

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

TESE DE DOUTORADO

**Identificação e caracterização de modificações
pós-traducionais em homólogos de fatores de
iniciação da tradução em *Leishmania* sp.**

MARIANA MARQUES COUTELO PEREIRA

VIRTUS IMPAVIDA

Recife

2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**Identificação e caracterização de modificações pós-
traducionais em homólogos de fatores de iniciação da
tradução em *Leishmania* sp.**

MARIANA MARQUES COUTELO PEREIRA

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: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Recife 2013

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

Pereira, Mariana Coutelo

Identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Leishmania* sp. / Mariana Marques Coutelo Pereira. – Recife: O Autor, 2016.

170 f.: il.

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

1. Protozoário 2. Leishmania 3. Genética I. de Melo Neto, Osvaldo Pompílio (orient.) II. Título.

579.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-206

MARIANA MARQUES COUTELO PEREIRA

Identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Leishmania* sp.

Aprovado em 28/06/2013

Banca Examinadora:

**Dr. Fabrício Klerynton Marchini
Instituto Carlos Chagas – ICC/Fiocruz**

**Dr. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz**

**Dr. Tercílio Calsa Júnior
Departamento de Genética – UFPE**

**Dr. Antônio Carlos de Freitas
Departamento de Genética – UFPE**

**Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CpqAM/Fiocruz**

Orientador:

Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Coordenador do Programa:

Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Recife, 2013

Ao meu Marido Expedito Júnior, que me deu o presente mais lindo de toda a minha vida.... Nossa pequena, Maria Luísa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que sempre está comigo e que nos momentos difíceis não me deixa esmorecer....jamais!

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, por toda confiança depositada, pelos ensinamentos durante esses 10 anos de convivência, e pela orientação neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio técnico dado para realização do trabalho e aos órgãos de fomento CNPq, FACEPE e CAPES.

A todos os meus amigos do Aggeu e companheiros do grupo, principalmente Dani, Christian, Amaranta e Larissa, pela troca contínua de conhecimento, com muito humor e muita risada!. Um agradecimento especial também à Rômulo e Camila, que me ajudaram nos experimentos finais deste trabalho.

Às minhas eternas amigas da faculdade, Mari Andrade, Januana Teixeira e Cynthia Maria, pelo apoio, mesmo à distância!

A todos os meus amigos, que me apoiam, torcem pelo meu sucesso e vibram com minhas vitórias, mesmo alguns deles não entendendo nada do meu trabalho. Amigos são irmãos que a gente escolhe! Feliz é aquele que possui vários amigos!

Queria agradecer à minha mãe Denise e ao meu Pai José Augusto, por todo o esforço e dedicação para com meus estudos, por todo o conforto e carinho dado e pelos momentos de descontração e descanso, que são tão importantes quanto o trabalho em si. Quero agradecer ao meu irmão Daniel e à minha irmã Gabriela por estarem sempre ao meu lado e torcerem pelo meu sucesso.

À minha outra família, que me acolheu tão carinhosamente, minha sogra Dora, minhas cunhadas Mariana e Cristiane e ao meu cunhado Paulo, por todo o carinho e confiança depositados em mim. Muito obrigada!

E, finalmente, queria agradecer ao meu marido, companheiro e melhor amigo, Expedito Júnior, que me proporcionou neste Doutorado o maior e melhor de todos os meus experimentos.... o de ser Mãe!! Queria agradecer à minha pequena Maria Luísa pelo simples fato de existir em minha vida e me fazer querer ser sempre uma pessoa melhor do que sou! TE AMO, minha pequena, minha vidinha, minha princesa, minha MALU!

**“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original”**

(Albert Einstein)

Resumo

A iniciação da tradução em eucariotos é um ponto crucial no processo de síntese protéica e de sua regulação. Nesta etapa atua o complexo heterotrimérico eIF4F (formado pelas subunidades eIF4E, eIF4G e eIF4A), que atua recrutando a subunidade ribossomal 40S para o mRNA, para iniciar a tradução. O reconhecimento dos mRNAs se dá pela ligação da subunidade eIF4E no *cap* presente na sua extremidade 5', junto com a ligação da proteína de ligação ao poli-A (PABP), que interage diretamente com o eIF4G, na extremidade 3' destes mesmos mRNAs. Vários homólogos destes fatores foram encontrados nos tripanosomatídeos, indicando uma complexidade na iniciação da tradução que pode estar associada aos ciclos de vida únicos destes parasitas. Destes, dois complexos eIF4F típicos foram caracterizados, baseados em dois homólogos de eIF4E denominados de EIF4E3 e EIF4E4. Neste trabalho, a análise da expressão destas duas proteínas em *Leishmania amazonensis* mostrou que ambas são alvos de modificações pós-traducionais, identificadas como fosforilação, gerando múltiplas isoformas. O padrão de expressão dos dois conjuntos de isoformas é alterado com a inibição do processamento de mRNAs e a inibição da tradução interfere especificamente com as isoformas do EIF4E3. Curvas de sincronização celular sugerem uma associação de isoformas específicas com o ciclo celular do parasita. Múltiplos eventos de fosforilação parecem agir, porém de forma diferenciada, sobre os dois homólogos eIF4E. Diferentemente do EIF4E4, o EIF4E3 possui diferenças de expressão entre espécies de *Leishmania*, com uma banda de maior peso molecular, típica de células estressadas, encontrada apenas em *L. amazonensis*. A análise da seqüência do gene *EIF4E3* de três espécies de *Leishmania* mostrou que poucas mudanças de aminoácidos levam a diferenças marcantes de migração das respectivas proteínas em gel desnaturante. Ensaio de mutagênese, associados a expressão ectópica do EIF4E3 contendo um epítipo HA em células de *Leishmania* transfectadas, identificou a serina 75, exclusiva de *L. amazonensis*, como sítio responsável pela geração da isoforma específica desta espécie. Análises em gel bidimensional mostraram que esta isoforma não está associada a alterações no ponto isoelétrico, indicando que outro tipo de modificação, além das fosforilação, deve ter como alvo o EIF4E3. Experimentos de interação *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os EIF4E3 e 4 interagem diferencialmente com homólogos de PABP e realizam outras interações conservadas em espécies de tripanosomatídeos. Os resultados obtidos neste trabalho indicam uma complexa regulação destes fatores, através de múltiplos sítios de fosforilação, provavelmente relacionada com o ciclo celular do parasita.

Palavras-chave: *Leishmania* sp.; modificações pós-traducionais, EIF4E, fosforilação.

Abstract

Translation initiation in eukaryotes is a critical stage within the process of protein synthesis and its regulation. A major player is the heterotrimeric eIF4F complex (formed by the eIF4E, eIF4G and eIF4A subunits) which acts by recruiting the 40S ribosomal subunit to the mRNA to initiate translation. mRNA recognition occurs through the binding of the eIF4E subunit to its 5' end cap as well as the binding of the poly-A binding protein (PABP), which interacts directly with eIF4G, to its 3' end poly-A tail. Various homologues for the eIF4F subunits were found in trypanosomatids, indicating a greater complexity within translation initiation which can be associated with the parasites unique life cycle. Two typical eIF4F complexes were characterized based on two eIF4E homologues, named EIF4E3 and EIF4E4. In this study, expression analysis of both proteins in *Leishmania amazonensis* showed that both are targets for post-translational modifications, identified as phosphorylation, leading to multiple isoforms. The expression pattern of the two sets of isoforms is altered with inhibition of mRNA processing but translation inhibition specifically interferes with the EIF4E3 isoforms. Cell synchronization curves suggest an association of specific isoforms with the parasite cell cycle. Multiple phosphorylation events appear to differentially target the two eIF4E homologues. Unlike EIF4E4, expression of EIF4E3 differs between *Leishmania* species, with a higher molecular weight band, typical of stressed cells, found only in *L. amazonensis*. Sequence analysis of the EIF4E3 gene from three *Leishmania* species showed that few amino acid changes lead to marked differences in migration of the respective proteins in denaturing gel. Mutagenesis assays associated with ectopic expression of an HA-tagged EIF4E3 in transfected *Leishmania* identified serine 75, exclusive of *L. amazonensis*, as a site responsible for generating the isoform specific to this species. Two-dimensional gel analysis showed that this isoform is not associated with changes in isoelectric point, indicating that other modifications, in addition to phosphorylation, must target EIF4E3. *In vitro* and *in vivo* interaction studies demonstrated that EIF4E3 and 4 differentially bind to PABP homologues as well as performing other interactions conserved in various trypanosomatid species. The results produced in this study indicate a complex regulation of these factors through multiple phosphorylation sites, probably related to the cell cycle of the parasite.

Key words: *Leishmania* sp., post-translational modifications, EIF4E, phosphorylation

Lista de Ilustrações

Figura 1. Principais formas morfológicas da <i>Leishmania</i> sp.	6
Figura 2. Vetores invertebrados da leishmaniose	7
Figura 3. Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp	12
Figura 4. Conservação de genes entre os tripanosomatídeos	15
Figura 5. Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos	16
Figura 6. Diferenças no mecanismo de <i>cis</i> e <i>trans-splicing</i> nos eucariotos.	19
Figura 7. Estrutura do cap4 de tripanosomatídeos.	21
Figura 8. Mecanismo geral da iniciação da tradução em eucariotos.	26
Figura 9. Função do complexo eIF4F na iniciação da tradução em eucariotos.	28
Figura 10. eIF4GI e seus domínios de interação	32
Figura 11. Estrutura tridimensional do eIF4E de camungongo.	36
Figura 12. Regulação da atividade do eIF4E pelas 4E-BPs.	45
Figura 13. Análise da expressão de homólogos selecionados de eIF4E de <i>Leishmania</i> durante curva de crescimento em promastigota.	56
Figura 14. Esquema da curva de crescimento na presença de Hidroxiuréia (HU)	62
Figura 15. Esquema demonstrando as estratégias de amplificação dos mutantes do gene LaEIF4E3.	66
Figura 16. Análise da expressão dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 em curvas de crescimento celular frente ao uso de inibidores de processos celulares.	79
Figura 17. Análise da expressão dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 em curvas de crescimento celular frente ao uso de Lactacistina e Ácido Okadáico.	80
Figura 18. Curva de sincronização celular utilizando o composto Hidroxiuréia.	82
Figura 19. Perfil de eletroforese bidimensional de homólogos das subunidades eIF4F selecionados e PABP1.	84

Figura 20. Purificação de proteínas fosforiladas por cromatografia de afinidade e identificação dos EIF4A1, EIF4E3, EIF4E4 e PABP1 dentro do conjunto de fosfoproteínas de <i>L. amazonensis</i> .	88
Figura 21. Análise da expressão do EIF4E3 de <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> na curva de crescimento da forma promastigota.	90
Figura 22. Alinhamento do EIF4E3 das três espécies de <i>Leishmania</i> .	92
Figura 23. Comparação da expressão das proteínas exógenas EIF4E3 de <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i> transfectadas nas duas espécies.	93
Figura 24. Transcrição e tradução <i>in vitro</i> dos ortólogos de EIF4E3 de <i>L. major</i> , <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	95
Figura 25. Perfil de eletroforese bidimensional do EIF4E3 endógeno e exógeno de <i>L. infantum</i> .	97
Figura 26. Predição de sítios de O-Glicosilação em <i>LaEIF4E3</i> e <i>LiEIF4E3</i> .	101
Figura 27. Esquema das mutações idealizadas para serem realizadas no EIF4E3 de <i>Leishmania amazonensis</i> .	105
Figura 28. Análise comparativa da expressão dos mutantes obtidos do EIF4E3.	106
Figura 29. Expressão dos mutantes do <i>LaEIF4E3</i> durante uma curva de crescimento celular na fase promastigota.	108
Figura 30. Análise das isoformas apresentadas pelos mutantes do fator EIF4E3, após focalização isoeletrica.	110
Figura 31. Análise das interações <i>in vivo</i> através de imunoprecipitação dos parceiros dos EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> e EIF4E4 de <i>L. infantum</i> .	113
Figura 32. Análise da interação de homólogos ao fator eIF4E com o análogo do cap (7m-GTP).	115

Lista de Tabelas

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs de mutagênese.	65
Tabela 2. Análise de predição do ponto isoelétrico dos homólogos <i>LaEIF4E3</i> e <i>LaEIF4E4</i> a partir da adição de grupos fosfatos.	86
Tabela 3. Predição de sítios de fosforilação em Serinas, Treoninas e Tirosinas do EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	99
Tabela 4. Predição de sítios de ubiquitinação em <i>LaEIF4E3</i> e <i>L EIF4E3</i> .	102
Tabela 5. Predição de sítios de Sumoilação em <i>LaEIF4E3</i> e <i>L EIF4E3</i> .	104

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
4E-BPs	Proteína de ligação ao eIF4E (<i>4E binding protein</i>)
AA	Aminoácido
AUG	Códon de Iniciação da tradução
acetil-CoA	Enzima acetil Coenzima-A
ATP	Adenosina Trifosfato
AREs	Regiões ricas em repetições dos nucleotídeos AU (<i>AU-rich elements</i>)
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DIC	Contraste de interferência diferencial (<i>differential interference contrast</i>)
DMSO	DimetilSufóxido
DNA	ácido dextrorribonucléico (<i>desoxiribonucleic acid</i>)
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
ECL	Deteção por quimioluminescência (<i>Enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
eIFs	Fator de iniciação da tradução eucariótico (<i>Eukaryotic Initiation factor</i>)
GP63	Glicoproteína de 63 KDa
GST	Glutathiona S-Transferase

GTP	Guanosina Trifosfato
IPTG	Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo
kDa	kiloDáton
kDNA	DNA presente no cinetoplasto
LB	meio Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
miRNAs	Micro-RNAs
m ⁷ GTP	7- metilguanósina trifosfato (<i>7-methylguanosine Triphosphate</i>)
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos (<i>Mitogen activated protein kinases</i>)
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9
mTOR	Alvo para rapamicina em mamíferos (<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>)
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
Met-tRNAi	RNA transportador iniciador da tradução
OD	Densidade Óptica (<i>Optic Density</i>)
ODC	Ornitina Descarboxilase
PABC	Domínio C-terminal da PABP (<i>PABP C-terminal Domain</i>)
PABP	Proteína de ligação à cauda poli-A (<i>Poly-A binding protein</i>)
PABPC	PABP citoplasmática
PABPN	PABP nuclear

Pb	pares de base
P-Bodies	corpúsculos de processamento (<i>Processing bodies</i>)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)
PKDL	Leishmaniose dérmica pós-kalazar
PVDF	fluoreto de polivinilideno (Polyvinylidene fluoride)
RRMs	Motivos de reconhecimento de RNA (<i>RNA recognition motif</i>)
RNAi	Interferência de RNA (<i>RNA interference</i>)
RNase	Ribonuclease
RNapol	Enzima RNA polimerase
rRNAs	RNA ribossomal
SDS-PAGE	Gel de poliácridamida de dodecilsulfato de sódio (<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis</i>)
SL-RNA	Sliced-Leader RNA
SUMO	proteínas semelhantes à ubiquitina (<i>small ubiquitin-like modifier</i>)
SGs	Grânulos de stress (<i>Stress Granules</i>)
SL	Seqüência spliced leader ou mini-éxon
snRNAs	pequeno RNA nuclear (<i>small nuclear RNA</i>)
Tag	Marca de purificação
TBS	Solução salina tamponada com tris (<i>Tris Buffered Saline</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
TriTryps	Sigla dada para o conjunto das três espécies de tripanosomatídeos mais estudadas (<i>L. major</i> , <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i>)
tRNAs	RNA transportador

UTRs	Região não traduzida (<i>untranslated region</i>)
UBLs	<i>ubiquitin-like modifiers</i>
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
VSGs	Glicoproteína variante de superfície (<i>Variant Surface Glycoprotein</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
2.1 Família Trypanosomatidae	4
2.2 O gênero <i>Leishmania</i> e a Leishmaniose	5
2.2.1 Manifestações clínicas da Leishmaniose	8
2.2.2 Distribuição da Leishmaniose	9
2.2.3 Ciclo de Vida de <i>Leishmania</i> sp.	10
2.3 Características da biologia molecular dos tripanosomatídeos	13
2.3.1 Organização genômica dos tripanosomatídeos	14
2.3.2 Transcrição policistrônica nos Tripanosomatídeos	16
2.3.3 Processamento do mRNA e poliadenilação nos tripanosomatídeos	17
2.3.4 Cap4	20
2.3.5 Controle da expressão gênica nos tripanosomatídeos	21
2.4 Biossíntese protéica em eucariotos	24
2.4.1 Iniciação da tradução nos eucariotos	25
2.4.2 Complexo eIF4F e PABP	27
2.4.2.1 A RNA helicase – o fator eIF4A	29
2.4.2.2 O estruturador do complexo eIF4F – o fator EIF4G	31
2.4.2.3 A proteína de ligação à cauda poli(A) – PABP	33
2.5 A proteína de ligação ao cap – o fator eIF4E	34
2.5.1 Estrutura do eIF4E	35
2.5.2 Funções do eIF4E e seus parceiros de ligação	37
2.5.3 Regulação da atividade do eIF4E	40
2.5.3.1 Regulação transcricional do eIF4E e da sua degradação	41
2.5.3.2 Regulação por fosforilação do eIF4E	42
2.5.3.3 Regulação através das 4E-BPs	44

2.6 O complexo eIF4F e a PABP nos tripanosomatídeos.	45
2.6.1 EIF4As	46
2.6.2 EIF4Gs	47
2.6.3 PABPs	48
2.6.4 EIF4Es	48
2.7 Modificações pós-traducionais	50
2.7.1 Fosforilação	51
2.7.2 Glicosilação	52
2.7.3 Acetilação e Metilação	52
2.7.4 Ubiquitinação e Sumoilação	53
2.7.5 Modificações pós-traducionais nos tripanosomatídeos	54
2.8 Resultados prévios que deram origem a este trabalho	55
3. Objetivos	59
4. Material e Métodos	60
4.1 Obtenção, manutenção e congelamento de células infectivas de <i>Leishmania sp.</i>	60
4.2 Curvas de crescimento padrão e na presença de inibidores de diferentes processos celulares.	61
4.3 Ensaio de sincronização celular com Hidroxiuréia.	61
4.4 Ensaio de purificação e análise de fosfoproteínas.	63
4.5 Amplificação e Clonagem dos fragmentos EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	64
4.6 Estratégia de amplificação dos mutantes do gene <i>LaEIF4E3</i> .	65
4.7 Subclonagens do fator EIF4E3 e seus mutantes.	66
4.8 Transfecção e expressão das construções selvagens e mutantes.	67
4.9 Superexpressão do fator EIF4E3 e seus mutantes.	67
4.10 Imunoprecipitação de complexos protéicos <i>in vivo</i> .	68
4.11 Focalização isoeletrica e géis bidimensionais.	69
4.12 Ensaio de <i>Western-Blot</i>	70
4.12.1 Expressão de proteínas recombinants	71
4.12.2 Purificação de anticorpos policlonais	71

4.13 Transcrição e tradução <i>in vitro</i>	72
4.14 Ensaio de afinidade ao <i>cap</i>	73
5. Resultados	75
5.1 Detecção de processos celulares associados a expressão de isoformas de EIF4E3 e 4 em <i>L. amazonensis</i>	76
5.1.1 Análise do efeito de inibidores de processos metabólicos específicos na expressão de isoformas dos EIF4E3 e 4	76
5.1.2 Análise do efeito da expressão das proteínas frente à sincronização celular.	80
5.2 Identificação e caracterização de eventos de fosforilação nos EIF4E3 e 4 de <i>L. amazonensis</i>	82
5.2.1 Identificação do número e características das isoformas dos EIF4E3 e EIF4E4 através de eletroforese em géis bidimensionais.	83
5.2.2 Detecção dos EIF4E3 e 4 no fosfoproteoma de <i>L. amazonensis</i>	86
5.3 Estudo comparativo da sequência da proteína EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> e da expressão de suas isoformas	89
5.3.1 Análise comparativa da expressão do EIF4E3 durante curva de crescimento da forma promastigota nas três espécies estudadas.	89
5.3.2 Obtenção da sequência do gene <i>EIF4E3</i> de <i>L. amazonensis</i> e comparação com seus ortólogos em <i>L. infantum</i> e <i>L. major</i> .	91
5.3.3 Análise comparativa da expressão das isoformas do EIF4E3-HA de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	93
5.3.4 Análise de diferenças de peso molecular em ortólogos de EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. infantum</i> .	94
5.3.5 Identificação de isoformas de EIF4E3 em <i>L. infantum</i> .	96
5.4 Identificação “ <i>in silico</i> ” de possíveis sítios de modificação pós-traducional no EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	97
5.4.1 Predição de sítios de fosforilação.	98
5.4.2 Predição de sítios de glicosilação	100
5.4.3 Predição de sítios de Ubiquitinação	102
5.4.4 Predição de sítios de Sumoilação	103

5.5	Análise da expressão de mutantes do EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> contendo mutações pontuais em possíveis sítios de fosforilação e de interação com proteínas.	104
5.5.1	Análise da expressão dos mutantes de EIF4E3 transfectados em <i>L. amazonensis</i> , em fase exponencial de crescimento.	105
5.5.2	Análise da expressão dos mutantes do EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> durante curva de crescimento da forma promastigota.	107
5.5.3	Identificação do número de isoformas presentes nos mutantes do EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e análise do perfil destas isoformas por focalização isoelétrica.	108
5.6	Análise de interações funcionais diretamente relacionadas com a iniciação da tradução do EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e EIF4E4 de <i>L. infantum</i> .	111
5.6.1	Análise da formação de complexos protéicos <i>in vivo</i> entre os homólogos do eIF4E analisados e seus supostos parceiros funcionais.	111
5.6.2	Análise da interação com o cap dos EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> e do EIF4E4 de <i>L. infantum</i> selvagem e com mutação no sítio de ligação ao cap.	114
6.	Discussão	116
7.	Conclusões	124
8.	Referências Bibliográficas	125
9.	Produção científica associada ao período da Tese	151

1. INTRODUÇÃO

Doenças parasitárias causadas por protozoários continuam a ser um problema de saúde pública crítico, especialmente em regiões tropicais, onde as altas taxas de mortalidade estão associadas às condições sanitárias precárias e à falta de medidas profiláticas eficientes. Os tripanosomatídeos, responsáveis por uma considerável parte desta mortalidade no mundo, são protozoários eucarióticos unicelulares que incluem várias espécies causadoras de doenças de impacto mundial, como as várias espécies de *Leishmania* (leishmanioses), o *Trypanosoma brucei* (doença do sono) e o *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas).

Do ponto de vista molecular, os tripanosomatídeos possuem inúmeras peculiaridades que os diferem dos demais eucariotos, como transcrição policistrônica e processamento dos mRNAs por *trans-splicing*. Como consequência de sua transcrição constitutiva, a regulação da sua expressão gênica ocorre pós-transcricionalmente, sendo a iniciação da tradução um provável alvo de destaque para esta regulação. Durante e a síntese de proteínas, a iniciação da tradução compreende as etapas de reconhecimento do mRNA pela subunidade 40S do ribossomo e a identificação do códon AUG, que indica o início da seqüência que codifica para as proteínas. Diversos fatores de iniciação da tradução denominados de eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*) participam deste processo, dentre os quais o complexo eIF4F e a proteína de ligação ao poli-A (PABP), que atuam no reconhecimento do mRNA e facilitam o recrutamento do ribossomo para iniciar a síntese de proteínas. O complexo eIF4F é formado pelos fatores eIF4A, uma RNA helicase, o eIF4G, a proteína estruturadora do complexo, e o eIF4E, a proteína que reconhece a estrutura cap na extremidade 5' do mRNA.

A iniciação da tradução é bem estudada em leveduras, plantas e vertebrados, e, mesmo com os avanços realizados recentemente, ainda são necessários vários estudos sobre este processo nos tripanosomatídeos. Foram identificados múltiplos homólogos para as subunidades do complexo EIF4F, um fato inédito e um indicativo de complexidade na iniciação da tradução destes parasitas. Na caracterização preliminar dos primeiros quatro homólogos de eIF4E de *Leishmania*, foi observado que estes diferiam na sua abundância, capacidade de se ligar ao mRNA e ainda na sua associação com polissomas. Também foram observadas diferenças na sua localização subcelular, além de diferenças no estabelecimento de interações com homólogos de eIF4G. O conjunto de resultados obtidos, embora ainda não conclusivos, sugerem que as proteínas EIF4E3 e 4 exerçam funções mais gerais ao nível de síntese protéica, enquanto que os EIF4E1 e 2 devam ter um papel mais modulatório na tradução ou em algum outro aspecto no metabolismo dos mRNAs. Outros resultados implicam diretamente dois homólogos de eIF4G (EIF4G3 e 4) como exercendo funções fundamentais, porém distintas, na tradução em tripanosomatídeos.

O estudo da expressão de diferentes homólogos de eIF4E de *Leishmania amazonensis* mostrou variações de peso molecular para os EIF4E3 e 4 durante o ciclo de vida desta espécie, observando-se múltiplas isoformas diferencialmente expressas para cada proteína. O padrão de expressão das isoformas de EIF4E3 e 4 então se altera em condições em que o crescimento das células é diminuído, por meio de interferências com as condições de cultivo, como estresse nutricional. A presença destas isoformas sugerem a ocorrência de modificações pós-traducionais sobre esses fatores que necessitam ser mais bem investigadas. Por conta disso, este trabalho teve como ponto principal investigar estas modificações, primeiramente

identificando qual sua natureza, e posteriormente determinando sua relação com a função dos fatores estudados, neste último caso com o foco no EIF4E3. Os resultados obtidos indicam que mecanismos pós-traducionais, como fosforilação, estão regulando diferencialmente a atividade de fatores de iniciação da tradução, em *Leishmania*. Além disso, mostram a existência de modificações exclusivas de *L. amazonensis*, possivelmente associada a aspectos específicos de regulação da atividade de fatores de tradução neste organismo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família Trypanosomatidae:

Os membros da ordem Kinetoplastida são organismos unicelulares flagelados que incluem desde parasitas intra e extracelulares responsáveis por doenças graves em humanos e animais, bem como vários organismos de vida livre encontrados no solo e em ambientes aquáticos (Szöör *et al.*, 2010). Como característica peculiar, estes organismos apresentam uma região contendo DNA (kDNA) localizada dentro de uma única mitocôndria típica, denominada de Cinetoplasto (Stuart *et al.*, 2008). A estrutura morfológica do Cinetoplasto se apresenta semelhante a um disco achatado, e o kDNA é composto por duas classes de moléculas circulares de tamanhos diferentes, os maxi e os minicírculos, que codificam basicamente proteínas da cadeia respiratória e a maquinaria de tradução mitocondrial (Fidalgo and Gille, 2011).

Dentro da ordem Kinetoplastida destaca-se a família Trypanosomatidae, com nove gêneros formados exclusivamente por parasitas obrigatórios, alternando entre vários estágios morfológicos através de complexos ciclos de vida, muitas vezes envolvendo mais de um hospedeiro (Singh, 2006). Dois gêneros desta família, *Leishmania* e *Trypanosoma*, merecem destaque visto que incluem as espécies responsáveis por doenças que fazem parte do grupo das Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), sendo responsáveis por enfermidades de impacto mundial, como as várias manifestações clínicas da Leishmaniose (*Leishmania sp.*), a Doença do Sono (*Trypanosoma brucei*) e a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) (WHO, 2010).

Aproximadamente 500 milhões de indivíduos estão presentes nas áreas de risco das doenças provocadas por tripanosomatídeos, localizadas principalmente em países tropicais e subtropicais, e se estima que 20 milhões de pessoas já possam estar infectadas, tendo como resultado cerca de 100.000 mortes anuais (Stuart *et al.*, 2008). O tratamento dessas doenças ainda é insatisfatório em termos de segurança e eficácia, o que contrasta fortemente com as necessidades terapêuticas das pessoas que se encontram em situação de risco, com o número de pacientes afetados e o de mortes associadas (Flohé, 2012).

2.2 O gênero *Leishmania* e a Leishmaniose

O gênero *Leishmania* é formado por um grupo de protozoários com um caráter altamente diverso. Possui mais de 20 espécies patogênicas, onde a manifestação clínica da doença que provocam irá depender, dentre outros aspectos, da espécie infectante, variando desde lesões simples de pele que podem regredir por cura espontânea, passando por lesões desfigurantes das mucosas, até a forma mais grave da doença, acometendo as vísceras, que é letal (Scheltema *et al.*, 2010). As espécies pertencentes a este gênero podem ainda ser divididas em dois subgêneros, o *Leishmania* (*Leishmania*), encontrado no Velho e Novo Mundo e o *Leishmania* (*Viannia*), presente apenas no Novo Mundo. Estes sub-gêneros foram determinados de acordo com o local de desenvolvimento do parasita no interior do intestino do mosquito flebotomíneo vetor (hospedeiro invertebrado). Espécies do sub-gênero *Viannia* se desenvolvem nas porções média e posterior do intestino do vetor (peri-pilórico), enquanto que para as do sub-gênero *Leishmania*, o seu desenvolvimento ocorre apenas no seu intestino médio (supra-pilórico) (Bates, 2007).

O gênero *Leishmania* possui duas principais formas morfológicas, denominadas de promastigota e amastigota, sendo a primeira mais estudada por conseguir ser cultivada facilmente em meio de cultura (Figura 1). A forma promastigota compreende células alongadas que possuem um flagelo livre emergindo da sua região anterior. O núcleo é único e esférico, variando bastante quanto a sua posição. O tamanho da forma promastigota varia muito, mesmo dentro da mesma espécie, de 1,5 a 3 μm de largura e 16 a 40 μm de comprimento incluindo o flagelo, que é muitas vezes maior do que o corpo celular (Figura 1A) (Neves, 2011). Já a forma amastigota apresenta-se ovóide ou arredondada, com um único núcleo semelhante ao encontrado na forma promastigota que geralmente fica disposto em um dos lados da célula. Não possui flagelo aparente, apenas um rudimentar associado à bolsa flagelar, e seu tamanho varia entre 3 a 6,5 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de largura, dependendo da espécie (Figura 1B) (Schmidt e Roberts, 2009; Neves, 2011).

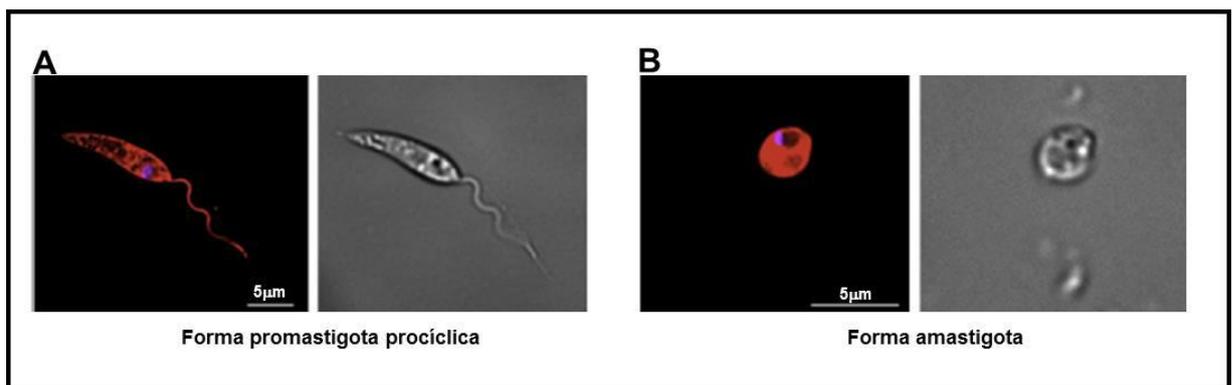


Figura 1. Principais formas morfológicas da *Leishmania* sp. Microscopia confocal mostrando uma proteína fusionada à proteína fluorescente (mCherry) distribuída por todo o citoplasma (em vermelho) das formas promastigota (A) e amastigota (B). O Cinetoplasto (em azul) foi marcado com DAPI. Como controle a imagem feita por DIC (*differential interference contrast*), em cinza. Fonte: Millington *et al.*, 2010.

A forma promastigota ainda é sub-dividida em várias formas morfológicas distintas, passando pelas variantes procíclica (entre 24 e 48 após infectar o mosquito), nectomona (48 - 72 horas), leptomona (4 - 7 dias), haptomona (5 - 7 dias) e metacíclica (7 -14 dias). A forma promastigota metacíclica é a forma infectiva do gênero *Leishmania* e possui um pequeno corpo celular, porém com um flagelo alongado que facilita a rápida locomoção (Bates and Rogers, 2004; Kamhawi, 2006; Besteiro et al., 2007).

A Leishmaniose é transmitida para o hospedeiro vertebrado por cerca de 30 espécies diferentes de flebotomíneos, que são insetos dípteros hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, encontrados no Velho e Novo Mundo respectivamente (Figura 02) (Chappuis et al., 2007). O inseto adulto, com 2 a 4 mm de comprimento, é mais ativo durante o entardecer e à noite, repousando durante o dia em locais escuros e úmidos, como em tocas de certos roedores, em fendas no solo, em cascas de árvores velhas, em rachaduras nas paredes das casas. São nestes locais que a fêmea deposita seus ovos, onde as larvas vão encontrar matéria orgânica, calor e umidade necessárias para o seu desenvolvimento (Griensven and Diro, 2012).

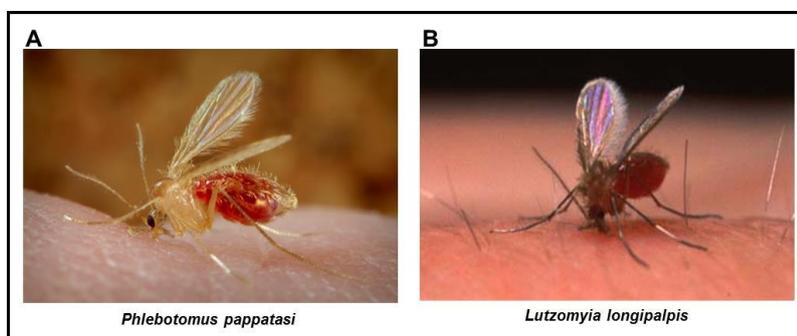


Figura 2. Vetores invertebrados da Leishmaniose. Em (A) o inseto do gênero *Phlebotomus* causador da doença no Velho Mundo e em (B) o gênero *Lutzomyia*, causador da doença no Novo Mundo. Fonte: sites Wikipédia (A) e Portal Fiocruz (B).

2.2.1 Manifestações clínicas da leishmaniose.

A leishmaniose possui diversas manifestações clínicas que incluem as formas cutânea (ou tegumentar), mucocutânea, cutânea difusa, visceral (ou Calazar), Leishmaniose dérmica pós-Calazar e ainda as recidivas (Gomez et al., 2010). Este polimorfismo clínico é resultado da interação de vários fatores, incluindo variações imunológicas do hospedeiro, espécie do parasita, vetor de transmissão e o próprio ambiente (Dujardin, 2009). A perspectiva de seu controle é altamente dependente da evolução das pesquisas científicas, em manipulações terapêuticas para o sistema imunológico, e no desenvolvimento de vacinas (Mansueto *et al.*, 2007).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da leishmaniose, sendo caracterizada por lesões cutâneas localizadas, que geralmente regredem espontaneamente, porém podem deixar cicatrizes graves e permanentes pelo resto da vida (David e Craft, 2009; WHO, 2010). As suas variações, a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a cutânea difusa (LCD), ocorrem mais raramente devido à migração linfática ou hematogênica de uma lesão cutânea primária para as mucosas, por conta de um aumento da resposta imune do paciente (Daneshbod et al., 2011). São formas mais graves da doença, que não possuem regressão espontânea se não tratadas e a invasão dos tecidos da mucosa ocorre depois de meses ou até anos após o início da infecção cutânea primária (Kato et al., 2010).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como kalazar, é a forma letal da doença que, se não tratada adequadamente, possui alto índice de mortalidade. Os pacientes sintomáticos apresentam febre, perda de peso, esplenomegalia proeminente, anemia, trombocitopenia e neutropenia, refletindo uma supressão da medula óssea. Disfunção hepática com hepatomegalia, icterícia e ascite podem

ocorrer no seu estágio avançado (Harhay et al., 2011; Griensven and Diro, 2012). Já a leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL) é uma manifestação cutânea pós-leishmaniose visceral e pode aparecer em qualquer lugar durante semanas ou anos após a remissão da infecção. (Salotra et al 2006; David and Craft 2009).

2.2.2 Distribuição da leishmaniose

A leishmaniose ocupa a nona posição entre as doenças infecciosas individuais, no entanto, ela ainda não é tratada como prioridade pelas políticas de saúde públicas (Hotez et al., 2006, WHO, 2010). É uma doença predominantemente rural que ocorre em 88 países, abrangendo quatro continentes, com aproximadamente 1,6 milhões de casos. Destes, são divididos cerca de 500 mil casos para a leishmaniose visceral e 1,1 milhão de casos para a Leishmaniose cutânea e suas derivações (WHO, 2010). Mais de 90% dos casos mundiais da leishmaniose visceral ocorrem em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão, com a Índia possuindo mais da metade do número total de casos (Griensven e Diro, 2012). Já a leishmaniose cutânea é mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos em cada uma das três regiões: as Américas, a bacia do Mediterrâneo e da Ásia ocidental até a Ásia Central. Os dez países com os casos estimados mais elevados são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru, que juntos respondem por 70 a 75% da incidência global da leishmaniose cutânea (Alvar *et al.*, 2012). A leishmaniose mucocutânea é mais encontrada na América do Sul, principalmente no Brasil, Peru e Colômbia (WHO, 2010).

O Brasil é o único país a reunir grande número de casos dos três principais tipos de leishmaniose. Nos últimos 20 anos foi observado um crescimento acelerado da forma cutânea, tanto em magnitude quanto em expansão geográfica (Ministério da Saúde, 2010). No caso da leishmaniose visceral, aproximadamente 90% dos casos que são notificados nas Américas ocorre no Brasil, com predominância na região Nordeste (Albuquerque *et al.*, 2008). Nos últimos 40 anos observou-se um aumento progressivo do número de casos que ocorrem nas demais regiões do Brasil. Em 1998 as regiões Norte, Sul, Sudeste e Centro-Oeste somavam 15% dos casos de LV que ocorriam no Brasil e até 2008 essa proporção aumentou consideravelmente para 44% (Maia-Elkhoury *et al.*, 2008; Harhay *et al.*, 2011).

2.2.3 Ciclo de Vida de *Leishmania* sp.

As espécies de *Leishmania* apresentam ciclo digenético com suas formas morfológicas distintas alternando entre o inseto vetor (hospedeiro invertebrado) e os mamíferos (hospedeiro vertebrado), infectando células da linhagem fagocítica (Cuervo *et al.*, 2010). O ciclo de vida do parasita começa quando promastigotas metacíclicas são transmitidas para o hospedeiro mamífero, através do repasto sanguíneo do mosquito flebotomíneo que regurgita estas formas altamente infectivas na corrente sanguínea do hospedeiro não infectado. O parasita é então fagocitado por macrófagos e consegue sobreviver dentro de um vacúolo, que vai se fundir com os lisossomos da célula hospedeira, formando o fagolisossomo, ou vacúolo parasitóforo. A diminuição do pH desta organela, passando a ácido, juntamente com o aumento da temperatura (que ocorre por conta da mudança de hospedeiro), provoca a diferenciação destas formas metacíclicas em amastigotas, que são

altamente adaptadas para sobreviver em pH ácido. Estas amastigotas se proliferam rapidamente, rompem a membrana dos macrófagos, sendo liberados novamente na corrente sanguínea e infectam novos macrófagos, se multiplicando dentro do hospedeiro vertebrado (Figura 3) (Neves, 2005; Stuart et al., 2008; Harhay et al., 2011; Kramer et al, 2012).

A transmissão da *Leishmania* para o inseto vetor não infectado ocorre quando a fêmea realiza o repasto sanguíneo e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados pelas formas amastigotas. Estes macrófagos se rompem durante o trajeto entre o trato digestivo superior e o estômago, liberando as formas amastigotas, que por sua vez sofrem divisão binária e rapidamente se modificam para a forma promastigota procíclica (Figura 3). Estas sofrem sucessivas divisões binárias, multiplicando-se ainda no sangue ingerido, que fica envolto pela membrana peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Dentro da matriz peritrófica, os parasitas diferenciam-se em promastigotas nectomonas, a maior e mais delgada forma da *Leishmania*. Após a digestão do sangue, entre o terceiro e o quarto dia, a membrana peritrófica se rompe e as formas promastigotas ficam livres e se diferenciam em leptomonas, que continuam a se dividir por divisão binária e proliferar no intestino do mosquito. Estas formas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, colonizam as regiões posterior ou média no intestino do inseto vetor (seção peripilária e suprapilária, respectivamente), e permanecem aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal através dos hemidesmossomas. As promastigotas leptomonas se diferenciam ainda em haptomonas e secretam uma substância em consistência de gel que força o mosquito a regurgitar os parasitas para a parte anterior do tubo digestivo, ficando armazenados na probóscide. É nesta fase que ocorre a metaciclogênese, e as

células atingem o estágio infectivo, se diferenciando em promastigotas metacíclicas (Figura 3) (Neves, 2005; Besteiro et al., 2007; Stuart et al., 2008; Harhay et al., 2011; Kramer, 2012). As promastigotas metacíclicas não conseguem se dividir, porém, são altamente adaptadas para voltar à corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, pois são resistentes à lise pelo sistema imunológico através da expressão estágio-específica de moléculas de membrana altamente especializadas (Kramer, 2012).

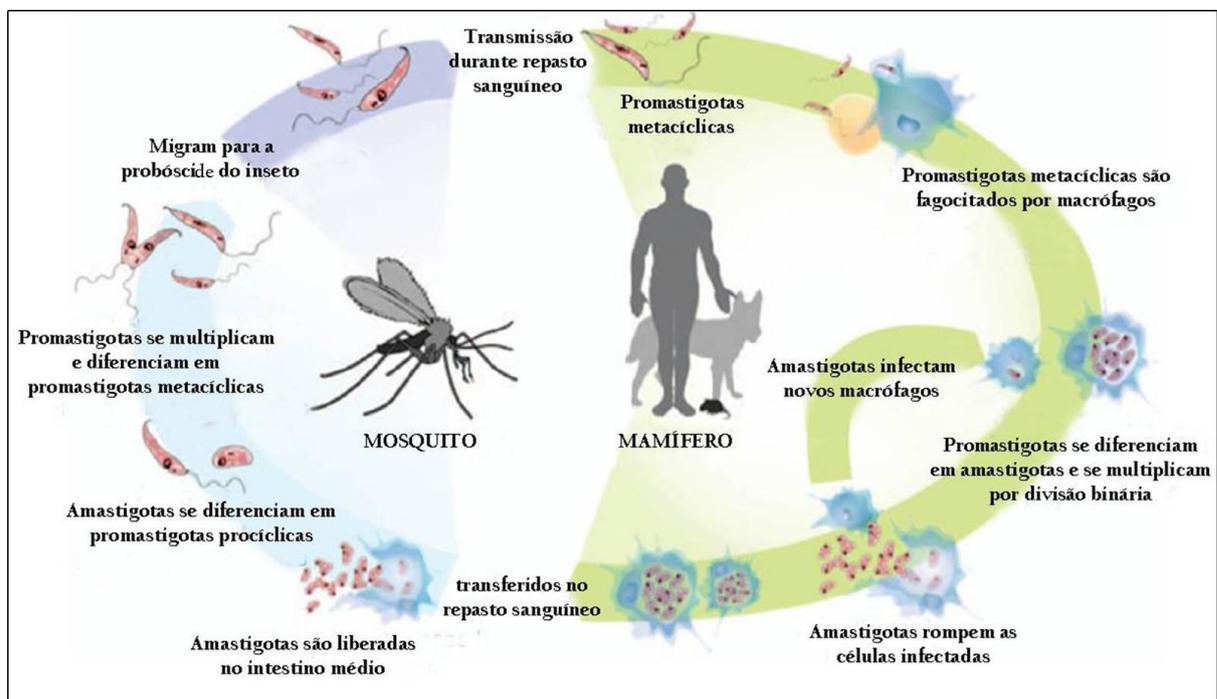


Figura 3. Ciclo de vida da *Leishmania* sp. As formas promastigota são encontradas no inseto vetor infectado, que ao fazer o repasto sanguíneo infecta o hospedeiro mamífero. Estas formas irão ser fagocitadas pelos macrófagos, diferenciando em amastigotas e se multiplicando. O inseto não infectado, ao fazer o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ingere os macrófagos presentes no sangue contendo as formas amastigotas, que se diferenciam em promastigota procíclicas e depois na forma metacíclica, fechando o ciclo. Fonte: Modificado de Harhay et al., 2011.

No processo de diferenciação para amastigota, os promastigotas de *Leishmania* são capazes de resistir à rápida mudança das condições ambientais, que incluem: modificação de temperatura, diferença na exposição ao oxigênio e

nitrogênio, alteração do pH extracelular e estresse nutricional, além de sobreviver à intensa atividade proteolítica que ocorre nos fagolisossomos encontrados dentro dos macrófagos. Os promastigotas se diferenciam dos amastigotas de acordo com suas necessidades nutricionais, sua taxa de crescimento e velocidade de divisão e pela expressão diferenciada de suas moléculas de superfície, além da sua morfologia (Besteiro et al., 2007). Cada forma evolutiva do parasita necessita então de uma regulação específica da expressão de uma variedade de genes. Embora alvos de estudos atuais, os mecanismos moleculares que levam a essa regulação ainda permanecem desconhecidos (Mcconville and Handman, 2007; Daniels *et al.*, 2010).

2.3 Características da biologia molecular dos tripanossomatídeos

Na última década houve uma revolução na compreensão dos organismos eucarióticos através do seqüenciamento de um número crescente de genomas, dentre os quais tripanossomatídeos como os *T. brucei* (Berriman *et al.*, 2005), *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005a) e *Leishmania major* (Ivens *et al.*, 2005). Por conta disso, está sendo possível obter um maior entendimento da biologia básica destes parasitas unicelulares, na busca da descoberta de diferentes alvos potenciais para o desenvolvimento de novas terapias de controle (Jackson, 2009). Os tripanossomatídeos também têm atraído a atenção de biólogos moleculares por serem organismos bastante atípicos que divergiram precocemente na evolução dos eucariotos, apresentando características moleculares únicas nos seus mecanismos de expressão gênica (Martinez-Carvalho et al., 2010).

2.3.1 Organização genômica dos tripanosomatídeos

Os “TriTryps”, como são conhecidas as três espécies mais estudadas de tripanosomatídeos (*T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*), possuem semelhanças e diferenças básicas em relação a organização, quantidade e disposição dos seus cromossomos. Com o sequenciamento dos “TriTryps”, foi observada uma grande sintonia (conservação da ordem dos genes) dos blocos de genes policistrônicos, apesar do grande período de divergência evolutiva entre as três espécies, estimado em cerca de 200 e 500 milhões de anos (Lukes et al., 2007, Martinez-Carvalho et al., 2010). Os genomas de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. major* possuem em média 12000, 8300 e 8100 genes que codificam para proteínas, respectivamente, e, apesar de possuírem uma conservação de aproximadamente 6200 genes ortólogos, em torno de 1000 genes específicos de *L. major* foram encontrados, muitos dos quais ainda permanecem sem caracterização (Figura 4) (Peacock et al., 2007; El Sayed et al., 2005b).

O tamanho do genoma de espécies do gênero *Leishmania* é conservado e de aproximadamente 34 Mb, dividido em cromossomos que possuem entre 0,3 e 2.5 Mb. Embora haja um certo polimorfismo considerado significativo, o cariótipo é em geral mantido entre suas espécies. A maioria dos genes se encontra em sintonia (cerca de 99%), mesmo havendo diferenças na quantidade de cromossomos entre as espécies do Velho Mundo (36 cromossomos) e as do Novo Mundo, *L. mexicana* (34 cromossomos) e *L. braziliensis* (35 cromossomos). Comparando espécies de *Leishmania* que já possuem o seu genoma publicado, como *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*, foram identificadas cerca de 200 diferenças do conteúdo de genes ou pseudogenes, incluindo aproximadamente 80 genes que são restritos a uma única espécie. Estas diferenças sugerem que alguns genes específicos de uma única

espécie são importantes na patogênese e manifestação clínica da doença, além de diferenças de expressão observada nos genes comuns entre as espécies (Peacock et al., 2007; Smith et al., 2007).

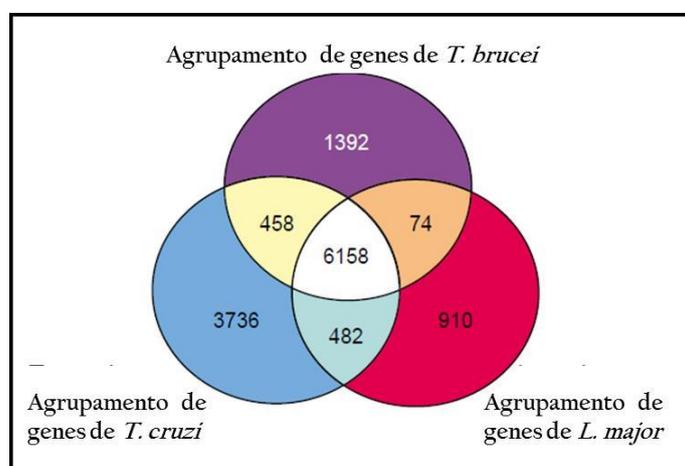


Figura 4. Conservação de genes entre os tripanosomatídeos. O esquema ilustra a divisão dos genes entre os “TriTryps”, que compartilham entre si 6158 genes. Genes específicos e compartilhados entre duas espécies apenas também são indicados, sendo claramente observada a diferença entre os genes compartilhados entre *T. cruzi* e *L. major*, que possuem 482 genes em comum, contra apenas 74 genes compartilhados entre *L. major* e *T. brucei*. Além disso, nota-se uma quantidade bem maior de genes específicos para *T. cruzi*, em relação às outras duas espécies. Fonte: Modificado de El-Sayed, 2005b.

2.3.2 Transcrição policistrônica nos tripanosomatídeos

Nos tripanosomatídeos, a transcrição ocorre de forma diferenciada dos demais eucariotos e seus genes são organizados ao longo de unidades de transcrição policistrônicas (Figura 5). Ao contrário do que é observado nos *operons* bacterianos, contudo, não há nenhuma relação funcional entre os genes que se encontram na mesma unidade policistrônica (Fernandez-Moya e Estevez, 2010; Preußner et al., 2012). Além disso, a escassez de promotores clássicos para a RNA polimerase II se reflete na ausência de alguns fatores de transcrição típicos.

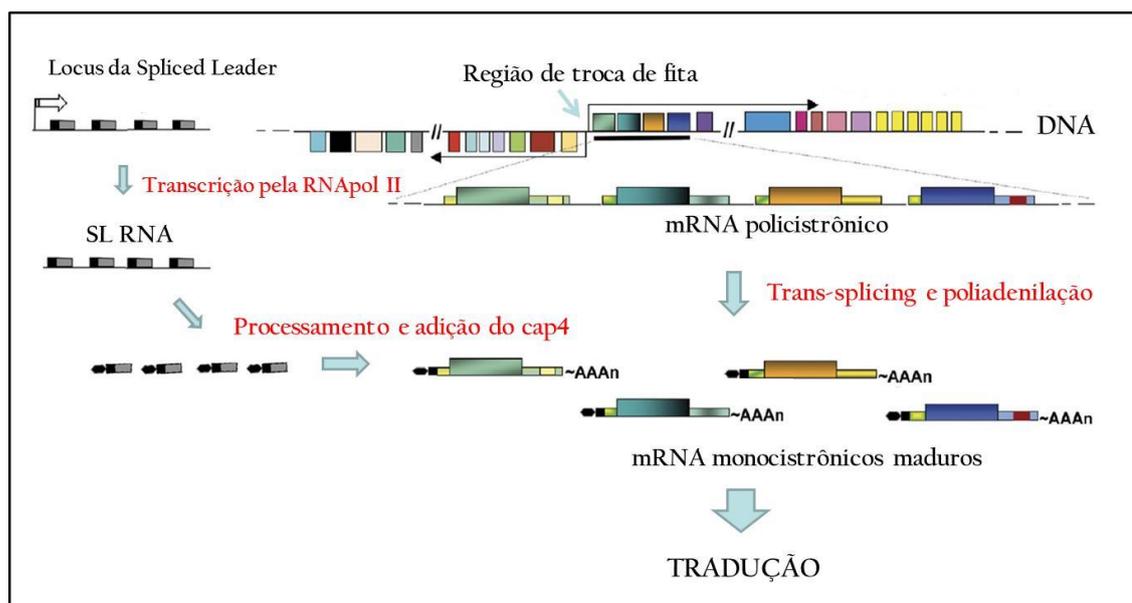


Figura 5. Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos A transcrição se inicia a partir da região de troca de fita, bilateralmente e em sentido contrário, utilizando as fitas opostas do DNA (neste caso, no sentido divergente). Os genes transcritos pela RNA polimerase II formam o pre-mRNA policistrônico, que é processado pelo mecanismo de *trans-splicing*. Os genes que codificam a sequência *spliced leader* (SL) também são transcritos pela RNA polimerase II e a estrutura cap modificada, cap4, é adicionada na porção 5' do SL-RNA. A partir do *trans-splicing*, os pré-mRNAs são separados, na região 5' é adicionado o SL-RNA + cap4 e, em paralelo, ocorre a poliadenilação na região 3'. Com estas etapas, o mRNA se torna maduro e pronto para ser utilizado na síntese de proteínas. Fonte: Modificado de Haile e Papadopolou, 2007

A maioria dos cromossomos dos tripanossomatídeos possui pelo menos dois grandes blocos gênicos (de 10 a 100 genes), agrupados em fitas distintas do DNA e transcritos em conjunto e em sentidos opostos, de forma divergente (na direção dos telômeros) ou convergente (na direção dos centrômeros) (Martinez-Carvalho et al, 2010). O local entre dois desses blocos gênicos de onde se inicia a transcrição é chamado de região de troca de fita (Figura 5). Até o momento não foram identificadas sequências promotoras definidas nestas regiões, embora tenham sido identificadas algumas sequências clássicas de promotores para as RNA polimerases I e III e um único promotor típico da RNA polimerase II, atuando no gene da sequência *spliced-leader* (Campbell et al, 2003; Palenchar e Bellofatto, 2006; Martinez-Calvillo et al., 2010; Kramer e Carrington, 2011). O tipo peculiar de

organização dos genes de tripanosomatídeos foi observado pela primeira vez no cromossomo 1 de *L. major*, que agrupa seus 85 genes em dois blocos distintos (com 32 e 53 genes), transcritos de forma divergente, a partir da região central de troca de fita (Figura 5) (Martinez-Carvalho et al, 2010). A finalização da transcrição policistrônicas provavelmente ocorre em pontos do cromossomo onde estão co-localizados genes que codificam RNAs transportadores (tRNAs), RNAs ribossômicos (rRNAs) ou pequenos RNA nucleares (snRNAs) (Ivens et al., 2005).

2.3.3 Processamento do mRNA e poliadenilação nos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos, diferentemente dos eucariotos em geral, não possuem íntrons na maioria dos seus genes (com apenas quatro exceções identificadas) (Ivens et al., 2005), e o processamento de seus mRNAs policistrônicos ocorre através do mecanismo denominado de *trans-splicing*, que permite a junção de duas moléculas separadas de RNA para formar um mRNA quimérico final (Hasting, 2005). O *trans-splicing* atua nos tripanosomatídeos adicionando um éxon denominado de *spliced leader* (SL), que possui 39 nucleotídeos, na região 5' dos mRNAs monocistrônicos maduros, juntamente com uma estrutura cap (7-metil guanósina) modificada nos tripanosomatídeos, denominado de cap4 (Kramer e Carrington, 2011). Todos os mRNAs de tripanosomatídeos possuem essa sequência *spliced leader*, por isso, dependem de uma taxa de síntese do SL-RNA bastante elevada. Para isto, possuem um elevado número de genes SL com cerca de 200 cópias e uma alta taxa de rotatividade dos transcritos resultantes (tempo de meia vida de aproximadamente 4 minutos) (Preußner et al., 2012). O processamento em *trans* ocorre através de uma reação com duas etapas de transesterificação, a qual gera

uma estrutura em “Y”, produto da junção do pré-mRNA e do SL-RNA, em lugar do laço intermediário formados pela retirada dos íntrons no processamento convencional (*cis-splicing*). O mecanismo ocorre em regiões ricas em pirimidinas, com a fusão do sítio doador “GU” presente no pré-SL-RNA a uma região próxima ao sítio aceptor “AG” do mRNA policistrônico precursor, denominada de ponto de ramificação (Figura 6) (Liang et al, 2003; Gunzl, 2010; Shulamit; 2012). Mais recentemente foi observado que o mecanismo de *trans-splicing* pode ocorrer em duas etapas. Sinais nas regiões intergênicas podem promover a formação de mRNAs intermediários, como dicistrons e mRNAs com grandes sequências 3' não traduzidas (3' UTRs), que só posteriormente sofreriam *trans-splicing* e poliadenilação, dando origem aos mRNAs monocistrônicos maduros (Jager et al., 2007).

Diferentemente dos demais eucariotos, a poliadenilação nos tripanosomatídeos é um processo que ocorre paralelamente ao *trans-splicing*, visto que ambos os mecanismos utilizam o mesmo sinal para realizar o processamento do pre-mRNA, a região rica em pirimidinas. Este trato polipirimídico se localiza nas regiões entre os genes presentes no mRNA policistrônico, e é utilizada tanto como sinal para a poliadenilação na região 3' do gene anterior, como para a adição da sequência SL na região 5' do gene posterior. Portanto, o sítio de poliadenilação fica localizado no pré-mRNA antes do sítio de *trans-splicing*, e entre eles, se encontra a região rica em pirimidinas (Benz et al., 2005, Gunzl et al., 2010). Os primeiros estudos realizados mostraram que 100 a 400 nucleotídeos separavam estas duas regiões (Matthews et al., 1994) porém, mais recentemente, foi identificada que a distância entre o sítio AG onde ocorre o *trans-splicing* e o trato polipirimídico possui

em média 142 nucleotídeos, com 50% dos genes possuindo um distância entre 128 e 178 nucleotídeos (Kolev et al., 2010).

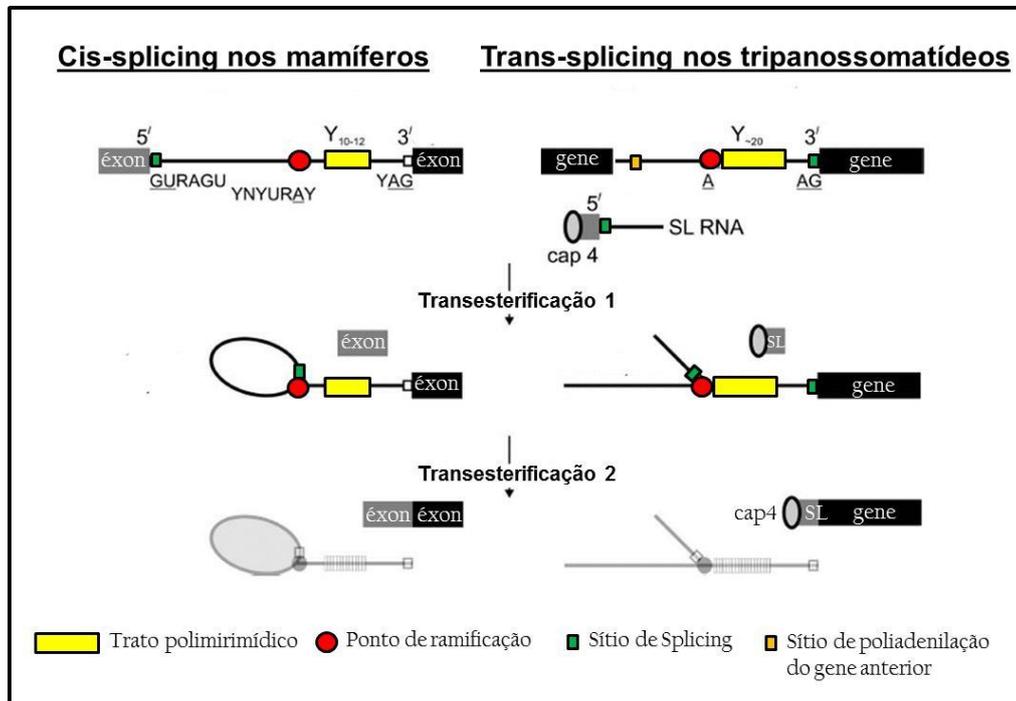


Figura 6. Diferenças no mecanismo de *cis* e *trans-splicing* nos eucariotos. Enquanto que em sistemas de mamíferos, os sítios 3'e 5' de *splicing* e o ponto de ramificação exibem sequências parcialmente conservadas (R, purina, Y, pirimidina, N, qualquer base), não há nenhuma conservação de sequências óbvia no ponto de ramificação e no sítio de processamento 3' dos tripanossomatídeos. As sequências parcialmente conservadas em mamíferos necessitam de um trato de polipirimidinas pequeno (10 a 12 resíduos). Já nos tripanossomatídeos este trato de polipirimidinas é maior (cerca de 20 resíduos), e é um determinante essencial para um processamento eficiente, estando tipicamente posicionado imediatamente a jusante do ponto de ramificação. Após a reação de transesterificação, no *cis-splicing* o íntron é retirado formando um laço, enquanto que uma estrutura intermédia em forma de Y é gerada no processo de *trans-splicing*. Após a segunda transesterificação, ambas as estruturas são desramificadas e rapidamente degradadas, e os éxons são reunidos. Fonte: Modificado de Gunzl, 2010.

Nos tripanossomatídeos também não foram encontradas sequências específicas para o sinal de poliadenilação, nem sequências clássicas como a região AAUAAA encontrada nos eucariotos superiores (Liang et al, 2003; Haile e Papadopolou, 2007). O mecanismo que determina o sítio de adição da cauda poli-A ainda permanece desconhecido, contudo, programas de predição que usam

algoritmos para flanquear a região já estão disponíveis para *T. brucei* e têm uma ótima aplicação também para *Leishmania* (Haile e Papadopolou, 2007).

2.3.4 Cap4

Todos os organismos eucarióticos possuem na região 5' dos seus mRNAs maduros uma estrutura conhecida como cap, composto por um resíduo de 7-metilguanossina (m^7GTP) que é requerida para manter a estabilidade do mRNA e uma tradução eficiente (Hall and Ho, 2006). A estrutura do cap é posicionada de forma invertida em uma ligação 5'-5', que se liga ao primeiro nucleosídeo do mRNA por uma ponte trifosfato. Em eucariotos superiores, o cap pode variar em relação ao número de metilações, desde aqueles contendo apenas a metilação inicial no m^7GTP (cap 0), até aqueles que possuem metilações adicionais nas riboses do primeiro (cap1) ou do primeiro e segundo (cap2) nucleotídeos do mRNA (Bangs et al., 1992, Shuman, 2002). Em contraste, os tripanosomatídeos possuem um cap hipermetilado, que além destas duas metilações, possui mais duas nas riboses dos terceiro e quarto nucleotídeos da sequencia *spliced leader*, e duas metilações nas bases nitrogenadas dos primeiro e quarto nucleotídeos (Figura 7). As metilações nas bases nitrogenadas são únicas dos tripanosomatídeos, e ainda não foram encontradas em nenhum outro grupo de eucariotos (Fernandez-Moya e Esteves, 2010; Zinoviev e Shapira, 2012).

As enzimas que promovem as metilações nas riboses dos quatro nucleotídeos para a formação do cap4 já foram identificadas (Arhin et al., 2006; Ruan et al., 2007), e o efeito da ausência das metilações foram testadas, levando a crer que seja necessário um nível mínimo de metilação do RNA-SL para a

viabilidade dos tripanosomatídeos (Zamudio *et al.*, 2006, 2009; Zinoviev e Shapira, 2012). Além disso, mutantes do cap não metilados não são encontrados associados aos polissomos (Zeiner, 2003), demonstrando a importância do cap para a tradução.

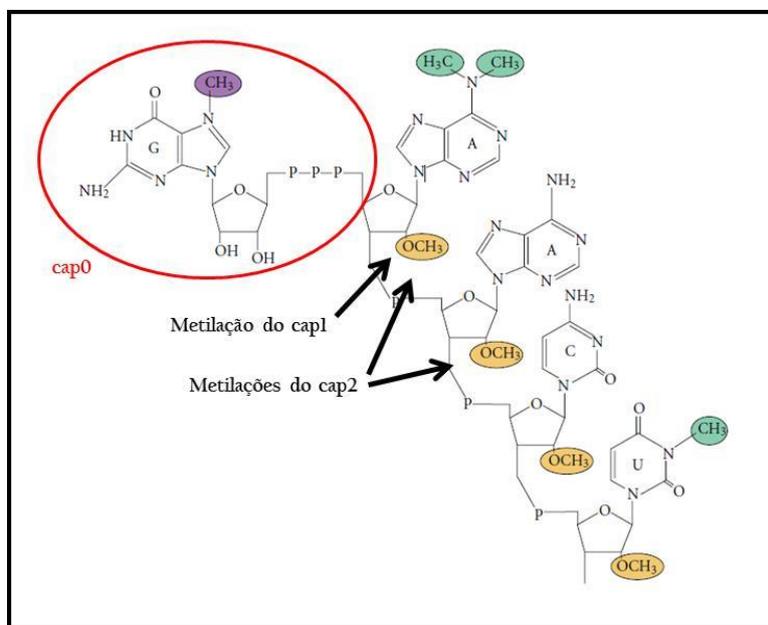


Figura 7. Estrutura do cap4 de tripanosomatídeos. Na figura, observam-se todas as metilações que ocorrem na formação do cap4. As metilações em amarelo, são as quatro metilações do carbono 2' das riboses que ocorrem nos primeiros 4 nucleotídeos (AACU) do SL-RNA dos tripanosomatídeos. O cap1 só possui a primeira metilação e o cap2 possui a primeira e segunda. Além destas metilações, os tripanosomatídeos possuem mais dois nucleotídeos que possuem metilações diretamente nas bases nitrogenadas (o primeiro e o quarto). Circulado em vermelho, o cap propriamente dito, o m⁷GTP, adicionado ao primeiro nucleotídeo através de uma ponte trifosfato. Sua própria metilação 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 Controle da expressão gênica nos tripanosomatídeos

Na maioria dos eucariotos, a regulação da expressão gênica ocorre principalmente ao nível transcricional, pela modulação da ação da RNA polimerase II. Nos tripanosomatídeos, o processo de transcrição policistrônica e a escassez de promotores clássicos para a RNAPol II são fatores determinantes para a ausência de regulação quantitativa substancial para a maioria dos genes que codificam proteínas. Recentemente foi demonstrado, que em *Leishmania* e *Trypanosoma*, os

pontos de início das unidades de transcrição policistrônica são delimitados por conformações de cromatina distintas, e a transcrição pela RNAPol II de grupos de genes contíguos poderia estar sendo regulada mais através da modificação das histonas presentes do que por atuação de fatores de transcrição propriamente ditos. A função destas mudanças e como elas são realizadas ainda permanecem desconhecidas, mas é possível que diferenças na cromatina possam ajudar a distinguir unidades policistrônicas que contém genes que deverão ser mais transcritos de outras, que não necessariamente precisem de uma alta taxa de produção (Fernandez-Moya e Estevez, 2010). Mesmo admitindo a possibilidade de eventos limitados de regulação transcricional, sabe-se que diferentes grupos de genes presentes nas mesmas unidades policistrônicas não possuem ligação funcional, e ainda assim apresentam padrões de expressão diferentes dentro da célula. Portanto, a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos ocorre predominantemente no nível pós-transcricional (Haile e Papadopolou, 2007). Evidências sugerem que os principais pontos de controle da expressão gênica destes parasitas encontram-se ao nível da estabilidade dos mRNAs e em sua utilização na síntese de proteínas (Fernandez-Moya e Estevez, 2010).

Em relação à estabilidade dos mRNAs, vários estudos têm sido realizados no intuito de identificar as diferenças que ocorrem entre os mRNAs que possuem um tempo de meia vida alto dos que são rapidamente degradados. Nos eucariotos em geral, essa degradação se inicia pela região 3' dos mRNAs, no qual a cauda poli-A é removida pela enzima poli-A nuclease. Em seguida, as enzimas Dcp1 e 2 realizam a remoção do cap, presente na região 5'. O mRNA decapeado segue então para degradação total pela enzima Xrn1, no sentido 5'-3' (Parker e Song, 2004; Franks e Lykke-Andersen, 2008). Uma outra via de degradação também foi descrita, na qual

um complexo de 11 enzimas denominado de exossomo degrada o mRNA no sentido 3' -5' (Buttner et al., 2006). Os tripanosomatídeos utilizam ambas as vias de degradação de mRNAs e todos os fatores proteicos associados, com exceção das enzimas Dcp1 e 2 presentes no complexo de decapeamento, foram identificadas nestes parasitas (Haile e Papadopoulou, 2007). Ainda assim, mesmo não sendo identificado ortólogos para estas duas enzimas, a atividade de decapeamento foi verificada nos tripanosomatídeos (Milone *et al.*, 2002; Haile *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). O exossomo dos tripanosomatídeos é similar ao encontrado em mamíferos, e foi demonstrado ser requerido para o controle da qualidade dos rRNAs, além de ser envolvido na degradação de mRNAs (Clayton e Estevez, 2010). As duas vias de degradação atuam em diferentes mRNAs nestes parasitas. Os mRNAs estágio-específicos instáveis são degradados por uma via regulada, através do complexo do exossomo no sentido 5'-3', ou por uma exonuclease denominada XRNA. Já os mRNAs estáveis são degradados a partir da deadenilação da cauda poli(A), sendo uma via constitutiva e mais lenta, que ocorre no sentido 3'-5' (Haile e Papadopoulou, 2007).

Alguns estudos mostram também alterações no tempo de meia vida dos mesmos mRNAs, nos distintos estágios morfológicos em que o organismo se encontra. Isto ocorre em cerca de 5-10% dos transcritos de *T. brucei*, e um pouco mais em *T. cruzi* e um pouco menos em *Leishmania*. Assim, o mesmo transcrito pode ter poucos minutos de meia vida quando o parasita se encontra em um hospedeiro e esse tempo modifica para algumas horas quando está presente no outro hospedeiro (Clayton e Shapira, 2007; Fernandez-Moya e Estevez, 2010; Kramer, 2012). Vários motivos localizados na região 3' não traduzida dos mRNAs, como as sequências ricas em AU, denominada AREs, podem modular o tempo de

meia vida dos mRNAs e são capazes de modificar a quantidade de transcrito, *in vivo*, através de interações com proteínas específicas de ligação a RNA (*RNA binding proteins*) (D'orso et al., 2003). Estas proteínas regulatórias ligam-se de forma específica às suas sequências alvo, estabilizando ou desestabilizando o mRNA através da inibição ou não da deadenilação. Em mamíferos, proteínas de ligação ao mRNA já são bem descritas, e participam como alvo final de várias vias de sinalização em cascata, desencadeadas por mudanças no ambiente (Kramer, 2012). Estes processos de regulação devem ser de extrema importância para que os tripanosomatídeos se adaptem rapidamente às condições ambientais tão variáveis (D'orso et al., 2003). Os outros dois mecanismos pós-transcricionais que possuem pontos considerados de extrema importância para a regulação da expressão gênica são, a biossíntese protéica e as modificações pós-traducionais.

2.4 Biossíntese protéica em eucariotos

A biossíntese protéica pode ser dividida em quatro fases distintas denominadas iniciação, alongação, terminação e reciclagem dos ribossomos (Acker e Lorsch, 2008; Valásek; 2012). Mesmo considerando que cada uma das etapas possui sua importância, a iniciação da tradução é a etapa mais complexa do processo e a que está mais sujeita a possuir mecanismos de regulação (Aitken e Lorsch, 2012). É nesta fase que ocorre a montagem subunidades ribossomais menor (40S) e maior (60S) junto ao mRNA e, para isto, os chamados fatores de iniciação da tradução, denominados de eIFs em eucariotos (*eukaryotic initiation factors*), são recrutados. Estes fatores, em conjunto, orquestram uma cascata de interações sequenciais, promovendo o posicionamento correto do ribossomo no códon de

iniciação AUG no mRNA (Jackson *et al.*, 2010). As fases da tradução que se seguem envolvem a atuação de apenas um grupo limitado de fatores (Livingstone *et al.*, 2010).

2.4.1 Iniciação da tradução nos eucariotos

A iniciação da tradução em eucariotos é auxiliada por pelo menos 12 fatores de iniciação da tradução compreendendo mais de 25 polipeptídeos diferentes (Jackson *et al.*, 2010; Aitken e Lorch, 2012). O processo começa com a seleção do RNA transportador inicial (Met-tRNA_i) pelo fator de iniciação eIF2 na sua forma ligada a GTP formando o complexo ternário Met-tRNA_i•eIF2•GTP. Em seguida, o eIF3, juntamente com os fatores eIF1, eIF1A e eIF5, induzem uma modificação “aberta” na conformação da subunidade menor ribossomal (40S), facilitando a sua ligação ao complexo ternário e formando assim o complexo de pré-iniciação 43S (Figura 8) (Jackson *et al.*, 2010; Lorsch e Dever, 2010; Valasék, 2012). O eIF3 presente no complexo 43S promove o carregamento deste complexo para a região 5' do mRNA, auxiliado por um grupo de proteínas pertencentes à família eIF4 que media o reconhecimento do mRNA e serão descritas mais detalhadamente a seguir. O fator eIF3 é o componente central para a organização do complexo 43S. Além de promover a ligação da subunidade 40S com o complexo ternário, atua na ligação do complexo 43S ao mRNA e também na etapa de busca do códon AUG. Em mamíferos, o eIF3 possui 13 componentes, com um peso molecular que, somando todas as suas subunidades, excede 650 KDa (Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012).

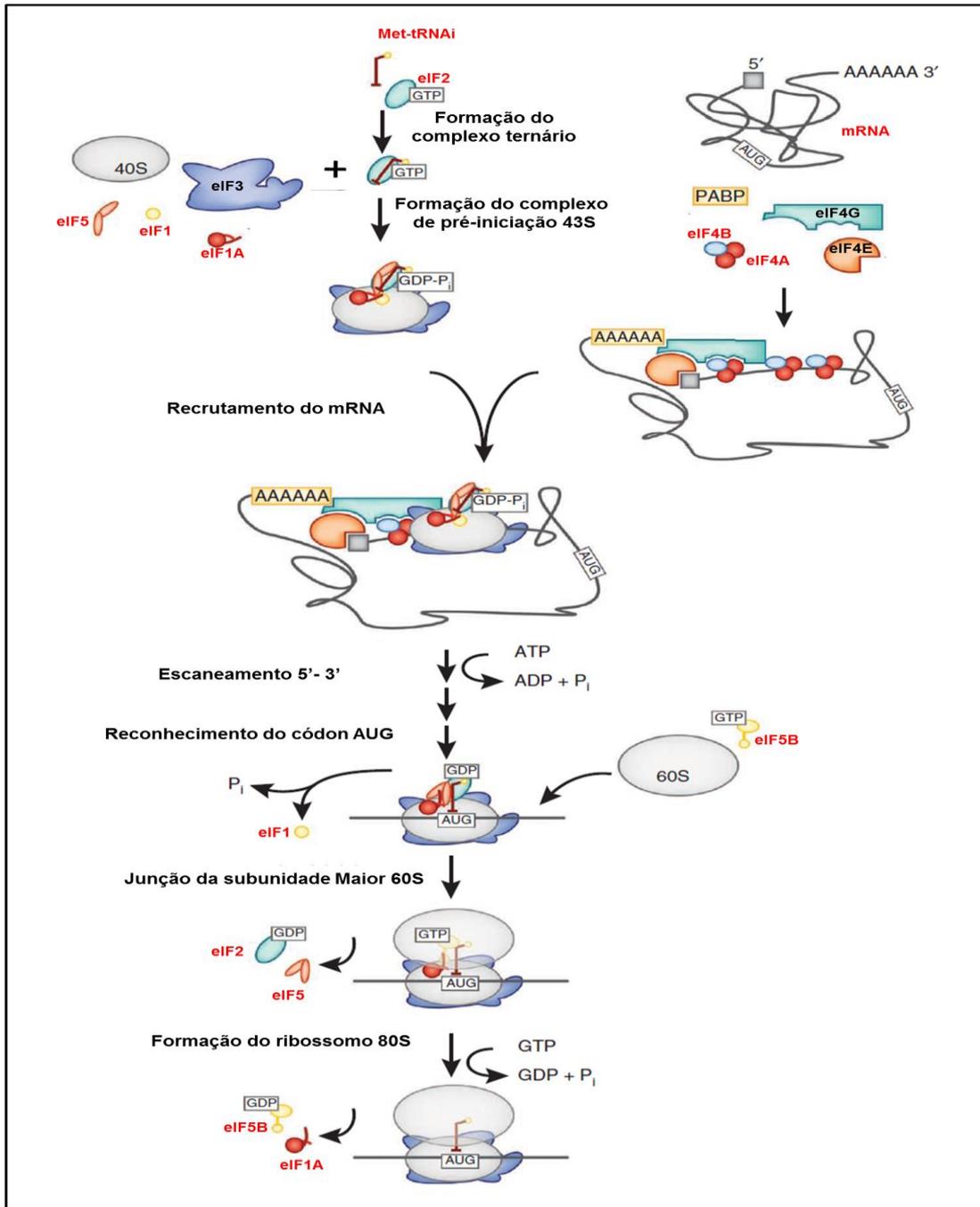


Figura 8. Mecanismo geral da iniciação da tradução em eucariotos. O processo começa com a formação do complexo ternário, contendo eIF2•GTP e o tRNA inicial. Este é recrutado para interagir com a subunidade 40S, com a ajuda de eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5 para formar o complexo de pré-iniciação 43S. Enquanto isso, o mRNA está interagindo com fatores da família eIF4 e com a proteína de ligação a cauda poli(A) (PABP) formando um mRNP ativado, que recruta o complexo 43S. Uma vez ligado à extremidade 5' do mRNA, o complexo 43S faz uma varredura para localizar o códon de início (AUG). Este reconhecimento desencadeia a liberação do eIF1 e a perda de um grupo fosfato do eIF2, estabilizando o complexo no local. Os eIF2 e eIF5 se dissociam do complexo, abrindo caminho para o eIF5B realizar a junção da subunidade 60S, que é seguida por hidrólise de GTP pelo fator eIF5B que é liberado juntamente com o eIF1A, e assim ocorre a formação do complexo de iniciação 80S. Fonte: modificado de Aitken e Lorsch, 2010.

O complexo de pré-iniciação 43S associado ao mRNA e aos fatores da família eIF4 formam o complexo 48S. Neste, a subunidade menor ribossomal se movimenta a partir da extremidade 5' do mRNA pela região 5' não traduzida (5' UTR), no sentido 5' – 3' , “escaneando” as bases do mRNA até encontrar o códon de iniciação AUG (Yánguez e Nieto, 2011; Valasék, 2012). Uma vez que o códon foi reconhecido, o complexo libera o eIF1, provocando a ativação da atividade GTPase do fator eIF5 e com isso a conversão do eIF2 ao seu estado ligado a GDP através da liberação de um fosfato. Esses eventos levam a uma modificação na conformação do complexo 48S restante para um estado “fechado”, estabilizando a interação da subunidade ribossomal 40S com o mRNA e com o Met-tRNA_i (Figura 8) (Aitken e Lorsch ,2010). Em uma segunda reação GTP-dependente, o fator eIF5B promove então a adesão da subunidade ribossomal maior (60S) ao complexo. Essa hidrólise do GTP leva à dissociação do eIF5B e eIF1A do complexo de iniciação 80S, deixando o Met-tRNA_i no sítio P do ribossomo pareado com o códon AUG. Nesta etapa, o ribossomo está pronto para entrar na fase de alongação e sintetizar a proteína (Lorsch e Dever, 2010; Hernandez et al., 2012).

2.4.2 Complexo eIF4F e PABP

Dentre os diversos fatores que participam da iniciação da tradução, destacam-se o complexo denominado eIF4F e a proteína de ligação a cauda poli-A (a PABP - *poly(A)-binding protein*). Ambos atuam no reconhecimento de estruturas presentes nas extremidades 5' e 3' do mRNA, provocando sua circularização durante o processo de tradução (Lloyd, 2006).

O complexo eIF4F é formado por três subunidades: o eIF4E, a proteína de ligação ao *cap*, que reconhece a estrutura na extremidade 5' do mRNA e que será discutido em mais detalhes a seguir); o eIF4A, que possui função de RNA helicase, rompendo estruturas secundárias presentes no mRNA e facilitando o deslocamento do complexo 43S ao longo do mRNA; e o eIF4G, a proteína estruturadora do complexo, que possui vários sítios de ligação para os fatores eIF4E e eIF4A, além do eIF3 e da PABP (Figura 9). Sendo assim, ao interagir com o eIF4E ligado ao *cap* e com o eIF3 presente no complexo de pré-iniciação 43S, o eIF4G atua como uma ponte para que ocorra a interação do mRNA com o ribossomo (Goodfellow e Roberts, 2008; Jackson *et al.*, 2010).

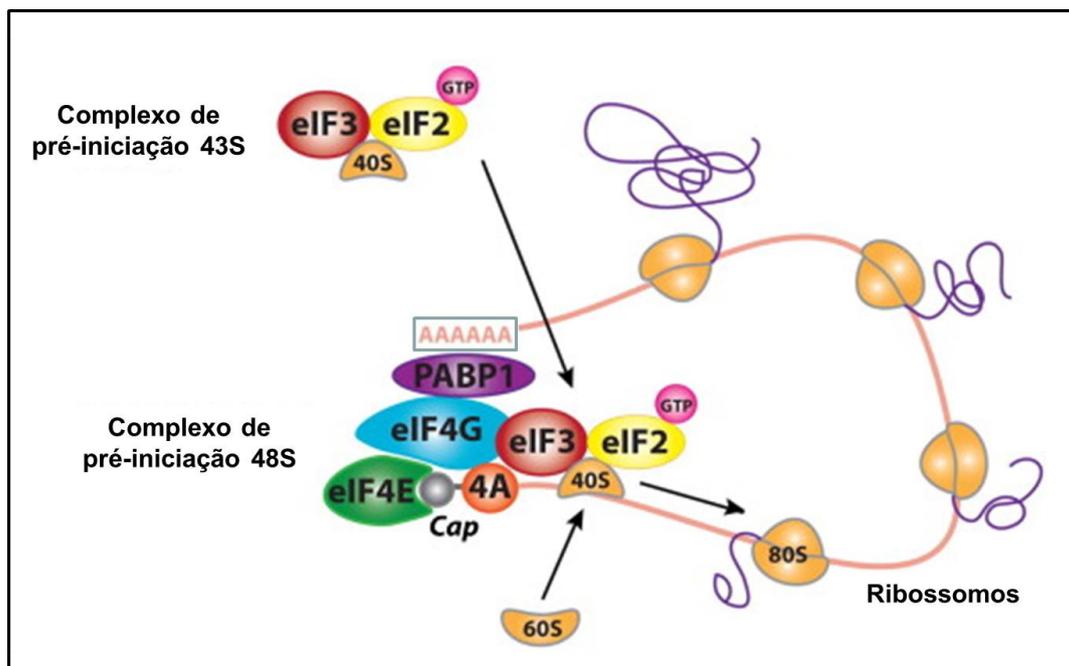


Figura 9. Função do complexo eIF4F na iniciação da tradução em eucariotos. O esquema ilustra uma das primeiras etapas da iniciação da tradução, onde observa-se que o complexo eIF4F se mantém ligado ao *cap* na região 5' do mRNA através da subunidade eIF4E (em verde). O fator eIF4G (em azul) também se encontra na região 5', através de sua ligação ao eIF4E, e carrega com ele a terceira subunidade do complexo eIF4F, o eIF4A (4A na Figura). Além desses dois fatores, o eIF4G se liga também ao eIF3 participante do complexo 43S (junto com a subunidade 40S e o eIF2 ligado a GTP), formando assim o complexo de pré-iniciação 48S. A ligação do eIF4G também com a PABP1 leva a circularização do mRNA e facilita a sua tradução. Fonte: Modificado de Yáñez e Nieto, 2011.

Várias evidências de uma diversificação molecular e funcional entre os componentes que participam da tradução foram encontradas nas proteínas da família eIF4. Muitos estudos demonstram que diferentes grupos de eucariotos unicelulares e pluricelulares possuem múltiplos genes parálogos para as subunidades eIF4E e eIF4G, com níveis de expressão distintos e propriedades bioquímicas diferenciadas, dentro do mesmo organismo (Keiper et al., 2000; Ptushkina et al., 2001; Dhalia et al., 2005; Mayberry et al., 2009; Freire et al., 2010; Hernandez et al., 2012). Estes achados suportam a hipótese de que em organismos com vários parálogos, um conjunto de fatores eIF4 devem participar da iniciação de tradução global enquanto outros realizam atividades diferenciadas em processos celulares específicos (Hernandez e Vazquez-Pianzola, 2005;. Hernandez et al, 2012).

Mesmo não sendo um fator de iniciação da tradução clássico, a PABP possui um papel de destaque no processo de biossíntese protéica, visto que a sua interação com o fator eIF4G leva à circularização do mRNA. Estudos mostraram que essa ligação auxilia na volta dos ribossomos para a região 5' do mesmo mRNA, para um novo ciclo de tradução, reforçando a iniciação da tradução e a estabilidade do mRNA, aumentando a taxa de biossíntese protéica. (Amrani et al., 2008).

2.4.2.1 A RNA helicase – o fator eIF4A

A evolução da tradução cap-dependente levou a uma necessidade da atividade de RNAs helicases para desfazer as estruturas secundárias presentes nas 5' UTRs dos mRNAs, durante a procura do códon AUG pela subunidade menor ribossomal, dentro do complexo de iniciação 48S (Hernandez et al., 2012). O fator

eIF4A foi a primeira helicase identificada que exibe um papel na iniciação da tradução eucariótica (também conhecida como DDX2). A família das helicases conhecidas como “DEAD-box” compreende proteínas que possuem nove motivos conservados, e com base na sua homologia, foi demonstrado que o eIF4A possui o motivo II que é o mais conservado dentro da superfamília SFII, denominado “DEAD” (L-D-E-A-D-X-X-L) (Linder, 2003; Parsyab et al., 2011). A maioria das helicases de RNAs envolvidos na tradução também desempenham uma variedade de papéis em outros processos do metabolismo do RNA, incluindo a degradação, exportação, e processamento dos mRNAs. As proteínas “DEAD-box” usam a energia do ATP para desmanchar regiões curtas de fita dupla de RNAs. Alternativamente elas também podem funcionar como grampos nos RNAs dependentes de ATP, gerando centros estáveis para auxiliar na formação de complexos RNA-proteínas (Linder e Jankowsky, 2011).

O eIF4A é a proteína melhor caracterizada atualmente com atividade de helicase junto às estruturas secundárias na região 5' UTR nos mRNAs. No entanto, há evidências crescentes de que algumas outras helicases, tais como, Ded1, Dead-box 29 (DHX29), Vasa (VAS), RNA helicase A (RHA, também conhecido como DHX9) e DEAD-box 25 (DDX25), poderiam ter papéis não-redundantes na iniciação de tradução (Parsyan et al., 2011). Até agora, parece que nenhuma destas helicases sozinha não possui ação suficiente para desfazer as estruturas secundárias no mRNA, criando condições que permitam a subunidade menor ribossomal procurar o códon de iniciação da tradução (Merrick, 2010). Estudos com ensaios *in vitro* mostram que apenas a adição do eIF4A já é suficiente para auxiliar a subunidade ribossomal, porém, não está claro se o efeito das helicases “*in vivo*”, reflete o mesmo resultado observado nestes ensaios (Merrick, 2010). Outros resultados apontam que

a Ded1 de levedura e a DHX29 de mamíferos são provavelmente helicases mais potentes do que o eIF4A, e sugerem que cada uma atue em conjunto com o eIF4A. O eIF4A realizaria então a função de fixar o ribossomo no mRNA, juntamente com o complexo eIF4F, enquanto que a Ded1 e DHX29 auxiliariam na varredura pelo mRNA na região 5' UTR (Jackson et al., 2010; Aitken e Lorsch, 2012). A atividade helicase do eIF4A livre é baixa, mas é estimulada quando a proteína se liga ao eIF4G e aos fatores eIF4B ou eIF4H, em mamíferos e plantas (Marintchev e Wagner, 2004; Marintchev *et al.*, 2009; Aitken e Lorsch, 2012).

2.4.2.2 O estruturador do complexo eIF4F – o fator EIF4G

O fator eIF4G funciona na iniciação da tradução como uma proteína de ancoramento, permitindo que múltiplos fatores de tradução se liguem a ele e permaneçam associados à região 5' da molécula de mRNA. Além disso, o eIF4G promove o recrutamento da pequena subunidade ribossomal 40S e ajuda na circularização do mRNA, também através da interação com proteínas participantes do processo (Prévôt et al., 2003). Por ser uma proteína muito grande, com aproximadamente 1600 aminoácidos, ainda não foi possível obter uma estrutura tridimensional em alta resolução do eIF4G inteiro. Contudo, domínios funcionais individuais como os domínios de ligação à PABP, ao eIF4E, e os dois domínios de interação ao eIF4A já foram obtidos (Bellolell et al., 2006; Valasék, 2012). O eIF4G pode ser dividido em três partes. A sua porção N-terminal, contém os sítios de interação com a PABP, com o eIF4E e com o RNA. Sua porção central possui sítios para ligação ao eIF4A (o primeiro, de dois sítios de interação), ao eIF3 e outros sítios envolvidos na ligação direta ao mRNA. Já a porção C-terminal possui o segundo

sítio de interação ao eIF4A e o sítio para a MAP-kinase que fosforila o eIF4E, a Mnk (Figura 10) (Valasék, 2012).

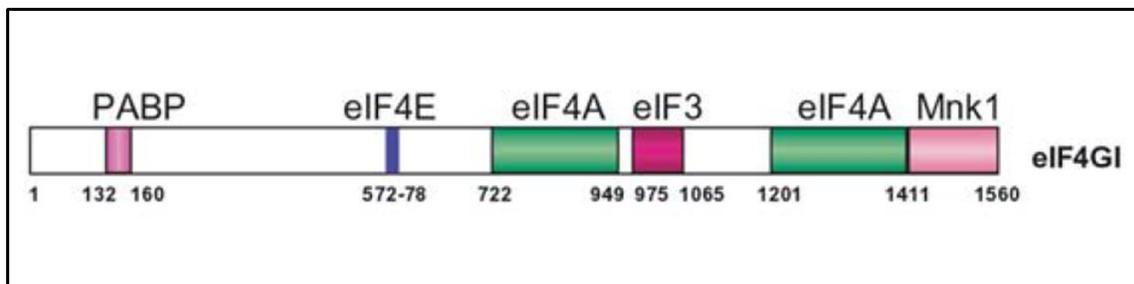


Figura 10. eIF4GI e seus domínios de interação. Esquema do fator eIF4GI de humanos demonstrando seus principais domínios de interação com proteínas que participam da iniciação da tradução. A região N-terminal da proteína possui o sítio de ligação a PABP e ao eIF4E. Na região central, são encontrados o sítio principal de interação ao eIF4A e o sítio de ligação ao eIF3. A região C-terminal possui o segundo sítio ao eIF4A e o sítio de ligação à quinase Mnk-Fonte: Prévôt et al., 2003.

A interação eIF4G-eIF3 cria uma ponte entre o complexo eIF4F-mRNA-PABP ligado ao cap, com o complexo de iniciação 43S (LeFebvre et al, 2006). Contudo, foi observado que em células com mutação no sítio de ligação do eIF4G ao eIF3 não houve impacto significativo nos níveis de tradução e que esse mutante permanece associado aos polissomos. Esses dados sugerem que a interação eIF4G-eIF3 pode não ser essencial para a associação do eIF4F (ligado ao mRNA) com o complexo de iniciação 43S em mamíferos e, portanto, pode ser dispensável para uma tradução basal geral (Hinton et al., 2007). Em mamíferos, foi demonstrado também que a interação eIF4G-eIF4E aumenta fortemente a interação do eIF4E pelo cap. Isto pode ser explicado pelo fato do eIF4G se ligar diretamente ao mRNA, favorecendo uma estabilização do complexo eIF4G-eIF4E-cap (Yanagiya et al., 2009).

O fator eIF4G apresenta-se como duas isoformas em mamíferos, leveduras e plantas. Em leveduras e mamíferos, as duas isoformas possuem uma conservação moderada entre suas seqüências (por volta de 50% de identidade). Em ambos os casos as duas isoformas aparentemente desempenham a mesma função (Prévôt *et al.*, 2003). Uma observação importante é que não foram identificadas interações dos eIF4Gs de leveduras com o eIF3 e sim com os eIF5 e eIF1 (Asano *et al.*, 2001). Acredita-se que estas interações poderiam funcionalmente substituir a interação do eIF3-eIF4G para o recrutamento do complexo de pré-iniciação 43S, nestes organismos (He *et al.*, 2003).

2.4.2.3 A proteína de ligação à cauda poli(A) – PABP

A proteína de ligação à cauda poli(A), PABP, possui funções variadas em diferentes processo biológicos celulares. Dois grupos distintos de PABP foram identificados em vertebrados: a PABP citoplasmática clássica, denominada de PABPC ou simplesmente de PABP; e a PABP nuclear (PABPN). A PABP citoplasmática atua na iniciação da tradução e na regulação da estabilidade dos mRNAs, funções que dependem de uma interação com o cap na extremidade 5' dos mRNAs (Kuhn e Wahle, 2004). Esta proteína atua ainda no processamento de pré-mRNAs, transporte do núcleo para o citoplasma e na terminação da tradução (Wang e Grumet, 2004). Já a PABPN está envolvida na síntese da cauda poli(A), auxiliando no aumento da ação da poli(A) polimerase e contribuindo para definir o comprimento da cauda poli(A) recém sintetizada (Kuhn e Wahle, 2004; Libri, 2010).

A PABP citoplasmática é composta por uma região N-terminal, que compreende quatro domínios de reconhecimento ao RNA (RRMs de RNA

recognition motifs) não idênticos, uma região de conexão rica em prolina e uma região C-terminal que consiste de um domínio estruturado conhecido por PABC. Os RRM's parecem diferir nas suas especificidades de ligação a RNAs e na sua capacidade de interagir com parceiros proteicos. Os RRM's 1 e 2 foram identificados como os domínios que se ligam especificamente ao poli(A) e estes mesmos domínios mostram uma disponibilidade de resíduos sobre a parte da proteína não ligada ao mRNA para mediar interações proteína-proteína (Smith e Gray, 2010).

Foi demonstrado que a PABP de mamíferos parece atuar como um genuíno fator de iniciação da tradução, uma vez que em ensaios *in vitro* interage com o eIF4G através de sua região N-terminal e esta ligação representa uma forma de promover a circularização mRNA, conectando o cap com a cauda poli(A), facilitando a tradução (Valasék, 2012). Dados recentes, contudo, levantam dúvidas em relação a importância funcional da circularização do mRNA especificamente gerado a partir da interação eIF4G-PABP, uma vez que, em levedura, foi mostrado que essa interação é dispensável para o crescimento celular. Além disso, esse estudo mostrou que só ocorre problemas na viabilidade das células quando a interação do eIF4E-cap e o domínio de ligação do eIF4G ao mRNA são simultaneamente impedidas (Park et al., 2010). Por isso, foi proposto que a ligação eIF4G-PABP não é crítica para uma iniciação da tradução eficiente, mas simplesmente representa uma das diversas interações que estabilizam o eIF4G na ligação ao mRNA (Valásek 2012).

2.5 A proteína de ligação ao cap – o fator eIF4E

O fator eIF4E é uma proteína de aproximadamente 24 kDa que possui um papel essencial na biossíntese protéica. É uma proteína conservada em diversos

organismos, chegando até a ser considerada como uma família de proteínas, envolvidas não somente na tradução, mas em outras funções celulares associadas ao metabolismo de mRNAs, como transporte núcleo-citoplasma, sequestro de mRNAs para repressão da tradução e a estabilização de mRNAs contra a degradação (Rhoads et al., 2007; Rhoads, 2009).

2.5.1 Estrutura do eIF4E

A análise estrutural do eIF4E aumentou consideravelmente a compreensão molecular das interações com o cap e com seus vários parceiros funcionais. Dadas as muitas funções críticas que este fator desempenha na célula, não é surpreendente que a sequência primária de aminoácidos seja conservada em vários organismos (Goodfellow e Roberts, 2008).

Estudos mostraram que o eIF4E de camundongo, humano e de levedura se ligam a análogos do cap, e que cada um deles é constituído por oito cadeias de folhas β suportadas por três α -hélices, conferindo a proteína a forma de uma mão côncava, em forma de concha (Matsuo et al., 1997; Marcotrigiano et al., 1997, Tommo et al, 2002). Dois resíduos do aminoácido aromático triptofano, encontrados nas posições 56 e 102, são altamente conservados e os responsáveis pela ligação a estrutura do cap, empacotando a guanosina metilada do cap dentro da superfície côncava da proteína (Figura 11) (Niedzwiecka et al., 2002; Joshi et al., 2005). Três pontes de hidrogênios entre o cap e os aminoácidos triptofano 102 e o glutamato 103 estabilizam ainda mais essa ligação, além de várias ligações polares entre a proteína e o grupo fosfato presente no cap e várias interações de *van der Waals* (Fischer, 2009; Jackson et al., 2010). Já na face convexa do eIF4E, se ligam a

maioria dos seus parceiros funcionais, como o eIF4G, e essa ligação envolve outro triptofano conservado, o W73 (Figura 11) (Goodfellow e Roberts, 2008).

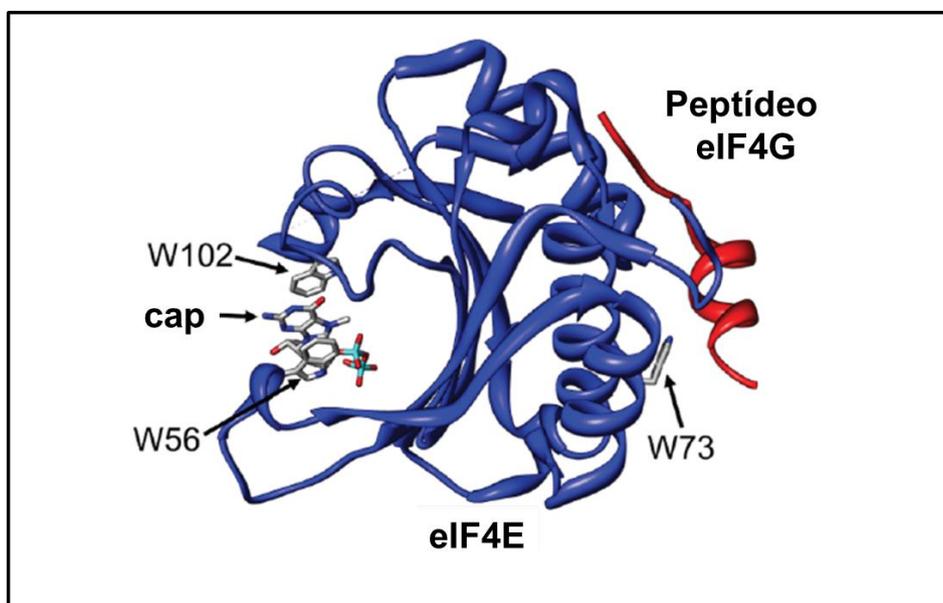


Figura 11. Estrutura tridimensional do eIF4E de camungongo. Conformação da proteína eIF4E (em azul), demonstrando o sítio de ligação ao cap na região côncava da proteína, nos aminoácidos W56 e W102. A figura mostra também o aminoácido W73, que está envolvido na ligação com o eIF4G (em vermelho), na parte convexa da proteína. Fonte: Modificado de Goodfellow e Roberts, 2008.

A análise de sequências membros da família eIF4E de um grande número de espécies representando os mais diferentes grupos de eucariotos sugerem que o eIF4E foi duplicado diversas vezes durante a evolução, produzindo novas formas da proteína que podem realizar outras funções ou até mesmo regular as atividades do próprio fator de tradução (Joshi et al., 2005). Estas proteínas foram divididas em três classes distintas, através da análise da conservação dos resíduos de triptofanos conservados críticos para sua função. Com a exceção de alguns homólogos de protistas, todos os eIF4Es podem ser agrupados em uma das três classes da superfamília eIF4E. Essas classes foram subdivididas de acordo com a presença

dos triptofanos 43 e 56 do eIF4E de humanos (Joshi et al. 2005). Os membros da classe I, contém os dois triptofanos, em ambas as posições. Os membros da classe II contém, no lugar do primeiro triptofano, uma tirosina, fenilalanina ou uma leucina, e, no lugar do segundo triptofano, uma tirosina ou fenilalanina. Já os membros da classe III contém o triptofano na primeira posição, mas substitui o segundo por uma cisteína ou tirosina (Rhoads, 2009).

2.5.2 Funções do eIF4E e seus parceiros de ligação

Em mamíferos, o eIF4E típico interage tanto com a estrutura cap e com o fator eIF4G, como também com proteínas denominadas 4E-BPs, as proteínas de ligação ao 4E (*4E-binding protein*), que atuam reprimindo a tradução, através do sequestro do eIF4E (Joshi et al., 2004). A maioria dos parceiros do eIF4E identificados em eucariotos, incluindo o eIF4G e as 4E-BPs, contém uma sequência de ligação YXXXXL ϕ , sendo o X qualquer aminoácido, e o ϕ qualquer resíduo hidrofóbico, podendo ser Leucina, Metionina ou Fenilalanina (Goodfellow e Roberts, 2008; Rhoads, 2009). A ligação eIF4E-eIF4G é um alvo importante para o controle da tradução, pois as 4E-BPs e algumas outras proteínas também contém este motivo peptídico que se assemelham ao sítio de ligação do eIF4G pelo eIF4E. Este motivo é pequeno (no máximo 15 aminoácidos), porém é através desta região que estas proteínas competem com o eIF4G e assim controlam a taxa de associação da subunidade ribossomal 40S com mRNA, e conseqüentemente, a iniciação da tradução (Ritcher and Sonnemberg, 2005).

Levando em consideração os três homólogos do eIF4E de mamíferos, todos eles podem interagir com a estrutura cap e se ligar aos mRNAs. Porém em relação

ao 4G e às 4E-BPs, cada um interage de maneira específica. O eIF4E-1, que pertence à classe I na superfamília dos 4Es, liga-se ao eIF4G, bem como às 4E-BPs. Já o eIF4E-2, inserido na classe II, não interage com o eIF4G, e o eIF4E-3 (Classe III), não se liga às 4E-BPs (Joshi et al., 2004; Jagus et al., 2012). Uma provável hipótese é que cada membro da família eIF4E preencha uma função especializada no recrutamento dos mRNAs pelo ribossomo por meio de diferenças em suas capacidades de interagir com o cap e/ou interagir com eIF4G e 4E-BPs (Joshi et al., 2004). Além disso, alguns membros da superfamília dos eIF4Es pertencentes a classe II poderiam estar atuando como repressoras da tradução. O 4E-HP ou eIF4E-2 de mamíferos, o eIF4E-8 em drosófila, o IF4 em *C. elegans* e a nCBP em *Arabidopsis thaliana*, são exemplos de membros da classe II que se ligam ao cap, mas não interagem com o eIF4G, sequestrando mRNAs específicos para não serem traduzidos (Hernandez et al., 2012). Em outros casos, homólogos do eIF4E podem estar envolvidos com novas funções moleculares não relacionadas diretamente com a iniciação da tradução. Este parece ser o caso do eIF4E-2 de *Giardia* sp., que se liga a pequenos RNA nucleares não traduzíveis (Li e Wang, 2005).

Em mamíferos, cerca de 68% do eIF4E é encontrado no núcleo, e parte dele atua coordenando a exportação de um subconjunto de mRNAs envolvidos na progressão do ciclo celular, baseado no reconhecimento de um elemento de 50 nucleotídeos na região 3' UTR dos transcritos, conhecido como elemento de sensibilidade ao 4E (4E-SE) (Culjkovic et al., 2007). Através da presença deste elemento, a exportação de mRNAs que dependem do eIF4E acabam por possuir uma estabilidade maior, e com o aumento da quantidade e acúmulo destes mRNAs

no citoplasma, possibilitam uma produção aumentada da proteína (Culjkovic et al., 2007).

O eIF4E possui ainda um papel fundamental na regulação da degradação dos mRNAs. Foi descoberto que micro-RNAs (miRNAs) não traduzíveis atuam mediando a repressão transcricional e a degradação de mRNAs através de pareamento de bases com os mRNAs (Filipowicz et al., 2008). Além disso, mRNAs que são transcricionalmente reprimidos podem ser acumulados em locais citoplasmáticos denominados de *P-Bodies*, que parecem atuar como sítio final da degradação de mRNAs, ou em grânulos de estresse (SGs), que se formam em resposta a várias condições de estresse na célula (Anderson e Kedersha, 2007; Olszewska et al., 2009). Os grânulos de estresse são dinâmicos e parecem ser compostos por mRNAs que são retidos no processo de iniciação da tradução. Eles contém, complexado a estes mRNAs, um conjunto de fatores de iniciação da tradução (eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, and eIF2), além da subunidade menor ribossomal e a PABP (Balagopal and parker, 2009). Já no caso dos *P-Bodies*, esses fatores e a subunidade 40S não são encontrados, com exceção do eIF4E e os componentes da maquinaria de repressão dos miRNAs, mais um indício que de o fator atue nesta função (Rhoads, 2009; Balagopal e Parker, 2009).

Várias outras proteínas, além do eIF4G e 4E-BPs, foram identificadas interagindo com o eIF4E, cada uma atuando de forma a regular a função deste fator (Rhoads, 2009). A p20 e a Maskin foram descritas como proteínas de repressão da tradução em *S. cerevisiae* e *Xenopus laevis*, respectivamente (Altmann et al., 1997; Richter e Sonenberg, 2005). Já a Vpg, uma proteína viral, reduz a afinidade do eIF4E pelo cap (Léonard et al., 2000). A Lipoxigenase 2 regula a atividade do eIF4E por competir com o eIF4G e 4EBPs pelo sítio de interação do fator (Freire et al.,

2000). Já a proteína transportadora do eIF4E (*4E-transporter*) é uma proteína que transporta o eIF4E para o núcleo, e também interage com o fator no mesmo sítio do eIF4G e das 4E-BPs (Dostie et al., 2000). Além disso, dentro do núcleo, o eIF4E ainda interage com proteínas que possuem domínios estruturais específicos que regulam sua ligação ao cap e inibem a exportação de mRNAs (Culjkovic et al., 2005).

Com estas múltiplas funções, o fator eIF4E pode ser considerado como um potente modulador da expressão gênica global. O eIF4E atua na modulação da expressão de fatores de proliferação e de ciclo celular, na regulação da degradação de mRNAs específicos e também na repressão da tradução, afetando diretamente a expressão gênica final da célula (Culjkovic et al., 2007).

2.5.3 Regulação da atividade do eIF4E

Sendo uma das principais funções do eIF4E participar da tradução a nível global, uma falha na regulação desta função pode contribuir para uma malignidade celular. Em metazoários, uma alteração na regulação do eIF4E permite uma tradução alterada de um conjunto limitado de mRNAs que codificam proteínas-chaves envolvidas na proliferação de células, angiogênese e metástase (Fisher, 2009). Portanto, sua atividade necessita ser bem orquestrada por diferentes mecanismos de regulação e que atuam via modulação da transcrição de seu gene e degradação da proteína madura, controlando seus níveis intracelulares. O controle ainda pode ocorrer via por fosforilação e através da interação com as 4E-BPs (Goodfellow e Roberts, 2008).

2.5.3.1 Regulação transcricional do eIF4E e da sua degradação

O controle transcricional da síntese do eIF4E ainda não está totalmente esclarecido, mas sabe-se que seu promotor possui dois sítios de ligação do regulador transcricional c-Myc, que atua na regulação da expressão do gene (Lynch et al., 2005). Estudos mostraram que os dois sítios myc são necessários para a expressão do eIF4E em sistemas heterólogos (Jones et al., 1996), e que a expressão diferenciada de alguns genes foram associados com níveis alterados do eIF4E, em resposta à alterações nos níveis de expressão de c-Myc (Schmidt, 2004).

A presença de soro, fatores de crescimento ou de ativação imunológica nas células T têm sido associadas ao aumento da transcrição do gene eIF4E (Schmidt, 2004). Contudo, esta superexpressão não leva ao aumento global da taxa de tradução. Apenas um grupo específico de mRNAs têm suas taxas aumentadas, incluindo alguns codificados por genes considerados oncogênicos, como os da Ciclina D1, VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial), ODC (Ornitina Descarboxilase) e o MMP9 (Metaloproteinase de Matriz 9), além do próprio c-Myc (Fisher, 2009). Assim, a superexpressão do eIF4E induz a transformação e malignidade das células de animais e, ainda que os níveis elevados de eIF4E tenham sido observados associados a vários tipos de câncer, a importância destes níveis e o papel do eIF4E na progressão de tumores ainda não estão bem esclarecidos (Goodfellow e Roberts, 2008).

Pouco se sabe em relação à regulação da degradação do mRNA que codifica o eIF4E e da própria proteína. Um estudo mostrou que o eIF4E é ubiquitinado no resíduo Lys-159, um sinal de proteólise, e que o uso de um inibidor de proteassoma leva ao aumento dos níveis de eIF4E na célula, sugerindo que a proteólise do eIF4E

é dependente deste proteassoma (Murata e Himotohno, 2006). Além disso, um mutante do W73, incapaz de ligar ao eIF4G ou a 4E-BP, exibe uma degradação aumentada, enquanto a superexpressão da 4E-BP protege o eIF4E da ubiquitinação (Murata e Himotohno, 2006).

2.5.3.2 Regulação por fosforilação do eIF4E

O eIF4E de humanos é alvo de fosforilação em apenas um único sítio, na serina 209, perto da porção C-terminal da proteína (Joshi *et al.*, 1995). A fosforilação do eIF4E ocorre principalmente quando o eIF4E e as chamadas quinases do eIF4E, as Mnks (Mnk1 e 2), estão ligadas ao eIF4G. As Mnks, porém, que interagem diretamente com a região carboxi-terminal do eIF4G, também podem fosforilar o eIF4E na ausência deste último, mas a eficiência desse processo é bem mais baixo (Pyronnet, 2000). A fosforilação do eIF4E parece regular sua função, porém, apesar de extensos estudos ao longo de mais de duas décadas, não há consenso ou mesmo um modelo claro que possa explicar a importância funcional desta fosforilação (Buxade *et al.*, 2008).

Por ser a fosforilação do eIF4E induzida por fatores de crescimento, alguns grupos postulam que a presença da fosforilação aumenta a eficiência de tradução (Scheper & Proud, 2002). Estudos com diferentes organismos sustentam esta teoria, como a utilização de um mutante pontual no sítio de fosforilação do eIF4E de drosófila, que reduz a viabilidade e o tamanho do corpo das larvas (Lachance *et al.*, 2002). O uso do inibidor da quinase Mnk, que bloqueia a fosforilação do eIF4E e inibe a síntese da proteína angiotensina-II, causando hipertrofia muscular de ratos (Ishida *et al.*, 2003). Outros relatos, no entanto, não suportam essa teoria e a análise *in vitro* da interação entre o eIF4E fosforilado na Ser-209 e o cap demonstra que há

uma repulsão eletrostática entre os dois com o aumento da taxa de dissociação do fator de seu substrato no mRNA (Slepenkov et al., 2006). Entretanto, este estudo do cap é controverso, visto que alguns outros estudos prévios sugerem que a fosforilação de eIF4E aumenta a sua afinidade pelo cap, além de também favorecer a sua entrada no complexo de iniciação da tradução (Minich et al., 1994; Pyronnet, 2000; Mahalingam e Cooper, 2001).

Uma terceira teoria propõe que os eventos de fosforilação-desfosforilação não possuiriam relação com a tradução. Um estudo demonstrou que a Mnk1 e 2 são essenciais para a fosforilação do eIF4E, mas não para o crescimento e desenvolvimento celular, pois mutantes com nocautes duplos nas duas Mnks de ratos não apresentaram alterações significativas nos níveis de tradução global (Ueda et al, 2004). Outro estudo demonstrou que a inibição da fosforilação impede a exportação da ciclina D pelo eIF4E, indicando que a fosforilação é um importante regulador da atividade de transporte núcleo-citoplasma (Topisirovic et al., 2004). A fosforilação poderia então estar relacionada com outras funções do eIF4E sem estar necessariamente ligada a tradução.

O efeito da fosforilação do eIF4E e sua relevância funcional é diferente entre os eucariotos, visto que resíduos equivalente a Ser-209 de metazoários não são conservados em fungos, protistas e plantas. Embora conservada entre os metazoários, ortólogos de Mnk também não foram encontrados em *S. cerevisiae* ou em plantas, cujos homólogos de eIF4G não possuem o domínio de ligação a Mnk. Além disso, tanto o EIF4E3 de *Trypanosoma brucei* como o eIF4E de *S. cerevisiae* são fosforilados em resíduos diferentes da Ser-209 (Hernandez et al., 2012). Esses dados suportam a idéia de que a fosforilação na Ser-209 pelas quinases Mnks

envolvem apenas os metazoários, e que mecanismos alternativos devem regular esta fosforilação nos outros eucariotos (Hernandez et al., 2010).

2.5.3.3 Regulação através das 4E-BPs

A participação do eIF4E na iniciação da tradução em metazoários é regulada também através da sua interação com proteínas da família 4E-BP, que funcionam como sequestradores do eIF4E, competindo com o eIF4G pelo mesmo sítio de ligação, inibindo assim a tradução cap-dependente (Figura 12) (Sonenberg E Hinnebusch, 2009). Em mamíferos, a família das 4E-BPs consiste de três proteínas de baixo peso molecular, denominadas 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3. A mais estudada entre elas, a 4E-BP1 (também conhecida com PHAS-I) foi primeiramente identificada em adipócitos como uma proteína fosforilada na serina 64, pela quinase MAPK, em resposta a um tratamento com insulina (Lin et al., 1994; Pause et al., 1994; Zhou e Huang, 2011).

A ligação das 4E-BPs ao eIF4E é controlada, pela fosforilação das 4E-BPs, através do mecanismo em cascata que depende da via I3K/Akt/mTOR (Figura 12) (Hay e Sonenberg, 2004). Quando as 4E-BPs estão hipofosforiladas, elas se ligam ao eIF4E, inibindo a tradução. Mas quando elas se encontram hiperfosforiladas, não se ligam ao eIF4E, que permanece livre para participar da iniciação da tradução (Goodfellow e Roberts, 2008; Jackson et al., 2010). Estas fosforilações ocorrem em resposta a estímulos extracelulares e sinais intracelulares que ativam a via da quinase mTOR (*mamalian Target Of Rapamycin* – alvo da rapamicina de mamíferos). Estes estímulos incluem fatores de crescimento, oferta de energia, disponibilidade de aminoácidos e quantidade de oxigênio. A via da quinase mTOR

fosforila a 4E-BP em múltiplos sítios (Figura 12), tendo sido identificados até agora 6 sítios para a 4E-BP1 (Richter e Sonenberg, 2005; Sonenberg, 2008).

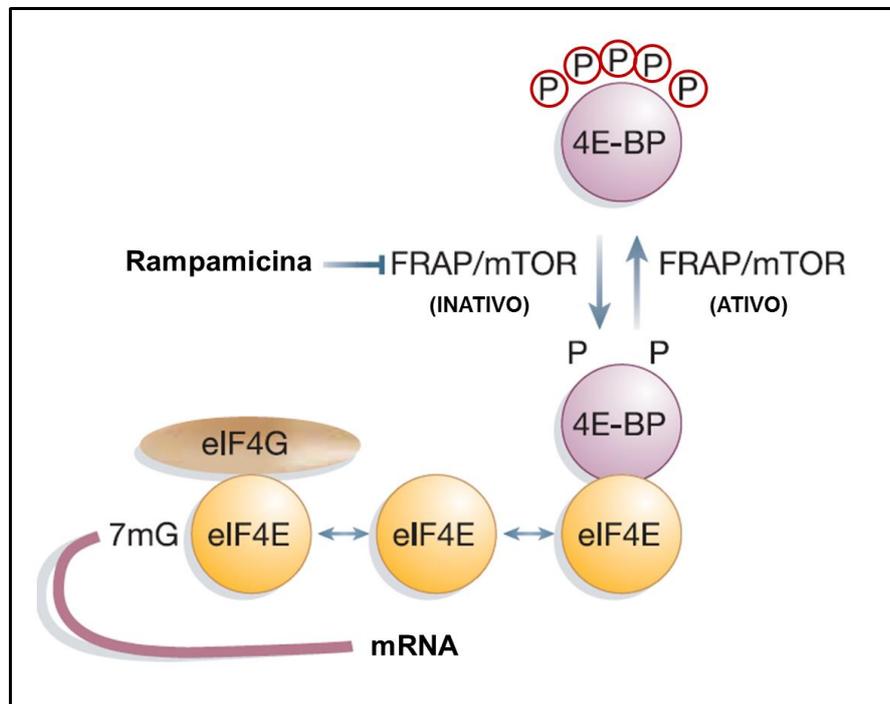


Figura 12. Regulação da atividade do eIF4E pelas 4E-BPs. A quinase FRAP/mTOR hiperfosforila a 4E-BP em vários sítios, o que provoca a liberação do eIF4E para ser ligar ao eIF4G e participar da iniciação da tradução. A inibição da via FRAP/mTOR pela rampamicina leva à hipofosforilação da 4E-BP, competindo com o eIF4G pela ligação com o eIF4E. Assim, a fosforilação da 4E-BP está diretamente relacionada com o aumento da tradução. Fonte: Richter e Sonenberg, 2005.

2.6 O complexo eIF4F e a PABP nos tripanosomatídeos.

A iniciação da tradução nos tripanosomatídeos ainda precisa ser mais compreendida mas, a partir da conclusão do sequenciamento dos genomas das primeiras espécies destes organismos, já foram descritos dois homólogos do fator eIF4A, quatro de eIF4E, cinco de eIF4G e três de PABP em *Leishmania* (Yoffe et al., 2004; Dhalia et al., 2005; Yoffe et al., 2006; da Costa Lima et al., 2010). Com exceção da PABP, que possui apenas dois homólogos encontrados em *T. brucei* e *T. cruzi*, todos os outros fatores possuem o mesmo número de homólogos nas

diferentes espécies de tripanosomatídeos. O número elevado de homólogos de eIF4E (são seis ao todo, com dois ainda não descritos na literatura) e eIF4G chama bastante a atenção, em especial se considerar que eucariotos bem mais complexos, como animais metazoários, tem até três homólogos de eIF4E e em geral um ou dois homólogos de eIF4G (Contreras et al., 2008). É possível que este fato seja consequência do complexo ciclo de vida destes organismos, com dois hospedeiros e formas de vida distintas (Dhalia et al., 2005), embora um outro protozoário com um ciclo de vida ainda mais complexo, como o *Plasmodium falciparum*, conte com apenas dois homólogos de eIF4E (Shaw et al., 2007).

2.6.1 EIF4As

O primeiro homólogo de fator de iniciação da tradução identificado em tripanosomatídeos foi um homólogo de eIF4A de *Leishmania*, denominado de LeIF, que é constitutivamente expresso nas suas fases amastigota e promastigota (Skeiky et al., 1998). Contudo, seu papel na iniciação da tradução só passou a ser investigado mais tarde, quando da identificação de um segundo homólogo deste fator (Dhalia et al., 2005). Em *T. brucei* seus ortólogos foram melhor caracterizados e observou-se que apenas um deles (o *TbEIF4AI* ou *EIF4AI*) é um eIF4A funcional com função na tradução, visto que sua localização é citoplasmática e a depleção pela técnica de RNAi causa a inviabilidade do parasita e inibição da síntese proteica. Já o segundo homólogo de eIF4A também é essencial para a célula mas possui uma localização nuclear e não parece estar envolvido na síntese proteica. Este parece ser um provável ortólogo do eIF4AIII, com quem tem mais homologia de sequência, e por este motivo foi denominado de *TbEIF4AIII* (ou *EIF4AIII*), agindo talvez em

mecanismos de processamento dos mRNAs (Dhalia et al., 2006). Outro estudo independente confirma que a função do EIF4AI deve estar relacionada com a tradução, visto que possui função ATPase dependente de RNA *in vitro* e interage diretamente com o eIF4G de levedura (Barhoumi et al., 2006).

2.6.2 EIF4Gs

Em contraste com os homólogos de eIF4E e eIF4A, cuja similaridade com seus equivalentes de outros eucariotos se dá ao longo de toda a sua sequência, a semelhança entre os cinco homólogos de eIF4G de tripanosomatídeos (EIF4G1 a 5) e os de outros eucariotos se restringe a seu domínio central de ligação ao eIF4A, eIF3 e RNA. A exceção dos EIF4G3 e 4, que possuem região de homologia entre si ao longo de toda a sua sequência, é apenas nesse domínio central que também ocorre homologia entre estas proteínas (Dhalia et al., 2005). Do ponto de vista funcional, até o momento apenas os EIF4G3 e 4 foram direta ou indiretamente implicados na síntese protéica. No caso do EIF4G3, este se mostrou-se capaz de interagir diretamente com o EIF4E4 e com o EIF4AI e o complexo formado foi encontrado na fração polissomal, indicando sua participação na tradução (Yoffe et al., 2009). Em *T. brucei*, as mesmas interações foram observadas, além de uma interação adicional entre o EIF4G3 e o EIF4E3, que parece ser específica desta espécie (Freire et al., 2010). Já no caso do EIF4G4, sua interação específica com o EIF4E3 em *Leishmania* e *T. brucei* reforça um papel na tradução, se não ativamente no processo ao menos como um elemento regulador (Freire et al., 2010; Zinoviev et al., 2012).

2.6.3 PABPs

Os três homólogos da PABP identificados em *Leishmania sp.* possuem todas as regiões identificadas para as PABPs citoplasmáticas, entretanto foi observado que as três proteínas diferem na maneira de se ligar ao RNA alvo. Todas são citoplasmáticas e expressas simultaneamente, mas o tratamento com Actinomicina D leva a migração quase que total das PABP2 e 3 para o núcleo, diferentemente da PABP1. De fato, experimentos de imunoprecipitação mostram que as PABP2 e 3 interagem entre si, e nenhuma das duas se liga a PABP1, enquanto que somente a PABP1 parece interagir com o EIF4G3. Já nos ensaios de RNAi com os dois homólogos da PABP presentes em *T. brucei*, foi observado que as duas proteínas são essenciais para a viabilidade do parasita (da Costa Lima et al., 2010).

2.6.4 EIF4Es

Em *L. major* um primeiro candidato homólogo do eIF4E foi inicialmente identificado e caracterizado (*LeishIF4E-1*) como uma proteína citoplasmática e com afinidades equivalentes de ligação ao cap monometilado e tetrametilado (Yoffe et al., 2004). Posteriormente, um segundo trabalho foi publicado identificando os quatro homólogos de eIF4E caracterizados até o momento (Dhalia et al., 2005). Em seguida ensaios foram realizados onde se avaliou a capacidade dos quatro homólogos de reconhecer diferentes análogos sintéticos de cap e estes mostraram diferentes especificidades para cada proteína. Ao mesmo tempo, quando sua interação com a proteína eIF4E-BP1 de mamíferos foi avaliada, apenas as proteínas EIF4E1 e EIF4E4 se ligaram à GST-eIF4E-BP1 imobilizada em resina (Yoffe et al., 2006).

Mais recentemente a viabilidade celular dos quatro homólogos de eIF4E de *T. brucei* foi investigada através de ensaios de RNAi e sua interação com homólogos de eIF4G também foi avaliada. Estes estudos resultaram na separação das quatro proteínas em dois grupos distintos. Os homólogos EIF4E1 e 2 não estariam diretamente envolvidos na tradução, mas com funções essenciais para a viabilidade celular. Já os EIF4E3 e 4, que são mais abundantes e citoplasmáticos, provavelmente estariam envolvidos na iniciação da tradução. Ensaios de interação proteína-proteína demonstraram a interação dos fatores EIF4G3/EIF4E4 e EIF4G4/EIF4E3, indicando que em tripanosomatídeos pode haver a formação de dois complexos EIF4F distintos (FREIRE *et al.*, 2010). Estes dois complexos poderiam co-existir, realizando, por exemplo, a tradução de diferentes classes de mRNAs, como já foi visto em plantas, que possuem o complexo eIF4F e o eIF(iso)4F (Browning *et al.*, 1992)

Estudos mais recentes foram realizados utilizando células de *Leishmania amazonensis*. Foi observado através de espectrometria de massa que o EIF4E4 interage com homólogos de outros fatores de iniciação da tradução, além do EIF4G3, como homólogos de eIF5, eIF5B, subunidades dos eIF3 e eIF2, além das PABP1 e 2 e algumas proteínas ribossomais (Zinoviev *et al.*, 2011). Em ensaios de duplo-híbrido em leveduras, a ligação do EIF4E4 com o EIF4G3 foi investigada e identificou-se que uma mutação pontual em resíduo do EIF4E4 equivalente ao W73 de mamíferos impede essa interação (Zinoviev *et al.*, 2011). O EIF4E1 também interagiu com vários fatores de iniciação da tradução, como o EIF4AI, e homólogos das subunidades do eIF3 e eIF2 além das PABP1 e 2, com interações muito similares as do EIF4E4. Esta proteína, contudo, não foi capaz de interagir com nenhum dos homólogos do EIF4G (Zinoviev *et al.*, 2011).

Outro estudo com *L. amazonenses*, focando no EIF4E3, mostrou que este interage fortemente com o EIF4G4, porém dificilmente se liga ao cap4. Além disso, nenhum destes dois fatores co-migram com polissomas em gradientes de sacarose. Por conta disso, é provável que não atuem na iniciação da tradução global. Na microscopia confocal, o EIF4E3 foi encontrado dentro de grânulos induzidos por estresse nutricional, mas seu parceiro EIF4G4 não foi encontrado no mesmo local, o que é esperado, visto que sob esta condição, a interação entre essas duas proteínas seria diminuída. Provavelmente, no estresse, o EIF4E3 sofre alguma modificação, sendo liberado pelo EIF4G4 para entrar nos grânulos provocados pelo estresse, onde os mRNAs inativos são armazenados (Zinoviev et al., 2012).

2.7 Modificações pós-traducionais

Modificações pós-traducionais possuem papel fundamental na regulação da expressão gênica, especialmente ao nível transcricional. A expressão de muitos genes pode ser alterada simultaneamente em resposta a estímulos extracelulares, através de reações em cascata (Yang, 2005; Fernandez-Moya e Estevez, 2010). As modificações mais importantes conhecidas nas proteínas incluem a adição de pequenos grupos químicos, como fosfato, metil, acetil, lípideos, e açúcares, como também polipéptidos inteiros, tais como ubiquitina ou SUMO, que são empregados para controlar as interações entre fatores protéicos e propriedades como, localização, estabilidade e atividade das proteínas-alvo (Ulrich, 2012; Castro et al., 2012)

2.7.1 Fosforilação

Durante o curso da evolução, a fosforilação emergiu como um dos tipos de modificação pós-traducional mais importantes para o controle da função de proteínas, talvez devido à sua versatilidade e rápida reversibilidade, e até hoje é a modificação pós-traducional melhor estudada. Fosfo-aminoácidos são gerados como novas entidades químicas que não se parecem com qualquer aminoácido natural, e assim, proporcionam um meio de diversificar a natureza química da superfície da proteína (Hunter, 2012). A fosforilação reversível funciona como um interruptor molecular, que permite a regulação do metabolismo e a transdução de sinal nas células (Leitner et al., 2011).

Quase um terço de todas as proteínas eucarióticas são modificadas pela fosforilação, atuando em resíduos de serina, treonina ou tirosina, controlando um enorme número de funções celulares (Walsh *et al.*, 2005; Andreeva e Kutuzov, 2008). Na célula, fosfatases e quinases têm um papel antagônico, controlando a fosforilação. Dessa forma elas podem modular a função de diferentes proteínas através de mudanças conformacionais que alteram suas atividades, causam mudanças de estabilidade, modificam sua localização celular e influenciam na formação de complexos protéicos. Essas mudanças ocorrem através de cascatas de sinalização e regulam processos como o ciclo celular, a diferenciação, a interação entre célula-célula e célula/substrato, a motilidade celular, a resposta imune, a atividade de transporte transmembrana, a transcrição gênica, a tradução do mRNA e também o metabolismo básico (Szöör, 2010). Talvez não surpreendentemente, proteínas quinases e fosfatases tornaram-se fortes alvos na descoberta de drogas nos últimos anos. Vários inibidores de quinases têm sido identificados exibindo seletividade e, no caso de patógenos, atividade anti-parasitária, podendo

representar candidatos promissores para drogas anti-parasitárias (Kutuzov e Andreeva, 2008).

2.7.2 Glicosilação

A glicosilação de proteínas é reconhecida como uma das modificações pós-traducionais mais frequentes e complexas agindo sobre as proteínas. As mudanças na abundância das glicoproteínas, o grau de glicosilação, e a estrutura do glicano estão associadas com uma variedade de doenças, inclusive alguns tipos de câncer (Zang et al., 2012). Os dois tipos mais comum de glicosilação são a N-glicosilação e a O-glicosilação. Nas N-glicoproteínas, os carboidratos são ligados à resíduos de asparagina presentes no motivo NXST, sendo o X qualquer aminoácido exceto prolina. No caso da O-glicosilação, os carboidratos são ligados à resíduos de serina ou treonina (Zang et al., 2012).

2.7.3 Acetilação e Metilação

A acetilação ocorre através da transferência do radical acetil a partir da acetil-CoA para o grupo amino de um resíduo de lisina presente na proteína. É uma modificação reversível, tendo seus níveis equilibrados por duas enzimas, a acetiltransferase e as desacetilases (You et al., 2012). Já a metilação é caracterizada por uma adição do grupo metil (-CH₃) ao nucleotídeo citosina, pela enzima DNA metiltransferase, que atua na estabilidade do genoma e na repressão da expressão gênica (Kobow e Blümcke, 2012). A adição do grupo metil também pode ocorrer em resíduos de lisina, nas proteínas, sendo bem estudada regulando atividade das histonas, juntamente com a acetilação. A acetilação das histonas está

associada com ativação transcricional, enquanto que a metilação das histonas recrutam complexos que promovem um estado de repressão da cromatina (Zhang et al., 2012; Bilinski et al., 2012).

2.7.4 Ubiquitinação e Sumoilação

A ubiquitinação atua como um sinal celular versátil que controla uma variedade de processos biológicos, incluindo degradação de proteínas, reparação do DNA, endocitose, autofagia, transcrição, imunidade e inflamação. A ubiquitina é uma proteína de baixo peso molecular composto de 76 aminoácidos, que pode ser ligado covalentemente a resíduos de lisina presente em proteínas alvo. Esse é em geral o sinal para o reconhecimento e proteólise dependente de ATP destas proteínas, pelo proteassoma 26S (Pickart e Eddins, 2004). A especificidade da sinalização da ubiquitina é conseguida por sinais conjugados alternativos (monoubiquitina e cadeias de ubiquitina) e interações com proteínas de ligação a ubiquitina (conhecidos como receptoras de ubiquitina) que interpretam os sinais das proteínas ubiquitinadas a partir de cascatas bioquímicas na célula (Husnjak e Dikic, 2012).

Uma série de análogos de ubiquitina modificados (UBLs - *ubiquitin-like modifiers*) também foram descritos e partilham uma conformação estrutural e a maquinaria de conjugação (Castro et al., 2012). Uma destas UBLs, a SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), é um fator essencial no processo de desenvolvimento dos organismos eucarióticos, estando implicada em vários mecanismos celulares, como a manutenção da integridade do genoma, transporte, modulação da transcrição e regulação do ciclo celular (Hay, 2005; Ulrich, 2009; Lomeli e Vazquez 2011). Diferentemente da ubiquitina, a SUMO não deve estar associada com degradação

de proteínas, e como estas duas modificações tem como alvo os mesmo tipo de aminoácido, elas foram inicialmente sugeridas como processos antagônicos (Wilkinson e Henley, 2010). A SUMO é uma pequena proteína de aproximadamente 100-115 aminoácidos, que apesar de apresentar uma homologia baixa com outras UBLs, compartilha de uma conformação estrutural semelhante. Ao contrário da ubiquitina, a SUMO possui uma extensão de aminoácidos flexível em sua extremidade N-terminal, e é diferentemente carregada (Castro et al., 2012).

2.7.5 Modificações pós-traducionais nos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos também possuem proteínas que são modificadas pós-traducionalmente através de sítios específicos para glicosilação, fosforilação, acetilação e metilação, como ocorrem com os demais eucariotos. Além destas, eles possuem também um tipo peculiar de modificação pós-traducional denominada de fosfoglicosilação (Haynes, 1998), que não foi encontrada em nenhum eucarioto pluricelular, embora tenha sido observada também em outros grupos de protistas unicelulares como a ameba *Dictyostelium discoideum* e a *Entamoeba histolitica* (McConville et al., 2002). Esta modificação parece ser a forma mais abundante das proteínas glicosiladas encontradas em espécies de *Leishmania*, onde um grupo fosfato é adicionado ao açúcar ligado em resíduos de serina ou treonina (McConville et al., 2002).

Nos tripanosomatídeos, as glicosilações são mais estudadas em proteínas de superfície de membrana e proteínas de secreção, pois estão fortemente relacionadas com a patogenicidade, relação parasito-hospedeiro e com a capacidade de escapar do processo de fagocitose, como a GP63 de *Leishmania*

(Ilgoutz e McConville, 2001) e as VSGs de *Trypanosoma brucei* (Holder, 1985). Assim, algumas destas proteínas, e também as enzimas que realizam a glicosilação, são consideradas fortes candidatas a antígenos de vacinas contra estes parasitas (Duschak e Couto, 2012; DC-Rubin e Schenkman, 2012). No caso da fosforilação, análises realizadas nos genomas de *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* identificaram uma quantidade bastante elevada de quinases em relação a outros eucariotos, mostrando que eles codificam, respectivamente, 179, 156 e 171 proteínas cataliticamente ativas (Brenchley et al., 2007; Fernandez-moya e estevez, 2010). Durante os diferentes estágios do ciclo celular destes parasitas, foram observados padrões diferenciados de fosforilação de proteínas, sugerindo que as quinases e fosfatases estejam envolvidas também nos processos de diferenciação celular (Bengs et al., 2005). Especula-se ainda que também estejam associadas ao desenvolvimento do processo de infecção, no momento da interação parasito-hospedeiro (Naula, et al., 2005).

Mais recentemente, as modificações por ubiquitinação e sumoilação começaram a ser mais estudadas, visto que os genes ortólogos das enzimas e proteínas que participam deste processo foram identificados nos tripanosomatídeos. Observou-se que o sistema para a realização destas modificações está ativo nestes parasitas (Bayona et al., 2011).

2.8 Resultados prévios que deram origem a este trabalho

No intuito de investigar diferenças funcionais nos homólogos de eIF4E de tripanosomatídeos, sua expressão em formas representativas do ciclo de vida de *Leishmania* foi analisada de forma mais detalhada (Pereira, 2008, Dissertação de

Mestrado). Curvas de crescimento de formas promastigote e também induzidas a diferenciação em amastigotas foram estabelecidas para *L. amazonensis* e a expressão de cada homólogo analisada individualmente utilizando soros policlonais previamente produzidos contra os mesmos. No caso do crescimento das formas promastigotas, foi observado que os fatores EIF4E1 e EIF4E2 estão presentes em baixos níveis durante toda a extensão das curvas geradas, de forma constitutiva. Já os EIF4E3 e EIF4E4, moléculas bem mais abundantes, também são expressos constitutivamente, entretanto ambos são representados por duas ou mais isoformas cujo padrão de expressão varia ao longo das fases de crescimento do parasita, em curvas padrão (Figura 13A).

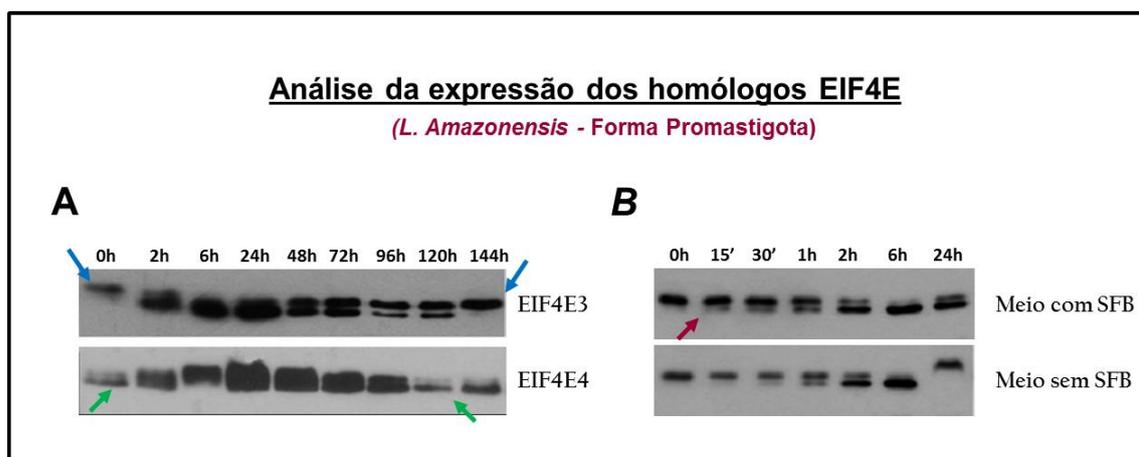


Figura 13. Análise da expressão de homólogo selecionados de eIF4E de *Leishmania* durante curva de crescimento em promastigota. (A) Ensaios de *Western-blot* dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 mostrando a expressão destas proteínas durante uma curva de crescimento padrão de células promastigotas. As setas azuis realçam as isoformas do EIF4E3 predominantemente expressas no início e fim da curva, que contrastam com as isoformas predominantes do EIF4E4 (setas verdes) nas mesmas condições. **(B)** *Western-blot* do EIF4E3, sob estresse nutricional. A seta vermelha realça a diferença na expressão da isoforma de menor peso molecular da proteína já a partir dos primeiros 15 minutos da curva. Fonte: Pereira, 2008.

As isoformas presentes nestes dois fatores se comportam de maneira antagônica, visto que em condições onde a isoforma de maior peso molecular do

EIF4E3 está exclusivamente presente, no início e fim das curvas, ocorre a predominância das isoformas de menor peso molecular do EIF4E4 (Figura 13A). Este padrão de expressão é rapidamente alterado quando a curvas se iniciam de forma que com 6 horas de cultivo o padrão de expressão destas isoformas se inverte, uma vez que nestas condições as isoformas de menor peso molecular no EIF4E3 prevalecem enquanto que isoformas de maior peso molecular são observadas para o EIF4E4. Já no restante da curvas ocorre um padrão misto de expressão das diferentes isoformas.

Na curva de diferenciação em amastigota, essa alternância entre isoformas dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 também é observada de acordo com a fase de crescimento, porém, ocorre uma diminuição brusca da expressão das duas proteínas no final da curva. Ensaio de localização subcelular com amostras das diferentes fases de crescimento de promastigota não mostraram diferenças no padrão de localização destas isoformas encontradas, estando em geral espalhadas pelo citoplasma (Pereira, 2008, Dissertação de Mestrado). Através de ensaios de marcação metabólica, foi possível correlacionar baixos níveis de síntese protéica com a presença das isoformas de maior e menor peso molecular, respectivamente, para os EIF4E3 e EIF4E4.

O padrão de expressão das isoformas dos EIF4E3 e 4 também é modificado em condições em que o crescimento das células é alterado por meio de interferências com as condições de cultivo. Como, por exemplo, quando as células são submetidas a crescimento por 24 horas em meio sem soro fetal bovino, a isoforma predominante do EIF4E4 passa a ser a de menor peso molecular, característica da fase estacionária. Já para o EIF4E3 uma terceira isoforma aparece em 24h, de peso molecular ainda maior (Figura 13B). Além disso, nota-se

claramente que aos primeiros 15 minutos de repique já começa a aparecer a isoformas de menor peso molecular do EIF4E3. Esse resultado é uma confirmação de que as isoformas observadas devam ocorrer devido à modificações pós-traducionais, visto que este é um tempo bastante curto para modificações no processo transcricional ou até mesmo traducional.

Vale ressaltar que este padrão mínimo de duas isoformas observadas para os EIF4E3 e 4 também foi observado com a proteína PABP1 de *Leishmania* (dados não mostrados), sendo que neste caso já se sabe que a banda de maior peso molecular é produto de fosforilação da proteína (Bates *et al.*, 2000). Esses resultados obtidos, juntamente com o fato de homólogos de eIF4E em outros eucariotos também serem regulado por fosforilação, sugere a possibilidade de que as isoformas de maior peso molecular dos EIF4E3 e 4 sejam produtos de modificações pós-traducionais, possivelmente fosforilação.

O presente trabalho teve como ponto principal investigar melhor as modificações pós-traducionais associados as diferentes isoformas observadas para os fatores EIF4E3 e 4 de *Leishmania*. Para isso, buscou-se verificar as mudanças que ocorrem no padrão de expressão destas isoformas, com a inibição de processos celulares importantes, como a transcrição, tradução e processamento de mRNAs e correlacionar estas mudanças com o ciclo celular da célula. Estas modificações foram também estudadas fazendo uso de eletroforese em gel bidimensional que permite avaliar melhor o número de modificações e sua natureza. Focando no EIF4E3 e fazendo uso de ferramentas genéticas de manipulação de *L. amazonensis* e *L. infantum* novas abordagens foram utilizadas com o foco na identificação de sítios alvos para estas modificações e na caracterização de propriedades dessa proteína que possam ser alteradas de acordo com a isoforma expressa.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Identificar, em espécies de *Leishmania* sp., a natureza de modificações pós-traducionais que atuam sobre homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E selecionados, avaliando também eventos associados com a formação destas modificações e as possíveis conseqüências da sua presença na função dos fatores em estudo.

3.2 Objetivos específicos:

3.2.1 Avaliar a associação entre a expressão/modificação de isoformas dos fatores EIF4E3 e eIF4E4 de *L. amazonensis* e os processos metabólicos básicos como transcrição, tradução e ciclo celular.

3.2.2. Investigar a natureza das modificações pós-traducionais direcionadas aos EIF4E3 e 4 de *L. amazonensis* e *L. infantum*, com o foco na confirmação da existência de eventos de fosforilação e na definição de quantas isoformas são identificadas para cada proteína.

3.2.3. Avaliar de forma comparativa as modificações pós-traducionais que agem sobre os homólogos de EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* e identificar possíveis sítios alvos responsáveis pela expressão diferenciada nas duas espécies.

3.2.4. Identificar a associação dos EIF4E3 e 4 de *L. amazonensis* e *L. infantum* com parceiros ligantes buscando avaliar novas propriedades funcionais ainda não descritas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção, manutenção e congelamento de células infectivas de *Leishmania sp.*

A obtenção de células infectivas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/77/LTB0016) foi realizada através da inoculação no coxim plantar de camundongos Balb/C, de 10^7 células da forma metacíclica, encontradas na fase estacionária, diluídas em 25 μ l de PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,47 mM KH_2PO_4 , pH 7.3). Após o aparecimento da lesão cutânea, entre quatro a oito semanas após o inóculo, os camundongos foram sacrificados em câmara de gás CO_2 , específica para roedores. As lesões foram cuidadosamente retiradas com bisturi e pinça e colocadas em PBS, onde foram maceradas e processadas para separar as formas amastigotas infectivas (ULIANA ET AL, 1999). As células obtidas foram colocadas em meio Schneider pH 7,2, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 0,1% v/v de Penicilina e Estreptomicina (Sigma-Aldrich Co.), para realização da diferenciação em formas promastigotas. Após a diferenciação, culturas em crescimento exponencial foram congeladas com glicerol a 60%, na proporção de 1:1. As células de *L. infantum* (MHOMMA#67#ITMAP-263) foram obtidas através do grupo colaborador do trabalho, do Centre de Recherche en Infectiologie, no Québec, Canadá.

A manutenção das culturas das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foi realizada no meio Schneider pH 7,2 suplementado, e os parasitas foram mantidos e repassados em fase exponencial de crescimento, na temperatura de 26°C. Culturas de células de *L. infantum* também foram mantidas em meio SDM-79,

suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 5µg/ml de hemina e 0,1% v/v de Penicilina e Estreptomicina, nas mesmas condições acima.

4.2 Curvas de crescimento padrão e na presença de inibidores de diferentes processos celulares.

Células das três espécies estudadas na fase estacionária de crescimento foram repassadas para meio Schneider pH 7,2 numa diluição de 10^6 células/ml. Alíquotas foram retiradas nos pontos 0h, 2h e 6h e diariamente até a fase de morte celular. As culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos, lavadas com PBS, e ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE, para uma concentração de 10^5 células/µl. Para a inibição dos diferentes processos celulares, células na fase estacionária também foram repassadas para meio Schneider pH 7,2 numa diluição de 10^6 células/ml, e tratadas separadamente com os inibidores de transcrição (Actinomicina D 10 µg/ml), tradução (Cicloheximida 50 µg/ml e Puromicina 50 µg/ml), processamento de mRNAs (Sinefugina 2,6 µM) e ainda inibidor de proteasoma (Lactacistina 50 µM) e de fosfatases (Acido Okadáico 10µM). Para as diferentes curvas, volumes correspondentes a cerca de 10^6 células de cada amostra foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) para detecção das proteínas de interesse através de ensaios de *Western-blot*.

4.3 Ensaios de sincronização celular com Hidroxiuréia.

Células na fase estacionária de crescimento foram repassadas para meio Schneider pH 7,2 numa diluição de 10^6 célula/ml. Após 48h de crescimento, a cultura

foi dividida em duas alíquotas denominadas amostras 1 e 2, sendo a amostra 1 mantida em crescimento e a amostra 2 separada para processamento como descrito a seguir (figura14).

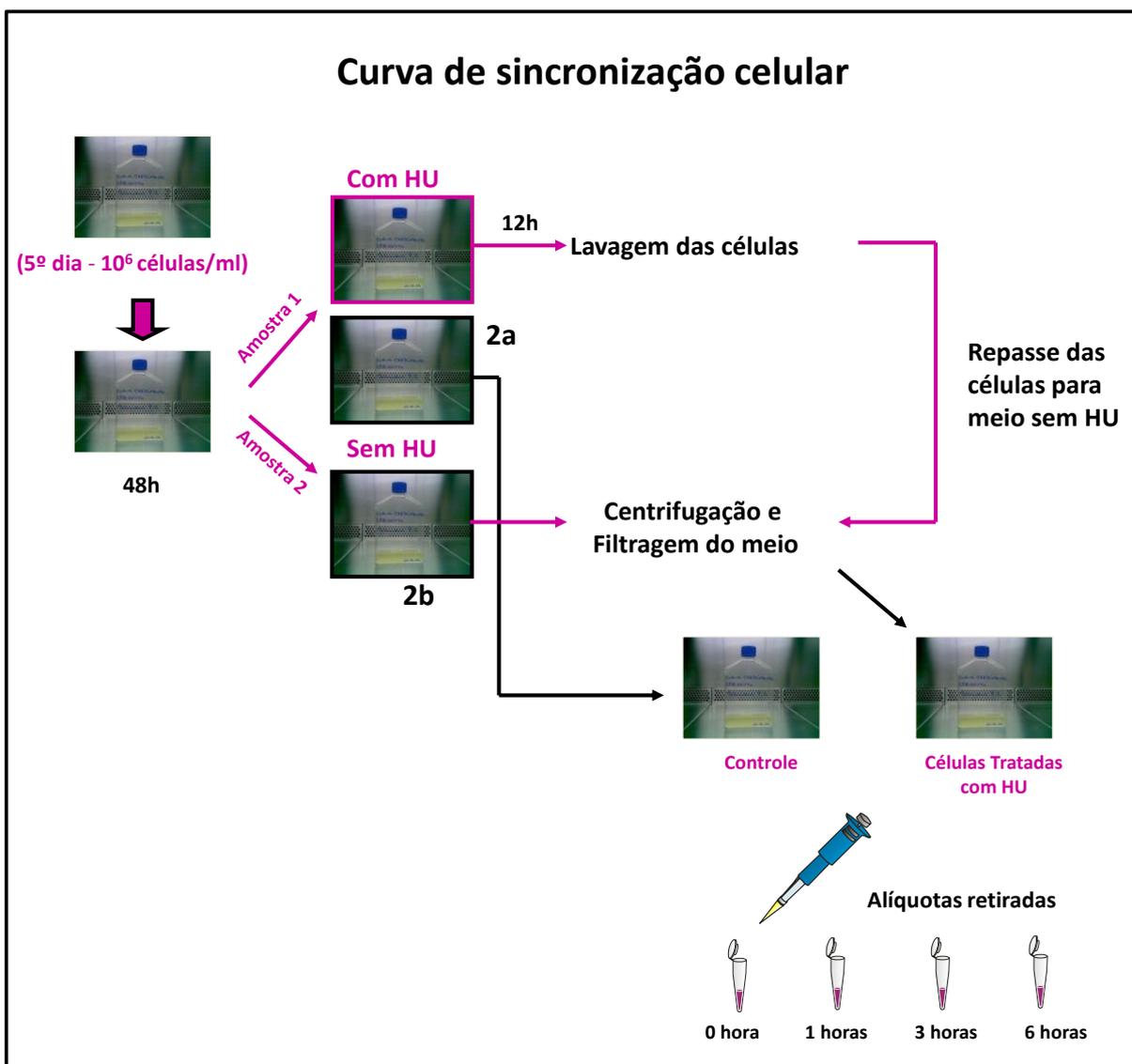


Figura 14. Esquema da curva de crescimento na presença de Hidroxiuréia (HU). Na amostra 1 foi adicionado a HU, enquanto que a amostra 2 foi dividida em duas culturas com o mesmo volume da amostra 1, e denominadas de 2a e 2b. A amostra 2a foi utilizada como controle do experimento. Já a amostra 2b foi centrifugada para baixar as células crescidas, e filtrada, para que o meio pudesse ser reaproveitado para repassar as células da amostra 1. Assim, as células tratadas com HU poderiam retomar o seu crescimento no meio livre do composto.

Esta amostra 2 também foi dividida em duas novas alíquotas, denominadas amostras 2a (controle) e 2b (Hidroxiuréia). A amostra 2b foi então tratada com

Hidroxiuréia (HU - Sigma), numa concentração de 15 mM, por 12h. A amostra 1, após este período, foi centrifugada a 7000 rpm por 5 minutos, as células foram descartadas e o meio foi filtrado e dividido em duas novas garrafas estéreis. Já as amostras 2a e 2b foram centrifugadas a 600 rpm por 10 minutos, lavadas com PBS, e as células foram ressuspensas no meio previamente filtrado oriundo da Cultura 1 (Figura 14). Alíquotas das Culturas controle e tratada com Hidroxiuréia foram retiradas nos pontos 0h, 1h, 3h e 6h e fracionadas em gel SDS-PAGE para visualização das proteínas de interesse através de ensaios de *Western-blot* (Figura 14).

4.4 Ensaio de purificação e análise de fosfoproteínas.

A purificação do conjunto de fosfoproteínas de *L. amazonensis* foi realizada com o sistema comercial *PhosphoProtein Purification Kit*[®] (Qiagen), onde foi possível realizar a separação da fração de proteínas fosforiladas do total protéico das células. Cerca de 2×10^8 células de cultura exponencial foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, lavadas com HEPES 10 mM pH7,0 e centrifugadas novamente sob as mesmas condições. O sedimento foi ressuspensado em 3 ml de tampão de lise proveniente do próprio *kit*, com nova centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido após a lise foi quantificado através do método de Bradford, e 25 mg de proteína total foi diluída em 25 ml do mesmo tampão de lise. Esta amostra foi passada em uma coluna de íons metais positivamente carregados, e as proteínas fosforiladas (carregadas negativamente) foram atraídas e retidas pela coluna. Nesta etapa, foi coletada a fração não ligante (Sobrenadante). Após sucessivas lavagens, foram feitas seis eluições de 500 µl cada. O lisado total (30

µg), a fração não ligante (30 µg) e as eluições (100 µl) foram fracionadas em SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF para detecção das proteínas de interesse através de ensaios de *Western-blot*.

4.5 Amplificação e clonagem dos fragmentos EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Para a amplificação do gene *EIF4E3* de *L. amazonensis* e *L. infantum* a partir do DNA total, foi desenhado um par de oligonucleotídeos (Primer 5' – GGATCCATG AACCCGTCTGCCGCAGCATAC / Primer 3' – AAGCTTCTAAGCATAATCTGGCAC ATCATAAGGATAGAASGTGTGATCGGGCGAGATCT) contendo os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Além disso, no primer 3', foi adicionada a sequência que codifica um epítipo de 9 aminoácidos da proteína Hemaglutinina do vírus influenza (epítipo HA), para ser utilizado para detecção posterior.

Para a reação de PCR foi utilizado o sistema baseado na enzima Phusion (*High-Fidelity PCR kit* – New England Biolabs) na condição de 98°C por 4 minutos para desnaturação inicial, seguida de 10 ciclos no sistema *touchdown*, diminuindo a temperatura de anelamento em 1°C a cada ciclo (98 °C – 1min / 65°C a 55°C – 30s/ 72°C – 30s). Para finalizar, foi utilizado um programa de 25 ciclos utilizando a temperatura de anelamento mais baixa (98 °C – 1min / 55°C – 30s/ 72°C – 30s) e 5 minutos para extensão final a 72°C. Os fragmentos amplificados foram purificados com o sistema GFX (GE Healthcare) e clonados no vetor pGEMT *easy* (Promega), de acordo com as especificações dos fabricantes.

4.6 Estratégia de amplificação dos mutantes do gene *LaEIF4E3*.

Neste trabalho, quatro genes *EIF4E3* mutantes de *L. amazonensis* foram construídos para investigar quais efeitos causariam nas modificações em estudo. Para isso, oligonucleotídeos foram desenhados com as mutações em pontos selecionados para realização da mutagênese (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs de mutagênese.

MUTANTE EIF4E3	PRIMER UTILIZADO PARA A MUTAGÊNESE
EIF4E3 New NT Alteração do Aminoácido Tirosina 8 para Alanina	Forward 5' <u>GGATCC</u> CGCCACCATGAACCCGTCTGCCGAGCA GCCATACCACCGAAAAGCGAT 3'
EIF4E3 New CT Alteração do Aminoácido Serina 344 para Alanina	Reverse 5' <u>AAGCTT</u> CTAAGCATAATCTGGCACATCATAAGGATAG AAGGTGTGATCGGGCGCGATCTTCGTCTTGCCCTT 3'
EIF4E3 PF-A Alteração dos Aminoácidos Prolina 45 e Fenilalanina 46 para Alanina	Reverse 5' TTCGGGCCGCCAGGCACGGCCGCTCTGCGGCCG CGCTTAG 3'
EIF4E3 S75A Alteração do Aminoácido Serina 75 para Alanina	Reverse 5' CGGGCGCTCCGTGAGCGGGCGCACAGTCGTCT TTCCGTC 3'

Legenda : Em vermelho, as bases mutadas que reflete na modificação do aminoácido. Sublinhado em preto, os sítios de restrição *BamHI* e *HindIII* adicionado aos primers utilizados na estratégia de PCR única.

A estratégia de mutagênese foi realizada através de reação de PCR única ou seqüencial, utilizando a combinação dos primers mutados com os primers 3' ou 5' do gene selvagem, citados no tópico anterior. Os fragmentos mutantes 4E3 Δ Y8A-HA e 4E3 Δ S344A-HA foram amplificados a partir de PCR única. Já os mutantes 4E3 Δ P45/F46A-HA e 4E3 Δ S75A-HA foram gerados a partir da PCR seqüencial (Figura 15). Para a reação de PCR também foi utilizado o sistema baseado na

enzima Phusion[®] (*High-Fidelity PCR kit*), nas mesmas condições citadas no tópico anterior.

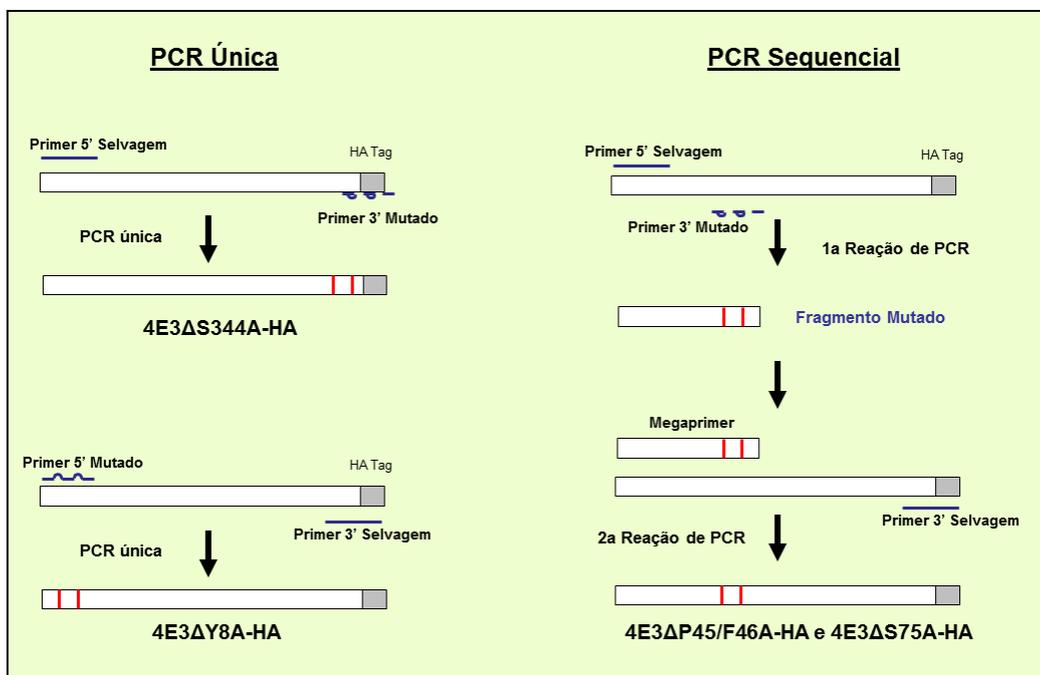


Figura 15 – Estratégias de amplificação dos mutantes do gene EIF4E3 de *L. amazonensis*. Esquema da PCR única e sequencial utilizada para amplificação dos genes mutantes do EIF4E3. Na PCR única, foram amplificados os mutantes 4E3ΔS344A-HA e 4E3ΔY8A-HA. Na PCR sequencial, utilizando os megaprimers formados na primeira PCR, foram amplificados os mutantes 4E3ΔP45/F46A-HA e 4E3ΔS75A-HA. Cada reação de amplificação utilizou uma combinação de oligonucleotídeos com a sequência dos genes selvagens com os oligonucleotídeos contendo mutações nos pontos selecionados.

4.7 Subclonagens do fator EIF4E3 e seus mutantes.

A partir das clonagens obtidas no pGEMTeasy, foi realizada uma digestão dos genes *EIF4E3* selvagens e mutantes com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*. Assim, foi possível realizar a subclonagem no plasmídeo pSPBT1Yneo^oLR (Padmanabhan et al., 2012), construído a partir do pSP72 (promega) e gentilmente cedido pelo Centre de Recherche en Infectologie, no Québec, Canadá. Este plasmídeo modificado permite a integração do gene de interesse ao loco do gene

constitutivo Biopteridina (BT1) de *Leishmania infantum*, permitindo assim a seleção dos transfectantes com o antibiótico neomicina.

Os genes *EIF4E3* de *L. infantum* e *L. amazonensis* selvagens foram subclonados, no pET21a (Novagen), para ser utilizado em ensaios de transcrição e tradução *in vitro*. Os genes *EIF4E4* de *L. infantum* selvagem e com a mutação no sítio de ligação ao cap no triptofano 305 (*EIF4E4WΔ305*), clonados no pSPBT1YneoαIR em um trabalho anterior, também foram subclonados no pET21a, para a mesma finalidade. Os fragmentos e vetores foram purificados com o sistema GFX[®] (GE Healthcare) e a ligação foi realizada com a enzima T4 DNA ligase[®] (New England Biolabs), de acordo com o fabricante, utilizando 20 ng do vetor purificado e concentrações variadas dos fragmentos. A transformação bacteriana, tanto nas clonagens quanto nas subclonagens, foi realizada segundo Sambrook e Russel (2001), utilizando 5 µl das construções plasmidiais.

4.8 Transfecção e expressão das construções selvagens e mutantes.

Para a realização do procedimento de transfecção, foi utilizada $2,5 \times 10^8$ células de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Estas células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas com 5 ml de Tampão HEPES-NaCl pH 7,05 (20 mM HEPES, 85 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na₂PO₄ e 20 mM Glicose), ressuspendidas em 400 µl do mesmo tampão e transferidas para cuvetas de 2 mm (Biolabs), já contendo de 5 a 10 µg da construção plasmidial a ser transfectado. Após 15 minutos no gelo, as cuvetas foram colocadas no eletroporador BTX ECM830 (BTX Harvard apparatus), e as células submetidas a eletroporação (6 pulsos de 900V com duração do pulso de 300 µs e intervalo de 200 ms). Imediatamente após o procedimento, foi adicionado 1 ml

de meio Schneider pH 7,2 na cuveta e a amostra repassada para um frasco de cultura, com 5 ml do mesmo meio. A pré-seleção foi realizada no dia seguinte, adicionando mais 5 ml de meio Schneider pH 7,2 e 8 µl de neomicina a 50 mg/ml. Após 24h, foi feita uma diluição de 1 ml das culturas transfectadas em 5 ml de meio Schneider pH 7,2 com a mesma concentração de neomicina da pré-seleção. Os transfectantes foram obtidos entre 7 e 14 dias após o início da etapa de seleção.

4.9 Superexpressão do fator EIF4E3 e seus mutantes.

O plasmídeo pSPBT1YneoαIR permite a expressão constitutiva das respectivas proteínas em níveis significativos. Após a seleção da transfecção, as células foram repassadas em meio Schneider pH 7,2 e seu crescimento foi acompanhado diariamente por visualização em microscópio invertido. Células na fase exponencial foram utilizadas na preparação de extratos celulares para fracionamento em gel SDS-PAGE, e em dois tipos de lisados, para uso em ensaios de imunoprecipitação e focalização isoeétrica. Células já transfectadas com o EIF4E4 selvagem e o seu mutante foram crescidas em meio SDM-79 e utilizadas nos ensaios de imunoprecipitação.

4.10 Imunoprecipitação de complexos protéicos *in vivo*.

As proteínas de interesse foram imunoprecipitadas a partir das células transgênicas, expressando os homólogos possuindo a marca de identificação HA. Cerca de 2×10^8 células na fase exponencial de crescimento foram centrifugadas, lavadas com Hepes 10 mM e ressuspendidas em tampão de lise brando (20 mM Hepes KOH pH 7.4, 5 mM acetato de potássio, 4 mM acetato de magnésio, 2 mM

DTT), acrescido de inibidor de proteases EDTA-free[®], (Roche) e inibidor de fosfatases phosphostop[®] (Roche), de acordo com as instruções do fabricante. Para auxiliar na lise celular, oito ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido foram realizados, a amostra foi novamente centrifugada e 200 µl do sobrenadante incubado com 30 µl do anticorpo monoclonal anti-HA imobilizado em agarose (Sigma), previamente lavado quatro vezes com 1 ml de PBS. Após 2 horas de incubação a 4°C, a amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante, o lisado depletado, armazenado para estudo. A resina foi lavada novamente quatro vezes com 1 ml de PBS e, na última lavagem, 10 a 15 µl de PBS foi adicionado na resina. O produto precipitado do ensaio, juntamente com o lisado total e o depletado, foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de PVDF para posterior análise por *Western-blot*, com anticorpos dirigidos contra os possíveis parceiros ligantes já conhecidos.

4.11 Focalização isoelétrica e géis bidimensionais.

Para a focalização isoelétrica, cerca de 5×10^8 células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas com HEPES 10 mM seguida de nova centrifugação e o sedimento foi ressuscitado em tampão de lise para bidimensional (7M uréia, 2M tiuréia, 4% CHAPS, 40 mM Tris). O lisado foi purificado por precipitação com o sistema *2D clean-up* (GE-Healthcare), segundo o manual do fabricante ou utilizando TCA 10% e acetona 80%, e as amostras foram solubilizadas em tampão de hidratação (8 M uréia, 4% CHAPS, 2M tiuréia e traços de azul de bromofenol). As amostras solubilizadas foram quantificadas pelo método de Bradford e, para realização da primeira dimensão, 75 a 160 µg de proteína total foram

aplicadas em fitas *immobiline dry-strips*[®] de 11 cm (GE-HealthCare), com faixas de pH entre 4-7 e 6-11. A focalização foi realizada no aparelho Ettan IPGphor 3[®] (GE-HealthCare), com base nas condições recomendadas pelo fabricante.

Para a segunda dimensão, as fitas foram incubadas com tampão de equilíbrio (6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 50mM tris pH 8,8 e traços de azul de bromofenol) contendo 10 mg/mL DTT por 15 minutos e posteriormente com Iodoacetamida 25 mg/mL, também por 15 minutos. As fitas equilibradas foram montadas em placas contendo gel SDS-PAGE 12,5%. Após a corrida, o gel foi corado com prata ou transferido para membranas de PVDF para realização dos ensaios de *Western-Blot*.

4.12 Ensaios de *Western-Blot*

Os extratos e lisados obtidos a partir das células em estudo foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membranas PVDF (Immobilon-P – Millipore[®]) para a realização dos ensaios de *Western-blot*. As membranas foram bloqueadas em solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5), leite desnatado 5% e Tween-20 a 0,05% em temperatura ambiente (TA) por uma hora. Em seguida, a membrana foi incubada com soro policlonal ou anticorpo purificado, produzidos previamente, em diluição pré-definida, durante uma hora em solução de TBS, leite 5% e Tween-20 a 0,05%. Nos ensaios utilizando amostras das células transfectadas, anticorpos monoclonais anti-HA (Invitrogen) foram utilizados numa diluição de 1:5000. Após lavagem com TBS, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado com peroxidase - Jackson ImmunoResearch Laboratories), numa diluição de 1:10.000 e 1:5000, respectivamente, na mesma solução que a incubação anterior, seguida de nova

lavagem com TBS. A membrana foi incubada por 1 minuto com uma solução contendo 1,2 mM de luminol, 0,4 mM de iodofenol (em DMSO) e 0,03% peróxido de hidrogênio. O sinal foi visualizado através de quimioluminescência (técnica ECL – *Enhanced Chemiluminescence*) em filme Kodak Biomax Light, com tempos de exposição pré-definidos.

4.12.1 Expressão de proteínas recombinantes

A produção de proteínas recombinantes foram necessárias para obtenção do anticorpo purificado do EIF4E3, visto que o soro policlonal não reconhece fortemente e especificamente esta proteína. A expressão foi realizada através da transformação em células BL21 de *Escherichia coli* com a construção plasmidial já disponível no laboratório, p pET21a clonado com o EIF4E3 de *L. major*. Bactérias transformadas foram crescidas em meio LB (Luria Bertani) até a densidade ótica (OD600) de 0,5, e posteriormente induzidas, por 4 horas a 30°C, com IPTG (Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo) em concentração final de 0,1 mM. Após a indução, as bactérias foram centrifugadas (10.000 g / 4°C / 10 min), e ressuspendidas em tampão de amostra para SDS-PAGE. As proteínas foram analisadas em gel 15%, submetido a uma solução corante contendo azul de Comassie R-250, e quantificadas através de uma curva de diluição de BSA com quantidades pré-definidas.

4.12.2 Purificação de anticorpos policlonais

O soro produzido contra o EIF4E3 de *L. major* foi purificado através da técnica de imunoabsorção, sendo as proteínas recombinantes fracionadas em gel SDS-

PAGE 15% e transferidas para membrana PVDF (Immobilon-P – Millipore®). Após a transferência, a membrana foi corada com 0,2% vermelho de Ponceau / 1% TCA onde a banda correspondente à proteína foi excisada da membrana e cortada em pequenos pedaços, colocados em tubo de 1,6 ml. Após o bloqueio de 30 minutos em solução de PBS com leite 1% e Tween-20 a 0,05%, o soro foi adicionado numa diluição de 1:1 com PBS e deixado sob agitação durante aproximadamente 18 horas, a 4°C. A eluição do anticorpo foi obtida através da adição de 200 µl de uma solução de glicina 0,1 M (pH 2,5) com vigorosa agitação do tubo durante 5 minutos, seguida da neutralização do pH por adição de 20 ml de 1M Tris pH 8,0 e 200 µl de PBS duas vezes concentrado. O anticorpo purificado foi então utilizado em ensaios de *Western-Blot* para o teste de sensibilidade e especificidade, utilizando diluições seriadas das respectivas proteínas recombinantes quantificadas.

4.13 Transcrição e tradução *in vitro*

Nestes ensaios foram utilizadas as construções plasmidiais derivadas do vetor pET21a e contendo os genes codificantes do EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*, assim como o gene *EIF4E4* selvagem de *L. infantum* e o mutante EIF4E4WΔ305. Todos os plasmídeos foram linearizados com a enzima *HindIII* e em seguida transcritos *in vitro* com a enzima T7 RNA polimerase (Amersham Biosciences). Já as construções contendo os genes *EIF4E1* e *EIF4E3* de *L. major*, que foram utilizados neste experimento como controle positivo e negativo respectivamente, foram linearizados com *NotI*. A reação de transcrição foi realizada para um volume final de 50 µL, onde foi utilizado 5 µL tampão de transcrição (400 mM Tris-HCl pH 7, 150 mM MgCl₂), 2,5 µL de 10 mM m7-GTP (*New England*

Biolabs), 2 µl de solução de NTPs (GTP a 10 mM, enquanto os outros NTPs a 100 mM), 0,5 µl DTT 1M, 1,5 µl inibidor de RNase (10 U/µL), 2,0 µl de T7 RNA polimerase (5 U/µL) (Pharmacia), 3 µg de DNA plasmidial linearizado e água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A reação foi incubada a 37 ° C por 30 minutos, onde foi adicionado 0,5 µL de GTP a 100 mM. Após mais 30 minutos, foi adicionado 0,5 µL de T7 RNA polimerase e a amostra foi incubada por mais 60 minutos a 37 °C. Ao término da incubação adicionou-se ao sistema 50 µL de tampão TE 10X (Tris 10 mM, EDTA 10 mM). Destes 100 µL de transcritos sintetizados, 1 µL foi analisado em gel de agarose 1%.

Os RNAs sintéticos obtidos foram extraídos em fenol/clorofórmio 1:1, precipitados com etanol 100% e NaCl 0,3 M e ressuspensos em 20 µL de água tratada com DEPC. Uma alíquota de 3 µl de RNA purificado (~1µg/ µl) foi traduzida utilizando lisado de reticulócito de coelho, de acordo com o fabricante (*Rabbit Reticulocyte Lysate*[®] - Promega) contendo metionina marcada com ³⁵S (2,5 µCi/reação). As reações foram incubadas a 30° C por 90 minutos. Em seguida, foi adicionado tampão de amostra para gel de SDS-PAGE. Os produtos das traduções foram separados por eletroforese em gel 15% em condições desnaturantes, os géis foram secos á vácuo e revelados por auto-radiografia com exposição em filme Biomax-MR[®] (Kodak).

4.14 Ensaio de afinidade ao cap

Neste ensaio foram utilizadas as proteínas marcadas com ³⁵S resultantes das reações de tradução *in vitro* descritas no item anterior. Por volta de 25 µl de cada proteína marcada com ³⁵S foram incubadas com 33 µl da resina 7-metil-GTP-

sefarose[®] (GE Healthcare) e 142 μ l de tampão HEPES[®] (50 mM de HEPES; 14 mM de β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA e 99 mM de KCl) por 1 hora a 4 °C. A resina foi lavada três vezes com 1 ml de tampão HEPES, três vezes com 50 μ l de tampão HEPES acrescido de 100 μ M de GTP e posteriormente eluído três vezes com 50 μ l do tampão HEPES acrescido de 50 μ M de *cap* solúvel. Alíquotas coletadas em todas as fases do ensaio foram analisadas em SDS-PAGE 15% e reveladas por autoradiografia conforme descrito.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser divididos em três abordagens distintas, que foram realizadas com o intuito de investigar pontos diferentes e responder a questionamentos específicos sobre os homólogos de eIF4E estudados. O primeiro grupo de resultados mostra a realização de um estudo mais geral das modificações pós-traducionais dos EIF4E3 e 4 de *L. amazonensis*, observando o perfil de expressão das suas várias isoformas e relacionando diferenças no padrão de expressão com diferentes processos celulares. Os resultados obtidos nesta primeira etapa foram utilizados para confecção do artigo científico publicado na revista *Molecular and Biochemical Parasitology* intitulado **“THE eIF4E SUBUNITS OF TWO DISTINCT TRYPANOSOMATID eIF4F COMPLEXES ARE SUBJECTED TO DIFFERENTIAL POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ASSOCIATED TO DISTINCT GROWTH PHASES IN CULTURE”** (Pereira et al., 2013).

Para o segundo grupo de resultados, foi obtido utilizando ferramentas de manipulação gênica para identificar e mapear sítios de modificações pós-traducionais do EIF4E3 de *L. amazonensis*. Neste ponto foi possível realizar um estudo comparativo com seus ortólogos de *L. infantum* e *L. major* e avaliar aspectos básicos como a natureza dessas modificações. Já o terceiro e último grupo de resultados foi obtido através da análise funcional dos EIF4E3 e 4, observando interações protéicas *in vivo* com proteínas relacionadas com a iniciação da tradução e com a estrutura *cap*. Os resultados alcançados para o EIF4E3 permitirá a confecção de um artigo científico de impacto relevante futuramente. Já os dados do EIF4E4 de *L. infantum* serão utilizados como parte de um conjunto de resultados em um artigo que está sendo finalizado para submissão, com o título provisório de **“THE NOVEL LEISHMANIA EIF4E4 N-TERMINUS IS A TARGET FOR MULTIPLE**

PHOSPHORYLATION EVENTS AND TAKES PART IN CRITICAL INTERACTIONS REQUIRED FOR TRANSLATION INITIATION”.

5.1 Detecção de processos celulares associados a expressão de isoformas de EIF4E3 e 4 em *L. amazonensis*

Os resultados obtidos previamente nas curvas de crescimento e diferenciação de *L. amazonensis* mostrou que o padrão de expressão das isoformas dos EIF4E3 e 4 varia ao longo destas curvas. Este resultado chamou a atenção por conta das rápidas mudanças no perfil das isoformas induzida pelo repique celular, que pode ser um indicativo de que esses fatores poderiam estar sendo regulados pelo ciclo celular do parasita. Por conta destes achados, culturas de células foram tratadas com diferentes compostos com o intuito de correlacionar mudanças de expressão nas isoformas com a inibição de processos metabólicos específicos e identificar se o aparecimento destas isoformas na fase exponencial estaria associado com populações distintas de células na mesma cultura.

5.1.1 Análise do efeito de inibidores de processos metabólicos específicos na expressão de isoformas dos EIF4E3 e 4

Para avaliar processos celulares específicos associadas às mudanças de expressão encontradas nos fatores estudados, inibidores desses processos foram utilizados no intuito de se correlacionar a inibição de um dado processo específico com alterações no padrão de expressão das isoformas dos EIF4E3 e 4. Os inibidores selecionados estão ligados diretamente aos processos de transcrição (Actinomicina D), tradução (Cicloheximida e Puromicina) e processamento de mRNA

(Sinefungina). Além disso, também foram avaliados um inibidor de proteassoma (Lactacistina) e um inibidor de fosfatases (Ácido okadáico).

Curvas de crescimento utilizando os diversos inibidores selecionados foram realizadas em condições equivalentes aos experimentos que geraram os resultados apresentados na Figura 13B. Inicialmente foram avaliadas propriedades como crescimento celular e morfologia sob as condições de inibição em comparação com curvas controle padrão. Nas curvas de inibição de transcrição e tradução, as células se encontravam sem motilidade e mortas após as 24h de crescimento. Foi observada alteração de morfologia com células bastante alongadas ou com tamanho inferior ao observado no controle. Já no ensaio de inibição com Sinefungina, as células não alteraram sua morfologia, mas possuíam pouca movimentação celular. As células não morreram, porém não houve crescimento celular. Já com a Lactacistina e o Ácido Okadáico, foi observado um crescimento celular um pouco mais lento do que o da cultura controle, mas não houve alteração na morfologia das células.

Em seguida partiu-se para avaliar o perfil de expressão dos EIF4E3 e 4 em amostras representativas das diferentes curvas geradas (Figura 16). Nestes ensaios a expressão do fator EIF4A1 foi utilizada como um controle quantitativo do experimento, tendo visto esta ser uma proteína de expressão constitutiva e onde não se observa alterações visíveis induzidas por modificações pós-traducionais. Um ponto interessante nestas análises foi a visualização nítida de várias isoformas do EIF4E4, e não apenas duas como aparece no EIF4E3 ou um bloco de isoformas não definidas como foi visto anteriormente nas suas curvas de crescimento. Esse é um indicativo, confirmado posteriormente como descrito a seguir, de que esta proteína possui vários sítios de modificações pós-traducionais.

Em um primeiro momento o foco desta análise foram as primeiras horas após o repique celular (até 6h de crescimento) período onde se observam nas curvas controle as alterações mais significativas nos perfis de expressão das isoformas dos EIF4E3 e 4. Nestas condições, o aparecimento da isoforma de baixo peso molecular do EIF4E3, evento nitidamente observado no ponto de 6h da curva controle, foi bloqueado na presença tanto do inibidor de processamento de mRNAs como de ambos os inibidores de tradução. Esse efeito não foi visualizado nas curvas de crescimento com a inibição da transcrição, utilizando a Actinomicina D. No caso do EIF4E4, a incubação com os inibidores de tradução nas primeiras 6 horas da curva não interferiu de forma significativa no padrão de expressão de suas isoformas. Entretanto, na curva com a presença da Cicloheximida, composto que atua estabilizando os polissomos, é notável o aparecimento das isoformas de maior peso molecular, no ponto de 2h e 6h, semelhante ou até intensificado em relação ao controle. Mesmo na presença de Puromicina, que induz a dissociação dos polissomos, também houve o aparecimento das isoformas de maior peso molecular, porém menos pronunciado do que o observado com Cicloheximida. Em contraste, o tratamento com a Sinefungina levou ao bloqueio do aparecimento destas isoformas e um efeito intermediário foi observado na presença de Actinomicina D. Em conjunto estes resultados indicam claramente a necessidade de um processo ativo de tradução para a ocorrência na mudança de expressão do EIF4E3, ao contrário do EIF4E4 onde a inibição da tradução não afeta a alteração no perfil de expressão das suas isoformas.

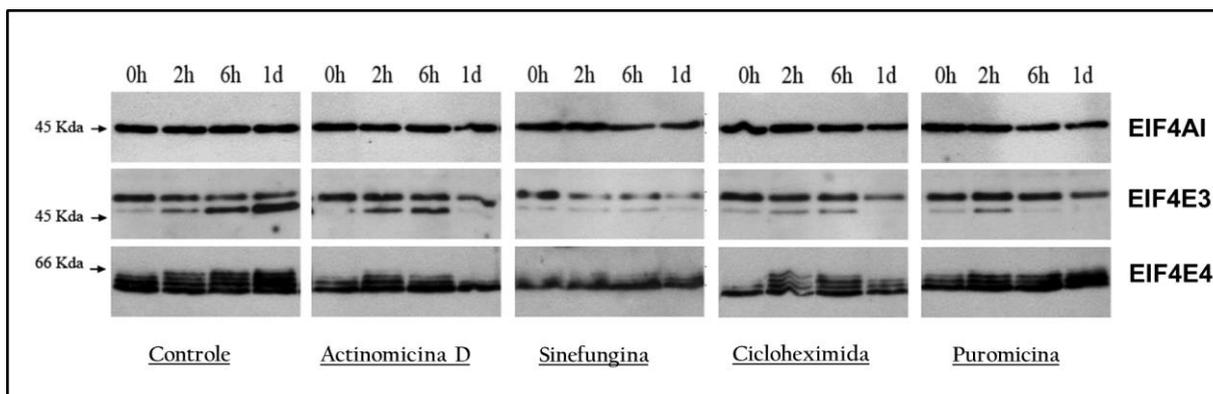


Figura 16. Análise da expressão dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 em curvas de crescimento celular de *L. amazonensis* frente ao uso de inibidores de processos celulares. As amostras foram retiradas nos pontos 0h, 2h, 6h e 24h após a adição do inibidor. Cerca de 10^6 células foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF para realização dos ensaios de Western-blot. Foram utilizados os anticorpos anti-EIF4AI, anti-EIF4E3 e anti-EIF4E4, que reconhecem as respectivas proteínas em *L. amazonensis*. As curvas de crescimento foram realizadas utilizando diferentes inibidores de transcrição (Actinomicina D), processamento de mRNAs (Sinefungina) e tradução (Cicloheximida e Puomicina), que atuaram modificando a expressão das isoformas tanto do EIF4E3 como do EIF4E4 em relação ao controle.

Quando se observa a expressão dos EIF4E3 e 4 no período de 24 horas após repique, todos os quatro inibidores interferiram no padrão de expressão das suas isoformas em comparação com as curvas controle. As células nas três condições testadas (Figura 16) apresentaram um padrão semelhante ao encontrado em culturas de células na fase estacionária (Figura 13A – 144h), indicando que células submetidas ao estresse devem apresentar o mesmo perfil de expressão.

Com o uso da Lactacistina, um inibidor de proteassoma, e do Ácido Okadáico, um inibidor de fosfatases, não houve diferença de expressão em ambas as proteínas estudadas em relação ao controle (Figura 17). Isso pode ter ocorrido visto que estes não são inibidores gerais, e sim de vias específicas, e com isso, as

fosfatases e proteases inibidas por esses compostos não estariam participando de uma possível desfosforilação e degradação das proteínas em estudo.

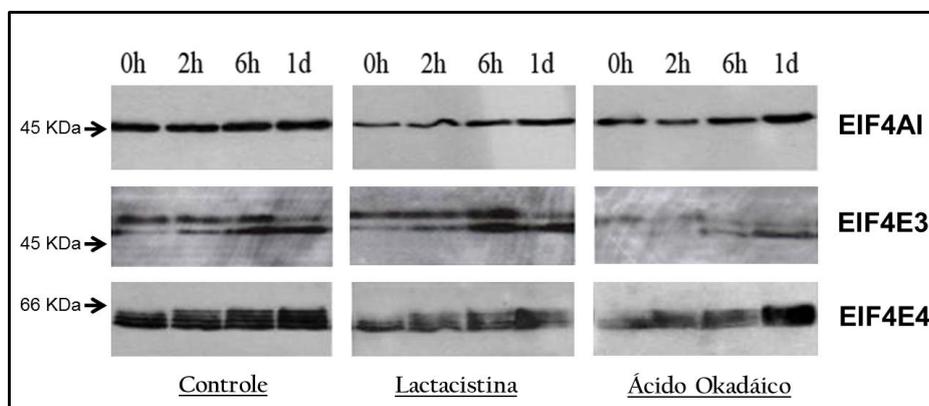


Figura 17. Análise da expressão dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 em curvas de crescimento celular frente ao uso de Lactacistina e Ácido Okadáico. Estas curvas de crescimento foram realizadas utilizando os inibidores de proteassoma e fosfatases, com a mesma metodologia empregada nas demais curvas de inibição. Nestes dois casos, entretanto, não houve modificação da expressão das isoformas dos fatores estudados em relação ao controle.

5.1.2 Análise do efeito da expressão das proteínas frente à sincronização celular.

A partir do repique realizado com as culturas de células na fase estacionária, um novo ciclo de crescimento recomeça com uma sincronização limitada do ciclo celular. Assim, observa-se no ponto 0h das curvas de crescimento realizadas, que o EIF4E3 e 4 apresentam predominantemente uma isoforma. Até o ponto de 6h, ocorre uma inversão das isoformas, mas a sincronização celular ainda é mantida, e, como o ponto 0h, ocorre predominância de uma isoforma. A partir do ponto de 24h, cada célula se encontra na sua fase específica, ou seja sem qualquer sincronização de ciclo celular, e as isoformas se apresentam de modo equivalente. No final da

curva as células estão novamente sincronizadas na fase de morte celular, e mais uma vez apenas uma isoforma predomina (Figura 13A). Esse resultado chamou a atenção para o fato de que quando as células estão “sincronizadas”, ou seja, na mesma fase do ciclo celular, parece haver apenas uma isoforma predominante para os EIF4E3 e 4. Este padrão encontrado na fase exponencial poderia ser, então, um resultado de populações em estágios diferentes do ciclo celular.

Para definir se o perfil de expressão das isoformas do EIF4E3 e 4 estaria de fato se alterando de acordo com a fase do ciclo celular de *Leishmania*, foi realizada uma nova curva de crescimento onde a proliferação das células de uma cultura exponencial era interrompida na fase S pela adição do composto Hidroxiuréia (HU). Esperava-se induzir um novo evento de sincronização do ciclo celular, independente mas comparável aquele induzido pelo repique de células estacionárias para uma nova cultura. Neste caso a adição do composto se deu a células a partir de 48h de crescimento, ponto onde são encontradas o maior número de isoformas, nos dois fatores estudados, nas curvas controle (Figura 13A). Com a concentração de 15 mM, foi possível observar uma pequena alteração na expressão das isoformas das duas proteínas estudadas (EIF4E3 e EIF4E4), até a primeira hora após a retirada da HU do meio (Figura 18). O fator EIF4E4 foi mais claramente observado, com o ponto até 1h permanecendo com apenas as isoformas de menor peso molecular, mostrando uma clara distinção em relação ao controle. Estes resultados reforçam a possibilidade de uma expressão de isoformas associadas ao ciclo celular para o EIF4E4 que poderiam estar associadas a eventos de controle da tradução de mRNAs específicos.

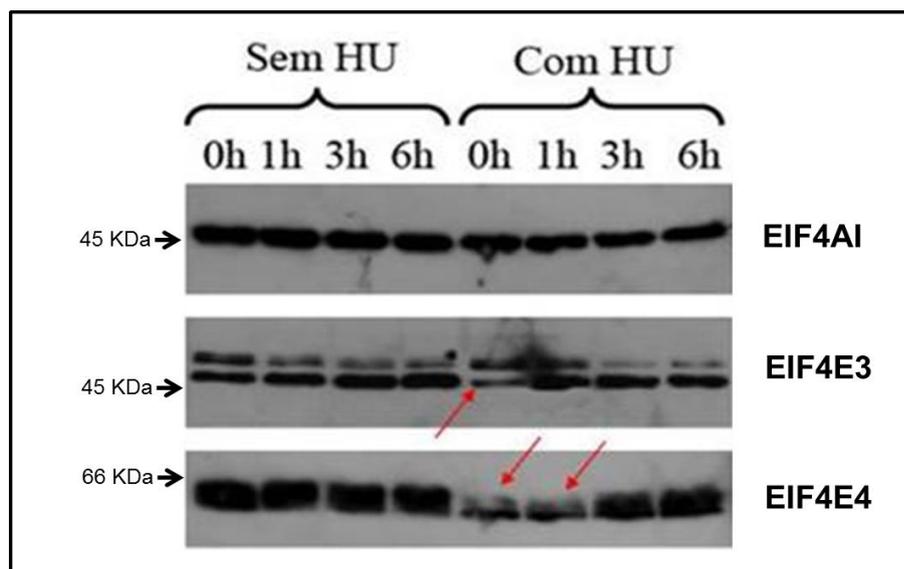


Figura 18. Curva de sincronização celular de *Leishmania amazonensis* utilizando o composto Hidroxiuréia. As amostras foram retiradas nos pontos 0h, 1h, 3h e 6h após a adição da droga. Cerca de 10^6 células foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF para realização dos ensaios de Western-blot. Foram utilizados os anticorpos anti-*LmEIF4AI*, anti-*LmEIF4E3* e anti-*LmEIF4E4*, que reconhecem as respectivas proteínas em *L. amazonensis*. As setas vermelhas indicam os pontos onde houve diminuição de uma das bandas em relação ao controle do experimento.

5.2 Identificação e caracterização de eventos de fosforilação nos EIF4E3 e 4 de *L. amazonensis*

A observação das isoformas distintas encontradas nos fatores EIF4E3 e 4 e a rápida modificação de expressão destas isoformas, com apenas 15 minutos após o repique, são indicativos fortes da ocorrência de modificações pós-traducionais nestes fatores. Além disso, a presença de fosforilação em ortólogos do eIF4E em outros organismos já foi bem descrita, apontando que estas isoformas encontradas poderiam ser provenientes de modificação pós-traducional por fosforilação. Por isso, análise em géis bidimensionais e purificação de fosfoproteínas foram realizadas,

com o intuito de verificar se nestas isoformas também ocorreriam eventos de fosforilação.

5.2.1 Identificação do número e características das isoformas dos EIF4E3 e EIF4E4 através de eletroforese em géis bidimensionais.

Por conta das modificações pós-traducionais encontradas, nas diferentes fases do ciclo celular de *L. amazonensis*, além do padrão diferenciado de expressão dos fatores EIF4E3 e EIF4E4, foi utilizada a metodologia de eletroforese em gel bidimensional para melhor avaliar o padrão de isoformas expressas para cada fator. Com esta técnica, é possível melhor definir quantas isoformas são encontradas para cada fator, visto que a separação pelo peso molecular no gel unidimensional pode não separar adequadamente as isoformas com pequena diferença de peso molecular, além de avaliar como estas diferem em ponto isoelétrico, uma propriedade que pode ser alterada pela fosforilação das proteínas. Nestes ensaios foram utilizadas células em crescimento exponencial, com 48h de crescimento, visto que é nesta fase que são detectadas a totalidade das isoformas observadas em gel unidimensional encontradas em níveis equivalentes (Figura 13A).

No caso do EIF4E3, foi observada que a posição de sua isoforma de menor peso molecular na focalização é semelhante à determinada pelo seu ponto isoelétrico (pI), que é de 8,56 (Figura 19), confirmando que esta seria a isoforma correspondente a proteína nativa sem modificações pós-traducionais. Este fator apresentou um padrão bem diferenciado de isoformas, com dois *spots* (1 e 2) representando a banda de alto peso molecular vistas no unidimensional (Figura 13A), e os outros dois *spots* (3 e 4), representando a banda de menor peso. Já o EIF4E4, cuja forma sem modificações pós-traducionais possui seu ponto isoelétrico

de 9,20, foi representando por um grande número de *spots* diferentes (oito ou mais), que aumentam em tamanho com uma redução simultânea no pI, mudanças estas compatíveis com muitos eventos de fosforilação (Figura 19 – setas verdes).

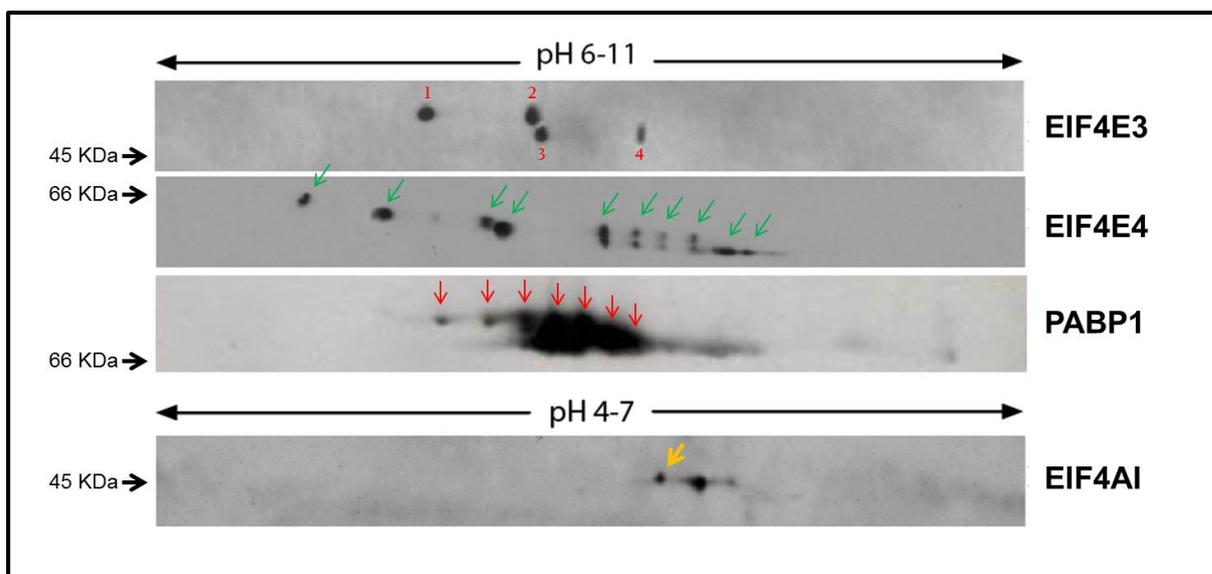


Figura 19. Perfil de eletroforese bidimensional de homólogos das subunidades eIF4F selecionados e PABP1. As amostras foram retiradas na fase exponencial do parasita (48h), cerca de 75ug de proteína total foi focalizada em fitas (primeira dimensão), fracionadas em gel SDS-PAGE 12,5% (segunda dimensão) e transferidas para membranas de PVDF para realização dos ensaios de Western-blot. Foram utilizados os anticorpos anti-*LmEIF4A1*, anti-*LmEIF4E3*, anti-*LmEIF4E4*, anti-*LmPABP1*, anti-*LmEIF4G3* e anti-*LmEIF4G4*, que reconhecem as respectivas proteínas em *L. amazonensis*. Os números em vermelho demonstram as isoformas encontradas no EIF4E3. As setas verdes e vermelhas apontam as múltiplas isoformas identificadas no EIF4E4 e PABP1, respectivamente. A seta amarela demonstra uma isoforma de menor intensidade identificada no EIF4A1.

Um perfil de isoformas parecido com o do EIF4E4 foi visto com a PABP1, utilizada como controle neste experimento tendo em vista já ter sido descrita como alvo de fosforilação em *L. major* (Bates et al., 2000). A PABP1 também é representada por número grande de isoformas que aumentam de peso à medida que vão migrando para a zona mais ácida da fita de focalização (Figura 19 – setas

vermelhas). Um segundo controle utilizado foi o EIF4AI, cujas evidências iniciais indicavam não ser fosforilado. Entretanto neste caso, embora uma única isoforma predomine (pI de aproximadamente 6,00), provavelmente a forma não fosforilada, uma segunda isoforma de intensidade muito menor também foi observada (Figura 19). Esta segunda isoforma seria uma indicação de que a proteína pode estar sujeita a um grau limitado de fosforilação, o que está de acordo com a detecção fraca desta proteína na eluição contendo fosfoproteínas (Figura 20).

As diferenças no ponto isoelétrico observadas entre as duas isoformas de maior peso molecular do EIF4E3 e também as de maior peso do EIF4E4 são bem maiores quando comparadas com as de menor peso molecular do EIF4E4. Estas diferenças, no entanto, foram coerentes com a análise obtida de predição de pI para ambas as proteínas, quando realizada uma estimativa com a ocorrência de múltiplos eventos de fosforilação (Tabela 2). Enquanto que um ou dois eventos de fosforilação modificam amplamente o pI do EIF4E3, uma alteração sutil do pI foi predita para os primeiros grupos fosfatos adicionados ao EIF4E4.

Um dado interessante observado para o EIF4E3 foi que a mudança de tamanho entre as isoformas 2 e 3 do EIF4E3 (Figura 19), não parece ser acompanhada por mudança de pI compatível com fosforilação. Isto sugere uma ocorrência de algum outro tipo de modificação pós-traducional, que cause uma modificação perceptível de peso molecular, mas que não interfere muito na mudança do pI da proteína. O mesmo é observado para as isoformas de menor peso molecular do EIF4E4, que possuem dois conjuntos de isoformas com praticamente o mesmo pI , porém, com uma mudança visível de peso molecular.

Tabela 2. Análise de predição do ponto isoelétrico dos homólogos *LaEIF4E3* e *LaEIF4E4* a partir da adição de grupos fosfatos.

<i>L. amazonensis</i>					
EIF4E3			EIF4E4		
Número de fosfatos	Peso Molecular	Ponto Isoelétrico	Número de fosfatos	Peso Molecular	Ponto Isoelétrico
0	37721	8.63	0	48503	9.20
1	37799	7.90	1	48581	8.97
2	37877	7.19	2	48659	8.63
3	37955	6.86	3	48737	8.00
4	38033	6.63	4	48815	7.40
5	38111	6.46	5	48893	7.05
6	38189	6.31	6	48971	6.79
7	38267	6.18	7	49049	6.58
8	38345	6.05	8	49127	6.40
9	38423	5.94	9	49205	6.23
10	38501	5.83	10	49283	6.08

Legenda: Através do programa encontrado na internet *Scansite Molecular Weight & Isoelectric Point Calculator*, de predição de pI a partir do aumento de sítios de fosforilação, foi possível observar a diferença dos pontos isoelétricos das isoformas quando cada grupo fosfato é adicionado na proteína. Foram colocadas na análise, 10 predições de grupos fosfato para cada proteína. Interessante notar a diferença ampla de pI nos primeiros pontos do EIF4E3, que não é observado no EIF4E4. Peso Molecular medido em KDa.

5.2.2 Detecção dos EIF4E3 e 4 no fosfoproteoma de *L. amazonensis*

Para avaliar se as isoformas encontradas para os fatores eram correspondentes à modificação pós-traducional por fosforilação, procedeu-se a purificação do fosfoproteoma deste parasita para avaliar a presença das proteínas alvo no mesmo, juntamente com o EIF4AI e a PABP1. O fator EIF4AI é usado como controle negativo nos experimentos das curvas de crescimento no nosso laboratório,

por ser uma proteína constitutiva. Este fator não foi descrito apresentando forma fosforilada em outros eucariotos e nas avaliações prévias em géis uni e bidimensionais de *Leishmania* aparece predominantemente como uma única isoforma.

Em todos os ensaios realizados com o EIF4E3 e EIF4E4 foi observada a presença das isoformas no ponto de eluição, onde são encontradas apenas fosfoproteínas (Figura 20). Além disso, diferentemente do EIF4A1, as isoformas fosforiladas foram observadas em níveis bastante elevados, nos dois fatores. Esse resultado comprova que estas isoformas visualizadas na curva de crescimento são os fatores nas suas formas fosforiladas. Um ponto interessante neste resultado é observar que as formas de maior peso molecular, tanto para o EIF4E3, quanto para o EIF4E4 são observadas predominantemente no eluato. Porém, as formas de menor peso molecular também foram encontradas, podendo indicar que todas as formas das proteínas em questão são fosforiladas, só mudando a quantidade de sítios de fosforilação presentes. Uma outra explicação seria que apenas um grupo fosfato num único sítio de fosforilação poderia ser uma modificação muito pequena para alterar o peso da proteína, sendo as isoformas desfosforilada e a fosforilada visualizadas migrando de modo similar. Além disso, na fração sobrenadante do EIF4E3 apenas as isoformas de menor peso molecular são visualizadas, indicando que provavelmente todas as isoformas fosforiladas se ligaram à coluna de afinidade, e não foram coletadas nesta fração.

Em alguns dos ensaios realizados, o EIF4A1 não foi observado no ponto da eluição das fosfoproteínas, confirmando as suspeitas de que este fator não estaria sendo regulado por eventos de fosforilação. Porém, interessante em outros ensaios, foi possível visualizar uma quantidade muito baixa da proteína no ponto de

eluição (Figura 20). Esta discreta fosforilação é condizente com as isoformas de menor intensidade observada pelos géis bidimensionais para o EIF4AI, mas por ocorrer em um número muito limitado de moléculas, pode não influenciar significativamente na função da proteína.

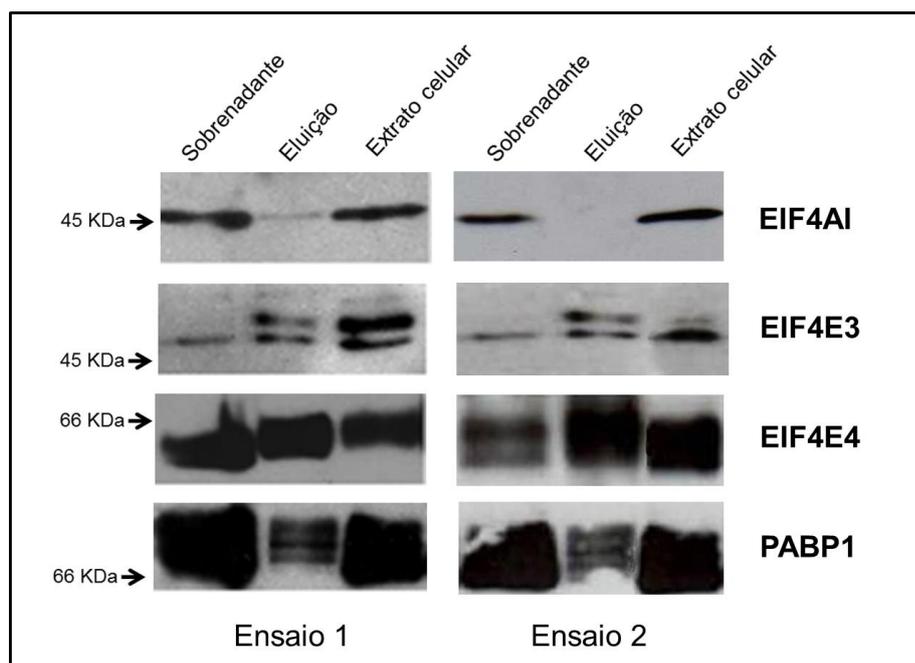


Figura 20. Purificação de proteínas fosforiladas por cromatografia de afinidade e identificação dos EIF4AI, EIF4E3, EIF4E4 e PABP1 dentro do conjunto de fosfoproteínas de *L. amazonensis*. A figura mostra dois dos vários ensaios realizados com células de *L. amazonensis*, no ponto de 48h da curva de crescimento. Para o *Western-blot*, foram utilizados cerca de 30ug de extrato total tanto do sobrenadante como do extrato celular e 100ul da eluição obtida. Essas amostras foram precipitadas com TCA e acetona, fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF para realização dos ensaios de *Western-blot*. Todos os fatores estudados apareceram na fração de eluição, confirmando a ocorrência de fosforilação nestas proteínas.

A PABP1 foi utilizada neste ensaio mais como um controle positivo, visto que seu ortólogo em *L. major* já foi descrito como fosforilado. Como eram observadas isoformas da PABP1 nas curvas de crescimento em *L. amazonensis*, era esperado que a mesma aparecesse no ponto de eluição, o que ocorreu em todos os ensaios realizados (Figura 20). Neste resultado, observou-se que as isoformas de maior

peso molecular apareceram na eluição, entretanto a saturação da coluna utilizada pode justificar a presença das mesmas isoformas também no sobrenadante da coluna (não ligado).

5.3 Estudo comparativo da sequência dos EIF4E3 de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. major* e da expressão de suas isoformas

Nos últimos anos, foi observado um grande avanço no estudo dos múltiplos fatores de iniciação da tradução nos tripanosomatídeos. Assim, dois complexos de iniciação da tradução EIF4F foram identificados, com a presença dos dois fatores EIF4E3 e 4 estudados neste trabalho. Enquanto que o complexo em que o EIF4E4 foi identificado interage com a PABP e o *cap* em *L. major* e *T. brucei*, o EIF4E3 participa de um complexo EIF4F que não realiza essas interações. Por conta disso, a função exata deste fator na iniciação da tradução permanece desconhecida e os estudos prévios ficaram mais focados no EIF4E4. Assim, com o intuito de melhor investigar este homólogo, que possui um padrão de expressão tão diferenciado em relação ao EIF4E4 de *Leishmania*, este estudo visou avaliar o fator EIF4E3 das três principais espécies de *Leishmania* estudadas.

5.3.1 Análise comparativa da expressão do EIF4E3 durante curva de crescimento da forma promastigota nas três espécies estudadas.

A partir da identificação de isoformas nos EIF4E4 e EIF4E3 de *L. amazonensis*, era necessário saber se essas isoformas e as modificações pós-traducionais seriam conservadas em outras espécies de *Leishmania*. Assim, curvas de crescimento da forma promastigota foram realizadas também com *L. major* e *L.*

infantum. O EIF4A1 mais uma vez foi utilizado como controle quantitativo do experimento.

Interessantemente, a expressão do EIF4E3 nestas duas espécies ocorre apenas com a visualização de uma única banda (Figura 21 - A e B), diferentemente do que é visto em *L. amazonensis*, que possui duas isoformas com pesos moleculares distintos (Figura 13A). Além disso, o EIF4E3 nestas duas espécies não possuem mudanças significativas de expressão, sendo visualizada em todos os pontos da curva em níveis equivalentes, com exceção do ponto 144h da curva de *L. infantum*, na fase de morte celular (Figura 21B). Esse resultado sugere que os dados obtidos em relação ao EIF4E3 de *L. amazonensis* podem ser específicos para esta espécie e podem representar distinções funcionais desta proteína em diferentes espécies de *Leishmania*.

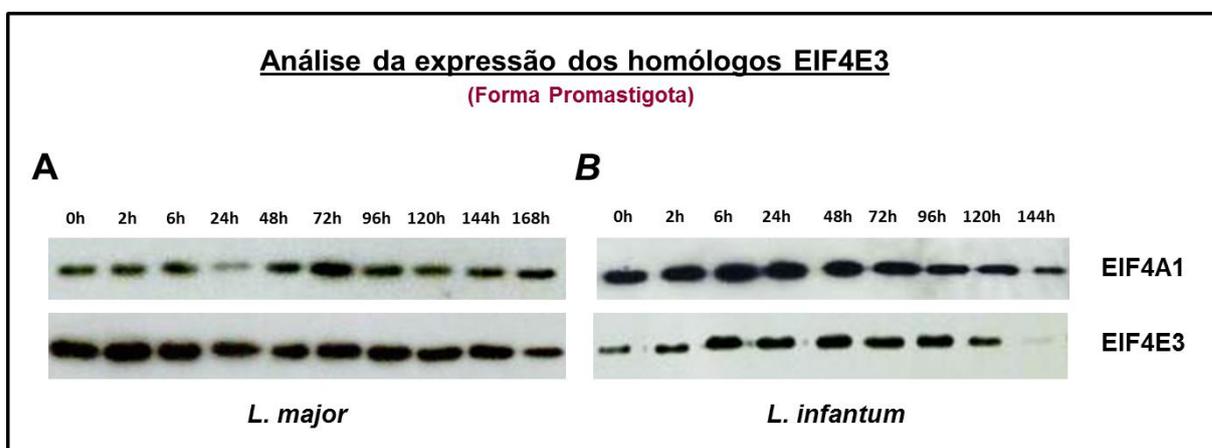


Figura 21. Análise da expressão do EIF4E3 de *L. infantum* e *L. major* na curva de crescimento da forma promastigota. Cerca de 10^6 células foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF para realização dos ensaios de Western-blot. **(A)** Curva de crescimento de *L. major* e **(B)** Curva de crescimento de *L. infantum*. A expressão dos dois ortólogos EIF4E3 pode ser considerado constitutivo, pois aparece em todos os pontos da curva sem alteração significativa, com exceção do ponto 144h de *L. infantum*, que praticamente some na fase de morte celular.

5.3.2 Obtenção da sequência do gene *EIF4E3* de *L. amazonensis* e comparação com seus ortólogos em *L. infantum* e *L. major*.

Por conta da grande diferença de expressão observada entre o EIF4E3 de *L. amazonensis*, e seus ortólogos de *L. major* e *L. infantum*, que apresentaram perfil similar de expressão sem isoformas aparentes, uma análise da seqüência das respectivas proteínas tornou-se necessária. Para isso foi preciso a clonagem e seqüenciamento do gene codificando o EIF4E3 de *L. amazonensis*, tendo em vista que, quando da realização dos experimentos descritos a seguir, o genoma de *L. amazonensis* ainda não havia sido seqüenciado ou depositado em bancos de dados públicos. Para o desenho dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene *EIF4E3* tomou-se como base a seqüência do seu gene de *L. mexicana* (que possui uma similaridade acentuada com *L. amazonensis*) além dos de *L. infantum* e *L. major*, todas espécies com seus genomas completos depositados. Assim, o par de oligonucleotídeos desenhados serviu tanto para amplificação do gene em *L. amazonensis*, como para *L. infantum*.

Após a clonagem, o gene *EIF4E3* de *L. amazonensis* foi então sequenciado e sua seqüência de aminoácidos resultante comparada através de alinhamento com as seqüências de *L. infantum* e *L. major* também avaliadas nesse estudo (Figura 22). As três espécies possuem a proteína EIF4E3 com 349 aminoácidos, e as seqüências de *L. amazonensis* e *L. infantum* diferem em apenas 20 aminoácidos (AA em vermelho) com a de *L. major* diferindo nestes além de mais sete aminoácidos (AA em azul). Todas possuem duas regiões na porção N-Terminal bastante conservadas (Figura 22 - caixas em verde), que podem estar relacionadas com alguma região de interação com parceiros funcionais. As três espécies possuem conservados também os triptofanos W187 e o W216, possíveis sítios de

interação ao EIF4G e ao *cap*, respectivamente (Figura 22- caixas em roxo). Um ponto interessante a destacar é que foi observado que este fator possuía três possíveis sítios de fosforilação para as MAP quinases, que são resíduos de serina seguido por uma prolina, nas posições S75, S165 e S344, sendo o S75 encontrado apenas em *L. amazonensis* (Figura 22 – caixas marrons). Este fato reforça o resultado observado nos bidimensionais, com o EIF4E3 apresentando apenas quatro isoformas, diferentemente do EIF4E4, que possui na sua sequência vários sítios de fosforilação para MAP quinases (De Melo Neto, comunicação pessoal), e várias isoformas encontradas.



Figura 22. Alinhamento do EIF4E3 das três espécies de *Leishmania*. Comparação da sequência protéica do EIF4E3 de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. major*, mostrando os principais pontos de conservação e diferenças entre as espécies estudadas. Em vermelho, os aminoácidos que diferem entre *L. amazonensis* e *L. infantum*. E em azul, os aminoácidos de *L. major* que diferem de *L. amazonensis*. Nas caixas verdes, motivos conservados na região N-terminal, podendo estar relacionados com interação com parceiros funcionais. Os dois triptofanos conservados (Caixas roxas), possíveis sítios de interação com *cap* e EIF4G4. Nos boxes marrons, possíveis sítios alvos de fosforilação pelas MAP quinases, sendo o sítio na posição S75, exclusivo de *L. amazonensis*.

5.3.3 Análise comparativa da expressão das isoformas do EIF4E3-HA de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Tanto o EIF4E3 de *L. infantum*, como o EIF4E3 de *L. major* não possuem o padrão de expressão variado e com a visualização de duas bandas como ocorre em *L. amazonensis* (Figura 21). Assim, com o intuito de investigar e comparar o comportamento do EIF4E3 foi realizada a clonagem de ambos os genes *EIF4E3* de *L. amazonensis* e *L. infantum*, em um vetor para transfecção em *Leishmania*. Essa subclonagem permitiu a adição de uma marca do epítipo de HA na região C-terminal das duas proteínas. Assim, foi possível investigar se a isoforma exclusiva de *L. amazonensis* apareceria no EIF4E3 de *L. infantum* ou desapareceria do EIF4E3 de *L. amazonensis*, após transfecção das duas construções nas duas espécies de interesse. Após a seleção dos transfectantes, extratos de células com crescimento exponencial (48h) foram analisadas através de *Western-blot*. Com este resultado, foi possível observar que a banda adicional do EIF4E3 de *L. amazonensis* se manteve nos dois transfectantes, e que a banda única do EIF4E3 de *L. infantum* também foi mantida nas duas espécies (Figura 23).

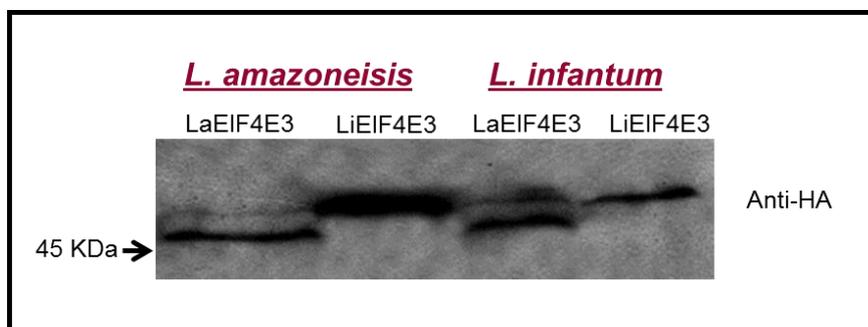


Figura 23. Comparação da expressão das proteínas exógenas EIF4E3 de *L. infantum* e *L. amazonensis* transfectadas nas duas espécies. As amostras foram coletadas com os transfectantes em crescimento exponencial (48h) e o extrato de 5×10^6 células foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para uma membrana de PVDF, para realização dos ensaios de

Western-blot. Nestes, foi utilizado o anticorpo comercial anti-HA, que reconhece o epítopo HA fusionado às proteínas.

Esses resultados confirmam que a banda extra do EIF4E3 *L. amazonensis* é produto direto da sua seqüência de aminoácidos e não uma consequência de diferenças de metabolismo entre as duas diferentes espécies de *Leishmania* analisadas.

5.3.4 Análise de diferenças de peso molecular em ortólogos de EIF4E3 de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. infantum*.

O ponto mais interessante do resultado anterior foi a observação de que a banda de maior peso molecular do EIF4E3 de *L. amazonensis* possui altura similar da única banda encontrada na proteína de *L. infantum* (Figura 23). Esse resultado chamou a atenção visto que as duas proteínas possuem 349 aminoácidos e diferem em apenas 20 aminoácidos (Figura 22). Assim, este resultado seria um indicativo de que a banda de menor peso molecular encontrada no EIF4E3 de *L. amazonensis* seria produto de algum tipo de regulação por clivagem protéica. Portanto, para determinar se ocorre algum tipo de clivagem protéica neste fator, que seria exclusiva em *L. amazonensis*, ou se as diferenças de peso molecular visualizadas em gel de SDS-PAGE refletem apenas propriedades intrínsecas das seqüências de aminoácidos das duas proteínas, seus respectivos genes foram subclonados no plasmídeo pET21A, para realização de transcrição e tradução *in vitro*. Através da comparação das proteínas recombinantes, seria possível determinar se haveria diferença ou não de peso molecular, e assim, confirmar a teoria da clivagem. A construção do EIF4E3 de *L. major*, disponível no laboratório, também foi utilizada

neste experimento, pois também possui 349 aminoácidos e uma semelhança muito grande com seus ortólogos.

A partir da tradução *in vitro*, ficou claro que as proteínas recombinantes dos três ortólogos diferem em tamanho aparente quando fracionadas por gel, tendo o EIF4E3 de *L. amazonensis* o menor peso molecular, a proteína de *L. infantum* peso intermediário, e a de *L. major* possuindo o maior peso molecular entre elas (Figura 24). É possível que a diferença de aproximadamente 20 aminoácidos entre as três proteínas seja suficiente para modificar um pouco a carga da proteína e fazê-las migrar com tamanhos próximos, porém diferentes.

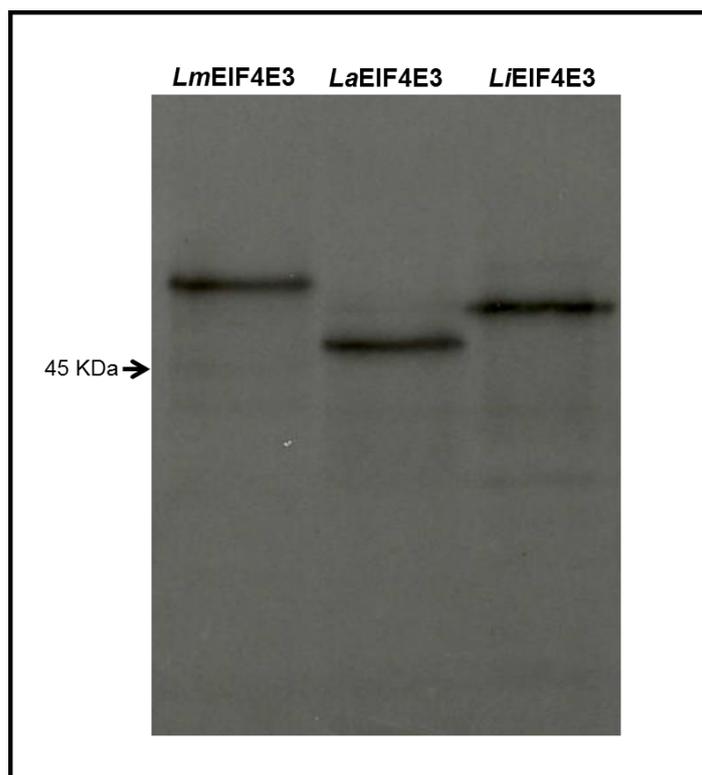


Figura 24. Transcrição e tradução *in vitro* dos ortólogos de EIF4E3 de *L. major*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Após obtenção dos mRNAs no ensaio de transcrição *in vitro*, foi realizada a tradução *in vitro* utilizando reticulócito de coelho. Para produção das proteínas radioativas foi utilizado o aminoácido metionina marcado com ^{35}S . Após incubação, as amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e o gel exposto a filme radiográfico. A comparação do tamanho das três proteínas recombinantes mostrou uma diferença gradativa entre seus pesos moleculares.

Assim, a hipótese de que poderia estar havendo algum tipo de clivagem protéica no EIF4E3 de *L. amazonensis* foi descartada, visto que as proteínas recombinantes não possuem o mesmo tamanho, sendo apenas uma coincidência o fato da isoforma maior do EIF4E3 de *L. amazonensis* ter o mesmo tamanho da proteína de *L. infantum* (Figura 24). Portanto, a existência desta isoforma maior em *L. amazonensis* deve ocorrer realmente devido a alguma modificação pós-traducional exclusiva da espécie. Além disso, essa modificação deve estar direcionada para um dos 20 aminoácidos que foram encontrados diferentes nas duas espécies.

5.3.5 Identificação de isoformas de EIF4E3 em *L. infantum*.

Com o intuito de avaliar a presença de isoformas induzidas por modificações pós-traducionais no EIF4E3 de *L. infantum* foi realizada uma focalização isoeletrica comparando a proteína nativa com aquela superexpressa fusionada ao epítipo HA. A análise do bidimensional de extratos de células em crescimento exponencial (48h) mostra que, mesmo com a visualização de apenas uma única banda em gel unidimensional (Figura 21), há a presença de pelo menos três isoformas distintas (Figura 25 – setas vermelhas). No caso do EIF4E3 nativo, nota-se claramente a presença de três *spots* de intensidades mais ou menos equivalentes, com a de peso molecular mais baixo um pouco mais fraca. As isoformas migram para o lado ácido e positivo da fita subindo gradativamente seu peso molecular. A proteína fusionada a HA apresentou um padrão de expressão similar com a presença de três isoformas principais, com a de menor peso com a expressão mais fraca, migrando um pouco mais deslocadas para o lado ácido provavelmente pela presença do tag de HA

(Figura 25). Esse resultado também indica que as características de migração destas isoformas encontradas no EIF4E3 de *L. infantum* também devem ocorrer devido à eventos de fosforilação da proteína.

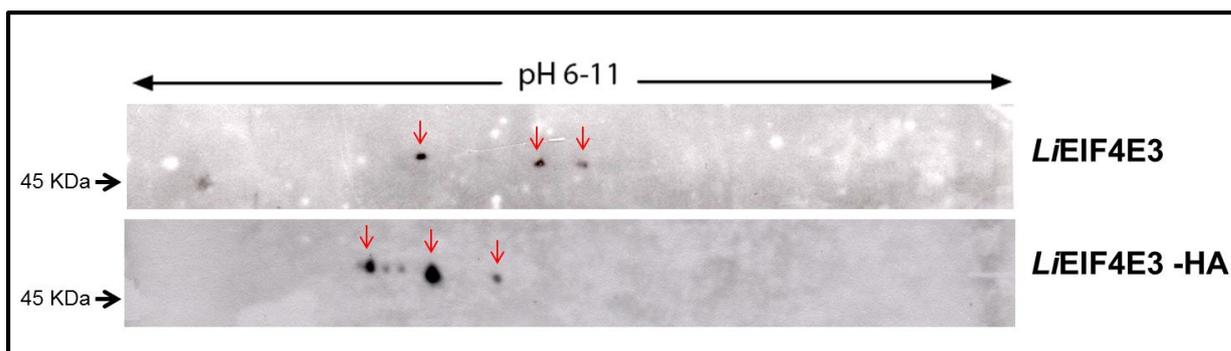


Figura 25. Perfil de eletroforese bidimensional do EIF4E3 endógeno e exógeno de *L. infantum*. As amostras foram retiradas na fase exponencial do parasita (48h), cerca de 75ug de proteína total foi focalizada em strips (primeira dimensão), fracionadas em gel SDS-PAGE 12,5% (segunda dimensão) e transferidas para membranas de PVDF para realização dos ensaios de *Western-blot*. Foram utilizados os anticorpos anti-*LmEIF4E3* e o anti-HA, que reconhecem as proteínas em questão. As setas vermelhas ressaltam os *spots* discutidos no texto.

Um fato interessante a destacar é que no caso do EIF4E3 de *L. infantum* não ocorre uma mudança brusca de peso molecular sem alteração do pI, como ocorre em *L. amazonensis* (Figura 19 – 2 e 3). Essa alteração de peso consegue ser observada em gel unidimensional, com a visualização de 2 bandas distintas, e como não ocorre em *L. infantum*, apenas uma banda é encontrada em gel unidimensional.

5.4 Identificação “*in silico*” de possíveis sítios de modificação pós-traducional no EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*

A partir dos resultados obtidos na comparação da sequência de *L. amazonensis* e *L. infantum* e das análises de géis bidimensionais, ficou claro que a

diferença de peso molecular das isoformas 2 e 3 (Figura 19) do EIF4E3, exclusiva de *L. amazonensis*, deveria estar ocorrendo por alguma outra modificação pós-traducional além da fosforilação. Como a diferença de tamanho é grande, não poderia ser qualquer modificação, e sim aquelas que modificassem substancialmente o peso molecular da proteína. Além disso, essas modificações deveriam ocorrer em um dos 20 aminoácidos que diferem entre as duas espécies. Portanto, estas características foram procuradas em páginas de predição de modificações pós-traducionais como glicosilação, ubiquitinação e sumoilação, modificações que produzem um aumento mais significativo no peso molecular da proteína. Foi realizada também a predição dos possíveis sítios de fosforilação dos ortólogos, já que foi confirmada pela coluna de purificação de fosfoproteínas que o EIF4E3 de *L. amazonensis* é fosforilado e que o EIF4E3 de *L. infantum* possui três isoformas detectadas pelo gel bidimensional, com perfil de migração por fosforilação.

5.4.1 Predição de sítios de fosforilação.

De acordo com a página disponibilizada na *internet*, o servidor NetPhos 2.0 Server (Blom et al., 1999) foi utilizado para determinar os possíveis sítios de fosforilação no EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os resultados obtidos mostram que a maioria das serinas, treoninas e tirosinas passíveis de fosforilação foram preditas igualmente nas duas espécies analisadas (Tabela 3). A serina 75, exclusiva de *L. amazonensis*, e a treonina 33, exclusiva em *L. infantum*, foram também preditas como possíveis sítios de fosforilação, com a serina 75 com uma probabilidade maior de ocorrência, de acordo com a pontuação gerada pelo programa de predição (Tabela 3 – resultados em vermelho). Três outros

aminoácidos foram preditos como possíveis sítios de fosforilação em apenas uma espécie, dois deles em *L. amazonensis* (S162 e T8) e um apenas em *L. infantum* (S88) (Tabela 3 – resultados em azul). Estes aminoácidos são encontrados na outra espécie, porém, como o programa avalia a sequência como um todo, próxima ao aminoácido predito, a sequência presente na outra espécie não deve ter recebido uma pontuação mínima para ser considerado um possível sítio para receber a fosforilação.

Tabela 3. Predição de sítios de fosforilação em Serinas, Treoninas e Tirosinas do EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

<u><i>L. infantum</i></u>					<u><i>L. amazonensis</i></u>				
Name	Pos	Context	Score	Pred	Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	13	IPPKSDAKG	0.515	*S*	Sequence	13	IPPKSDAKG	0.733	*S*
Sequence	21	GEPKSSSAA	0.953	*S*	Sequence	21	GEPKSSSAA	0.953	*S*
Sequence	22	EPKSSSAAA	0.534	*S*	Sequence	22	EPKSSSAAA	0.534	*S*
Sequence	55	PKQASATST	0.816	*S*	Sequence	55	PKQASATST	0.889	*S*
Sequence	58	ASATSTHVD	0.683	*S*	Sequence	58	MSATSTHVD	0.765	*S*
Sequence	83	ERPASSLPD	0.954	*S*	Sequence	75	KTIVSPLTE	0.748	*S*
Sequence	84	RPASSLPDS	0.989	*S*	Sequence	83	ERPASSLPN	0.984	*S*
Sequence	88	SLPDSAAAA	0.565	*S*	Sequence	84	RPASSLPNS	0.614	*S*
Sequence	105	ENDDSQLDW	0.969	*S*	Sequence	105	ENDDSQLDW	0.932	*S*
Sequence	165	ASNSPTST	0.985	*S*	Sequence	162	SNTASHSP	0.720	*S*
Sequence	168	SSPTSTMSF	0.957	*S*	Sequence	165	ASHSPTST	0.989	*S*
Sequence	171	TS TMSFEPI	0.945	*S*	Sequence	168	SSPTSTMSF	0.892	*S*
Sequence	237	DRDRSGLSD	0.983	*S*	Sequence	171	TS TMSFEPI	0.945	*S*
Sequence	240	RSGLSDKQV	0.951	*S*	Sequence	237	DRDRSGLSD	0.983	*S*
Sequence	277	LKVRSNKPV	0.558	*S*	Sequence	240	RSGLSDKQV	0.951	*S*
Sequence	301	AFANSVRDT	0.997	*S*	Sequence	277	LKVRSNKPV	0.558	*S*
Sequence	344	KTKI SPDHT	0.986	*S	Sequence	301	AFANSVRDT	0.997	*S*
Sequence	33	KPPSTQLVT	0.570	*T*	Sequence	344	KTKI SPDHT	0.986	*S*
Sequence	59	SATSTHVDP	0.814	*T*	Sequence	59	SATSTHVDP	0.814	*T*
Sequence	66	DPKATTEDG	0.639	*T*	Sequence	67	PKTATEDGK	0.561	*T*
Sequence	67	PKATTEDGK	0.869	*T*	Sequence	73	DGKTIVSPL	0.776	*T*
Sequence	305	SVRDTLSKI	0.630	*T*	Sequence	78	VSP LTERPA	0.969	*T*
Sequence	150	SWDLYADDH	0.971	*Y*	Sequence	305	SVRDTLSKI	0.630	*T*
Sequence	320	QKLEYYSHH	0.590	*Y*	Sequence	8	SAAYIPPK	0.522	*Y*
					Sequence	150	SWDLYADDH	0.971	*Y*
					Sequence	320	QKLEYYSHH	0.590	*Y*

Legenda: Os resultados em vermelho são sítios preditos de aminoácidos exclusivos da espécie, como a serina 75 de *L. amazonensis* e a treonina 33, de *L. infantum*. Os resultados em azul apontam os sítios que foram preditos em apenas uma das espécies, mas a serina ou tirosina alvos não são exclusivas da espécie. Os resultados em preto são os aminoácidos preditos para ambas as espécies analisadas.

5.4.2 Predição de sítios de glicosilação

Uma modificação pós-traducional que poderia mudar visivelmente o peso molecular de uma proteína é a glicosilação. Para avaliar essa possibilidade, foi utilizado uma página de predição de O-glicosilação (Julenios et al., 2005) para os fatores EIF4E3 de *L. infantum* e *L. amazonensis*. Diferentemente das outras duas análises acima, esta predição apontou alguns sítios diferentes, com alta probabilidade de ocorrência, entre as duas espécies estudadas (Figura 26). Em *L. infantum*, foi encontrada a predição exclusiva na T33 e T66. Já em *L. amazonensis*, várias predições exclusivas foram apontadas, como a T65, S75, T78, T158, S165 e T167, inferindo a possibilidade de que em algum destes aminoácidos, exclusivos desta espécie, possa estar ocorrendo este tipo de modificação (Tabela 4). Mas o que mais chama a atenção neste resultado foi a alta predição de O-glicosilação na região entre os aminoácidos 50 e 100 (figura 26 – quadro vermelho), mais especificamente na S75, visto que a serina, posteriormente seguida por uma prolina, é o sítio de fosforilação já descrito para as MAP quinases de mamíferos, e exclusiva em *L. amazonensis*.

Um outro ponto a ser considerado é que em O-glicosilações adicionadas em serinas, pode ocorrer uma outra modificação pós-traducional, denominada de Fosfoglicosilação, que foi identificada no final da década de 90, em espécies de *Leishmania*. (Haynes, 1998). Esta seria uma outra possibilidade de modificação que poderia estar causando a presença destas modificações pós traducionais em algumas das serinas preditas exclusivamente em *L. amazonensis*.

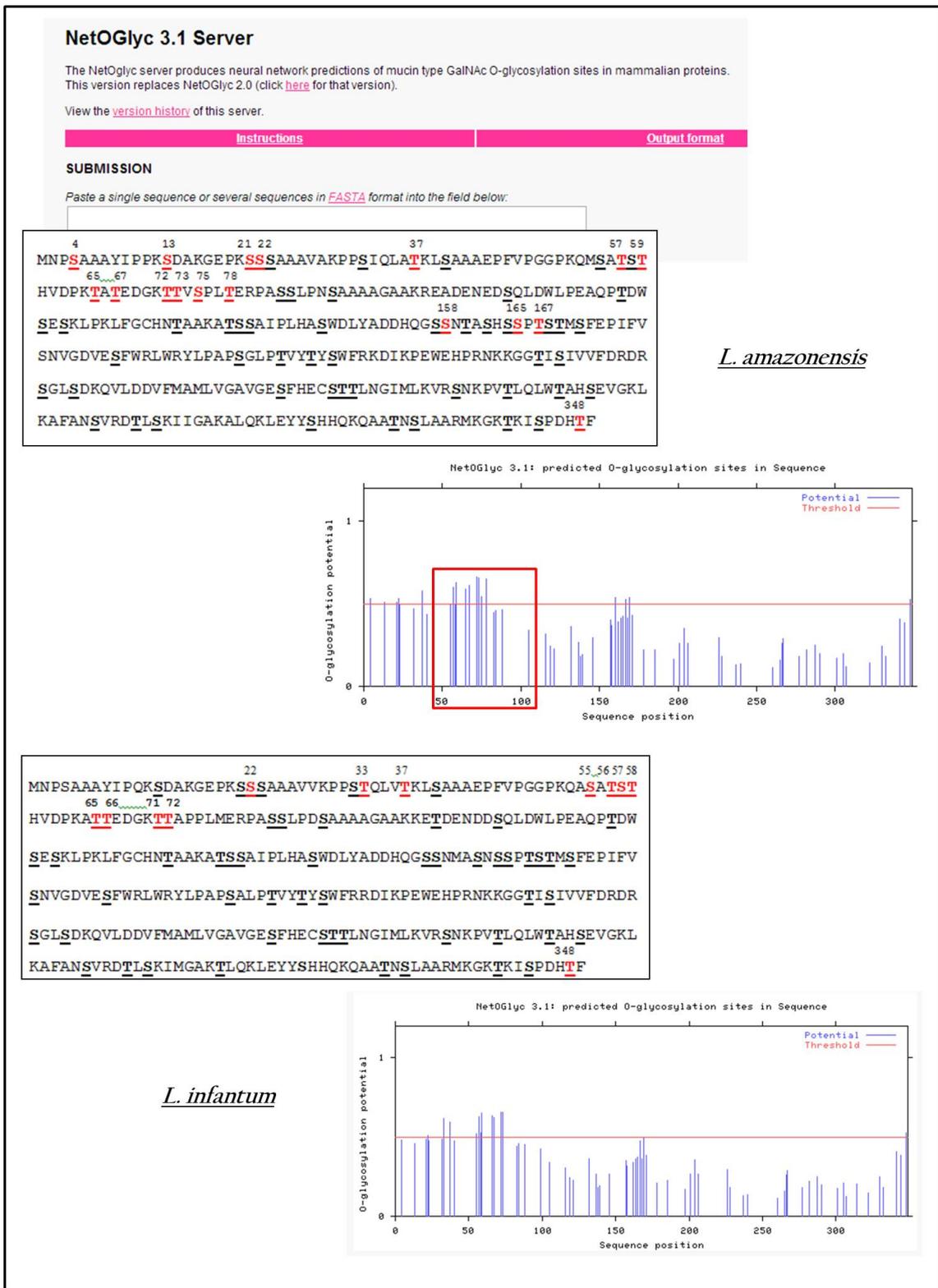


Figura 26. Predição de sítios de O-Glicosilação em LaEIF4E3 e L/EIF4E3. Através da página no servidor NetOGlyc 3.1, de predição de O-glicosilação, foi possível determinar os possíveis motivos que teriam a capacidade de receber este tipo de modificação no EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*. As serinas e treoninas marcadas em vermelho nas sequencias, são as que o programa calculou como alta probabilidade de ser O-glicosilado. O gráfico mostra que a probabilidade maior de ocorrência dessas modificações acontece entre os aminoácidos 50 e 100 da proteína (quadro vermelho).

5.4.3 Predição de sítios de Ubiquitinação

Outro tipo de modificação pós traducional que causa um aumento significativo no peso molecular da proteína é a ubiquitinação. Através da página de predição de sítios de interação com ubiquitinas (Radivojac et al., 2010), também foi possível obter estes possíveis motivos do EIF4E3 das duas espécies e compará-los entre si (Tabela 4).

Tabela 4. Predição de sítios de ubiquitinação em *LaEIF4E3* e *LiEIF4E3*.

<i>L. amazonensis</i>				<i>L. infantum</i>			
12	0.73	Yes	Medium confidence	12	0.80	Yes	Medium confidence
16	0.64	Yes	Low confidence	16	0.67	Yes	Low confidence
20	0.76	Yes	Medium confidence	20	0.77	Yes	Medium confidence
29	0.44	No		29	0.32	No	
38	0.81	Yes	Medium confidence	38	0.77	Yes	Medium confidence
52	0.82	Yes	Medium confidence	52	0.80	Yes	Medium confidence
64	0.89	Yes	High confidence	64	0.82	Yes	Medium confidence
71	0.92	Yes	High confidence	71	0.81	Yes	Medium confidence
96	0.89	Yes	High confidence	96	0.88	Yes	High confidence
122	0.83	Yes	Medium confidence	97	0.89	Yes	High confidence
125	0.72	Yes	Medium confidence	122	0.83	Yes	Medium confidence
135	0.68	Yes	Low confidence	125	0.71	Yes	Medium confidence
210	0.51	No		135	0.66	Yes	Low confidence
213	0.31	No		213	0.36	No	
222	0.47	No		222	0.46	No	
223	0.56	No		223	0.53	No	
242	0.57	No		242	0.62	Yes	Low confidence
274	0.17	No		274	0.17	No	
279	0.18	No		279	0.20	No	
294	0.48	No		294	0.46	No	
296	0.50	No		296	0.53	No	
308	0.10	No		308	0.12	No	
313	0.29	No		313	0.29	No	
317	0.17	No		317	0.17	No	
326	0.50	No		326	0.47	No	
338	0.17	No		338	0.16	No	
340	0.17	No		340	0.18	No	
342	0.18	No		342	0.16	No	

Legenda: Através da página UBPred (Radivojac et al., 2010), que realiza predição de sítios de ubiquitinação, foi possível determinar os possíveis motivos que teriam a capacidade de receber este tipo de modificação no EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Dos 29 motivos avaliados pelo programa, 11 foram considerados como possíveis alvos em *L. amazonensis* e 13 em *L. infantum*, e os mesmos sítios encontrados em *L. amazonensis*, também foram detectados em *L. infantum*.

Nesta predição, foi possível determinar 11 motivos em comum entre as duas espécies, que são prováveis alvos para ubiquitinação, uns com probabilidade mais alta, enquanto outros, mais baixa (Tabela 4). No caso de *L. infantum*, dois sítios adicionais, não identificados em *L. amazonensis*, também foram preditos. Porém, pela predição do programa, essa possível modificação possui uma baixa probabilidade de ocorrência nestes dois sítios (Tabela 4). Mesmo com essa diferença entre as duas espécies, é provável que não seja este tipo de modificação que leva ao aparecimento da segunda banda visualizada apenas em *L. amazonensis*. Os dois sítios diferentes entre as espécies, além de ter uma predição com baixa probabilidade, foram identificados em *L. infantum*, que possui apenas uma banda visualizada, e não na *L. amazonensis*.

5.4.4 Predição de sítios de Sumoilação

A análise *in silico* para sítios de sumoilação foi realizada em uma página de predição de sítios específicos para esta modificação pós-traducional, desenvolvida pela empresa Abgent. Esta análise apontou nove possíveis motivos capazes de receber a modificação, tanto em *L. amazonensis*, como em *L. infantum*. Destes nove motivos, quatro apresentaram alta e cinco apresentaram baixa probabilidade na predição (Tabela 5). Porém, o que chamou mais a atenção foi o fato de que foram detectados os mesmos sítios para as duas espécies, diminuindo a possibilidade de ser esta modificação que causa o aparecimento da segunda banda em *L. amazonensis*.

Tabela 5. Predição de sítios de Sumoilação em *La*EIF4E3 e *Li*EIF4E3.

<i>L. amazonensis</i>				<i>L. infantum</i>			
No.	Pos.	Group	Score	No.	Pos.	Group	Score
1	K213	WFRKD <u>IK</u> PE WEHPR	0.94	1	K213	WFRRD <u>IK</u> PE WEHPR	0.94
2	K16	PPKSD <u>AK</u> GE PKSSS	0.79	2	K29	SAAAV <u>VK</u> PP STQLV	0.82
3	K96	AAAGA <u>AK</u> RE ADENE	0.79	3	K16	PQKSD <u>AK</u> GE PKSSS	0.79
4	K29	SAAAV <u>AK</u> PP SIQLA	0.69	4	K96	AAAGA <u>AK</u> KE TDEND	0.79
5	K12	AAVIP <u>PK</u> SD AKGEP	0.61	5	K296	SEVGK <u>LK</u> AF ANSVR	0.56
6	K296	SEVGK <u>LK</u> AF ANSVR	0.56	6	K12	AAVIP <u>QK</u> SD AKGEP	0.50
7	K317	GAKAL <u>QK</u> LE YYSHH	0.50	7	K317	GAKTL <u>QK</u> LE YYSHH	0.50
8	K223	EHPRN <u>KK</u> GG TISIV	0.31	8	K223	EHPRN <u>KK</u> GG TISIV	0.31
9	K125	SESKL <u>PK</u> LF GCHNT	0.26	9	K125	SESKL <u>PK</u> LF GCHNT	0.26

Legenda: Através da página de predição de sumoilação SUMOplot, da empresa ABGENT, foi possível determinar os possíveis motivos que teriam a capacidade de receber este tipo de modificação no EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os aminoácidos com o score destacado em vermelho são as predições consideradas com maior probabilidade de ocorrer.

5.5 Análise da expressão de mutantes do EIF4E3 de *L. amazonensis* contendo mutações pontuais em possíveis sítios de fosforilação e de interação com proteínas.

Com o intuito de mapear possíveis sítios de fosforilação e de interação do EIF4E3 com outras proteínas que atuam na iniciação da tradução, o alinhamento prévio das sequências dos EIF4E3 (Figura 22) foi utilizado para a identificação de possíveis pontos para realização das mutações. Então, os quatro primeiros mutantes foram idealizados em pontos estratégicos para a identificação desses prováveis sítios (Figura 27).

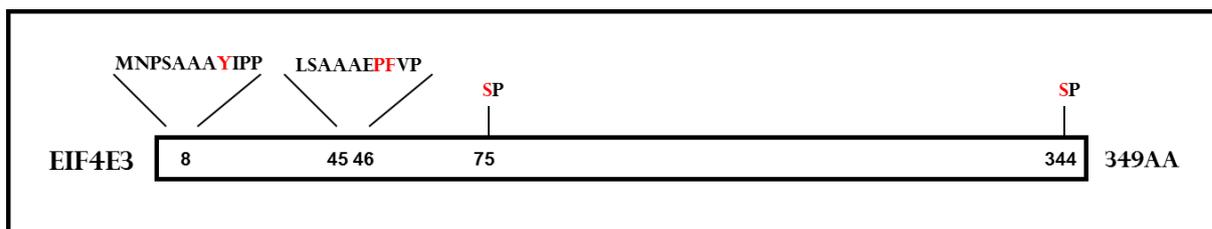


Figura 27. Esquema das mutações idealizadas para serem realizadas no EIF4E3 de *Leishmania amazonensis*. Este esquema aponta as quatro mutações que foram idealizadas para começar o estudo do mapeamento dos sítios de fosforilação e de interação com proteínas. As duas primeiras mutações nas duas regiões conservadas da N-terminal, na Y8 e outro mutante na P45 e F46 e a mutação nas serinas 75 e 344. Os aminoácidos mutados se encontram em vermelho no esquema, sempre substituídos por alaninas.

5.5.1 Análise da expressão dos mutantes de EIF4E3 transfectados em *L. amazonensis*, em fase exponencial de crescimento.

As duas primeiras mutações, nos dois motivos conservados, da região N-terminal (Figura 22 – caixas verdes), teriam o intuito de verificar se as interações com parceiros funcionais, como a PABP 2 e 3 e o EIF4G4, seriam ou não abolidas. As mutações nas serinas 75 e 344 seriam úteis na investigação de possíveis sítios de fosforilação, visto que estas regiões possuem o aminoácido serina seguido de uma prolina, ponto de atuação das MAP quinases em mamíferos. Além disso, a Serina 75 é o aminoácido exclusivo em *L. amazonensis* que foi predito como possível sítio de glicosilação e fosforilação. Todos os aminoácidos mutados foram trocados pela alanina, que é o aminoácido de escolha em experimentos de mutagênese, pois além de ser o segundo menor aminoácido, não apresenta carga e possivelmente não deve interferir na estrutura da proteínas.

Os mutantes foram amplificados, clonados e sequenciados, para verificar a presença da mutação e do epítipo HA. Após a obtenção dos transfectantes, extratos foram obtidos com as células mutantes na fase exponencial de crescimento (48h),

para verificar se haveria a expressão das proteínas mutadas (Figura 28). Dos quatro mutantes analisados no Western-blot, a expressão do 4E3 Δ Y8A-HA e do 4E3 Δ P45/F46A-HA pareceu muito semelhante à observada com a proteína selvagem, com a presença das duas bandas (Figura 28). Já a expressão do mutante 4E3 Δ S344A-HA, com a mutação na serina presente na região C-terminal, nota-se uma diminuição acentuada da intensidade da banda de menor peso molecular (Figura 28 - seta vermelha). Como nesta banda, são visualizadas pelo menos 2 isoformas, esse resultado poderia estar indicando que esta serina seria um sítio de fosforilação. Para confirmar esse suposto sítio, seria necessário observar a expressão das isoformas em gel bidimensional. No entanto, apenas com o unidimensional já foi possível afirmar que a serina 75 é a responsável pelo aparecimento da banda de maior peso molecular do EIF4E3 de *L. amazonensis*. A expressão da proteína no mutante com o provável sítio abolido deixou claro que só ocorre a expressão das isoformas de menor peso molecular (Figura 28 - Seta verde).

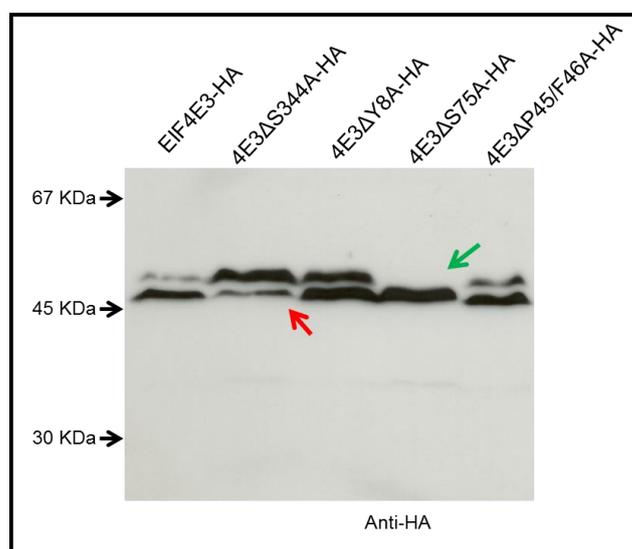


Figura 28. Análise comparativa da expressão dos mutantes obtidos do EIF4E3. A partir das amostras obtidas na fase de crescimento exponencial dos transfectantes (48h), foi possível observar e comparar a expressão dos mutantes do *LaEIF4E3*. O anticorpo utilizado no ensaio foi um Anti-HA comercial. A seta vermelha indica a banda de menor peso molecular do mutante 4E3 Δ S344A-HA de menor intensidade. A seta verde indica a ausência da banda de maior peso molecular do mutante 4E3 Δ S75A-HA.

5.5.2 Análise da expressão dos mutantes do EIF4E3 de *L. amazonensis* durante curva de crescimento de formas promastigotas.

Com o intuito de observar se a expressão do EIF4E3, durante uma curva de crescimento da forma promastigota, seria semelhante àquela observada com a proteína selvagem (Figura 13A), culturas das células mutantes foram acompanhadas diariamente. Não foi observada diferença significativa no crescimento celular dos quatro mutantes, em comparação com a célula selvagem. Em relação à expressão do gene, os mutantes 4E3 Δ Y8A-HA, 4E3 Δ P45/F46A-HA e 4E3 Δ S344A-HA apresentaram a mesma expressão observada pelo gene selvagem. O ponto após o repique (0h) se apresenta quase que na totalidade com as isoformas de maior peso molecular. Em 6 horas, a banda de menor peso molecular se destaca, e as duas bandas permanecem equivalentes no ponto intermediário da curva (48h). No final da curva de crescimento, na fase de morte celular (144h), os três mutantes apresentam apenas a banda de maior peso molecular, como ocorre na proteína selvagem (Figura 29). Nesta curva, porém, não foi observada diminuição da banda de menor peso molecular do mutante 4E3 Δ S344A-HA, vista na expressão teste do ponto 48h após seleção dos transfectantes.

Já no caso do mutante 4E3 Δ S75A-HA, ocorre a expressão apenas da banda de menor peso molecular, em todos os pontos observados. Mesmo no ponto 0h e 144h, que é observada apenas a banda de maior peso molecular na proteína selvagem e nos outros três mutantes, no 4E3 Δ S75A-HA a banda é visualizada na sua totalidade com peso molecular mais baixo (Figura 29). Esse resultado é mais um indicativo de que o aumento de peso molecular observado para o EIF4E3 selvagem ocorre por modificações pós-traducionais, pois, neste mutante, ao invés da banda de maior peso molecular não ser expressa nos pontos 0h e 144h, ela é expressa, mas

permanece com peso molecular mais baixo, sem a adição da modificação pós-traducional na serina 75 (Figura 29 – setas vermelhas).

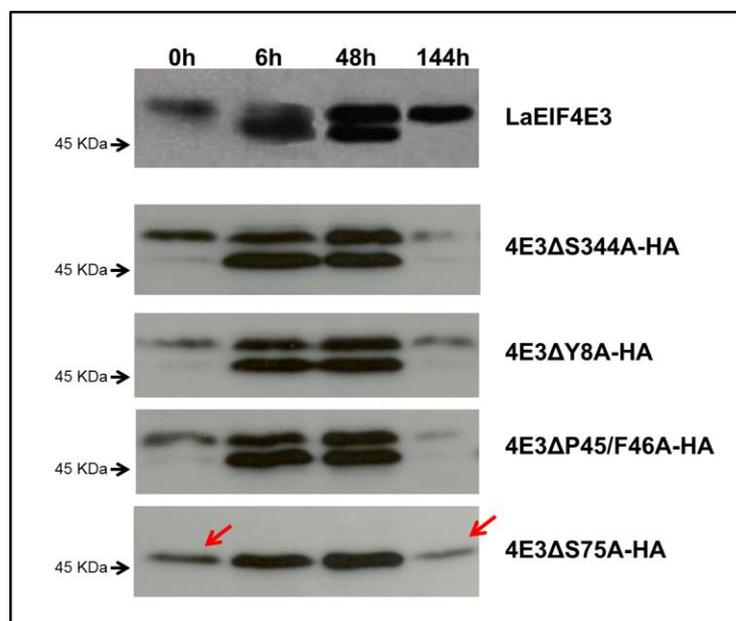


Figura 29. Expressão dos mutantes do LaEIF4E3 durante uma curva de crescimento celular na fase promastigota. 10^6 células na fase estacionária foram repassadas para uma nova cultura e o seu crescimento acompanhado diariamente, até a fase de morte celular. Amostras no ponto 0h, 6h, 48h e 144h foram retiradas, fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de PVDF, com o intuito de comparar a expressão dos mutantes do LaEIF4E3. O anticorpo utilizado nos ensaios de *Western-blot* foi um Anti-HA comercial. A seta vermelha ressalta a presença apenas da banda de menor peso molecular no mutante 4E3ΔS75A-HA.

5.5.3 Identificação do número de isoformas presentes nos mutantes do EIF4E3 de *L. amazonensis* e análise do perfil destas isoformas por focalização isoeétrica.

Como o EIF4E3 nativo de *L. amazonensis* apresenta quatro isoformas na análise por gel bidimensional (Figura 19), os mutantes que não apresentaram diferenças no padrão de bandas em gel unidimensional poderiam sofrer ausência de alguma das isoformas observadas na segunda dimensão. Por conta disso, uma análise através de géis bidimensionais foi realizada com estes quatro mutantes e a proteína selvagem EIF4E3-HA. De forma similar ao observado na proteína nativa, a

proteína selvagem apresentou as quatro isoformas esperadas (Figura 30 – 1 a 4 em vermelho). Entretanto, por alguma razão, as isoformas 1 e 3 não apresentaram a mesma equivalência de expressão observada na proteína nativa. Além disso, nota-se que houve uma migração das isoformas para a zona mais ácida da fita, o que já era esperado visto que o tag de HA confere uma acidez e diminui um pouco o ponto isoelétrico das proteínas. A expressão diferenciada do mutante 4E3ΔY8A-HA chamou um pouco a atenção visto que no unidimensional não eram observadas mudanças no perfil de expressão em relação à proteína endógena. No bidimensional nota-se claramente que as isoformas 1 e 3 praticamente não são visualizadas, e além disso, há um aumento de intensidade da isoforma 4 (Figura 30 - seta verde).

Surpreendentemente, os outros três mutantes apresentaram um padrão de expressão mais diferenciado, com a presença de isoformas não detectadas nem na proteína selvagem exógena, nem na endógena. Além das quatro isoformas esperadas, ainda apresentaram outras quatro isoformas, uma que seria encontrada na banda de maior peso molecular (Figura 30 - seta azul), e três que estariam localizadas, no unidimensional, na banda de menor peso molecular (Figura 30 - setas amarelas e vermelha). Um ponto bastante interessante foi observar que no mutante 4E3ΔS344A-HA, que foi abolido um provável sítio de fosforilação, não foi visualizada as duas isoformas intermediárias apontadas pelas setas amarelas (Figura 30). Além disso, nota-se claramente o aumento da intensidade das isoformas que compõem a banda de maior peso molecular no mutante 4E3ΔP45/F46A-HA (Figura 30).

O resultado mais esperado foi também o mais surpreendente. O mutante 4E3ΔS75A-HA, que claramente aboliu a banda de maior peso molecular no unidimensional, e no qual não era esperado aparecerem as isoformas 1 e 2,

apresentou isoformas equivalentes de menor peso molecular, indicando que apenas a modificação que causa o aumento no peso não foi adicionada à proteína (Figura 30). Como já foi visto que essa modificação causa o aumento do peso molecular, mas não causa modificação do pI, as isoformas 1 e 2, então, só diminuíram de peso, permanecendo no mesmo ponto da focalização isoeletrica (Figura 30).

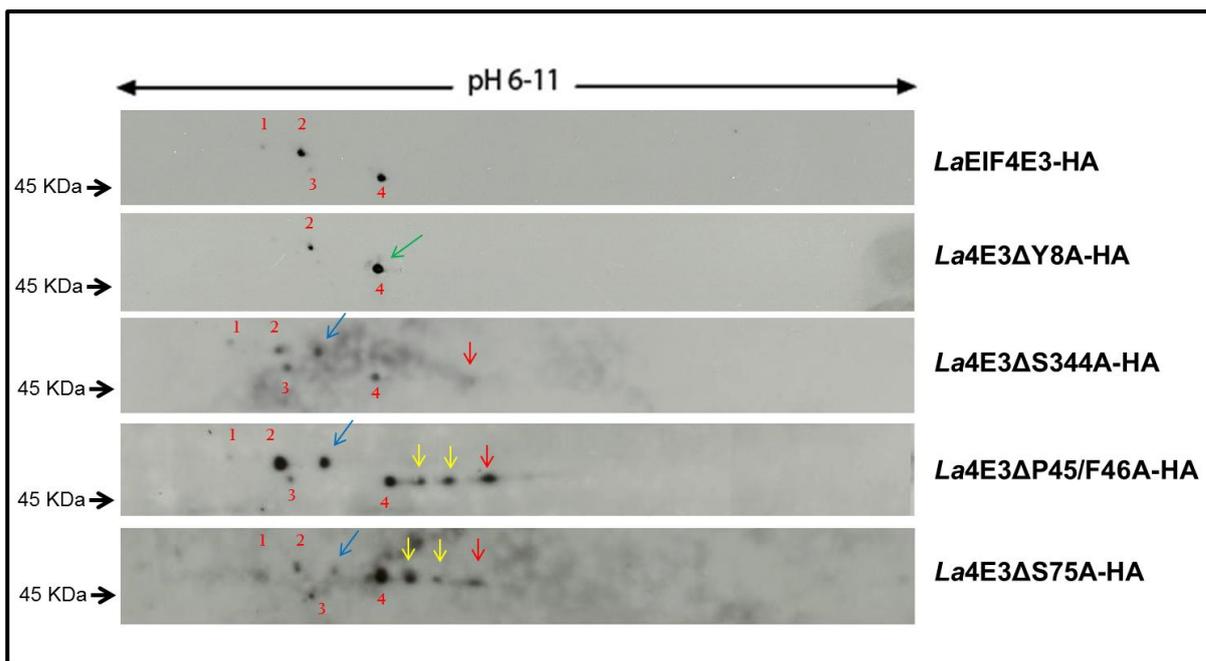


Figura 30. Análise das isoformas apresentadas pelos mutantes do fator EIF4E3, após focalização isoeletrica. Amostras da fase exponencial de crescimento (48h) foram utilizadas no experimento. O *western-blot* foi revelado com anticorpo comercial anti-HA. O gene selvagem fusionado ao HA apresentou quatro isoformas (1 – 4 em vermelho), o mesmo número de isoformas encontradas na proteína endógena. A seta verde ressalta o aumento da expressão da isoforma 4 no mutante La4E3ΔY8A. As setas azul, vermelha e amarelas apontam isoformas diferenciadas presentes nos mutantes La4E3ΔS344A, La4E3ΔP45/F46A e La4E3ΔS75A, mas que não foram visualizadas na proteína selvagem.

Outro aspecto interessante foi observar a presença da isoforma apontada pela seta azul nos mutantes 4E3ΔS344A-HA, 4E3ΔS75A-HA e 4E3ΔP45/F46A. É provável que esta isoforma seja formada pela adição de modificações na isoforma apontada pela seta vermelha, visto que esta isoforma não está presente no mutante

4E3ΔY8A e na proteína selvagem EIF4E3-HA. Além disso, no mutante 4E3ΔS75A-HA, que também apresentou essa isoforma, houve diminuição de peso, mas não houve alteração do pI, indicando que a modificação nesta serina provavelmente não possui carga, como a glicosilação, reforçando a análise obtida nas predições *in silico*. Este resultado afasta a hipótese de que poderia ocorrer uma fosfo-glicosilação na serina 75, pois a ausência desta modificação causaria diminuição de peso molecular e também do pI (Figura 30).

5.6 Análise de interações funcionais diretamente relacionadas com a iniciação da tradução do EIF4E3 de *L. amazonensis* e EIF4E4 de *L. infantum*.

Para se conseguir determinar e inferir a função de uma proteína é necessário identificar com quem essa proteína interage na célula, sua localização e como essa proteína é regulada, entre outras propriedades. Para contribuir no entendimento da função dos EIF4E3 e 4 de *Leishmania*, esse estudo realizou também ensaios de interação *in vitro* e *in vivo* entre esses homólogos de eIF4E e proteínas que poderiam participar da iniciação da tradução, tendo em vista a disponibilidade de anticorpos contra diferentes parceiros candidatos desta proteína. Também foi avaliada sua interação com um nucleotídeo *cap* sintético, tendo em vista a importância desta interação para a função de homólogos de eIF4E na tradução.

5.6.1 Análise da formação de complexos protéicos *in vivo* entre os homólogos do eIF4E analisados e seus supostos parceiros funcionais.

Após obtenção dos transfectantes do EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* selvagens, foi possível realizar ensaios de interação, através de

imunoprecipitação, com extratos celulares na fase exponencial de crescimento das duas espécies estudadas. Assim, foi possível identificar se as interações observadas pelos homólogos do complexo eIF4F de outras espécies de tripanosomatídeos ocorriam também em *L. amazonensis* e *L. infantum*, além de verificar também interações com proteínas relacionadas, mas que ainda não foram identificadas interagindo com os homólogos EIF4E.

Através do epítipo de HA foi possível purificar os EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* e também o EIF4E4 de *L. infantum*, por meio de imunoprecipitação, juntamente com o complexo de proteínas ligados à eles. A amostra purificada foi utilizada em ensaios de *Western-blot*, como também o lisado total utilizado no ensaio e o lisado depletado, após a incubação com a resina. Os resultados das interações *in vivo* obtidas tanto com o EIF4E3 de *L. amazonensis* como o de *L. infantum* foram os mesmos (Figura 31). O EIF4E3 e o EIF4E4 foram os primeiros a serem observados ligados à resina, pois se não aparecessem, provavelmente o ensaio não teria funcionado, já que o epítipo de HA que é purificado pela resina está fusionado a estas proteínas. Foi observada posteriormente a ocorrência das interações EIF4E3/EIF4G4 e EIF4E4/PABP1 que já foram visualizadas em *L. major* e *T. brucei* *in vivo*, e também em ensaios de *pull-down* com as respectivas proteínas recombinantes (Da Costa Lima et al, 2010, Freire et al., 2010). A interação EIF4E3/PABP1 não foi visualizada em *L. infantum* e *L. amazonensis*, diferentemente da interação forte que ocorre entre o EIF4E4 e a PABP1, resultados também já observados nas outras espécies já citadas. Assim, especula-se que estas interações devam ser conservadas entre os tripanosomatídeos de um modo geral.

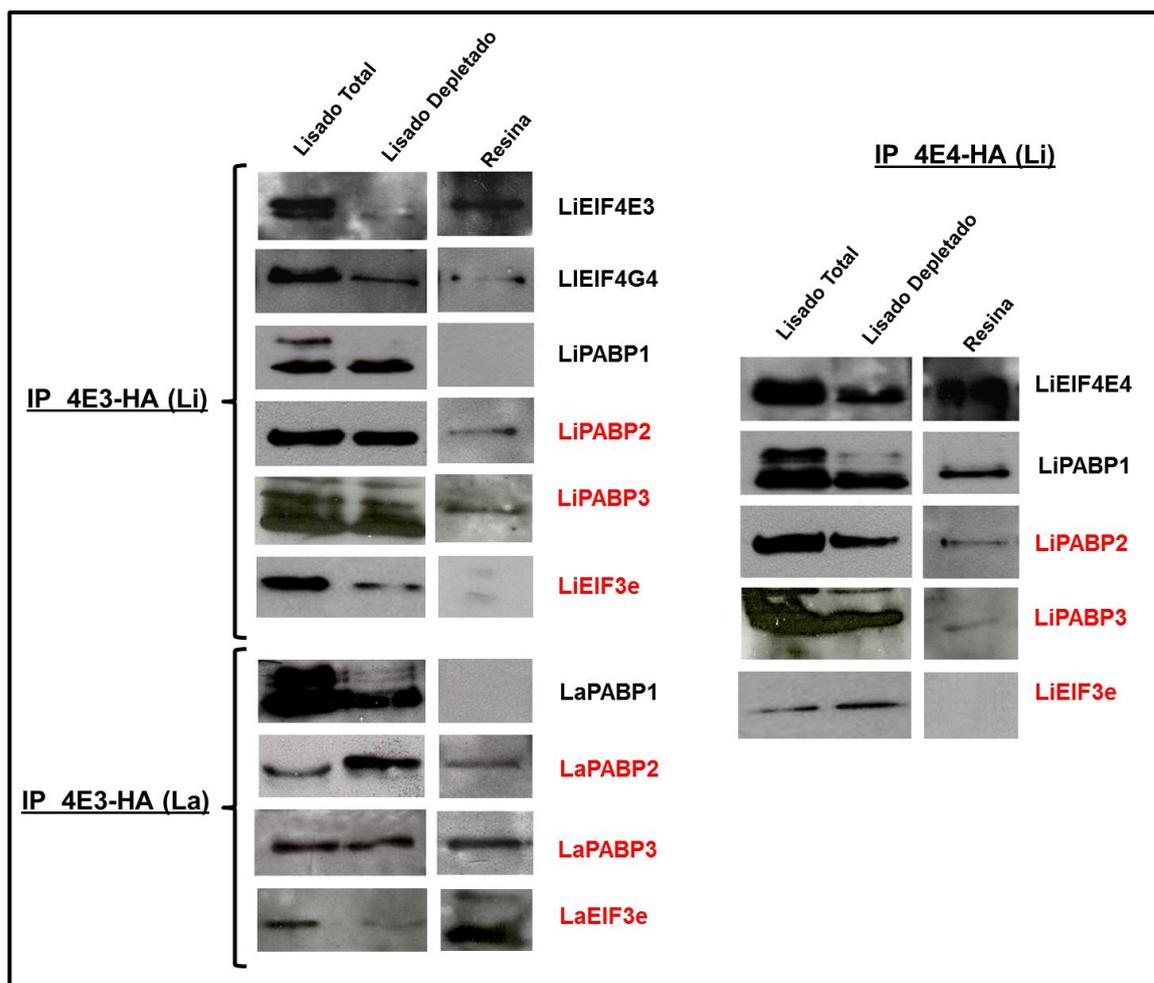


Figura 31. Análise das interações *in vivo* através de imunoprecipitação dos parceiros dos EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* e EIF4E4 de *L. infantum*. Células na fase exponencial de crescimento foram usadas neste experimento. As amostras obtidas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de PVDF, para realização dos ensaios de *Western-blot*. Todos os anticorpos utilizados neste ensaio estavam disponível no laboratório. As proteínas em vermelho são resultados inéditos, que ainda não tinham sido observadas em ensaios *in vivo* em nenhuma espécie de tripanosomatídeos. As amostras que apareceram na resina indicam que houve ligação do fator estudado com a proteína avaliada no ensaio.

Algumas outras proteínas, também relacionadas com a iniciação da tradução, foram investigadas neste ensaio, visto que a interação delas com os homólogos EIF4E3 e 4 ainda não haviam sido estudadas, como os homólogos da PABP (PABP2 e 3) e uma das subunidade do eIF3 (EIF3e). Além disso, como já se sabe que o EIF4E3 não interage com a PABP1, havia o interesse de verificar se iria ocorrer algum tipo de ligação com os outros dois homólogos da PABP. Os resultados

mostraram interessantemente que realmente houve uma interação do EIF4E3 das duas espécies estudadas com a PABP2 e também a PABP3 (Figura 31). Mais o resultado mais surpreendente é que o EIF4E4, além de interagir com a PABP1, também se liga a aquelas duas proteínas (Figura 31). O ponto fundamental é determinar se os homólogos da PABP interagem com o EIF4E3 e EIF4E4 através de uma ligação direta, ou se esta interação ocorre via EIF4G4 ou até mesmo via mRNA onde as PABPs estão ligadas na extremidade 3' e os EIF4Es na sua extremidade 5'.

5.6.2 Análise da interação dos EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* e do EIF4E4 de *L. infantum* selvagem e mutante com o cap.

Como já foi descrito, o EIF4E3 de *L. major* não se liga ao cap monometilado. Então, para saber se os ortólogos estudados neste trabalho também se comportam da mesma forma, foi realizado o ensaio de interação ao cap. Foi avaliado também o EIF4E4 de *L. infantum* e seu mutante no sítio de interação a este nucleotídeo, já que este fator em *L. major* já foi descrito interagindo com o ⁷m-GTP. Além disso, para confirmar os resultados obtidos em experimentos de deleção gênica com estas duas proteínas, era necessário comprovar que este mutante não interagia ao cap (de Melo Neto, manuscrito em redação). Como controles positivo e negativo deste experimento, foram utilizados o EIF4E1 e o próprio EIF4E3 de *L. major*, respectivamente. Mesmo com a radiação com o tempo de meia vida bastante reduzido, é possível visualizar claramente que tanto nas lavagens como nas eluições, temos a presença do EIF4E1, mas não do EIF4E3, confirmando que o ensaio funcionou adequadamente (Figura 32).

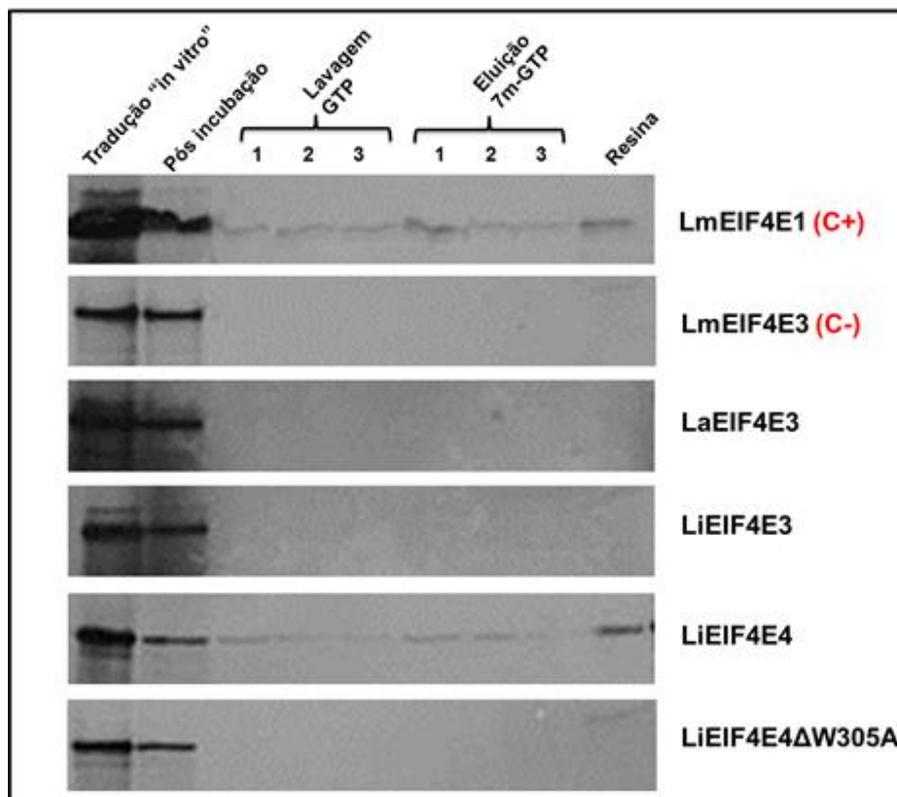


Figura 32. Análise da interação de homólogos ao fator eIF4E com o análogo do cap (7m-GTP). Após obtenção dos mRNAs no ensaio de transcrição *in vitro*, foi realizada a tradução *in vitro* utilizando reticulócito de coelho. Para produção das proteínas radioativas foi utilizado o aminoácido metionina marcado com ^{35}S . Estas proteínas foram incubadas com a resina ligada ao análogo do cap monometilado, 7m-GTP, e tanto as lavagens como as eluições foram aliqüotadas para serem visualizadas no experimento. Estas amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE e o gel foi exposto a filme autorradiográfico. O EIF4E1 e EIF4E3 de *L. major* foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O único fator observado que interagiu com cap foi o EIF4E4 selvagem de *L. infantum*.

No que concerne as proteínas investigadas no experimento, nem o EIF4E3 de *L. amazonensis* nem o de *L. infantum* foram capazes de interagir com o cap ligado a resina, não aparecendo nem nas lavagens com o competidor GTP, nem nas eluições, que utiliza o próprio cap solúvel (o $^7\text{m-GTP}$) como competidor para desligar a proteína da resina (Figura 32). Assim, podemos inferir que a propriedade de ausência ligação ao cap monometilado deva ser conservada entre os ortólogos dos tripanosomatídeos. Já o EIF4E4 de *L. infantum* interage com o cap, como previsto, e a mutação no triptofano descrito como responsável por esta interação, conservada nos homólogos do eIF4E, impede que a interação aconteça (Figura 32).

6. DISCUSSÃO

Diferentemente dos demais eucariotos, o controle da expressão gênica nos tripanosomatídeos ocorre no nível pós-transcricional. As evidências até agora indicam que os dois principais pontos deste controle ocorrem na estabilidade/degradação do mRNA e na iniciação da tradução (Fernandez-Moya e Estévez, 2010). Além disso, estudos demonstraram que enquanto a porcentagem dos níveis de mRNA que variam durante o ciclo de vida dos tripanosomatídeos é de 1-2% dos transcritos, as análises proteômicas identificaram aproximadamente 10% de proteínas diferentemente expressas entre as formas promastigota e amastigota de *Leishmania* (McNicoll et al., 2005). Esta diferença demonstra tanto a importância da iniciação da tradução como também das modificações pós-traducionais no controle da expressão gênica. A presença das modificações pós-traducionais nestes parasitas são de extrema importância, visto que passam por mudanças rápidas nas suas formas morfológicas e necessitam regular a função de suas proteínas rapidamente. Assim, modificações pós traducionais encontradas nos vários fatores de iniciação da tradução podem desempenhar um papel fundamental na regulação da tradução dos mRNAs e na função desses fatores como um todo.

Nos eucariotos em geral, mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica por modificações pós-traducionais em fatores de iniciação da tradução já foram descritos, principalmente através de fosforilação em resíduos específicos de fatores selecionados (Dennis et al., 2009). Através do estudo apresentado nesta Tese foi possível identificar também em *L. amazonensis* que as várias isoformas encontradas nos fatores EIF4E3 e EIF4E4 são formadas a partir de modificações pós-traducionais, entre elas a fosforilação, claramente identificada pelo

ensaio de purificação de fosfoproteínas. O mecanismo de fosforilação já foi descrito para homólogos do fator eIF4E em outros organismos, como *Drosophila*, leveduras e humanos (Lachance et al., 2002; Zanchin e McCarthy, 1995; Hiremath et al., 1989). Até o momento, contudo nenhum grupo de pesquisa investigou sobre a fosforilação do fator EIF4E em *Leishmania*, o que torna este estudo inédito e de extrema importância. Um trabalho recente observou também a presença de isoformas no EIF4E3 de *Leishmania amazonensis*, sugerindo a presença de modificações pós-traducionais (Zinoviev et al., 2012), que já foram identificadas neste trabalho.

Nos ensaios de purificação de fosfoproteínas a PABP1 foi utilizada como um controle positivo tendo em vista que seu ortólogo em *L. major* já foi descrito como fosforilado (Bates et al., 2000). Além disso, a PABP1 de *L. amazonensis* apresentava várias isoformas, que indicavam que ela também deveria ser uma proteína fosforilada, o que de fato foi confirmado pelo ensaio. Um artigo mais recente, que caracterizou a PABP de *L. infantum*, demonstrou que esta proteína foi fosforilada *in vitro* por uma quinase já bem descrita em metazoários, a MAPK p38 (Guerra et al., 2011). A grande surpresa destes ensaios partiu do resultado obtido com o EIF4AI, que algumas vezes apareceu na fração de eluição de fosfoproteínas. Estudos com análise de fosfoproteoma de *T. brucei* e *T. cruzi* não identificaram presença de fosforilação no EIF4AI (Nett et al., 2010; Nakayasu et al., 2009). Assim, foram encontradas diferenças entre os ortólogos deste fator, pois o EIF4AI de *T. brucei* neste mesmo ensaio de purificação de fosfoproteínas não foi detectado (Malvezzi, 2010), estando de acordo com os artigos do fosfoproteoma. Uma análise do fosfoproteoma de *T. brucei* mais recente identificou apenas um sítio de fosforilação para o EIF4AI (Urbaniak et al., 2013), indo em contradição aos trabalhos anteriores. Porém, com apenas um sítio e um mecanismo de fosforilação que

provavelmente não ocorre de maneira contínua na proteína, fica difícil, mesmo pela espectrometria de massa, detectar a modificação deste fator. Assim, esta discreta fosforilação que foi detectada, poderia estar relacionada como algum “reforço” para a proteína desenvolver melhor sua função, mas a falta desta não impediria sua atuação na iniciação da tradução e/ou na interação com outras proteínas.

A identificação de fosforilação dos homólogos de eIF4E aqui estudados pelo ensaio de purificação de fosfoproteínas também não garante que todas as isoformas evidenciadas por eletroforese unidimensional sejam provenientes de modificações por fosforilação. Por isso, a realização da focalização isoeétrica foi de extrema importância para este estudo. Com ela, foi possível identificar quantas isoformas cada fator analisado possui e as diferenças e semelhanças entre seus homólogos. Através de análises em gel bidimensional, um estudo mais amplo mostrou que aproximadamente 80% das proteínas identificadas da forma procíclica de *T. brucei* apresentaram quatro isoformas ou menos, com alteração de pI, porém com pouca alteração de peso molecular (Jones et al., 2006). Assim, pode-se perceber que as modificações pós-traducionais de proteínas são bastante comuns nos tripanosomatídeos. Além disso, genes codificando quinases de proteínas nestes parasitas foram identificados em número até duas vezes maior do que em outros eucariotos unicelulares, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Plasmodium falciparum*, indicando que a fosforilação é um mecanismo bastante utilizado para regulação da atividade de proteínas nos tripanosomatídeos (Naula et al., 2005).

O EIF4E3 de *L. amazonensis* possui claramente 4 isoformas bem definidas, diferentemente do seu homólogo EIF4E4, que possui pelo menos 8 isoformas. Esse resultado difere do encontrado em *T. brucei*, com os EIF4E3 e 4 possuindo ambos o mesmo conjunto de várias isoformas (Malvezzi, 2010). A fosforilação destes fatores

em outras espécies de tripanosomatídeos já foi descrita em artigos de análises de fosfoproteoma, sendo identificadas fosforilação no EIF4E3 de *T. brucei* e *T. cruzi* (Nett et al., 2010; Nakayasu et al., 2009) e no EIF4E4 de *L. infantum* (Hem et al., 2010). Nota-se que as isoformas migram do lado mais básico para o lado mais ácido, diminuindo de pI e aumentando de peso gradativamente. Este tipo de migração é um indicativo de fosforilação, visto que cada grupo fosfato adicionado à proteína lhe confere uma carga mais negativa, fazendo a proteína migrar para o lado positivo na focalização, causando a diminuição do pI. Por isso, algumas modificações, como a própria fosforilação, a glicosilação e algumas proteólises são facilmente localizadas em géis 2D, aparecendo em sinais (*spots*) distintos ao longo dos eixos horizontal e vertical (Kosako e Nagano, 2011).

No ensaio com hidroxiuréia, o ponto de 48h apresentou prevalência de uma única isoforma em relação ao controle. Neste ensaio, foram utilizadas diferentes concentrações de Hidroxiuréia, visto a dificuldade de se conseguir sincronizar totalmente essas células e escassez de artigos científicos que usem a droga para o fim de sincronização em *Leishmania*. Na literatura, os artigos encontrados testam a Hidroxiuréia para fins anti-parasitário, usando concentrações elevadas da droga aliados com tempo prolongado (Melo e Beiral, 2003; Martinez-Rojano et al., 2008). Um trabalho realizado em 2005, utilizou para fins de sincronização em *Leishmania major*, 400 ug/ml da droga, o que equivale a 5 mM de hidroxiuréia (Zick et al., 2005), a mesma concentração utilizada nos primeiros ensaios realizados. Porém, para conseguirmos resultados mais visíveis para nossos fatores, tivemos que aumentar em três vezes essa concentração, utilizando 15 mM da droga. Uma possível explicação seria o fato de que, no estudo de Zick (2005) foi investigado proteínas sabidamente mais expressas na fase-S, sendo facilmente detectadas. Neste caso

não seria necessário a cultura total estar bem sincronizada para conseguir detectar um aumento da expressão. Já neste trabalho havia o interesse de verificar se a presença simultânea das isoformas na fase exponencial era devido a presença de populações distintas de células, sendo muito difícil conseguir fazer uma sincronização total da cultura de *Leishmania*, mas tendo um indício de que os fatores estudados podem sofrer regulação através do ciclo celular do parasita.

Nas curvas utilizando os inibidores de processos celulares, nota-se claramente que a sinefungina causou o efeito mais significativo nos EIF4E3 e 4, bloqueando já nas primeiras horas a formação da banda de menor peso molecular do EIF4E3 e a de maior peso molecular do EIF4E4. Este resultado do EIF4E4 é compatível ao observado com a proteína PABP1 de *T. brucei*, que apresentou um bloqueio do aparecimento da banda de maior peso molecular em culturas tratadas com a mesma concentração da droga (Kramer et al., 2013). Já na curva com os inibidores de tradução, tanto a puromicina como a cicloheximida não interferiram significativamente no padrão de expressão do EIF4E4 nas primeiras 6h, resultado novamente semelhante ao encontrado com a PABP1 de *T. brucei* (Kramer et al., 2013). A semelhança entre a expressão do EIF4E4 e da PABP1 já tinha sido observada em trabalhos prévios do nosso grupo, com o EIF4E4 e a PABP1 apresentando predominantemente as bandas de menor peso molecular em fase de morte celular e em curvas de estresse nutricional (Pereira, 2008 – Dissertação de Mestrado). Mais uma vez foi observado que o EIF4E3 apresenta um padrão diferenciado de expressão, visto que é afetado nas primeiras 6h pelos inibidores de tradução, entretanto de forma menos significativa do que ocorreu na presença da sinefungina.

Trabalhos publicados até o momento demonstram que tanto as interações *in vitro* como as *in vivo* dos homólogos de eIF4E estudados parecem ser conservadas nos tripanosomatídeos (Dhalia et al, 2005; Yoffe et al., 2009; Freire et al., 2010; Da Costa Lima et al., 2010; Zinoviev et al., 2011; Zinoviev et al., 2012). Neste trabalho, foi possível observar que o EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*, também interage com o EIF4G4, já tendo sido identificados como parceiros funcionais em *L. major* e *T. brucei* (Reis, 2009; Freire et al., 2010; Yoffe et al., 2009). Recentemente, um trabalho demonstrou que essa interação entre o EIF4E3 e EIF4G4 não ocorre, se as células de *L. amazonensis* forem submetidas a estresse nutricional (Zinoviev et al., 2012). A interação do EIF4E4 com a PABP1, bem como a ausência de interação entre a PABP1 com o EIF4E3 também já tinha sido observada através de espectrometria de massa em *L. major* (Zinoviev et al., 2011). Esse resultado também foi confirmado para o EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* e para o EIF4E4 de *L. infantum*.

Resultados obtidos neste trabalho inéditos na literatura foram as interações do EIF4E4 de *L. infantum* com os outros dois homólogos da PABP "*in vivo*" (PABP2 e 3). Nestes dois casos, essas ligações realmente não ocorreram via EIF4G3, pois foi observado que estes dois homólogos não interagem "*in vivo*" com o EIF4G3 de *L. major* (Da Costa Lima et al., 2010). Além disso, os homólogos EIF4E3 tanto de *L. infantum* como de *L. amazonensis* também interagiram com estes dois homólogos da PABP. Um trabalho recente com *T. brucei* relata a presença da PABP2, do EIF4E1 e do EIF4E3 nos mesmos grânulos de estresse, enquanto que a PABP1, o EIF4G3 e o EIF4E4 estão agrupados em outros tipos de grânulos (Kramer et al., 2013). Esse resultados reforçam as interações encontradas neste trabalho e indicam

que essas proteínas devam fazer parte de duas vias distintas, que interagem com diferentes conjuntos de mRNAs.

Em *L. major* e *T. brucei*, os homólogos do eIF4E possuem diferentes afinidades pelo cap. O EIF4E1 e EIF4E4 interagem tanto com o cap monometilado, como o cap4 de tripanosomatídeos, enquanto que o EIF4E3 não interage ou interage fracamente com o cap monometilado e tetrametilado (Dhalia et al., 2005; Yoffe et al., 2006; Freire et al., 2010). A interação com o cap também parece ser um mecanismo conservado nos tripanosomatídeos, pois ambos os homólogos EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* não interagiram com o cap monometilado neste trabalho. Contudo, o RNAi do EIF4E3 de *T. brucei* causa morte celular rapidamente e é observada uma queda acentuada na síntese protéica (Freire et al., 2010), levando a crer que mesmo não se ligando ao cap, esse fator participa da síntese protéica.

Todos os resultados observados até o momento sugerem que estes dois fatores estudados, os EIF4E3 e EIF4E4, participam da iniciação da tradução nos tripanosomatídeos. Este trabalho foi focado mais no EIF4E3 visto que, diferentemente do EIF4E4 que mantém o mesmo padrão de expressão em diferentes espécies de tripanosomatídeos (Pereira et al., 2013 – Manuscrito submetido, de Melo Neto, manuscrito em redação), o EIF4E3 apresenta uma expressão diferenciada entre as espécies. Esse resultado chama bastante a atenção para este fator, e essa diferença foi identificada neste trabalho sendo um reflexo das diferenças de aminoácidos encontradas nas sequências estudadas, como é o caso da serina 75, específica de *L. amazonensis*. A presença deste sítio confere o aparecimento de uma banda de maior peso molecular não encontrada nas outras espécies estudadas. A análise *in silico* demonstrou que não devem ocorrer

modificações do tipo ubiquitinação e sumoilação neste sítio, que são processos que já foram descritos para o EIF4E3 de *Drosophila* (Nie et al., 2009) e também em humanos (Xu et al., 2010). Contudo, uma possível ocorrência de glicosilação foi predita para o sítio da serina 75, e esta modificação possui carga neutra e causa uma mudança de peso compatível com a que foi observada na proteína avaliada nos bidimensionais. O uso de inibidores de glicosilação como 2 desoxi-d-glicose ou Benzil 2-acetamido-2-deoxi- α -D-galactopiranosideo serão necessários para confirmação desta predição.

Os resultados deste trabalho são inéditos, e colaboram para o entendimento do processo de iniciação da tradução nos tripanosomatídeos, visto que foi observado que a atividade dos fatores deve ser mediada por modificações pós-traducionais do tipo fosforilação e que a regulação desta atividade pode estar intimamente relacionada com o ciclo celular do parasita. Porém maiores estudos devem ser realizados, com o intuito de desvendar qual outro tipo de modificação poderia estar ocorrendo na serina 75 do fator EIF4E3 de *L. amazonensis*, o que esta modificação influencia na função da proteína, visto que é exclusiva, e porque este mecanismo só ocorre com esta espécie. Além disso, é necessário mapear os outros sítios onde ocorrem modificações nos outros ortólogos do EIF4E3 e, também em outros fatores estudados, relacionar a fosforilação identificada nos fatores com a sua funcionalidade, aumentando assim o entendimento de como ocorre a regulação pós-transcricional da expressão gênica nestes parasitas, que pode ser em grande parte movida por estas mesmas modificações pós-traducionais.

7. CONCLUSÕES

- O padrão de expressão das isoformas tanto do EIF4E3 como do EIF4E4 de *L. amazonensis* é alterado pelo inibidor de processamento de mRNA (Sinefungina), enquanto que inibidores de tradução (Cicloheximida e Puromicina) afetam especificamente o EIF4E3 e a expressão diferencial dos dois conjuntos de isoformas pode estar relacionada com a fase do ciclo celular em que o parasita se encontra.
- Os fatores EIF4E3 e EIF4E4 e a PABP1 de *L. amazonensis* apresentam múltiplas isoformas provenientes de fosforilação, embora o seu perfil de migração em gel bidimensional é compatível com outros tipos de modificação pós-traducional direcionadas também aos EIF4E3 e 4.
- O EIF4E3 das três espécies estudadas apresenta diferenças no seu padrão de expressão que ocorre como consequência direta de diferenças nas suas seqüências de aminoácidos.
- A mutação da serina 75 do EIF4E3 eliminou completamente a expressão da sua isoforma exclusiva de *L. amazonensis*, e a análise *in silico* indicou a ocorrência de uma possível O-glicosilação neste sítio.
- As interações investigadas com os EIF4E3 e 4 são bem conservadas nas espécies de tripanosomatídeos mais estudadas, e foram identificadas novas interações destes fatores com as PABP2 e 3.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acker MG, Lorsch JR. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. *Biochem Soc Trans* 2008; 36(4): 653-7.

Aitken CE, Jon R Lorsch JR. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012; 19(6): 568-76.

Albuquerque PL, Silva Júnior GB, Freire CC, Oliveira SB, Almeida DM, Silva HF, Cavalcante MS, Sousa AQ. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 2009; 26(4): 330-3.

Altmann M, Schmitz N, Berret C, Trachsel H. A novel inhibitor of cap dependent translation initiation in yeast: p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J.* 1997; 16: 1114-1121.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One* 2012; 7(5): e35671.

Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature* 2008; 453(7199): 1276-80.

Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules. *J. Cell Biol.* 172, 803–808 (2006)./ Eulalio, A., Behm-Ansmant, I. & Izaurralde, E. P-bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9–22 (2007).

Andreeva AV, Kutuzov MA. Protozoan protein tyrosine phosphatases. *International Journal for Parasitology* 2008, 38: 1279–1295.

Arhin GK, Ullu E, Tschudi C. 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* 2006; 147(1):137-139.

Armengol G, Rojo F, Castellví J, Iglesias C., Cuatrecasas M, Pons B, Baselga J, Ramón Y, Cajal S. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer* 2007, 15;67(16):7551-5

Asano K, Shalev A, Phan L, Nielsen K, Clayton J, Valásek L, Donahue TF, Hinnebusch AG. Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J.* 2001; 20(9): 2326-37.

Balagopal V, Parker R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr. Opin. Cell Biol* 2009; 21, 403-408.

Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *J Biol Chem* 1992; 267: 9805-9815.

Barhoumi M, Tanner NK, Banroques J, Linder P, Guizani I. *Leishmania infantum* LeIF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. *FEBS J.* 2006; 273, 5086-5100.

Bates EJ, Knuepfer E, Smith DF. Poly(A)-binding protein I of *Leishmania*: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Res* 2000; 28 (5): 1211-20.

Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. for Parasitol* 2007; 37: 1097–1106.

Bates PA, Rogers ME. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med*. 2004; 4(6): 601-9.

Bayona JC, Nakayasu ES, Laverrière M, Aguilar C, Sobreira TJ, Choi H, Nesvizhskii AI, Almeida IC, Cazzulo JJ, Alvarez VE. SUMOylation pathway in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization and proteomic analysis of target proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2011; 10(12): M110.007369.

Melo EJT, Beiral HJ. Effect of hydroxyurea on the intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*, *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(1):65-9.

Bellsolell L, Cho-Park PF, Poulin F, Sonenberg N, and Burley SK. Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. *Structure* 2006; 14, 913-923.

Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *Mol Microbiol* 2005; 55 (5): 1606-15.

Benz C, Nilsson D, Andersson B, Clayton C, Guilbride DL. Messenger RNA processing sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 143, 125-134.

Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 2007; 37: 1063-1075.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005; 309 (5733): 416-22.

Bilíński P, Wojtyła A, Kapka-Skrzypczak L, Chwedorowicz R, Cyranka M, Studziński T. Epigenetic regulation in drug addiction. *Ann Agric Environ Med* 2012; 19(3):491-6.

Brenchley R, Tariq H, Mcelhinney H, Szöör B, Huxley-Jones J, Stevens R, Matthews K, Taberner L. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* 2007; 8: 434.

Browning KS, Webster C, Roberts JK, Ravel JM. Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* 1992; 267, 10096-10100.

Buttner K, Wenig K, Hopfner KP. The exosome: a macromolecular cage for controlled RNA degradation. *Mol. Microbiol* 2006; 61, 1372-1379.

Buxade M, Parra-Palau J, Proud CG. The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). *Front Biosci.* 2008, 1 (13): 5359-73.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect* 2003; 5: 1231-1240.

Castro PH, Tavares RM, Bejarano ER, Azevedo H. SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012; DOI 10.1007/s00018-012-1094-2

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 2007; 5, 873-882.

Clayton C, Estevez A. The exosomes of trypanosomes and other protists. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 702: 39-49.

Clayton C, Shapira M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 156: 93-101.

Contreras V, Richardson MA, Hao E, Keiper BD. Depletion of the cap-associated isoform of translation factor eIF4G induces germline apoptosis in *C. elegans*. *Cell Death Differ* 2008; 15 (8): 1232-42.

Cuervo P, Domont GB, De Jesus JB. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *J Proteomics* 2010; 73 (5): 845-67.

Culjkovic B, Topisirovic I, Skrabanek L, Ruiz-Gutierrez M, Borden KL. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *J. Cell Biol* 2005; 169(2): 245-56.

Culjkovic B, Topisirovic I, Borden KL. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell Cycle* 2007; 6(1): 65-9.

D'orso I, De Gauzenzi JG, Frasch AC .RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. *Trends Parasitol* 2003; 19(4): 151-5.

Da Costa Lima TDC, Moura DMN, Reis CRS, et al. Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryotic cell* 2010; 101484-94.

Daneshbod Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian S, Negahban S, Aledavood A, Davarpanah MA, Soleimanpoor H, Daneshbod K. Clinical, hisyopathologic and cytologic diagnosis of mucosal leishmaniasis and literature review. *Arch Pathol Lab Med*. 2011; 135(4): 478-82.

Daniels JP, Gull K, Wickstead B. Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 4 (4): 552-69.

David CV, Craft N. Cutaneous and Mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.* 2009, 22(6): 491-502.

DC-Rubin SS, Schenkman S. Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. *Cell Microbiol.* 2012; 14(10): 1522-30.

Dennis MD, Person MD, Browning KS. Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components. *J Biol Chem.* 2009 Jul 31;284(31):20615-28

Dhalia R, Reis CR, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JR, Standart N, De Melo Neto OP. Translation initiation in *Leishmania major*. Characterization of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 140 (1): 23-41.

Dhalia R, Marinsek N, Reis CR, Katz R, Muniz JR, Standart N, Carrington M, De Melo Neto OP. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res* 2006; 34 (9): 2495-507.

Duschak VG, Couto AS. Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A Review. *Curr Med Chem.* 2009;16(24):3174-202. Review.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005a; 309 (5733): 409-15.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005b 309: 404-409.

Olszewska M, Bujarski JJ, Kurpisz M. P-bodies and their function during mRNA cell cycle: mini-review. *Cell Biochem Funct.* 2012 Apr;30(3):177-82.

Fernandez-Moya SM, Estévez AM. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2010; 1(1): 34-46.

Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. *Pharm Res.* 2011; 28(11): 2758-70.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008; 9(2): 102-14.

Fischer PM. Cap in Hand: Targeting eIF4E. *Cell Cycle* 2009; 8:16, 1-7.

Flohé L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. *Biotechnology Advances* 2012; 30: 294–301.

Franks TM, Lykke-Andersen J. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol Cell.* 2008; 5;32(5):605-15.

Freire ER, Dhalia R, Moura DM, Da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CR, Hughes K, Figueiredo RC, Standart N, Carrington M, De Melo Neto OP. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Mol Biochem Parasitology* 2010. 176 (1): 25-36.

Gomez C, Esther Ramires M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA. Regulation of gene expression in protozoa parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010, 726045.

Goodfellow I, Roberts L. Eukaryotic initiation factor 4E. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 2675-2680.

Griensven JV, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012 ;26(2): 309-22.

Guerra N, Vega-Sendino M, Perez-Morgado MI, Ramos E, Soto M, Gonzalez VW, Martin ME. Identification and functional characterization of poly(A) binding protein from *Leishmania infantum* (PABP). *FEBS Lett* 2011; 3;585(1):193-8

Gunzl A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? *Eukaryotic cell* 2010; (8): 1159-1170.

Haile S, Estevez AM, Clayton C. A role for the exosome in the in vivo degradation of unstable mRNAs. *RNA* 2003; 9, 1491-1501.

Haile S, Papadopoulou B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10 (6): 569-77.

Hall MP, Ho CK. Functional characterization of a 48 kDa *Trypanosoma brucei* cap 2 RNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 2006; 34 (19): 5594-602.

Harhay MO, Shaw JJ, Costa CH. Infectious disease control in Brazil. *Lancet* 2011; 24; 378(9797): 1135-6

Hasting KE. SL trans-splicing: easy come or easy go? *Trends Genet.* 2005; 21(4): 240-7.

Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004; 15;18(16):1926-45.

Hay RT. SUMO: a history of modification. *Mol Cell* 2005; 18:1–12.

Haynes PA. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? *Glycobiology* 1998; 8(1): 1-5.

He H, Haar TVD, Singh CR. et al. The Yeast Eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) HEAT Domain Interacts with eIF1 and eIF5 and Is Involved in Stringent AUG Selection. *Molecular and cellular biology* 2003; 23 (15): 5431-5445.

Hem S, Gherardini PF, Osorio y Fontéa J, Hourdel V, Morales MA et al. Identification of Leishmania-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-Ms/MS and comparative genomics analyses. *Proteomics* 2010; 10(21): 3868-83.

Hernandez G, Altmann M, Lasko P. Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukariotes. *Trends Biochem Sci.* 2010; 35(2): 63-73.

Hernandez G, Proud CG, Preiss T, Parsyan A. On the diversification of the translation apparatus across eukariotes. *Comp Funct Genomics* 2012; 2012: 256848 doi: 10.1155/2012/256848.

Hernández G, Vazquez-Pianzola P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. *Mechanisms of development* 2005; 7-8, 865-76.

Hinton TM, Coldwell MJ, Carpenter GA, Morley SJ, Pain VM. Functional analysis of individual activities of the scaffold protein eIF4G. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(3):1695-708.

Hiremath LS, Hiremath ST, Rychlik W, Joshi S, Domier LL, Rhoads RE. In vitro synthesis, phosphorylation and localization on 48S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E. *J Biol Chem.* 1989 Jan 15;264(2):1132-8.

Holder AA. Glycosylation of the variant surface antigens of *Trypanosoma brucei*. *Curr. Top Microbiol Immunol* 1985; 117:57-74.

Hotez PJ, Molyneux DH, Stillwaggon E, Bentwich Z, Kumaresan J. Neglected tropical diseases and HIV/AIDS. *Lancet* 2006; 368(9550):1865-6

Hunter T. Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012; 367(1602): 2513-6.

Husnjak K, Dikic I. Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem.* 2012; 81: 291-322.

Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol.* 2001; 31(9): 899-908.

Ishida M, Ishida T, Nakashima H, Miho N, Miyagawa K, Chayama K, Oshima T, Kambe M, Yoshizumi M. Mnk1 is required for angiotensin-II induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2003; 93(12): 1218-24.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005; 309 (5733): 436-42.

Jackson AP. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. *Mol Biol Evol* 2009; 27 (1): 33-45.

Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol Rev* 2010; 11 (2): 113-27.

Jager AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D'Orso I, Frasch AC. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104: 2035–2042.

Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B, Place AR. Diversity of eucariotic translational initiation factor eIF4E in protists. *Comp Funct Genomics*. 2012; 2012: 134839.

Jones RM, Branda J, Johnston KA, Polymenis M, Gadd M, Rustgi A, Callanan L., Schmidt EV. An essential E box in the promoter of the gene encoding the mRNA cap-binding protein (eukaryotic initiation factor 4E) is a target for activation by c-myc. *Mol Cell Biol* 1996; 16(9): 4754-64.

Jones A, Faldas A, Foucher A, Hunt E, Tait A, Wastling JM, Turner CM. Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form of *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 2006; 6, 259-267.

Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, Beach CM, Stepinski J, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at Ser-209. *J. Biol. Chem* 1995; 270: 14597–14603.

Joshi B, Cameron A, Jagus R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. *Eur J Biochem* 2004; 271: 2189-2203.

Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evol. Biol* 2005; 5, 48.

Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 2006; 22(9): 439-45.

Kato H, Gomez EA, Cáceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y. Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2010, 7, 814-826.

Keiper BD, Lamphear BJ, Deshpande M, Jankowska-Anyszka M, Aamodt EJ, Blumenthal T, Rhoads RE. Functional characterization of five eIF4E isoforms in

Caenorhabditis elegans. The Journal of biological chemistry 2000; 275: 10590–10596.

Kobow K, Blümcke I. The emerging role of DNA methylation in epileptogenesis. Epilepsia. 2012; 53 Suppl 9:11-20.

Kolev NG, Franklin JB, Carmi S, Shi H, Michaeli S, Tschudi C: The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. PLoS Pathog 2010; 6(9), pii: E1001090.

Kosako H, Nagano K. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase mediated signal transduction pathways. Expert. Rev. Proteomics 2011; 8(1):81-94.

Kramer S, Carrington M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. Trends Parasitol Rev 2011; 27 (1): 23-30.

Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. Molecular & Biochemical Parasitology 2012; 181: 61– 72.

Kramer S, Bannerman-Chukuaim B, Ellis L, Boulden EA, Kelly S, Field MC, Carrington M. Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. Plos one 2013; 8(1): e54004

Kuhn U, Wahle E. Structure and function of poly(A) binding proteins. Biochim. Biophys. Acta 2004; 1678, 67-84.

Kutuzov MA, Andreeva AV. Protein Ser/Thr phosphatases of parasitic protozoa. Mol Biochem Parasitol Rev 2008; 161 (2): 81-90.

Lachance PE, Miron M, Raught B, Sonenberg N, Lasko P. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. *Mol Cell Biol.* 2002 Mar;22(6):1656-63.

LeFebvre AK, Korneeva NL, Trutschl M, Cvek U, Duzan RD, Bradley CA, Hershey JW, Rhoads RE. Translation initiation factor eIF4G-1 binds to eIF3 through the eIF3e subunit. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 22917-22932.

Leitner A., Sturm M, Lindner W. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. *Anal Chim Acta.* 2011; 703(1): 19-30.

Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberté JF. Complex formation between potyvirus VPg and translational eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol.* 2000; 74(17): 7730–7737.

Li CH, Irmer H, Gudjonsdottir-Planck D, Freese S, Salm H, Haile S, Estevez AM, Clayton C. Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'->3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA* 2006; 12, 2171-2186.

Li L, Wang CC. Identification in the ancient protist *Giardia lamblia* of two eukaryotic translation initiation factor 4E homologues with distinctive functions. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(5): 948-59.

Liang XH, Haritan A, Uliel S, Michaeli S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot. Cell* 2003; 2, 830-840.

Libri D. Nuclear poly(A)-binding proteins and nuclear degradation: take the mRNA and run? *Mol Cell.* 2010; 37(1): 3-5.

Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC Jr. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science* 1994; 266: 653–656.

Lynch M, Chen L, Ravitz MJ, Mehtani S, Korenblat K, Pazin MJ, Schmidt EV. hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(15): 6436-53.

Linder P. Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol. Cell* 2003; 95: 157-167.

Linder P, Jankowsky E. From unwinding to clamping – The DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(8):505-16

Livingstone M, Atas E, Meller A, Sonenberg N. Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Phys Biol Rev* 2010; 7 (2): 021001.

Lloyd RE. Translational control by viral proteinases. *Virus Res Rev* 2006; 119 (1): 76-88.

Lomeli H, Vázquez M. Emerging roles of the SUMO pathway in development. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(24):4045-64.

Lorsch JR, Dever TE. Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. *The Journal of biological chemistry* 2010; (285): 21203–21207.

Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholová E, Haralambous C, Pratlong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania*

donovani complex with a revision of current taxonomy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 2007; 104, 9375-9380.

Mahalingam M, Cooper JA. Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation. Prog Mol Subcell Biol. 2001; 27: 132-42.

Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad. Saude Publica 24, 2941–2947.

Malvezzi, Amaranta Muniz. Identificação de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, p. 1-171, 2010.

Malys N, McCarthy JE. Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. Cell Mol Life Sci. 2011; 68(6): 991-1003.

Mansueto P, Vitale G, Di Lorenzo G, Rini GB, Mansueto S, Cillari E. Immunopathology of leishmaniasis: an update. Int J Immunopathol Pharmacol Rev 2007; 20 (3): 435-45.

Marcotrigiano J, Gingras A, Sonenberg N, Burley S. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. Cell 1997; 89: 951-961.

Marintchev A, Wagner G. eIF4G and CBP80 share a common origin and similar domain organization: implications for the structure and function of eIF4G. Biochemistry 2004; 44: 12265-12272.

Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G. Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 2009; 136, 447-460.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-De-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol Rev* 2010; 2010: 525241.

Martinez-Rojano H, Mancilla-Ramirez J, Quinnonez-Diaz L, Galindo-Sevilla N. Activity of Hidroxyurea against *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10): 3642-7

Mata J, Marguerat S, Bähler J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci Rev* 2005; 30 (9): 506-14.

Matsuo H, Li H, McGuire AM, Fletcher CM, Gingras AC, Sonenberg N, Wagner G. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat Struct Biol.* 1997; 4(9): 717-24.

Matthews KR, Tschudi C, Ullu E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev.* 1994; 15;8(4):491-501.

Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD, Browning KS. Evidence for variation in the optimal translation initiation complex: plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F differentially promote translation of mRNAs. *Plant Physiology* 2009; 150 (4): 1844–1854, 2009.

Mcconville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol Rev* 2007; 37 (10): 1047-51.

McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory pathways of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(1): 122-54.

McNicoll F, Müller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dubé M, Papadopoulou B. Distinct 3'unstranlated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem.* 2005; 280(42): 35238-46.

Merrick WC. Eukariotic protein synthesis: still a mystery. *J Biol Chem* 2010; 285(28): 21197-201.

Millington OR, Myburgh E, Mottram JC, Alexander J. Imaging of the host/parasite interplay in cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol* 2010; 126(3): 310-7

Milone J, Wilusz J, Bellofatto V. Identification of mRNA decapping activities and an ARE-regulated 3' to 5' exonuclease activity in trypanosome extracts. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(18):4040-50.

Minich WB, Balasta ML, Goss DJ, Rhoads RE. Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994; 91(16): 7668-72.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2.^a edição atualizada. 2010, Brasília – DF.

Murata T, Shimotohno K. Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukariotic translation initiation fator 4E. *J Biol Chem.* 2006 Jul 28;281(30):20788-800. Epub 2006 May 23.

Nakayasu ES, Gaynor MR, Sobreira TJ, Ross JA, Almeida IC. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. *Proteomics*. 2009 Jul;9(13):3489-506.

Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1754 (1-2): 151-9.

Neves D *Parasitologia Humana*. 11ª edição. Ed. Atheneu, 2011, São Paulo, 521p.

Nett IR, Martin DM, Miranda-Saavedra D, Lamont D, Barber JD, Mehlert A, Ferguson MA. The phosphoproteome of bloodstream form *Trypanosoma brucei*, causative agent of African sleeping sickness. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8,1527-1538.

Nie M, Xie Y, Loo JA, Courey AJ. Genetic and proteomic evidence of roles of *Drosophila* SUMO in cell cycle control Ras signaling and early pattern formation. *PLoS One*. 2009; 4(6): e5905.

Niedzwiecka A, Marcotrigiano J, Stepinski J, Jankowska-Anyszka M, Wyslouch-Cieszynska A, Dadlez M, Gingras AC, Mak P, Darzynkiewicz E, Sonenberg N, Burley SK, Stolarski R. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *J Mol Biol*. 2002; 319(3): 615-35.

Padmanabhan PK, Dumas C, Samant M, Rochette A, Simard MJ, Papadopoulou B. Novel Features of a PIWI-Like Protein Homolog in the Parasitic Protozoan *Leishmania*. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e52612.

Palenchar JB, Bellofatto V. Gene transcription in trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2006; 146, 135-141.

Park EH, Walker SE, Lee JM, Rothenburg S, Lorsch JR, Hinnebusch AG. Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1-PABP mRNPs in vivo. *EMBO J.* 2010; 30, 302-316.

Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11, 121-127.

Parsyab A, Svitkin Y, Shahbazian D, Gkogkas C, Lasko P, Merrick WC, Sonenberg N. mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12(4):235-45.

Pause A, Belsham GJ, Gingras G, Donzé AC, et al. Insulin-independent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature* 1994; v. 371, 762-767.

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* 2007; 39, 839-847.

Pereira, Mariana Marques Coutelo. 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*. Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, p. 1-119, 2008.

Pereira MM, Malvezzi AM, Nascimento LM, Lima TD, Alves VS, Palma ML, Freire ER, Moura DM, Reis CR, de Melo Neto OP. The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. *Mol Biochem Parasitol.* 2013; 190, 82-6.

Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: Structures, functions, mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* 2004; 29; 1695 (1-3): 55-72.

Preußner C, Jaé N, Bindereif A. mRNA splicing in trypanosomes. *Int J Med Microbiol.* **2012**; 302(4-5): 221-4.

Prevot D, Darlix JL, Ohlmann T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* 2003; 95, 141-156.

Ptushkina M, Berthelot K, von der Haar T, Geffers L, Warwicker J, McCarthy JE. A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. *Nucleic Acids Res.* 2001 Nov 15;29(22):4561-9.

Pyronnet S, Imataka H, Gingras AC, Fukunaga R, Hunter T, Sonenberg N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* 2000; 18, 270-279.

Reis, Christian Robson de Souza. Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator eIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major*. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. 152pp, 2009.

Respuela P, Ferella M, Rada-Iglesias A, Aslund L. Histone acetylation and methylation at sites initiating divergent polycistronic transcription in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2008, 283: 15884–15892.

Rhoads RE. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J. Biol. Chem.* 2009; 284, 16711-16715.

Richter JD, Sonenberg N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 2005; 433, 477-480.

Ruan JP, Ullu E, Tschudi C. Characterization of the *Trypanosoma brucei* cap hypermethylase Tgs1. *Mol Biochem Parasitol.* 2007; 155(1): 66-9.

Salotra P, Singh R. Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123(3): 295-310.

Sambrook, J. e Russel, D. Introduction to Preparation of Plasmids DNA by Alkaline Lysis with SDS. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* New York, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol 1, p.1.31-1.42, 2001.

Scheltema RA, Decuyper S, T'kindt R, Dujardin JC, Coombs GH, Breitling R. the potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomic era. *Parasitology.* 2010; 137(9): 1291-302.

Scheper GC, Proud CG. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* 2002; 269, 5350-5359.

Schmidt EV. The Role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene.* 2004; 23(18): 3217-21.

Schmidt GD, Roberts LS. *Foundations of Parasitology.* 8a edição. Published by McGraw-Hill. 2009. p.720

Shaw PJ, Ponmee N, Karoonuthaisiri N, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y. Characterization of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* eIF4E homologue and mRNA 5' cap status. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 155 (2): 146-55.

Sulamit M. Spliced leader RNA silencing (SLS) – a programmed cell death pathway in *Trypanosoma brucei* that induced upon ER stress. *Parasit Vectors* 2012; 5:107

Shuman,S. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3, 619–625.

Siegel TN, Hekstra DR, Kemp LE, Figueiredo LM, Lowell JE, et al. Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*. *Genes Dev* 2009, 23:1063–1076.

Singh S. New Developments in diagnosis of leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123(3): 311-30.

Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Owendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 161 (11): 6171-9.

Slepenkov SV, Darzynkiewicz E, Rhoads RE. Stopped-flow kinetic analysis of eIF4E and phosphorylated eIF4E binding to cap analogs and capped oligoribonucleotides: evidence for a one-step binding mechanism. *J Biol Chem.* 2006; 281(21): 14927-38.

Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37, 1173-1186.

Smith RW, Gray NK. Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem J.* 2010; 426(1): 1-12.

Sonenberg N. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. *Biochem. Cell Biol.* 2008; 86, 178-183.

Sonenberg N, Hinnebusch AG. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 2009; 136 (4): 731-45.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J. Clin. Invest* 2008; 118, 1301-1310.

Szöör B. Trypanosomatid protein phosphatases. *Mol Biochem Parasitol Rev* 2010; 173 (2): 53-63.

Thomas S, Green A, Sturm NR, Campbell DA, Myler PJ. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* 2009, 10:152.

Tomoo K, Shen X, Okabe K, Nozoe Y, Fukuhara S, Morino S, et al. Crystal structures of 7-methylguanosine 5'-triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P (3)-adenosine-5',5'-triphosphate (m(7)GpppA)- bound human full length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the Cterminal flexible region. *Biochem. J.* 2002; 262: 539–544.

Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R. 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.* 2004; 24(15): 6539-49.

Ulrich HD. Preface Ubiquitin, SUMO and the maintenance of genome stability. *DNA Repair (Amst).* 2009 Apr 5;8(4):429.

Ulrich HD. Ubiquitin, SUMO and phosphate: How a trio of posttranslational modifiers governs protein fate. *Mol Cell.* 2012 Aug 10;47(3):335-7.

Urbaniak MD, Martin DM, Ferguson MA. Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. *J Proteome Res*. 2013 May 3;12(5):2233-44.

Valásek LS. 'Ribozoomin' – Translational initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). *Curr Protein Pept Sci* 2012; 13(4):305-30.

Voigts-Hoffmann F, Klinge S, Ban N. Structural insights into eukaryotic ribosomes and the initiation of translation. *Curr Opin Struct Biol*. 2012 Dec;22(6):768-77.

Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJJR. Protein posttranslational modification: The chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005; 44 (45): 7342-72.

Wang X, Grumet R. Identification and characterization of proteins that interact with the carboxy terminus of poly(A)-binding protein and inhibit translation in vitro. *Plant Mol Biol* 2004; 54(1):85-98

Weinstein DC, Honore E, Hemmati-Brivanlou A. Epidermal induction and inhibition of neural fate by translation initiation factor 4AIII. *Development* 1997; 124, 4235-4242.

World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2010; 184p.

Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 2010; 428:133–145, doi:10.1042/BJ20100158.

Xu X, Vatsyayan J, Gao C, Bakkenist CJ, Hu J. Sumoylation of eIF4E activates mRNA translation. *EMBO Rep*. 2010; 11(4): 299-304.

Yanagiya A, Svitkin YV, Shibata S, Mikami S, Imataka H, Sonenberg N. Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Mol. Cell Biol.* 2009; 29, 1661-1669.

Yang XJ. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 2005; 24 (10): 1653-62.

Yángüez E, Nieto A. So similar, yet so diferente: selective translational of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Res.* 2011 Mar;156(1-2):1-12.

Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, Zeira Z, Keasar C, Orr-Dahan I, Jankowska-Anyszka M, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Shapira M. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 2004; 37, 3243-3253.

Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Stepinski J, Altmann M, Darzynkiewicz E, Shapira M. Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryot. Cell* 2006; 5, 1969-1979.

Yoffe Y, Leger M, Zinoviev A, Zuberek J, Darzynkiewicz E, Wagner G, Shapira M. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res* 2009; 37, 3243-3253.

You L, Nie J, Sun WJ, Zheng ZQ, Yang XJ. Lysine acetylation: enzymes, bromodomains and links to different diseases. *Essays Biochem.* 2012; 52: 1-12.

Zamudio JR, Mitra B, Zeiner GM, Feder M, Bujnicki JM, Sturm NR, Campbell DA. Complete cap4 formation is not required for viability in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* 2006 Jun;5(6):905-15.

Zamudio JR, Mitra B, Campbell DA, Sturm NR. Hypermethylated cap4 maximizes Trypanosoma brucei translation. Mol Microbiol. 2009 Jun;72(5):1100-10.

Zanchin NI, McCarthy JE. Characterization of the in vivo phosphorylation sites of the mRNA cap binding complex proteins eukaryotic initiation factor 4E and p20 in saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 1995; 3;270(44):26505-10.

Zhang Y, Yin H, Lu H. Recent progress in quantitative glycoproteomics. Glycoconj J. 2012; 29(5-6): 249-58.

Zhang X, Wen H, Shi X. Lysine methylation: beyond histones. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2012;44(1): 14-27.

Zhou H, Huang S. Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. Curr Protein Pept Sci. 2012; 12(1): 30-42.

Zick A, Onn I, Bezalel R, Margalit H, Shlomai J, Assigning functions to genes: identification of S-phase expressed genes in Leishmania major based on post-transcriptional control elements. Nucleic Acids Research 2005, 33 (13): 4235–4242.

Zinoviev A, Léger M, Wagner G, Shapira M. A novel 4E interacting protein in Leishmania is involved in stage-specific translation pathways. Nucleic acids research, 2011; 39 (19): 8404-15.

Zinoviev A, Manor S, Shapira M. Nutritional stress affects an atypical cap-binding protein in Leishmania. RNA Biol. 2012;9(12): 1450-60.

Zinoviev A, Shapira M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. Comp Funct Genomics 2012; 2012:813718.

9. PRODUÇÃO CIENTÍFICA NO PERÍODO DA TESE

1-Participação na formação de recursos humanos:

- Co-orientação da aluna do curso de Biomedicina **Janaína de Freitas Nascimento**, no período entre 2008-2010, que resultou no trabalho de conclusão de curso intitulado Análise da expressão e localização subcelular de dois homólogos ao fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei*.
- Co-orientação do aluno do curso de Biomedicina **Rômulo Murilo do Nascimento Moraes**, no período entre 2010-2012, que resultou no trabalho de conclusão de curso intitulado Avaliação do perfil de isoformas de homólogos do fator de iniciação da tradução EIF4E (EIF4E3 e EIF4E4) e da proteína de ligação à cauda poli-A (PABP1) em células de *Leishmania amazonensis* submetidas a estresse nutricional.

2 – Produção científica:

- Artigo submetido à Molecular and Biological Parasitology em 2013, “**THE EIF4E SUBUNITS OF TWO DISTINCT POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS ASSOCIATED TO DISTINCT GROWTH PHASES IN CULTURE**” como primeira autora.

3 – Participação em eventos científicos:

- I Jornada de Pós Graduação em Genética (2011). **Pereira MMC**, de Melo Neto OP. Identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Leishmania* sp.

- XXVIII Anual Meeting of the SBPz (Sociedade Brasileira de Protozoologia) (2012). **Pereira MMC**, Nascimento LM, Reis CRS, de Melo Neto OP. Selected *Leishmania* EIF4E and EIF4G homologues are differentially affected by phosphorylation events during growth in culture.
- II Jornada de Pós Graduação em Genética (2012). **Pereira MMC**, de Melo Neto OP. Identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Leishmania* sp.
- XIX Encontro de Genética do Nordeste (2012). **Pereira MMC**, de Melo Neto OP. Avaliação do perfil de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução EIF4E de *Leishmania* sp., em diferentes condições de crescimento.
- XIX Encontro de Genética do Nordeste (2012). Moraes RMN, **Pereira MMC**, de Melo Neto OP. Análise do padrão de expressão de dois homólogos do fator EIF4E e da PABP1 em células de *Leishmania amazonensis* submetidas a estresse nutricional.
- XVIII Semana de Biomedicina (2012). Moraes RMN, **Pereira MMC**, de Melo Neto OP. Avaliação do padrão de expressão dos fatores EIF4E e da PABP1 em células de *Leishmania amazonensis* submetidas a diferentes condições de crescimento.
- 5 WorldLeish (2013) **Pereira MMC**, Nascimento LM, de Melo Neto OP. A complex pattern of post-translation modifications acting upon a single eIF4E homologue from different *Leishmania* species.

4 – Participação em cursos:

- Extensão universitária em Proteção Radiológica (2009). Carga horária: 40h. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.