhagem com duplo

knockout do gene foram realizadas, entretanto, sem sucesso. Apesar de ter sido possível recuperar uma cultura com células sobreviventes à seleção após a transfecção, não foi possível demonstrar a deleção da segunda cópia selvagem do gene. Através de *Southern blot*, foi observada a presença de uma terceira banda que não mostrava correspondência com nenhum dos perfis de bandas esperado (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

6.1 O papel da fosforilação na regulação dos complexos formados pelos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4

Protozoários kinetoplastídeos possuem uma série de características singulares na sua expressão gênica, incluindo a edição de RNA, *trans-splicing*, pré-mRNA policistrônico e estrutura do *cap* hipermetilado (Takagi *et al.*, 2007). Adicionalmente, a regulação dessa expressão ocorre a nível pós-transcricional e a etapa da iniciação da tradução parece ser uma etapa chave desse processo. Os níveis de fosforilação ou disponibilidade dos fatores de iniciação também parecem exercer papel importante no modo pelo qual a sua expressão gênica é controlada (Clayton, 2014).

Na primeira etapa deste trabalho, o foco foi caracterizar a ocorrência da fosforilação em homólogos selecionados de eIF4E (EIF4E3 e EIF4E4) e eIF4G (EIF4G3 e EIF4G4) que formam complexos do tipo eIF4F em *Trypanosoma brucei* já definidos como críticos para o processo de tradução (Moura *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2011). Uma vez que ainda há escassez de informações sobre seu papel na regulação do processo da iniciação da tradução em tripanossomatídeos, apesar da relevância da atuação desse mecanismo nas vias metabólicas de eucariotos superiores, o trabalho realizado buscou confirmar eventos de fosforilação agindo sobre estas proteínas em *T. brucei*, contribuindo ainda para a definição dos sítios alvos nos homólogos de eIF4E. A análise do perfil de expressão dos homólogos do eIF4E foi iniciada em um trabalho anterior e o presente trabalho buscou validar e complementar os resultados obtidos anteriormente (Malvezzi, 2010). Os

resultados aqui obtidos foram bem semelhantes, corroborando os resultados prévios.

O perfil de expressão dos homólogos de eIF4E e eIF4G analisados aqui demonstrou que esses fatores apresentaram-se como mais de uma banda em diferentes estágios da curva de crescimento, com exceção do EIF4G3, que foi detectado como apenas uma banda bem definida. Peculiarmente, o EIF4E4 foi a única proteína que apresentou variação no perfil de expressão, uma vez que na fase estacionária apenas a banda de menor peso molecular foi expressa. Esses resultados indicam que o controle da atividade desta proteína pode ser uma etapa relevante no controle do processo de síntese de proteínas em diferentes etapas de crescimento do parasita. Além disso, como o padrão de expressão do EIF4E4 apresenta um elevado grau de conservação em *T. brucei* e *Leishmania amazonensis* (Pereira, 2008), é possível que esse mecanismo de regulação se aplique às diferentes espécies de tripanosomatídeos, de uma forma geral.

Em *T. brucei* o perfil de expressão do fator EIF4E3 divergiu do apresentado em *L. amazonensis*, uma vez que em *Leishmania* a banda de maior peso molecular desta proteína diminui de intensidade ao longo da curva de crescimento, mas se intensifica novamente na fase estacionária (Pereira, 2008), enquanto em *T. brucei* o seu padrão de expressão parece constante. Por outro lado, o perfil de expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 foi bem semelhante ao observado em *L. amazonensis*, visto que o homólogo EIF4G3 também foi expresso em toda a curva de crescimento, sendo essa expressão inalterada quanto à intensidade ou presença de isoformas e o fator EIF4G4 também apresentou duas isoformas bem evidentes, também sem alterações de intensidade ao longo da curva (Nascimento, 2012).

A permanência da expressão de todos os fatores analisados (EIF4E3 e 4, EIF4G3 e 4) durante toda a curva de crescimento da forma procíclica do *T. brucei* é sugestivo de que essas proteínas são essenciais para a manutenção da homeostasia celular. De acordo com essa afirmação, ensaios de interferência de RNA para avaliar a viabilidade celular após a depleção dos níveis das proteínas EIF4G4 e EIF4E3 em *T. brucei*, resultaram em morte rápida da cultura (Freire *et al.*, 2011; Moura *et al.*, artigo aceito). A depleção do EIF4G4 também induziu mudanças na morfologia que precederam a morte celular, resultando em parasitas com formas arredondadas.

O estudo do fosfoproteoma pode ser feito de uma maneira global, isto é, com as proteínas totais do lisado, ou por estratégias de enriquecimento. As estratégias de enriquecimento são técnicas usadas para separar apenas as proteínas que apresentam fosforilação e são essenciais para a elucidação e identificação de fosfoproteínas pouco expressas, tais como moléculas sinalizadoras e receptores. Diante da dificuldade de se identificar fosfoproteínas pouco expressas, um sistema de purificação de fosfoproteínas foi utilizado, facilitando o nosso estudo. Através dessa abordagem comprovou-se que os fatores EIF4E3, EIF4E4, EIF4G3 e EIF4G4 realmente fazem parte do fosfoproteoma do parasita. Estes resultados foram corroborados pelas análises por gel bidimensional dos homólogos de eIF4E, onde foi possível se visualizar claramente diversas isoformas para os fatores EIF4E3 e 4, com pequenas diferenças de massa molecular e pI. Em contrapartida, no trabalho de Nakayasu e colaboradores, apenas o fator EIF4E3, o qual é o homólogo mais abundante do complexo eIF4F, tanto na forma procíclica quanto na sanguínea (Freire *et al.*, 2011), foi identificado como sendo fosforilado, dentre os fatores que compõe o

complexo eIF4F na forma sanguínea do *T. brucei* (Nakayasu *et al.*, 2009). Já em formas procíclicas de *T. brucei*, um estudo demonstrou que cerca de 80% das proteínas analisadas através de gel 2-D foram identificadas sob a forma de quatro ou menos *spots* (ex.: β -tubulina, HSP70). Estas apresentaram mudanças no pI, apesar de suas massas moleculares apresentarem discreta ou nenhuma alteração, demonstrando que a modificação de proteínas é bastante comum nesse parasita (Jones *et al.*, 2006).

Outro objetivo desse projeto foi delimitar os possíveis sítios de fosforilação nos fatores EIF4E3 e EIF4E4. Com os dados obtidos através das análises dos géis bidimensionais e das análises *in silico*, conseguimos delimitar a maior parte dos sítios de fosforilação à região N-terminal das proteínas estudadas e sugerir fortemente que essas são substratos de MAP ou cdk quinases. Várias famílias de MKs parecem ser importantes para o controle da iniciação da tradução: (1) As Mnks (*MAPK-interacting Kinases*) são fosforiladas e ativadas por ERKs (Mnk1 e Mnk2) e por p38MAPKs (MnK1), repassando assim os sinais vindos através da estimulação de fatores de crescimento e estresse (Fukunaga e Hunter 1997; Wang *et al.*, 1998). Outro ponto de grande relevância é que as Mnks conectam as MAPKs à iniciação da tradução via fosforilação do eIF4E e a quinase Msk1 (*Mitogen and Stress-activated protein Kinase 1*) media a fosforilação do 4E-BP1 induzida por radiação ultravioleta do tipo B (Liu *et al.*, 2002). Mais recentemente, e já durante a fase final de execução deste trabalho, Urbaniak *et al.*, em 2013, publicou um trabalho no qual foi realizado uma análise quantitativa global do fosfoproteoma das formas sanguínea e procíclica de *T. brucei* usando marcação SILAC em cada etapa do ciclo de vida. O trabalho levou à identificação de um total de 10.096 sítios de fosforilação em 2551 grupos de proteínas, sendo que

9.300 desses sítios (92%) não foram relatados anteriormente. Dentre as proteínas identificadas nesse estudo, estão o EIF4E3 e EIF4E4, com 10 sítios de fosforilação identificados para o EIF4E3 e oito para o EIF4E4. A grande maioria desses sítios de fosforilação identificados localizam-se na região N-terminal de ambas as proteínas, assim como foi mostrado nas análises com as proteínas truncadas nesse trabalho de tese. A fosforilação destas proteínas em outras espécies de tripanosomatídeos já havia sido descrita em artigos de análises de fosfoproteoma, sendo identificadas fosforilação no EIF4E3 de *T. brucei* na forma sanguínea (Nett *et al.*, 2009), em *T. cruzi* (Nakayasu *et al.*, 2009) e no EIF4E4 de *L. infantum* (Hem *et al.*, 2010).

Comparando os resultados desse trabalho com os de *L. amazonenses* (Pereira *et al.*, 2013), foi observada uma semelhança na quantidade de isoformas detectadas para o EIF4E4 de ambas as espécies, entretanto, para o EIF4E3, o número de isoformas divergiu significativamente. Em *T. brucei* os EIF4E3 e EIF4E4 possuem um conjunto de várias isoformas ao passo que em *L. amazonenses* o ortólogo do EIF4E3 possui claramente apenas quatro isoformas bem definidas, e o ortólogo do EIF4E4 possui pelo menos oito isoformas. As análises *in silico* para predição de sítios de fosforilação para MAP/cdk, reforça o que foi visto através da eletroforese bidimensional de ambas as espécies. O EIF4E3 de *L. amazonenses* apresenta poucos sítios para essas quinases, ao contrário do EIF4E3 de *T. brucei*, e o EIF4E4 apresenta múltiplos sítios de fosforilação para essas quinases nas duas espécies analisadas. Esses resultados são compatíveis com uma conservação nos mecanismos de controle da função do EIF4E4 em diferentes espécies de tripanosomatídeos, enquanto que no caso

do EIF4E3 os mecanismos de controle de sua função, inclusive através de fosforilação, parecem divergir.

Um estudo em vertebrados demonstrou que os efeitos da fosforilação do eIF4E na tradução *cap*-dependente *in vitro* são insignificantes. Entretanto, a fosforilação forçada do eIF4E através da superexpressão de Mnks em células de mamíferos levou a uma redução nos níveis de tradução (Knauf *et al.*, 2001). A fosforilação também parece produzir uma modesta diminuição na afinidade do eIF4E por mRNA capeados ou análogos de nucleotídeos capeados (Scheper e Proud, 2002) e análises mutacionais indicam que a fosforilação também é necessária para que ocorra transformação celular (Topisirovic *et al.*, 2004). De fato, descobrir os mecanismos de modulação da síntese protéica devido à fosforilação do eIF4E foi objeto de vários estudos, mas as conseqüências da fosforilação do eIF4E para a regulação da iniciação da tradução permanecem um assunto de debate (Scheper e Proud, 2002). Levando em consideração que o grau de fosforilação dos homólogos de eIF4E de *T. brucei* é bem maior do que o evento único de fosforilação do eIF4E de mamíferos, é possível que o efeito destas fosforilações possam ser completamente diferente do que já foi relatado na literatura. Até o momento, entretanto, os efeitos da fosforilação na iniciação da tradução nos tripanossomatídeos ainda permanecem totalmente obscuros.

6.2 Dinâmica dos novos complexos do tipo eIF4F baseados nos EIF4E5 e EIF4E6

Na segunda etapa desse trabalho, nós avaliamos novos aspectos associados a complexos do tipo eIF4F dos tripanossomatídeos que não foram até o momento evidenciados em outros organismos: a associação de homólogos de

fatores da iniciação da tradução com homólogos de enzimas formadoras do *cap*, formando complexos multiproteicos de localização citoplasmática.

Inicialmente, a co-purificação consistente das proteínas EIF4G1, EIF4G2, Tb117.5, 14-3-3I, 14-3-3II e das proteínas hipotéticas de 47,5-kDa e 17,9 KDa na purificação de proteínas utilizando o EIF4E5-PTP, levou à especulação de que essas proteínas estariam juntas formando um complexo. A técnica de duplo-híbrido e a purificação de proteínas e identificação por MudPIT ajudaram a decifrar a composição desse suposto complexo e as interações diretas que ocorrem entre os membros. Através do duplo-híbrido, Freire *et al*, 2011, demonstrou que o EIF4E5 interage diretamente com dois membros da família eIF4G, os EIF4G1 e EIF4G2, o que por si só já constitui um dado único, uma vez que a interação de um mesmo homólogo de eIF4E com dois homólogos funcionalmente distintos de eIF4G é um dado ainda não observado em outros eucariotos. Em mamíferos há dois eIF4Gs semelhantes, e que possuem funções relacionadas, que se ligam a um mesmo eIF4E. De modo oposto, em *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e leveduras existem múltiplos homólogos de eIF4E com um único eIF4G (Hernandez e Vazquez-Pianzola, 2005).

Com relação aos outros parceiros associados aos complexos identificados, o EIF4G1 também se ligou a Tb117.5, enquanto as duas tentativas (presa e isca) foram negativas para a interação EIF4E5/Tb117.5, revelando que o EIF4G1 é o responsável pela mediação da associação da proteína Tb117.5 com esse complexo (Freire *et al.*, 2014b). A análise através do MudPIT das proteínas Tb117.5, EIF4G1-PTP e EIF4G2-PTP ajudaram a esclarecer que, na verdade, são três complexos possíveis envolvendo o EIF4E5 (Freire *et al.*, 2014b). A

análise da purificação de proteínas utilizando o EIF4E5-PTP, EIF4G1-PTP e do Tb117.5, resultou na co-precipitação recíproca dessas mesmas proteínas, juntamente com a proteína hipotética de 47,5-kDa (Tb927.11.350). Ademais, o EIF4E5-PTP, EIF4G1-PTP também co-precipitam com a proteína regulatória 14-3-3II, mas o Tb117.5, não. De acordo com esses dados supomos que o complexo EIF4E5:EIF4G1 possui um dinamismo com relação aos seus parceiros. Esse complexo pode ligar-se à proteína Tb117.5, ou com a proteína regulatória 14-3-3II (figura 32), que se liga a proteínas com resíduos fosforilados, sugerindo uma implicação do complexo na modificação do *cap* de transcritos específicos (Freire *et al.*, 2014b) e uma possível regulação adicional através da fosforilação. O trabalho de Urbaniak também identificou o EIF4G1 e EIF4G2 como proteínas fosforiladas. O outro complexo é baseado na interação EIF4E5:EIF4G2, o qual distingue-se pela associação com ambas as isoformas de 14-3-3 (Inoue *et al.*, 2005; Benz *et al.*, 2010) e com a proteína hipotética de 17,9-kDa (Tb927.11.6010) (figura 32).

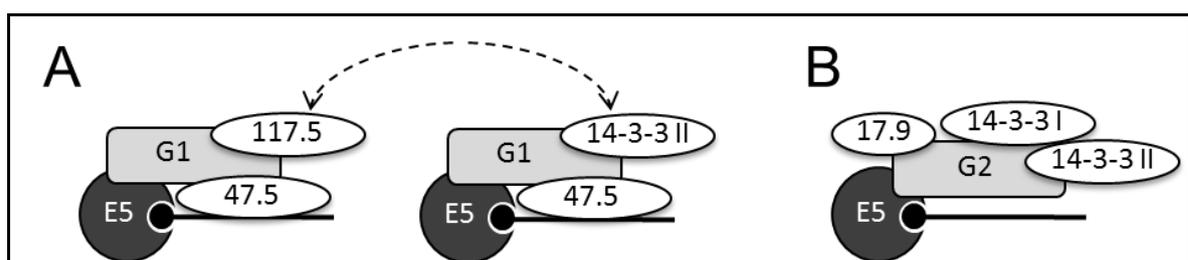


Figura 32. Modelo dos complexos envolvendo o EIF4E5 e as proteínas que co-purificam com o mesmo. (A) O complexo modelo dinâmico EIF4E5/EIF4G1. A proteína de 117,5 kDa, em associação com o EIF4G1 pode ser regulada pela presença da 14-3-3 II, e a ligação dos mesmos pode ser dependente da fosforilação do EIF4G1. As setas tracejadas destacam a dinâmica dos complexos. (B) Os componentes que co-purificam com EIF4E5 e EIF4G2. O RNA (linha preta, com o círculo preto representando o *cap* 4) é reconhecido pelo EIF4E5 (círculo cinza escuro, E5).

O EIF4G2 (retângulo cinza claro, G2) interage diretamente com o EIF4E5. As outras proteínas associadas ao EIF4E5 estão representadas pelas formas ovais. A sobreposição das formas ovais com outras formas é especulativa e baseada na função estruturadora assumida pelo EIF4G2, e as formas não refletem o tamanho da proteína. Fonte: Freire *et al.*, 2014b.

O complexo contendo EIF4E6, EIF4G5, TbG5-IP também foi confirmado do mesmo modo, uma vez que essas proteínas formam a interseção das purificações desse trio de proteínas (figura 33). As interações diretas dentro desse complexo também foram propostas a partir de análises de duplo-híbrido: o EIF4E6 interage diretamente apenas com o membro EIF4G5 da família eIF4G. O EIF4G5 também se ligou a TbG5-IP nas duas configurações, presa e isca, ao passo que o EIF4E6 não interage com TbG5-IP. Esses experimentos de duplo-híbrido revelaram que o EIF4G5 também é o estruturador desse complexo, assim como o EIF4G1, o que faz todo o sentido, tendo em vista a ação de arcabouço do eIF4G dentro do complexo eIF4F (Freire *et al.*, 2014a). Os resultados a respeito desse complexo foram corroborados com os experimentos de gel nativo onde todas as três proteínas (EIF4E6, EIF4G5 e TbG5-IP) formaram complexos semelhantes nas condições analisadas.

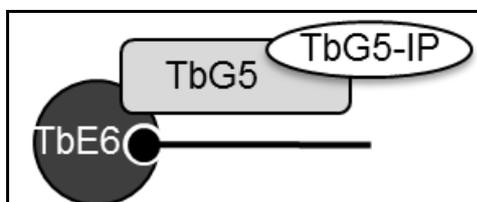


Figura 33. Ilustração dos componentes que co-purificam com o EIF4E6. O RNA (linha preta, com o círculo preto representando o *cap* 4) é reconhecido pelo componente de ligação ao *cap*, eIF4E. O EIF4G5 (retângulo cinza claro) é uma proteína estruturadora do complexo e interage diretamente com EIF4G6 e EIF4G5-IP. Fonte: Freire *et al.*, 2014a.

6.3 O papel de proteínas hipotéticas com possível atividade enzimática de formação do *cap* na função dos novos complexos baseados nos EIF4E5 e EIF4E6

Eucariotos dependem de três reações enzimáticas sequenciais para a formação do *cap* m⁷GpppN: 1) a ação da RNA 5' trifosfatase, 2) RNA guanililtransferase e 3) RNA (guanina-N7) metiltransferase. Embora a organização física do aparelho de formação do *cap* seja bastante distinta em diferentes famílias, até o momento, com o melhor do nosso conhecimento, só foi identificado um único polipeptídeo ou domínio para cada atividade enzimática (Shuman, 2001; Shuman, 2002; Shuman e Lima, 2004; Ghosh e Lima, 2010). Em contraste, uma organização genética diferente existe nos tripanossomatídeos, uma vez que dois domínios de guanililtransferase e dois de metiltransferase já foram identificados e caracterizados previamente: a guanililtransferase TbCe1 (Silva *et al.*, 1998); a enzima bifuncional TbCgm1 que possui atividade catalítica de guanililtransferase e de (guanina-N7) metiltransferase (Hall e Ho, 2006; Takagi *et al.*, 2007) e outra (guanina-N7) metiltransferase separada, TbCmt1 (Hall e Ho, 2006). Além disso, há uma trifosfatase de RNA separada, que é mecanicamente relacionada com as enzimas de fungos (Ho e Shuman, 2001b; Gong *et al.*, 2003). Embora alguns destes polipeptídios tenham sido caracterizados bioquimicamente e a TbCgm1 tenha se mostrado envolvida na formação do *cap*, permanece o desafio para atribuir funções *in vivo* para os outros polipeptídios.

Como parte da caracterização dos complexos envolvendo os EIF4E5 e EIF4E6, os novos homólogos de enzimas possivelmente envolvidas na formação do *cap* foram analisados, TbG5-IP e Tb117.5. TbG5-IP possui domínios de

guanililtransferase e NTPase em sua estrutura, ao passo que Tb117.5 possui domínios de guanililtransferase e metiltransferase. Com a identificação desses genes, agora são quatro domínios de guanililtransferase e três de metiltransferase identificados em *T. brucei*. A presença de vários domínios para enzimas formadoras do *cap* em protozoários tripanossomatídeos e a localização citoplasmática dessas proteínas aqui analisadas foi um dado inesperado e que destaca a singularidade desses parasitas, visto que esse processo em eucariotos ocorre em paralelo à transcrição no núcleo. Até o momento, ainda não foi relatado na literatura a localização celular das proteínas com atividades enzimáticas de formação de *cap* já caracterizadas previamente, TbCe1, TbCgm1e TbCmt1. Por outro lado, como esperado, as metiltransferases que metilam as riboses TbMtr1, TbMtr2 e TbMtr3 possuem localização nuclear (Zamudio *et al.*, 2006; Zamudio *et al.*, 2007).

Outro passo na caracterização das proteínas Tb117.5 e TbG5-IP foi a análise das consequências da depleção delas. O RNAi de Tb117.5 e TbG5-IP gerou resultados conflitantes, uma vez que alterações fenotípicas só foram observadas nos primeiros dias imediatamente após a indução com tetracilina e antes do primeiro repasse para novo meio, o que impossibilitou novas investigações por esta via. As hipóteses de falha na seleção clonal ou escape da maquinaria de RNAi não foram descartadas, mas é possível que a quantidade residual dessas proteínas fosse suficiente para o crescimento celular, uma vez que o RNAi não gera a eliminação total da proteína, mas sim regula negativamente os níveis de mRNA, ao contrário da deleção gênica (*knockout*). De fato, não foi possível gerar uma "clássica" linhagem *knockout*, onde ambos os alelos do gene são substituídos com um marcador de resistência a antibiótico,

indicando que esses genes provavelmente são essenciais. Uma pesquisa de RNAi em larga escala indicou que cada um dos três membros do complexo EIF4E6 é essencial para o crescimento normal das células, incluindo o TbG5-IP, com o comportamento do EIF4G5 em formas sanguíneas em diferenciação, sendo a única exceção. Da mesma forma, a proteína Tb117.5 revelou-se essencial em todos os estágios de vida do parasita, e o EIF4E5 e o EIF4G1 são essenciais em alguns desses estágios (Alsford *et al.*, 2011).

O impacto do *knockdown* do EIF4E5 e EIF4E6, através de RNAi, buscando indícios das funções dos complexos dessas proteínas, também foi analisado. Apesar de não ter sido identificada nenhuma alteração morfológica nas culturas do EIF4E5-PTP sob indução do RNAi, distintos aspectos da motilidade celular foram afetados, como alterações na capacidade de permanecer em suspensão em meio líquido e na perda da motilidade social (SoMo) (Freire *et al.*, 2014b). A depleção do EIF4E6-PTP através da indução do RNAi resultou em uma alta proporção de fenótipos flagelar anormais. Especificamente, os flagelos foram separados do corpo da célula. O desligamento flagelar não foi evidente em culturas vivas e pareceu ser dependente de forças, tais como as de centrifugação e/ou ressuspensão (Freire *et al.*, 2014a). A composição dos complexos envolvendo o EIF4E5 e EIF4E6 levanta um questionamento: uma vez que homólogos do eIF4E reconhecem a extremidade 5'-m7G do RNA, enquanto que a guanililtransferase atua em 5' difosfatos e a N7-metiltransferase requer uma guanossina invertida não modificada, qual é o substrato para os homólogos das enzimas associadas a formação do *cap*? Os fatores do tipo eIF4E são susceptíveis a formar uma interação estável com o RNA, enquanto que as proteínas com atividade de formação e modificação do *cap* podem ter uma

associação transiente com o seu substrato. Até o momento, permanece o questionamento sobre a prioridade de interação dessas proteínas com o *cap* ou o mRNA dentro desse complexo.

A presença de homólogos de enzimas de formação do *cap* num complexo do tipo eIF4F abre uma ampla gama de possibilidades para o destino dos mRNAs associados. Devido aos indícios fornecidos pelos domínios presentes nas proteínas TbG5-IP e Tb117.5, é razoável assumir que esses complexos possam estar envolvidos nas reações de formação do *cap* do mRNA, caso realmente desempenhem atividade catalítica. Assumindo essa possibilidade, transcritos cujo *cap* tenha sido previamente removido poderiam começar seu caminho de retorno à tradução ativa passando por esses complexos citoplasmáticos. Como um precedente, uma atividade de formação de *cap* citosólica já foi identificada em células de mamíferos (Otsuka *et al.*, 2009).

Outra possibilidade levantada para a função desses complexos envolvendo TbG5-IP e Tb117.5 é na atuação na remoção do *cap* (*decapping*) de mRNAs. O fato de o eIF4E de mamíferos ter sido implicado no direcionamento de mRNA para P-bodies destinados ao *turnover* de RNAs, embasa essa hipótese (Andrei *et al.*, 2005; Ferraiuolo *et al.*, 2005). Dados da literatura comprovaram que o *cap* não metilado, produto da reação da guanililtransferase, pode ter o resíduo de guanosina removido por uma reação reversível, no entanto, uma vez metilado para formar m⁷GpppN, a reação é irreversível (Ho *et al.*, 1996). Estranhamente, nenhum homólogo das enzimas conhecidas de remoção do *cap* em eucariotos foi identificada até o momento em tripanossomatídeos (Schwede *et al.*, 2009), embora uma enzima associada a essa função (homólogo de DcpS - *scavenger*) tenha sido caracterizada (Milone *et al.*, 2002; Erben *et al.*, 2014).

As especificidades de ligação de mRNAs do complexo EIF4E6 e EIF4E5 estão sendo examinadas atualmente e ajudarão a proporcionar uma indicação de suas funções. Ademais, análises para averiguar se os TbG5-IP e Tb117.5 possuem ou não atividades catalíticas, serão determinantes nesse processo. Por fim, os dados obtidos através dos fenótipos das análises do RNAi do EIF4E5 e EIF4E6, sugerem que esses complexos podem representar uma via para a expressão de proteínas envolvidas na conexão ao corpo da célula e atividade do flagelo.

7. CONCLUSÕES

- As proteínas EIF4E3, EIF4E4, EIF4G3 e EIF4G4 são expressas constitutivamente na fase procíclica do *T. brucei* porém, a exceção do EIF4G3, representadas por múltiplas isoformas e sujeitas a modificações pós-traducionais do tipo fosforilação.
- Os eventos de fosforilação direcionados aos EIF4E3 e EIF4E4 tem como alvo preferencial as suas regiões N-terminais e, no caso do EIF4E4, variam de acordo com as fases de crescimento do *T. brucei*.
- Sítios potenciais de fosforilação via enzimas MAP ou cdk quinases foram identificados nas regiões N-terminais dos EIF4E3 e EIF4E4.
- As proteínas Tb117.5 e TbG5-IP apresentam domínios associados a formação da extremidade 5' dos mRNAs porém apresentam localização citoplasmática e estão diferencialmente associadas a complexos do tipo eIF4F onde participam os EIF4E5 e EIF4E6.
- A proteína Tb117.5 se associa a uma subpopulação do complexo formado pelos EIF4E5/EIF4G1 apenas na ausência de proteínas regulatórias 14-3-3.
- A proteína TbG5-IP é parte integrante do complexo formado junto com as proteínas EIF4E6/EIF5G5.
- A depleção por RNA interferência das proteínas TbG5-IP e Tb117.5 não alterou a viabilidade celular apesar do insucesso nas tentativas em obter linhagens celulares com deleção dupla dos seus genes.

8. BIBLIOGRAFIA

Acker MG e Lorsch (2008) Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans* 36:653–7. doi: 10.1042/BST0360653

Aitken CE e Lorsch JR (2012) A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nat Struct Mol Biol* 19:568–76. doi: 10.1038/nsmb.2303

Algire M a e Lorsch JR (2006) Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Curr Opin Chem Biol* 10:480–6. doi: 10.1016/j.cbpa.2006.08.010

Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, Hertz-Fowler C e Horn D (2011) High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res* 21:915–24. doi: 10.1101/gr.115089.110

Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R e Lührmann R (2005) A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11:717–727. doi: 10.1261/rna.2340405

Arhin GK, Li H, Ullu E e Tschudi C (2006a) A protein related to the vaccinia virus cap-specific methyltransferase VP39 is involved in cap 4 modification in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 12:53–62. doi: 10.1261/rna.2223406

Arhin GK, Ullu E e Tschudi C (2006b) 2'-O-methylation of position 2 of the trypanosome spliced leader cap 4 is mediated by a 48 kDa protein related to vaccinia virus VP39. *Mol Biochem Parasitol* 147:137–9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.01.011

Bangs JD, Crainll PF, Hashizumell T, Mccloskeyllii JA e Boothroyd JC (1992) Spectrometry of mRNA. 267:9805–9815.

Barry JD, Graham S V, Fotheringham M, Graham VS, Kobryn K e Wymer B (1998) VSG gene control and infectivity strategy of metacyclic stage *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 91:93–105.

Benz C, Engstler M, Hillmer S e Clayton C (2010) Depletion of 14-3-3 proteins in bloodstream-form *Trypanosoma brucei* inhibits variant surface glycoprotein recycling. *Int J Parasitol* 40:629–34. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.10.015

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* (80-) 309:416–22. doi: 10.1126/science.1112642

Blewett NH e Goldstrohm AC (2012) A eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein promotes mRNA decapping and is required for PUF repression. *Mol Cell Biol* 32:4181–94. doi: 10.1128/MCB.00483-12

Brenchley R, Tariq H, McElhinney H, Szöör B, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews K e Tabernero L (2007) The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* 8:434. doi: 10.1186/1471-2164-8-434

Chan CC, Dostie J, Diem MD, Feng W, Mann M, Rappsilber J e Dreyfuss G (2004) eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10:200–209. doi: 10.1261/rna.5230104

Changela A, Ho CK, Martins A, Shuman S, Mondragón A e Mondrago A (2001) Structure and mechanism of the RNA triphosphatase component of mammalian mRNA capping enzyme. *EMBO J* 20:2575–2586. doi: 10.1093/emboj/20.10.2575

Cho PF, Poulin F, Cho-Park YA, Cho-Park IB, Chicoine JD, Lasko P e Sonenberg N (2005) A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* 121:411–23. doi: 10.1016/j.cell.2005.02.024

Chow C, Cloutier S, Dumas C, Chou M-N e Papadopoulou B (2011) Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. *Cell Microbiol* 13:1059–77. doi: 10.1111/j.1462-5822.2011.01602.x

Clarkson BK, Gilbert W V e Doudna J a (2010) Functional overlap between eIF4G isoforms in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5:e9114. doi: 10.1371/journal.pone.0009114

Clayton C e Shapira M (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 156:93–101. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.07.007

Clayton CE (2014) Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 195:96–106. doi: 10.1016/j.molbiopara.2014.06.005

Clayton CE (2002) Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21:1881–1888.

Cloutier S, Laverdière M, Chou MN, Boilard N, Chow C, Papadopoulou B, Cloutier S, Laverdie M e Papadopoulou B (2012) Translational Control through eIF2alpha Phosphorylation during the *Leishmania* Differentiation Process. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0035085

Cohen P (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25:596–601.

Cohen P (2001) The role of protein phosphorylation in human health and disease. *Eur J Biochem* 5010:5001–5010.

Conroy SC, Dever TE, Owens CL e Merrick WC (1990) Characterization of the 46,000-Dalton Subunit of eIF-4F. *Arch Biochem Biophys* 282:363–371.

Cordin O, Banroques J, Tanner NK e Linder P (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367:17–37. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.019

Cunningham I (1977) New culture medium for maintenance of tsetse tissues and growth of trypanosomatids. *J Protozool* 24:325–329. doi: doi: 10.1111/j.1550-7408.1977.tb00987.x

Czichos J, Nonnengaesser C e Overath P (1986) *Trypanosoma brucei*: cis-aconitate and temperature reduction as triggers of synchronous transformation of bloodstream to procyclic trypomastigotes in vitro. *Exp Parasitol* 62:283–291. doi: 10.1016/0014-4894(86)90033-0

Daniels J-P, Gull K e Wickstead B (2010) Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:552–69. doi: 10.1128/MMBR.00024-10

De Gaudenzi, Noé G, Campo VA, Frasc AC e Cassola A (2011) Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem* 31–46. doi: 10.1042/BSE0510031

Decroly E, Ferron F, Lescar J e Canard B (2012) Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol* 10:51–65. doi: 10.1038/nrmicro2675

Dever TE, Dar AC e Sicheri F (2007) The eIF2A KINASES. In: Mathews MB e Sonenberg, N. & Hershey JWB (eds) *Translational control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 319–344

Dhalia R, Marinsek N, Reis CRS, Katz R, Muniz JRC, Standart N, Carrington M e de Melo Neto OP (2006) The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res* 34:2495–507. doi: 10.1093/nar/gkl290

Dhalia R, Reis CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, Standart N e de Melo Neto OP (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 140:23–41. doi: 10.1016/j.molbiopara.2004.12.001

Erben E, Chakraborty C e Clayton C (2014) The CAF1-NOT complex of trypanosomes. *Front Genet* 4:2–5. doi: 10.3389/fgene.2013.00299

Estévez AM, Kempf T e Clayton C (2001) The exosome of *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 20:3831–3839. doi: 10.1093/emboj/20.14.3831

Estévez AM, Lehner B, Sanderson CM, Ruppert T e Clayton C (2003) The roles of intersubunit interactions in exosome stability. *J Biol Chem* 278:34943–34951. doi: 10.1074/jbc.M305333200

Fabrega C, Hausmann S, Shen V, Shuman S e Lima CD (2004) Structure and Mechanism of mRNA Cap (Guanine-N7) Methyltransferase. *Mol Cell* 13:77–89. doi: 10.1016/S1097-2765(03)00522-7

Fenn K e Matthews (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol* 10:539–46. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.014

Ferraiuolo M a., Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR e Sonenberg N (2005) A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol* 170:913–924. doi: 10.1083/jcb.200504039

Franco JR, Simarro PP, Diarra A e Jannin JG (2014) Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clin Epidemiol* 6:257–275. doi: 10.2147/CLEP.S39728

Freire ER, Dhaliya R, Moura DMN, da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CRS, Hughes K, Figueiredo RCBQ, Standart N, Carrington M et al. (2011) The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Mol Biochem Parasitol* 176:25–36. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.11.011

Freire ER, Malvezzi AM, Vashisht A a, Zuberek J, Saada E a, Langousis G, Nascimento JDF, Moura D, Darzynkiewicz E, Hill K et al. (2014a) *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. *Eukaryot Cell* 13:896–908. doi: 10.1128/EC.00071-14

Freire ER, Vashisht A a, Malvezzi AM, Zuberek J, Langousis G, Saada E a, Nascimento JDF, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Hill K et al. (2014b) eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. *RNA* 20:1272–86. doi: 10.1261/rna.045534.114

Fukunaga R e Hunter T (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* 16:1921–33. doi: 10.1093/emboj/16.8.1921

Furic L, Rong L, Larsson O, Hervé I, Yoshida K e Brueschke A (2010) eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *PNAS* 107:14134–14139. doi: 10.1073/pnas.1005320107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005320107

Gadelha C, Holden JM, Allison HC e Field MC (2011) Specializations in a successful parasite: What makes the bloodstream-form African trypanosome so deadly? *Mol Biochem Parasitol* 179:51–58. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.06.006

Gallie DR e Browning KS (2001) eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation, and translation of structured mRNAs. *J Biol Chem* 276:36951–60. doi: 10.1074/jbc.M103869200

Ghosh A e Lima CD (2010) Enzymology of RNA cap synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1:152–172. doi: 10.1002/wrna.19

Gingras, Raught B e Sonenberg N (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 68:913–63. doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.913

Gong C, Martins A e Shuman S (2003) Structure-Function Analysis of *Trypanosoma brucei* RNA Triphosphatase and Evidence for a Two-metal Mechanism. *J Biol Chem* 278:50843–50852. doi: 10.1074/jbc.M309188200

Gong C e Shuman S (2002) *Chlorella virus* RNA triphosphatase. Mutational analysis and mechanism of inhibition by tripolyphosphate. *J Biol Chem* 277:15317–24. doi: 10.1074/jbc.M200532200

Goodfellow IG e Roberts LO (2008) Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 40:2675–80. doi: 10.1016/j.biocel.2007.10.023

Gosselin P, Martineau Y, Morales J, Czjzek M, Glippa V, Gauffeny I, Morin E, Le Corguillé G, Pyronnet S, Cormier P et al. (2013) Tracking a refined eIF4E-binding motif reveals Angel1 as a new partner of eIF4E. *Nucleic Acids Res* 41:7783–92. doi: 10.1093/nar/gkt569

Gradi A, Imataka H, Svitkin Y V, Rom E, Raught B, Morino S e Sonenberg N (1998) A novel functional human eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol Cell Biol* 18:334–342.

Grifo JA, Tahara SM, Leis JP, Morgan MA, Shatkin AJ e Merrick WC (1982) Characterization of Eukaryotic Initiation Factor 4A, a Protein Involved of Globin mRNA * in ATP-dependent Binding. *J Biol Chem* 257:5246–5252.

Groppo R e Richter JD (2009) Translational control from head to tail. *Curr Opin Cell Biol* 21:444–51. doi: 10.1016/j.ceb.2009.01.011

Gross JD, Moerke NJ, Von Der Haar T, Lugovskoy AA, Sachs AB, McCarthy JEG e Wagner G (2003) Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115:739–750. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00975-9

Haile S e Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 10:569–77. doi: 10.1016/j.mib.2007.10.001

Håkansson K, Doherty AJ, Shuman S e Wigley DB (1997) X-Ray Crystallography Reveals a Large Conformational Change during Guanyl Transfer by mRNA Capping Enzymes. *Cell* 89:545–553. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80236-6

Hall MP e Ho CK (2006) Characterization of a *Trypanosoma brucei* RNA cap (guanine N-7) methyltransferase. *RNA* 12:488–497. doi: 10.1261/rna.2250606

Hammarton TC, Monnerat S e Mottram JC (2007) Cytokinesis in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol* 10:520–7. doi: 10.1016/j.mib.2007.10.005

Hausmann S, Altura M a, Witmer M, Singer SM, Elmendorf HG e Shuman S (2005) Yeast-like mRNA capping apparatus in *Giardia lamblia*. *J Biol Chem* 280:12077–86. doi: 10.1074/jbc.M412063200

Hem S, Gherardini PF, Osorio y Fortéa J, Hourdel V, Morales M a, Watanabe R, Pescher P, Kuzyk M a, Smith D, Borchers CH et al. (2010) Identification of *Leishmania*-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* 10:3868–83. doi: 10.1002/pmic.201000305

Hernández G, Altmann M, Sierra JM, Urlaub H, Diez del Corral R, Schwartz P e Rivera-Pomar R (2005) Functional analysis of seven genes encoding eight translation initiation factor 4E (eIF4E) isoforms in *Drosophila*. *Mech Dev* 122:529–43. doi: 10.1016/j.mod.2004.11.011

Hershey JWB, Sonenberg N e Mathews MB (2012) Principles of translational control: An overview. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1–10. doi: 10.1101/cshperspect.a009829

Hinnebusch AG (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem* 83:779–812. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035802

Hinnebusch AG e Lorsch JR (2012) The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:1–25. doi: 10.1101/cshperspect.a011544

Ho CK e Shuman S (2001a) A yeast-like mRNA capping apparatus in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3050–5. doi: 10.1073/pnas.061636198

Ho CK e Shuman S (2001b) *Trypanosoma brucei* RNA triphosphatase: Antiprotozoal drug target and guide to eukaryotic phylogeny. *J Biol Chem* 276:46182–46186. doi: 10.1074/jbc.M108706200

Ho CK, Van Etten JL e Shuman S (1996) Expression and characterization of an RNA capping enzyme encoded by *Chlorella virus* PBCV-1. *J Virol* 70:6658–6664.

Holmberg CI, Tran SEF, Eriksson JE e Sistonen L (2002) Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 27:619–27.

Hundsdoerfer P, Thoma C e Hentze MW (2005) Eukaryotic translation initiation factor 4G1 and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven

translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13421–6. doi: 10.1073/pnas.0506536102

Imataka H e Sonenberg N (1997) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol* 17:6940–6947.

Inoue M, Nakamura Y, Yasuda K, Yasaka N, Hara T, Schnauffer A, Stuart K e Fukuma T (2005) The 14-3-3 proteins of *Trypanosoma brucei* function in motility, cytokinesis, and cell cycle. *J Biol Chem* 280:14085–96. doi: 10.1074/jbc.M412336200

Jackson RJ, Hellen CUT e Pestova T V (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113–27. doi: 10.1038/nrm2838

Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B e Place AR (2012) Diversity of Eukaryotic Translational Initiation Factor eIF4E in Protists. *Comp Funct Genomics* 2012:134839. doi: 10.1155/2012/134839

Jankowska-Anyszka M, Lamphear BJ, Aamodt EJ, Harrington T, Darzynkiewicz E, Stolarski R e Rhoads RE (1998) Multiple Isoforms of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4E in *Caenorhabditis elegans* Can Distinguish between Mono- and Trimethylated mRNA Cap Structures. *J Biol Chem* 273:10538–10542. doi: 10.1074/jbc.273.17.10538

Jones A, Faldas A, Foucher A, Hunt E, Tait A, Wastling JM e Turner CM (2006) Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 6:259–67. doi: 10.1002/pmic.200500119

Joshi B, Cameron A e Jagus R (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem* 271:2189–203. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04149.x

Joshi B, Lee K, Maeder DL e Jagus R (2005) Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol Biol* 5:48. doi: 10.1186/1471-2148-5-48

Jung H, Gkogkas CG, Sonenberg N e Holt CE (2014) Remote Control of Gene Function by Local Translation. *157:26–40*. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.005

Keiper BD (2000) Functional Characterization of Five eIF4E Isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275:10590–10596. doi: 10.1074/jbc.275.14.10590

Kelley LA e Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 4:363–371. doi: 10.1038/nprot.2009.2

Kelly S, Reed J, Kramer S, Ellis L, Webb H, Sunter J, Salje J, Marinsek N, Gull K, Wickstead B et al. (2007) Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and

ectopic gene loci. *Mol Biochem Parasitol* 154:103–9. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.03.012

Kennedy PGE (2008) The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Ann Neurol* 64:116–26. doi: 10.1002/ana.21429

Knauf U, Tschopp C e Gram H (2001) Negative Regulation of Protein Translation by Mitogen-Activated Protein Kinase-Interacting Kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol*. doi: 10.1128/MCB.21.16.5500

Knebel A, Haydon CE, Morrice N e Cohen P (2002) Stress-induced regulation of eukaryotic elongation factor 2 kinase by SB 203580-sensitive and -insensitive pathways. *Biochem J* 532:525–532.

Kramer S (2012) Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol* 181:61–72. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.10.002

Kramer S e Carrington M (2011) Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *Trends Parasitol* 27:23–30. doi: 10.1016/j.pt.2010.06.011

Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Webb H, Hoheisel JD, Clayton C e Carrington M (2008) Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. *J Cell Sci* 121:3002–14. doi: 10.1242/jcs.031823

Kutuzov M a e Andreeva A V (2008) Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 161:81–90. doi: 10.1016/j.molbiopara.2008.06.008

Laird PW, Zomerdijk JCBM, Kortel D De, de Korte D e Borst P (1987) In vivo labelling of intermediates in the discontinuous synthesis of mRNAs in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 6:1055–1062.

Lamb JR, Fu V, Wirtz E e Bangs JD (2001) Functional Analysis of the Trypanosomal AAA Protein TbVCP with trans-Dominant ATP Hydrolysis Mutants. *J Biol Chem* 276:21512–21520. doi: 10.1074/jbc.M100235200

Lazaris-Karatzas A, Montine KS e Sonenberg N (1990) Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature* 345:544–547.

LeFebvre AK, Korneeva NL, Trutschl M, Cvek U, Duzan RD, Bradley C a, Hershey JWB e Rhoads RE (2006) Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J Biol Chem* 281:22917–32. doi: 10.1074/jbc.M605418200

Li C-H, Irmer H, Gudjonsdottir-Planck D, Freese S, Salm H, Haile S, Estévez AM e Clayton C (2006) Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'->3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA* 12:2171–86. doi: 10.1261/rna.291506

Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Richter-Cook NJ, Merrick WC e Sonenberg N (1999) Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol* 19:7336–7346.

Lima CD, Wang LK e Shuman S (1999) Structure and mechanism of yeast RNA triphosphatase: an essential component of the mRNA capping apparatus. *Cell* 99:533–543.

Lima RP (2014) Avaliação de propriedades biológicas e de parceiros funcionais de dois homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G de *Trypanosoma brucei*. 101.

Liu G, Zhang Y, Bode AM, Ma W-Y e Dong Z (2002) Phosphorylation of 4E-BP1 is mediated by the p38/MSK1 pathway in response to UVB irradiation. *J Biol Chem* 277:8810–6. doi: 10.1074/jbc.M110477200

Lu W-T, Wilczynska A, Smith E e Bushell M (2014) The diverse roles of the eIF4A family: you are the company you keep. *Biochem Soc Trans* 42:166–72. doi: 10.1042/BST20130161

Mackey ZB, Koupparis K, Nishino M e McKerrow JH (2011) High-throughput analysis of an RNAi library identifies novel kinase targets in *Trypanosoma brucei*. *Chem Biol Drug Des* 78:454–63. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01156.x

Mair G, Ullu E e Tschudi C (2000) Cotranscriptional cap 4 formation on the *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA. *J Biol Chem* 275:28994–9. doi: 10.1074/jbc.M004193200

Malvezzi AM (2010) Identificação de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei*. Universidade Federal de Pernambuco

Malvy D e Chappuis F (2011) Sleeping sickness. *Clin Microbiol Infect* 17:986–95. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x

Mamane Y, Petroulakis E, Rong L, Yoshida K, Ler LW e Sonenberg N (2004) eIF4E--from translation to transformation. *Oncogene* 23:3172–9. doi: 10.1038/sj.onc.1207549

Mao X, Schwer B e Shuman S (1995) Yeast mRNA cap methyltransferase is a 50-kilodalton protein encoded by an essential gene. *Mol Cell Biol* 15:4167–4174.

Marchini FK, de Godoy LMF, Rampazzo RCP, Pavoni DP, Probst CM, Gnad F, Mann M e Krieger M a (2011) Profiling the *Trypanosoma cruzi* Phosphoproteome. *PLoS One* 6:e25381. doi: 10.1371/journal.pone.0025381

Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N e Burley SK (1997) X-ray studies of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Nucleic Acids Symp Ser* 89:8–11. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80280-9

Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N e Wagner G (2010) complex in translation initiation. *Cell* 136:447–460. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.014.Topology

Martínez-Calvillo S, Vizuet-De-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG and Figueroa-Angulo EE (2010) Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010:525241. doi: 10.1155/2010/525241

Milone J, Wilusz J e Bellofatto V (2002) Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. *Medicine (Baltimore)* 30:4040–4050.

Morales M a, Watanabe R, Dacher M, Chafey P, Osorio y Fortéa J, Scott D a, Beverley SM, Ommen G, Clos J, Hem S et al. (2010) Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:8381–6. doi: 10.1073/pnas.0914768107

Morales M a, Watanabe R, Laurent C, Lenormand P, Rousselle J-C, Namane A e Späth GF (2008) Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro- and amastigote stages. *Proteomics* 8:350–63. doi: 10.1002/pmic.200700697

Moura (2007) Utilização de abordagens moleculares in vivo no estudo de homólogos do fator de iniciação da tradução 4G (eIF4G) de tripanosomatídeos. 126.

Moura DM, Reis CR, Xavier CC, Lima TD da C, Lima RP, Carrington M e Neto OP de M (artigo aceito) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol.*

Murphy WJ, Watkins KFP, Agabian N e Hall W (1986) Identification of a Novel Y Branch Structure as an Intermediate in Trypanosome mRNA Processing: Evidence for Trans Splicing. *Cell* 47:517–525. doi: 10.1016/0092-8674(86)90616-1

Nakayasu ES, Gaynor MR, Sobreira TJP, Ross JA e Almeida IC (2009) Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. *Proteomics* 9:3489–3506. doi: 10.1002/pmic.200800874.Phosphoproteomic

Nascimento LM (2012) ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE HOMÓLOGOS DO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4G AO LONGO DO CICLO DE VIDA DE *Leishmania amazonensis*. 1–93.

Naula C, Parsons M e Mottram JC (2005) Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. *Biochim Biophys Acta* 1754:151–9. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.08.018

Nett IRE, Davidson L, Lamont D e Ferguson M a J (2009a) Identification and specific localization of tyrosine-phosphorylated proteins in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 8:617–26. doi: 10.1128/EC.00366-08

Nett IRE, Martin DM a, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber JD, Mehlert A e Ferguson M a J (2009b) The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell proteomics* 8:1527–38. doi: 10.1074/mcp.M800556-MCP200

Nielsen PJ e Trachsel H (1988) The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J* 7:2097–2105.

Otsuka Y, Kedersha NL e Schoenberg DR (2009) Identification of a cytoplasmic complex that adds a cap onto 5'-monophosphate RNA. *Mol Cell Biol* 29:2155–2167. doi: 10.1128/MCB.01325-08

Parsons M, Worthey E a, Ward PN e Mottram JC (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6:127. doi: 10.1186/1471-2164-6-127

Peng J, Elias JE, Thoreen CC, Licklider LJ e Gygi SP (2003) Evaluation of multidimensional chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/LC-MS/MS) for large-scale protein analysis: The yeast proteome. *J Proteome Res* 2:43–50. doi: 10.1021/pr025556v

Pereira MMC (2008) Análise da expressão e investigação de mecanismos envolvidos com o controle da atividade de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*. 120.

Pestova, Lorsch JR e Hellen CUT (2007) The mechanism of translation initiation in eukaryotes. *Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 87–128

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

Pierrat O a, Mikitova V, Bush MS, Browning KS e Doonan JH (2007) Control of protein translation by phosphorylation of the mRNA 5'-cap-binding complex. *Biochem Soc Trans* 35:1634–7. doi: 10.1042/BST0351634

Preußner C, Jaé N e Bindereif A (2012) mRNA splicing in trypanosomes. *Int J Med Microbiol* 302:221–4. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.07.004

Prévôt D, Darlix J-L, Ohlmann T e Prevot D (2003) Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol Cell* 95:141–156. doi: 10.1016/S0248-4900(03)00031-5

Proud CG (2014) *Biochimica et Biophysica Acta Mnks* , eIF4E phosphorylation and cancer ☆.

Ptushkina M, Berthelot K, von der Haar T, Geffers L, Warwicker J e McCarthy JE (2001) A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. *Nucleic Acids Res* 29:4561–4569. doi: 10.1093/nar/29.22.4561

Pyronnet S, Imataka H, Gingras a C, Fukunaga R, Hunter T e Sonenberg N (1999) Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J* 18:270–9. doi: 10.1093/emboj/18.1.270

Ramírez-Valle F, Braunstein S, Zavadil J, Formenti SC e Schneider RJ (2008) eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy. *J Cell Biol* 181:293–307. doi: 10.1083/jcb.200710215

Raugh B e Gingras (2007) Signaling to translation initiation. *Translational control in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 369–400

Rhoads RE (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* 284:16711–5. doi: 10.1074/jbc.R900002200

Roach PJ (1991) Multisite and hierarchal protein phosphorylation. *J Biol Chem* 266:14139–42.

Rogers GW, Richter NJ e Merrick WC (1999) Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A. *J Biol Chem* 274:12236–12244. doi: 10.1074/jbc.274.18.12236

Rolin S, Hanocq-Quertier J, Paturiaux-Hanocq F, Nolan DP e Pays E (1998) Mild acid stress as a differentiation trigger in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 93:251–262. doi: 10.1016/S0166-6851(98)00046-2

Rosenzweig D, Smith D, Myler PJ, Olafson RW e Zilberstein D (2008) Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. *Proteomics* 8:1843–50. doi: 10.1002/pmic.200701043

Roux PP e Blenis J (2004) ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases : a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:320–344. doi: 10.1128/MMBR.68.2.320

Ruan J, Shen S, Ullu E e Tschudi C (2007) Evidence for a capping enzyme with specificity for the trypanosome spliced leader RNA. 156:246–254. doi: 10.1016/j.molbiopara.2007.09.001.Evidence

Rush J, Moritz A, Lee K a, Guo A, Goss VL, Spek EJ, Zhang H, Zha X-M, Polakiewicz RD e Comb MJ (2005) Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat Biotechnol* 23:94–101. doi: 10.1038/nbt1046

Sbicego S, Vassella E, Kurath U, Blum B e Roditi I (1999) The use of transgenic *Trypanosoma brucei* to identify compounds inducing the differentiation of bloodstream forms to procyclic forms. *Mol Biochem Parasitol* 104:311–322. doi: 10.1016/S0166-6851(99)00157-7

Schägger H e von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223–231. doi: 10.1016/0003-2697(91)90094-A

Scheper GC e Proud CG (2002) Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur J Biochem* 269:5350–5359. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.03291.x

Schimanski B, Nguyen TN, Günzl A e Gu A (2005) Highly Efficient Tandem Affinity Purification of Trypanosome Protein Complexes Based on a Novel Epitope Combination Highly Efficient Tandem Affinity Purification of Trypanosome Protein Complexes Based on a Novel Epitope Combination. doi: 10.1128/EC.4.11.1942

Schwede A, Manful T, Jha BA, Helbig C, Bercovich N, Stewart M e Clayton C (2009) The role of deadenylation in the degradation of unstable mRNAs in trypanosomes. *Nucleic Acids Res* 37:5511–5528. doi: 10.1093/nar/gkp571

Shibagaki Y, Itoh N, Yamada H, Nagata S e Mizumoto K (1992) mRNA Capping Enzyme. *J Biol Chem* 214:9521–9528.

Shuman S (2001) Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66:1–40.

Shuman S (2002) What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:619–625. doi: 10.1038/nrm880

Shuman S e Lima CD (2004) The polynucleotide ligase and RNA capping enzyme superfamily of covalent nucleotidyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 14:757–64. doi: 10.1016/j.sbi.2004.10.006

Silva E, Ullu E, Kobayashi R e Tschudi C (1998) Trypanosome capping enzymes display a novel two-domain structure. *Mol Cell Biol* 18:4612–4619.

Simarro P, Franco J, Diarra A, Postigo JR e Jannin J (2013) Diversity of human African trypanosomiasis epidemiological settings requires fine-tuning control strategies to facilitate disease elimination. 1–6.

Sonenberg e Hinnebusch AG (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731–45. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.042

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

Sturm NR, Zamudio JR e Campbell DA (2012) RNA Metabolism in Trypanosomes. *Nucleic Acids Mol Biol*. doi: 10.1007/978-3-642-28687-2

Sutton RE e Boothroyd JC (1986) Evidence for Trans splicing in trypanosomes. *Cell* 47:527–535.

Szöör B (2010) Trypanosomatid protein phosphatases. *Mol Biochem Parasitol* 173:53–63. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.05.017

Takagi T, Moore CR, Diehn F e Buratowski S (1997) An RNA 5'-triphosphatase related to the protein tyrosine phosphatases. *Cell* 89:867–873. doi: S0092-8674(00)80272-X [pii]

Takagi Y, Sindkar S, Ekonomidis D, Hall MP e Ho CK (2007) *Trypanosoma brucei* encodes a bifunctional capping enzyme essential for cap 4 formation on the spliced leader RNA. *J Biol Chem* 282:15995–6005. doi: 10.1074/jbc.M701569200

Tarrant MK e Cole PA (2009) The Chemical Biology of Protein Phosphorylation. *Annu Rev Biochem* 78:797–825. doi: 10.1146/annurev.biochem.78.070907.103047.The

Tarun SZ, Wells SE, Deardorff JA e Sachs AB (1997) Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9046–9051. doi: 10.1073/pnas.94.17.9046

Tonelli RR, Augusto LDS, Castilho B a., Schenkman S, Augusto S, Castilho B a., Schenkman S, da Silva Augusto L, Castilho B a. e Schenkman S (2011) Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2?? is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS One* 6:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0027904

Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M e Borden KLB (2004) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer Res* 64:8639–42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2677

Topisirovic I, Svitkin Y V., Sonenberg N e Shatkin AJ (2011) Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2:277–298. doi: 10.1002/wrna.52

Tsukamoto T, Shibagaki Y, Imajoh-Ohmi S, Murakoshi T, Suzuki M, Nakamura A, Gotoh H e Mizumoto K (1997) Isolation and characterization of the yeast mRNA capping enzyme beta subunit gene encoding RNA 5'-triphosphatase, which is essential for cell viability. *Biochem Biophys Res Commun* 239:116–122. doi: 10.1006/bbrc.1997.7439

Ueda T, Sasaki M, Elia AJ, In I, Chio C, Hamada K e Fukunaga R (2010) Combined deficiency for MAP kinase-interacting kinase 1 and 2 (Mnk1 and Mnk2) delays tumor development. *Proc Natl Acad Sci* 2:1–7. doi: 10.1073/pnas.1008136107/- /DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1008136107

Ueda T, Watanabe-fukunaga R e Fukuyama H (2004) Mnk2 and Mnk1 Are Essential for Constitutive and Inducible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4E but Not for Cell Growth or Development. *Mol Cell Biol* 24:6539–6549. doi: 10.1128/MCB.24.15.6539

Urbaniak MD (2014) Trypanosomatid Phosphoproteomics. In: Doerig C, Späth G e Wiese M (eds) *Protein Phosphorylation in Parasites: Novel Targets for Antiparasitic Intervention*, First edit. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp 63–77

Urbaniak MD, Martin DMA e Ferguson MAJ (2013) Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. *J Proteome Res* 12:2233–2244. doi: 10.1021/pr400086y

Urbaniak MD, Mathieson T, Bantscheff M, Eberhard D, Grimaldi R, Miranda-Saavedra D, Wyatt P, Ferguson MAJ, Frearson J e Drewes G (2012) Chemical proteomic analysis reveals the drugability of the kinome of *trypanosoma brucei*. *ACS Chem Biol* 7:1858–1865. doi: 10.1021/cb300326z

Utter CJ, Garcia SA, Milone J e Bellofatto V (2011) Poly(A)-specific ribonuclease (PARN-1) function in stage-specific mRNA turnover in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 10:1230–1240. doi: 10.1128/EC.05097-11

Von der Haar T, Gross JD, Wagner G e McCarthy JEG (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol* 11:503–11. doi: 10.1038/nsmb779

Walsh CT, Garneau-Tsodikova S e Gatto GJ (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chemie* 44:7342–72. doi: 10.1002/anie.200501023

Wang X, Flynn a, Waskiewicz a J, Webb BL, Vries RG, Baines I a, Cooper J a e Proud CG (1998) The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem* 273:9373–7.

Weinstein DC, Honoré E e Hemmati-Brivanlou A (1997) Epidermal induction and inhibition of neural fate by translation initiation factor 4AIII. *Development* 124:4235–4242.

Wendel H-G, Silva RL a, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukunaga R, Teruya-Feldstein J, Pelletier J et al. (2007) Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes Dev* 21:3232–7. doi: 10.1101/gad.1604407

- Wickstead B, Ersfeld K e Gull K (2002) Targeting of a tetracycline-inducible expression system to the transcriptionally silent minichromosomes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 125:211–6.
- Wirtz E, Leal S, Ochatt C e Cross G a (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99:89–101.
- Yoder-Hill J, Pause A, Sonenberg N e Merrick WC (1993) The p46 subunit of eukaryotic initiation factor (eIF)-4F exchanges with eIF-4A. *J Biol Chem* 268:5566–5573.
- Yoffe Y, Léger M, Zinoviev A, Zuberek J, Darzynkiewicz E, Wagner G e Shapira M (2009) Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res* 37:3243–53. doi: 10.1093/nar/gkp190
- Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Stepinski J, Altmann M, Darzynkiewicz E e Shapira M (2006) Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 5:1969–79. doi: 10.1128/EC.00230-06
- Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira ZI V, Keasar C, Orr-dahan I, Jankowska-anyszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E e Shapira M (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *RNA* 1764–1775. doi: 10.1261/rna.7520404.mammalian
- Zamudio JR, Mitra B, Chattopadhyay A, Wohlschlegel JA, Sturm NR e Campbell DA (2009) *Trypanosoma brucei* spliced leader RNA maturation by the cap 1 2'-O-ribose methyltransferase and SLA1 H/ACA snoRNA pseudouridine synthase complex. *Mol Cell Biol* 29:1202–1211. doi: 10.1128/MCB.01496-08
- Zamudio JR, Mitra B, Foldynová-Trantírková S, Zeiner GM, Lukes J, Bujnicki JM, Sturm NR e Campbell D a (2007) The 2'-O-ribose methyltransferase for cap 1 of spliced leader RNA and U1 small nuclear RNA in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 27:6084–92. doi: 10.1128/MCB.00647-07
- Zamudio JR, Mitra B, Zeiner GM, Feder M, Bujnicki JM, Sturm NR e Campbell D a (2006) Complete cap 4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 5:905–15. doi: 10.1128/EC.00080-06
- Zinoviev A, Léger M, Wagner G e Shapira M (2011) A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Res* 39:8404–15. doi: 10.1093/nar/gkr555
- Zinoviev A e Shapira M (2012) Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. *Comp Funct Genomics* 2012:813718. doi: 10.1155/2012/813718