



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Kleison da Costa Merlo

Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação ao poli-
A (PABP) de *Leishmania infantum*

RECIFE

2018

Kleison da Costa Merlo

**Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação
ao poli-A (PABP) de *Leishmania infantum***

Tese apresentada ao curso de Doutorado
em Biociências e Biotecnologia em Saúde
do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadores: Dr. Christian Robson de Souza Reis

Dra. Tamara De' Carli da Costa Lima

RECIFE

2018

Catlogação na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- M565c Merlo, Kleison da Costa.
Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania infantum* / Kleison da Costa Merlo. - Recife: [s.n.], 2018.
130 p. : il. ; 30 cm
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto; coorientadores: Christian Robson de Souza Reis, Tamara De' Carli da Costa Lima.
1. Iniciação traducional da cadeia peptídica. 2. *Leishmania*. 3. Mutação - genética. 4. Proteínas de ligação a poli(A). 5. Sobrevivência celular. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Reis, Christian Robson de Souza. III. Lima, Tamara De' Carli da Costa. IV. Título.

CDU 616.993.161

Kleison da Costa Merlo

**Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação
ao poli-A (PABP) de *Leishmania infantum***

Tese apresentada ao curso de Doutorado
em Biociências e Biotecnologia em Saúde
do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do título
de Doutor em Ciências

Aprovada em: 28/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Orientador)

Depto. de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (Membro interno)

Depto. de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo (Membro interno)

Depto. de Entomologia, Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE

Dr. Tercilio Calsa Junior (Membro externo)

**Laboratório de Genômica e Proteômica em Plantas, Depto. de Genética -
CCB/UFPE**

Dra. Ana Maria Benko Iseppon (Membro externo)

**Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Depto. de Genética -
CCB/UFPE**

Dedico este trabalho a minha família e amigos, em especial a minha esposa Jamilka e ao meu grande herói e filho Davi.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto primeiramente por ter me acolhido em seu grupo, uma vez que eu não tinha experiência alguma dentro da biologia molecular. Tenho grande admiração por você e seu trabalho. Muito obrigado por ter partilhado de seu conhecimento com um curioso como eu e por todo auxílio prestado durante esses 5 anos.

Aos meus coorientadores Dra. Tamara De' Carli e Dr. Christian Reis. Sem o apoio e ajuda de vocês não teria conseguido atingir o final desta árdua, porém satisfatória etapa profissional que agora se encerra. Muito obrigado!

À minha esposa Jamilka. Você foi e é meu braço direito na vida e meu maior suporte. Sem você este caminho teria sido muito mais difícil ou até mesmo impossível. Obrigado por me aceitar em sua vida e por dividir comigo os bons e maus momentos que já enfrentamos e que ainda enfrentaremos. Obrigado pelo seu companheirismo, amizade, atenção e exemplo. Amo você!

Ao meu filho Davi, que mesmo tão pequeno e jovem já superou tantas dificuldades. Você me trouxe uma nova forma de enxergar o mundo e um amor que jamais pensei ser capaz de sentir. Você é meu maior exemplo de superação e determinação. Obrigado por ter surgido em minha vida.

Aos "Os Valdos" por todo conhecimento e diversão compartilhados. Como eu fui um doutorando IC, aprendi um pouco com cada um de vocês. Sendo assim, este trabalho tem um poquinho de cada um de vocês, em especial de Larissa, Gustavo, Artur, Diego e Camila, que foram, em alguns momentos, meus coorientadores postigos e me ajudaram em vários experimentos realizados.

Aos meus pais Valdemar e Lúcia, meus irmãos Leonice, Kleber, Kleiton e Kleicy e meus sobrinhos. Mesmo distantes fisicamente carrego cada um de vocês em minhas escolhas e ações.

À Dona Nalva pelo cuidado e carinho imenso que tem por Davi. Você realmente é um anjo que apareceu em nossas vidas.

À minha sogra Dona Madalena por todo tipo de apoio prestado durante todos estes anos.

Aos meus vizinhos do Bloco C pela animação diária e ajuda em geral. Em especial à Sabrina pelo preparo semanal dos bolos especiais para Davi e ao Mailton por toda ajuda nos consertos gerais e conhecimento repassado.

Aos meus poucos, mas verdadeiros amigos espalhados por todo Brasil.

Ao grupo liderado por Barbara Papadopoulou.

Aos colegas de departamento e a todos os funcionários do Instituto Aggeu Magalhães, que igualmente ajudaram em meu trabalho.

Aos professores que aceitaram participar de minha banca de defesa de tese.

Ao programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde por me propiciar uma qualificação profissional e acadêmica de excelência.

Ao Instituto Aggeu Magalhães por fornecer uma excelente infra-estrutura necessária para a realização desse trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Mar calmo nunca fez bom marinheiro”.

MERLO, K. C. Contribuições ao estudo do modo de ação de homólogos da proteína de ligação ao poli-A (PABP) de *Leishmania infantum*. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Resumo

Os tripanossomatídeos são protozoários patogênicos em humanos, animais e plantas e cujas espécies mais conhecidas pertencem aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Estes parasitas apresentam uma complexa regulação da expressão gênica controlada por eventos pós-transcricionais, muitos dos quais afetando o metabolismo dos seus mRNAs. A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP) é uma das principais proteínas de ligação à mRNAs em eucariotos e possui um papel crítico na tradução e em outros processos. Três homólogos de PABPs foram descritos em *Leishmania*, sendo que a PABP1 foi confirmada como estando ativa na tradução, enquanto que as PABPs 2 e 3 interagem entre si e parecem estar associadas a mRNAs distintos aos da PABP1, mas as funções específicas de cada homólogo ainda não são bem definidas. Este trabalho teve como objetivo investigar diferenças funcionais entre estes três homólogos em *Leishmania infantum*, definindo se são ou não essenciais para a sobrevivência celular e identificando motivos críticos para sua função. Primeiro, foram construídos cassetes para deleção dos genes das PABPs 2 e 3 seguido de sua transfecção no patógeno. Pudemos observar a essencialidade da PABP2 e a não essencialidade da PABP3, sendo que a PABP1 foi confirmada como essencial em estudos prévios. Mutantes das PABPs 1 e 2 foram então gerados por mutagênese sítio-dirigida, expressos em *L. infantum* e testados quanto a sua capacidade de complementar a função da proteína nativa após a deleção dupla dos genes endógenos. Podemos concluir que os motivos LMW e YGF são críticos para a função da PABP1, enquanto que dois outros motivos não equivalentes, RQN e TGM, parecem ser essenciais para a PABP2. Mutantes também foram gerados para a PABP3, bem como um mRNA repórter que se espera capaz de se associar especificamente às PABPs 2 e 3. Estes resultados demonstram que os três homólogos atuam de maneira diferenciada e geram ferramentas para novos estudos, mais avançados, sobre a função dessas proteínas.

Palavras-chave: Iniciação traducional da cadeia peptídica. *Leishmania*. Mutações - genética. Proteínas de ligação a poli(A). Sobrevivência celular.

MERLO, K. C. Contributions to the study of the mode of action of poly-A binding protein (PABP) homologues in *Leishmania infantum*. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.

Abstract

Trypanosomatids are pathogenic protozoan for humans, animals and plants, whose best known species belong to the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera. These parasites have a complex regulation of their gene expression which is controlled by post-transcriptional events, many of which affect the metabolism of their mRNAs. The poly-A binding protein (PABP) is one of the major mRNA binding proteins in eukaryotes and plays a critical role during translation and other processes. Three PABP homologues have been described in *Leishmania*, with PABP1 confirmed as being active in translation, whereas PABPs 2 and 3 interact with each other and appear to be associated with mRNAs other than PABP1. The specific functions of each homologue are still not well defined. This work aimed to investigate functional differences between these three homologues in *Leishmania infantum*, defining whether or not they are essential for cell survival and identifying critical motifs for their function. First, constructs were designed to delete both copies of the PABP 2 and 3 genes in the pathogen. We could observe the essentiality of PABP2 and the non-essentiality of PABP3, with PABP1 being confirmed as essential in previous studies. Mutants of PABP 1 and 2 were then generated by site-directed mutagenesis, expressed in *L. infantum* and tested for their ability to complement the native protein's function after double deletion of the endogenous genes. We concluded that the LMW and YGF motifs are critical for the PABP1 function, while two other non-equivalent motifs, RQN and TGM, appear to be essential for PABP2. Mutants have also been generated for PABP3 as well as a mRNA reporter that is expected to be able to specifically associate with PABPs 2 and 3. These results demonstrate that the three homologues act in a differentiated manner and generate tools for further, more advanced studies on the function of these proteins.

Keywords: Peptide chain initiation, translational. *Leishmania*. Mutation - genetics. Poly(A) - binding proteins. Cell survival.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferentes vetores das principais doenças causadas pelos tripanossomatídeos.....	21
Figura 2 - Mudanças morfológicas durante o ciclo de vida da <i>Leishmania major</i>	23
Figura 3 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.....	24
Figura 4 - Transcrição poliscistrônica nos tripanossomatídeos.....	27
Figura 5 - Representação dos complexos semelhantes ao eIF4F envolvidos na tradução em tripanossomatídeos.....	38
Figura 6 - Esquema geral da PABP em eucariotos.....	39
Figura 7 - Modelo do mecanismo de controle do comprimento da cauda poli-A.....	42
Figura 8 - Plasmídeo <i>pSP-BT1-YneoalR</i>	58
Figura 9 - Plasmídeo <i>pSP72-YHYG-atubIR</i>	59
Figura 10 - Aparato de transferência do <i>Southern-blot</i>	63
Figura 11 - Representação da PCR de fusão.....	67
Figura 12 - PCR de fusão das IRs do gene PABP2 e da região codificante do gene de resistência à higromicina.....	68
Figura 13 - Digestão com enzima de restrição <i>NotI</i> dos plasmídeos contendo os cassetes para realização das transfecções SKO e DKO das PABPs 2 e 3.....	69
Figura 14 - <i>Western-blot</i> realizado para avaliar a eficiência do SKO e DKO da PABP3 em <i>L. infantum</i>	70
Figura 15 - <i>Western-blot</i> realizado para avaliar possíveis mudanças no perfil de expressão da PABP1 após realização do SKO e DKO da PABP3 em <i>L. infantum</i>	71
Figura 16 - Estratégia de complementação empregada.....	73
Figura 17 - Representação da localização das mutações realizadas para a PABP1 de <i>L. infantum</i>	74
Figura 18 - <i>Western-blot</i> de clones contendo o mutante DKO + TP-SP/AAAAAA (mutante de desfosforilação) da PABP1.....	75

Figura 19 - Representação das PCRs de confirmação realizadas para PABP1.....	77
Figura 20 - Eletroforese das PCRs de confirmação para <i>L. infantum</i> selvagem e SKOs com e sem as complementações com as construções mutantes da PABP1.....	78
Figura 21 - Eletroforese das PCRs de confirmação para os DKOs da PABP1.....	79
Figura 22 - Representação do local de atuação da enzima de restrição <i>ClaI</i> para mutantes da PABP1.....	80
Figura 23 - <i>Southern-blot</i> empregado para análise das transfecções com mutantes da PABP1.....	81
Figura 24 - Alinhamento <i>ClustalW</i> comparando as sequências de tripanosomatídeos com homólogos de PABPs de humanos, leveduras e plantas.....	82
Figura 25 - Representação da localização das mutações realizadas para a PABP2 de <i>L. infantum</i>	83
Figura 26 - Representação do processo de mutagênese empregado.....	84
Figura 27 - PCRs para ampliações de <i>megaprimers</i> de mutantes da PABP2.....	85
Figura 28 - PCRs para amplificação final dos cassetes contendo os genes mutantes da PABP2.....	86
Figura 29 - Digestão dos mutantes contruídos para a PABP2 subclonados em <i>pSP-BT1-YneoalR</i>	87
Figura 30 - Representação do local de atuação das enzimas de restrição <i>SacI</i> e <i>PvuII</i> para mutantes da PABP2.....	88
Figura 31 - <i>Southern-blot</i> empregado para análise das transfecções com mutantes da PABP2 após digestão com <i>PvuII</i>	89
Figura 32 - <i>Southern-blot</i> empregado para análise das transfecções com mutantes da PABP2 após digestão com <i>SacI</i>	90
Figura 33 - Representação da localização das mutações realizadas para a PABP3 de <i>L. infantum</i>	91
Figura 34 - PCRs de amplificação dos <i>megaprimers</i> de mutantes da PABP3.....	92

Figura 35 - PCRs para amplificação final dos cassetes contendo os genes mutantes da PABP3.....	92
Figura 36 - Digestão dos mutantes contruídos para a PABP3 subclonados em <i>pSP-BT1-YneoalR</i>	93
Figura 37 - PCR de fusão das IRs dos genes <i>H2B1</i> e <i>H2B2</i> com a região codificante do gene <i>GFP</i>	95
Figura 38 - Células de <i>L. infantum</i> transfectadas com o gene repórter <i>H2B1/GFP</i> observadas em microscopia confocal.....	96
Figura 39 - <i>Western-blot</i> de extratos de células co-transfectadas com os plasmídeos contendo o gene repórter <i>H2B1/GFP (pSP72-YHYG-αtubIR)</i> e contendo as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA (<i>pSP-BT1-YneoalR</i>) reveladas com anti-HA.....	98
Figura 40 - <i>Western-blot</i> de extratos de células co-transfectadas com os plasmídeos contendo o gene repórter <i>H2B1/GFP (pSP72-YHYG-αtubIR)</i> e contendo as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA (<i>pSP-BT1-YneoalR</i>) reveladas com anti-GFP.....	99
Figura 41 - <i>Western-blot</i> de extratos de células selvagens transfectadas com plasmídeo <i>pSP-BT1-YneoalR</i> contendo as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA reveladas com anti-HA.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA	Alanina-alanina-alanina
ApE	<i>A plasmid editor</i>
BP	<i>Base pair</i> (par de base)
Cap	7-metil guanosina invertido
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (quinase dependente de ciclina)
CPSF	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i> (fator específico de clivagem e poliadenilação)
DKO	<i>Double knockout</i> (duplo nocaute)
eIF	<i>Eukaryotic initiation factors</i> (fator de iniciação de eucariotos)
eRF	<i>Eukaryotic translation termination factor</i> (fator de término de eucariotos)
FRS	Fenilalanina-arginina-serina
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> (proteína fluorescente verde)
HSK	Histidina-serina-lisina
IAK	Isoleucina-alanina-lisina
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IR	<i>Intergenic region</i> (região intergênica)
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i> (sítio de entrada interno do ribossomo)
LMW	Leucina-metionina-triptofano
MAP	<i>Mitogen activated protein</i> (proteína ativada por mitógeno)
MLLE	PABC ou domínio da região C-terminal das PABPs
mRNA	RNA mensageiro
NMD	<i>Nonsense-mediated decay</i> (decaimento mediado por mutação sem-sentido)
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
ORF	<i>Open reading frame</i> (região codificante do gene)
Pab1p	PABP1 de leveduras
PABP	<i>Poly-A binding protein</i> (proteína de ligação à cauda poli-A)
PABPN	<i>Nuclear poly-A binding protein</i> (proteína de ligação à cauda poli-A nuclear)
PAIP	<i>PABP-interacting proteins</i> (proteína de interação à PABP)
PAM	<i>PABP interaction motif</i> (motivo de interação à PABP)

PAN	<i>Poly-A nuclease</i> (poli-A nuclease)
PAP	<i>Poly-A polymerase</i> (poli-A polimerase)
PARN	<i>Poly-A ribonuclease</i> (poli-A ribonuclease)
<i>P-bodies</i>	<i>Processing bodies</i> (corpos de processamento)
RBP	<i>RNA binding proteins</i> (proteína de ligação ao RNA)
RNA	RNA ribossomal
RNAi	RNA de interferência
RNP	<i>Ribonucleoprotein</i> (Ribonucleoproteína)
RQN	Arginina-glutamina-asparagina
RRM	<i>RNA recognition motifs</i> (motivo de reconhecimento de RNA)
RYQ	Arginina-tirosina-glutamina
SFB	Soro fetal bovino
SIDER	<i>Short interspersed degenerated retroposons</i> (retrotransposons degenerados intercalados curtos)
SKO	<i>Single Knockout</i> (nocaute de cópia única)
SL	<i>Spliced leader</i> (mini-exon)
SLBP	<i>Stem-loop binding protein</i> (proteína de ligação à haste-e-volta)
SOE	<i>Splicing overlapping extension</i> (PCR de fusão)
SP	Serina-prolina
SSC	<i>Standard saline citrate</i> (citrato salino padrão)
SSR	<i>Strand switch regions</i> (região de troca de fita)
TGM	Treonina-glicina-metionina
TP	Treonina-prolina
tRNA	RNA transportador
TSS	<i>Transcription start site</i> (sítios de iniciação da transcrição)
UREs	<i>U-rich instability elements</i> (elementos de instabilidade ricos em uracila)
UTR	<i>Untranslated region</i> (região não-traduzida)
UV	<i>Ultraviolet</i> (luz ultravioleta)
WT	<i>Wild type</i> (tipo selvagem)
YAR	Tirosina-alanina-arginina
YGF	Tirosina-glicina-fenilalanina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Tripanossomatídeos.....	21
2.2 O gênero <i>Leishmania</i>	21
<u>2.2.1 Ciclo de vida</u>	22
<u>2.2.2 Epidemiologia</u>	24
2.3 Aspectos peculiares da biologia molecular dos tripanossomatídeos..	25
<u>2.3.1 Organização genômica dos tripanossomatídeos</u>	26
<u>2.3.2 Transcrição</u>	26
<u>2.3.3 Processamento dos pré-mRNAs policistrônicos: <i>trans-splicing</i> e poliadenilação</u>	28
2.4 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos.....	29
<u>2.4.1 Processamento diferencial de pré-mRNAs</u>	29
<u>2.4.2 Controle da exportação de mRNAs maduros</u>	30
<u>2.4.3 Regulação da estabilidade dos mRNAs</u>	30
2.5 Tradução.....	33
<u>2.5.1 Tradução nos tripanossomatídeos</u>	34
<u>2.5.2 Complexos eIF4F de tripanossomatídeos</u>	35
2.6 Proteína de ligação à cauda poli-A (PABP).....	38
<u>2.6.1 Estrutura das PABPs citoplasmáticas</u>	38
<u>2.6.2 Aspectos das funções das PABPs</u>	40
<u>2.6.2.1 Poliadenilação</u>	40
<u>2.6.2.2 Exportação nuclear</u>	42
<u>2.6.2.3 Iniciação da tradução</u>	43
<u>2.6.2.4 Terminação da tradução</u>	45
<u>2.6.2.5 Controle da estabilidade e degradação dos mRNAs</u>	45
<u>2.6.3 PABPs de tripanossomatídeos</u>	47
2.7 Histonas.....	48
<u>2.7.1 Controle da tradução de mRNAs de histonas</u>	49
3 JUSTIFICATIVA.....	51
4 OBJETIVOS.....	52

4.1 Geral.....	52
4.2 Específicos.....	52
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
5.1 Construção de cassetes das PABPs 2 e 3 para realização de nocautes gênicos.....	53
<u>5.1.1 Amplificação convencional por reação em cadeia da polimerase (PCR).....</u>	53
<u>5.1.2 PCR de fusão.....</u>	54
<u>5.1.3 Clonagem dos cassetes construídos.....</u>	55
5.2 Construção de mutantes das PABPs 1, 2 e 3 para avaliação de sua influência sobre a dinâmica celular.....	56
5.3 Construção de genes repórteres para avaliação <i>in vivo</i> da associação entre as PABPs 2 e 3 e seus mRNAs alvos.....	58
5.4 Superexpressão de proteínas selecionadas em linhagens de <i>L. infantum</i> geneticamente modificadas fusionadas ao epítipo HA.....	59
5.5 Cultivo celular e transfecção.....	60
5.6 Obtenção de extrato total e <i>Western-blot</i>	61
5.7 <i>Southern-blot</i>	62
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	65
7 RESULTADOS.....	66
7.1 Avaliação da necessidade das PABPs 2 e 3 para a viabilidade da <i>L. infantum</i> em cultura.....	66
<u>7.1.1 Construção de cassetes para realização de nocautes gênicos das PABPs 2 e 3.....</u>	66
<u>7.1.2 Transfecção e avaliação da viabilidade de <i>L. infantum</i> após deleção dos genes codificantes das PABPs 2 e 3.....</u>	69
7.2 Impacto da fosforilação da PABP1 na sua capacidade de complementar a deleção da proteína endógena.....	72
<u>7.2.1 Descrição do ensaio de complementação.....</u>	72
<u>7.2.2 Avaliação da expressão do mutante de fosforilação da PABP1 em células submetidas ao duplo nocaute do gene endógeno.....</u>	73

7.3 Avaliação do papel de motivos selecionados da PABP1 na manutenção da sua função biológica.....	75
<u>7.3.1 Descrição dos motivos mutagenizados.....</u>	75
<u>7.3.2 Avaliação da capacidade de mutantes da PABP1 de complementar a ausência do gene endógeno.....</u>	76
7.4 Avaliação do impacto de mutações sobre motivos selecionados da PABP2 na sua capacidade de complementar a deleção da proteína endógena.....	82
<u>7.4.1 Seleção das regiões mutagenizadas da PABP2.....</u>	82
<u>7.4.2 Geração dos mutantes no gene codificante da PABP2.....</u>	84
<u>7.4.3 Ensaios de complementação e avaliação dos mutantes da PABP2 quanto à funcionalidade da proteína.....</u>	87
7.5 Avaliação de mutações sobre motivos selecionados da PABP3 na sua expressão em <i>L. infantum</i>	90
<u>7.5.1 Seleção das regiões mutagenizadas da PABP3.....</u>	90
<u>7.5.2 Geração dos mutantes no gene codificante da PABP3.....</u>	91
<u>7.5.3 Transfecção e expressão dos mutantes da PABP3 em <i>L. infantum</i>..</u>	94
7.6 Avaliação da expressão de gene repórter regulado por sequências regulatórias de histonas e potencialmente associado às PABPs 2 e 3.....	94
<u>7.6.1 Construção de gene repórter da GFP flanqueado por regiões intergênicas de genes de histonas.....</u>	94
<u>7.6.2 Avaliação da expressão da GFP do gene repórter <i>H2B1/GFP</i> em curva de crescimento de <i>L. infantum</i>.....</u>	96
7.6.3 Geração de linhagens expressando homólogos de PABP fusionados a HA co-expressando ou não o gene repórter <i>H2B1/GFP</i>	97
8 DISCUSSÃO.....	101
8.1 Avaliação da essencialidade de homólogos da PABP de <i>L. infantum</i> .	101
8.2 Avaliação do papel da fosforilação na função da PABP1.....	103
8.3 Avaliação do impacto de mutantes de PABP1 e PABP2 na interação com poli-A.....	104
8.4 Impacto dos mutantes de PABP1 e PABP2 no entendimento da interação com homólogos de eIF4E e outros parceiros.....	105
8.5 Avaliação da expressão do mRNA repórter <i>H2B1/GFP</i>	108

9 CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	110
APÊNDICE A - LISTA DE PRIMERS.....	124
APÊNDICE B - ALINHAMENTO DAS PABPS.....	127
APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO.....	130

1 INTRODUÇÃO

Tripanossomatídeos são protozoários flagelados da Família Trypanosomatidae causadores de doenças em humanos, animais e plantas, cujos principais representantes são espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, destacando-se entre eles: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. Todas são transmitidas por insetos vetores e espécies de ambos os gêneros são responsáveis por enfermidades de importância médica e econômica, como a doença do sono, a doença de Chagas e as leishmanioses.

Os tripanossomatídeos estão entre os mais primitivos eucariotos, pois divergiram precocemente de outros eucariotos durante a evolução, sobrevivendo atualmente como parasitas obrigatórios destes. Nestes organismos os genes codificantes de proteínas estão agrupados em unidades transcricionais que são co-transcritas constitutivamente em pré-mRNAs policistrônicos, os quais, a partir do processo de *trans-splicing* e poliadenilação, dão origem aos mRNAs monocistrônicos que são traduzíveis. Essa forma peculiar de processamento do RNA gera múltiplos mRNAs que são diferencialmente regulados durante o desenvolvimento parasitário. Apresentam características únicas dentre os eucariotos, como mecanismos distintos associados à sua expressão gênica. O reduzido número de elementos promotores em tripanossomatídeos indica ainda que a regulação da transcrição pela RNA polimerase II nesses organismos seja reduzida ou inexistente, de tal forma que a expressão gênica é controlada por eventos pós-transcricionais, através do controle no processamento, estabilidade e tradução de mRNAs e no processamento e modificações pós-traducionais das proteínas.

A proteína de ligação à cauda poli-A (PABP - *Poly-A Binding Protein*) é uma das principais proteínas de ligação à mRNAs nos eucariotos, cujo papel vem sendo demonstrado como crítico para uma tradução eficiente e para o controle da estabilidade dos mRNAs. A interação entre a PABP e a cauda poli-A, presente na extremidade 3' dos mRNAs, intermedia boa parte das funções associadas à esta estrutura, tais como o processamento dos mRNAs precursores no núcleo, o transporte núcleo-citoplasmático, o controle de meia-vida e degradação dos mRNAs, o recrutamento dos mRNAs pela maquinaria de síntese proteica e a tradução propriamente dita. Na tradução, além de se ligar à cauda poli-A, a PABP promove ainda a interação entre ambas as extremidades 5' e 3' dos mRNAs, através da

ligação com fatores de iniciação da tradução (eIFs - *Eukaryotic Initiation Factors*) do complexo eIF4F e proteínas individuais ou outros complexos proteicos, que auxiliam na atividade ribossomal.

Em geral, em células unicelulares, um único homólogo de PABP é encontrado, de forma que a identificação de três homólogos em um mesmo protozoário constitui um fato único e que sugere uma divergência de funções nas diferentes proteínas. Nos tripanossomatídeos, dois homólogos de PABP (PABP1 e PABP2) foram identificados conservados nas suas diferentes espécies e um terceiro homólogo é encontrado em espécies de *Leishmania* (PABP3). Dados recentes demonstram que em *Leishmania* a PABP1 tem um papel ativo na tradução uma vez que se demonstrou sua associação com o complexo de iniciação da tradução do tipo eIF4F implicado no processo. Já as PABPs 2 e 3 interagem diretamente entre si e parecem estar associadas à populações de mRNAs distintos da PABP1, embora seu papel na tradução deste ainda não esteja claramente definido.

Tendo em vista que dados preliminares apontam para a PABP1 se associando à mRNAs distintos das PABPs 2 e 3 e tendo possivelmente um papel diferenciado na tradução e outros processos, este estudo buscou avançar no conhecimento sobre como os diferentes homólogos de PABP em *Leishmania* se diferenciam funcionalmente e podem afetar de diferentes maneiras a tradução ou não se seus mRNAs alvos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados pertencentes à Ordem Kinetoplastida que são capazes de parasitar vertebrados, invertebrados e plantas. São caracterizados pela presença de um flagelo único e uma única e longa mitocôndria contendo em sua base uma organela conhecida como cinetoplasto, que contem o DNA mitocondrial (SIMPSON; STEVENS; LUKES, 2006). Em sua maioria, estes organismos se multiplicam assexuadamente por fissão binária durante a qual não ocorre a dissolução da membrana nuclear e a condensação cromossômica (STUART *et al.*, 2008).

Apesar de esses protozoários possuírem uma organização genômica, estruturas celulares e processos biológicos semelhantes, apresentam diferenças morfológicas significantes em seu ciclo de vida, visto que habitam nichos biológicos diferentes e são transmitidos por diferentes insetos vetores (STUART *et al.*, 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Diferentes vetores das principais doenças causadas pelos tripanossomatídeos.



Fonte: (BARBEIRO, 2018; MOSCA TSÉ-TSÉ, 2018; MOSQUITO-PALHA, 2018).

Nota: A) Barbeiro (*T. cruzi*); B) Mosca Tsé-Tsé (*T. brucei*); C) Mosquito-palha (leishmanioses).

2.2 O gênero *Leishmania*

Dos gêneros da família Trypanosomatidae, dois se destacam por apresentarem importância médica ou veterinária: *Trypanosoma* e *Leishmania*. Dentro do gênero *Leishmania* existem mais de 20 espécies que são responsáveis pelo grupo de doenças denominadas leishmanioses, capazes de infectar e se multiplicar em vários hospedeiros mamíferos (STEVERDING, 2017).

Parasitas do gênero *Leishmania* apresentam dois subgêneros principais de acordo com a região do intestino do vetor onde se dá sua colonização e desenvolvimento. Parasitas do subgênero *Leishmania* (*Leishmania*) apresentam seu desenvolvimento na porção mediana e anterior do intestino, enquanto que do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) apresentam desenvolvimento na região posterior (BATES, 2007).

Esses parasitos apresentam um ciclo de vida digenético com duas formas vegetativas principais: a forma promastigota flagelada que é encontrada no trato alimentar do vetor invertebrado, onde cresce extracelularmente e se diferencia na forma metacíclica infectante não-replicativa e a forma amastigota aflagelada replicativa (obrigatoriamente intracelular), capaz de se multiplicar em vários hospedeiros vertebrados, infectando células da linhagem fagocítica (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; BESTEIRO *et al.*, 2007). Durante essa troca de microambientes, dentre os vetores (intestino) e hospedeiros (macrófagos), os parasitas são submetidos a diferenças no pH, temperatura e nutrientes. Sua sobrevivência só é possível graças a mudanças no seu perfil de expressão gênica, tornando estes parasitas capazes de sofrerem grandes alterações durante seu ciclo de vida, como na sua motilidade, forma e metabolismo (MANNAERT *et al.*, 2012).

Existe uma grande diversidade de formas clínicas que podem ser desencadeadas pela infecção por espécies de *Leishmania*, resultando nas várias formas de leishmaniose. Tais formas clínicas dependem principalmente das espécies infectantes com sintomas variando de lesões cutâneas de cura espontânea na leishmaniose cutânea (*L. major*/ *L. tropicall* *L. mexicana*), leishmaniose mucocutânea (causada principalmente por *L. braziliensis*), leishmaniose cutânea difusa (principalmente por *L. amazonensis*/ *L. guyanensis*/ *L. aethiopica*) e a forma mais grave e fatal quando não tratada da leishmaniose visceral ou Kala-azar (*L. donovani*/ *L. infantum*/ *L. chagasi*) (DESJEUX, 1996; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

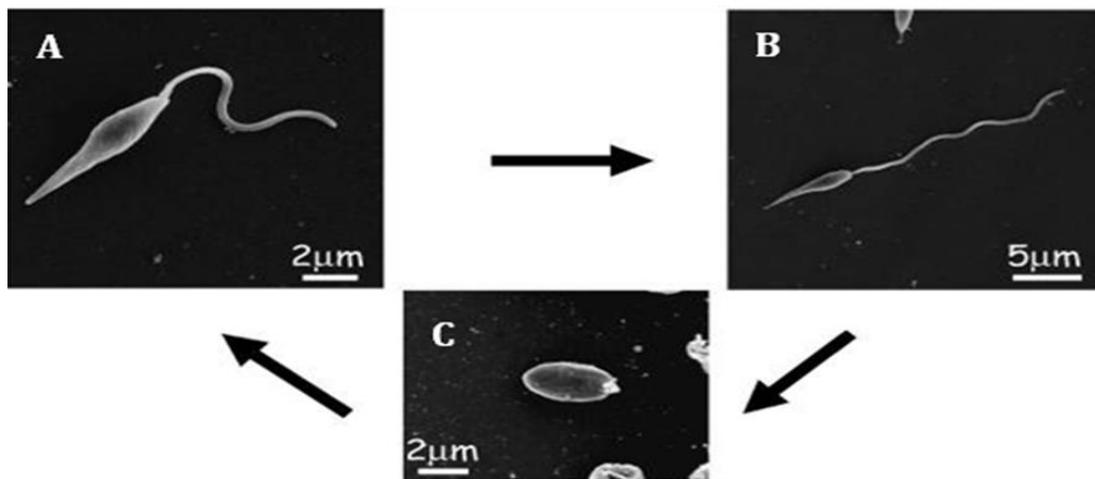
2.2.1 Ciclo de vida

A transmissão dos protozoários do gênero *Leishmania* se dá pela picada das fêmeas infectadas dos insetos vetores durante seu repasto sanguíneo. Esses vetores, insetos dípteros flebotomíneos, são classificados no gênero *Phlebotomus*,

no Velho Mundo, e *Lutzomya*, no Novo Mundo. As formas infectivas (promastigotas metacíclicas) são inoculadas principalmente em canídeos, lagomorfos, roedores e ocasionalmente no homem (DANTAS-TORRES, 2007). Na corrente sanguínea, o parasita sofre sua diferenciação para a forma amastigota após ser fagocitado pelos macrófagos. As amastigotas se multiplicam por fissão binária no interior dos macrófagos que podem então se romper, liberando assim amastigotas que se disseminam na corrente sanguínea e acabam por infectar novos macrófagos e tecidos (STUART *et al.*, 2008).

Eventualmente, fêmeas de flebotomíneos, ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados, acabam ingerindo amastigotas presentes no sangue (BATES, 2007). No intestino do inseto as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas e se multiplicam. Após alguns dias os parasitas começam a se replicar mais lentamente e se diferenciam nas formas infectivas (promastigotas metacíclicas), processo denominado metaciclogênese, completando assim seu ciclo biológico (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Mudanças morfológicas durante o ciclo de vida da *Leishmania major*.



Fonte: Modificado de Besteiro *et al.* (2007).

Nota: A) promastigota procíclica; B) promastigota metacíclica; C) amastigota. Imagens de células em microscopia eletrônica de varredura.

Figura 3 - Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

Fonte: Modificado de Organização Mundial da Saúde (2018).

Nota: As formas infectivas são inoculadas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo por insetos infectados. O parasita se diferencia em sua forma amastigota após ser fagocitado pelos macrófagos. As amastigotas se multiplicam no interior dos macrófagos que podem se romper, liberando amastigotas que se disseminam na corrente sanguínea e acabam por infectar novos macrófagos. Fêmeas de flebotomíneos acabam se infectando com formas amastigotas ao realizar o repasto sanguíneo em hospedeiros infectados. No intestino do inseto as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas e então na forma metacíclica, que é a forma infectiva.

2.2.2 Epidemiologia

Enquanto a doença do sono possui ocorrência na África Subariana e a doença de Chagas sendo prevalente na América Latina, as leishmanioses são encontradas nos cinco continentes em 98 países. Estima-se que 500.000 pessoas estejam infectadas por *T. brucei*, 10 milhões por *T. cruzi* e 12 milhões de pessoas estejam acometidas pelas diferentes formas de manifestação das leishmanioses, sendo estimado que 1,7 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco e que surjam dois milhões de novos casos anualmente (ALVAR, *et al.*, 2012; PIGOTT *et al.*, 2014; TEXEIRA *et al.*, 2012).

As leishmanioses se encontram largamente distribuídas nos trópicos e subtropicais se estendendo desde a América Central e do Sul até os países mediterrâneos, África, Ásia central, Índia e China. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2015), 87% das infecções de leishmaniose cutânea se desenvolvem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, Síria,

Tunísia e Iêmen, enquanto que 90% das infecções de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul.

2.3 Aspectos peculiares da biologia molecular dos tripanossomatídeos

Além da relevância médica, as peculiares características dos tripanossomatídeos os tornam modelos interessantes para estudos de evolução genômica e outros aspectos da função do genoma e mecanismos de controle de sua expressão. Estes apresentam uma série de aspectos moleculares não usuais em outros eucariotos (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). A precoce divergência evolutiva desses organismos resultou ainda em características bioquímicas não presentes nos eucariotos mais conhecidos, como enzimas relacionadas ao metabolismo antioxidante e de esteróis e biossíntese de glicosilfosfatidilinositol os quais tem se mostrado alvos de drogas promissoras (KOELLER; HEISE, 2011; OLIN-SANDOVAL; MORENO-SÁNCHEZ; SAAVEDRA, 2010).

Uma característica marcante dos tripanossomatídeos é a escassez de promotores para a RNA polimerase II e, conseqüentemente, o limitado controle transcricional nesses organismos (HORN, 2008). A praticamente ausência de transcrição de mRNAs dependente de promotores e a sua transcrição constitutiva e policistrônica enfatizam o papel do controle pós-transcricional da expressão gênica, uma vez que genes de uma mesma unidade policistrônica codificam para proteínas com funções distintas e não correlacionadas, além de serem expressas amplamente em diferentes níveis (CLAYTON, 2002). Assim o controle da regulação gênica se dá ao longo das etapas de *trans-splicing*, poliadenilação, degradação do mRNA dentro do núcleo, exportação a partir do núcleo, degradação no citosol e por outros processos ainda não conhecidos. A abundância de proteínas específicas também pode ser regulada por meio do início da tradução dos seus mRNAs e na etapa de alongação da cadeia polipeptídica (CLAYTON, 2014). Todas essas características fazem dos tripanossomatídeos uma fonte única de estudos relacionados à expressão gênica controlada por eventos pós-transcricionais (HORN, 2008).

2.3.1 Organização genômica dos tripanossomatídeos

Apesar das espécies *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* terem divergido entre si há cerca de 200 a 500 milhões de anos, e apesar da divergência no número e tamanho dos cromossomos, foi demonstrado pela comparação de seus genomas, alto nível de sintenia. De fato ocorre a conservação de 6200 genes, onde 94% desses genes estão arranjados em agrupamentos de sintenia direcional (GHEDIN *et al.*, 2004). A maioria dos genes espécie-específicos ocorrem em cromossomos não-sintênicos e consistem em membros de famílias de antígenos de superfície, RNAs estruturais e retroelementos (EL-SAYED *et al.*, 2005). É sugerido que o alto grau de conservação genômica entre os diferentes tripanossomatídeos seja devido a algum tipo de pressão seletiva que deva restringir o rearranjo dos genes, tais como a incidência relativamente baixa de recombinação sexual, a organização policistrônica ou a replicação (EL-SAYED *et al.*, 2005; GHEDIN *et al.*, 2004).

Apesar de notáveis diferenças na bioquímica, morfologia dos estágios de vida e doenças, estudos de comparação de expressão gênica revelou poucas diferenças na expressão quando foram comparados os níveis de mRNAs entre distintos estágios do ciclo de vida ou quando comparados o mesmo estágio em diferentes espécies de *Leishmania* (PEACOCK *et al.*, 2007). Comparando-se *L. infantum* e *L. major* observa-se que apenas 10 a 12% dos genes diferencialmente expressos são exclusivos de cada espécie (DEPLEDGE *et al.*, 2009).

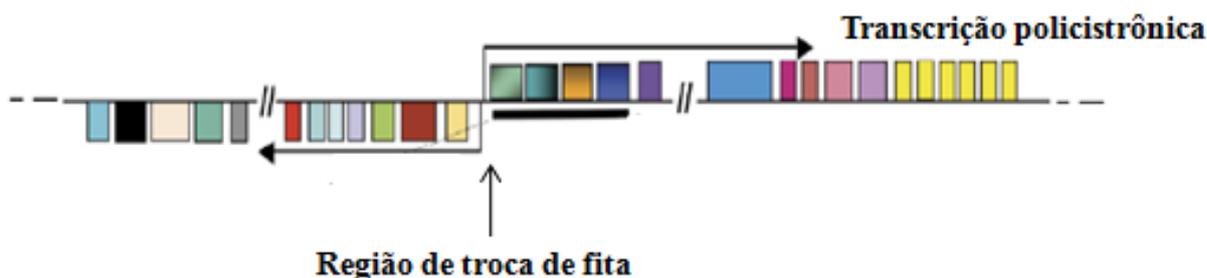
A publicação dos genomas dos tripanossomatídeos viabilizou e propiciou a criação de várias linhas de pesquisa dentro desse campo, permitindo assim uma melhor compreensão da biologia destes protozoários. Uma cuidadosa observação do padrão de expressão proteica e elucidação dos mecanismos regulatórios poderá revelar aspectos importantes da biologia destes parasitas, que conseqüentemente melhoraria a nossa compreensão sobre a infecção ao hospedeiro, além de favorecer a criação de eficazes estratégias no controle das leishmanioses (TEIXEIRA *et al.*, 2012).

2.3.2 Transcrição

A organização gênica dos tripanossomatídeos é reminiscente dos operons bacterianos, com os genes codificantes de proteínas densamente empacotados em

agrupamentos direcionados em uma fita e separados por regiões de troca de fitas ou *Strand Switch Regions* (SSRs). Estes agrupamentos são transcritos constitutivamente, a partir de promotores não definidos, em grandes precursores policistrônicos de mRNAs. Evidências experimentais sugerem que a transcrição se inicia bidirecionalmente entre dois agrupamentos de genes divergentes (SIEGEL *et al.*, 2009; WRIGHT; SIEGEL; CROSS, 2010) (Figura 4). Entretanto, esses genes transcritos constitutivamente e em conjunto não são funcionalmente relacionados, como no caso dos operons bacterianos, além dos mRNAs policistrônicos serem muito maiores (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; CLAYTON, 2002). Assim como em procariotos, os genes dos tripanossomatídeos em sua grande maioria não possuem íntrons, com apenas quatro exceções identificadas (IVENS *et al.*, 2005).

Figura 4 - Transcrição policistrônica nos tripanossomatídeos.



Fonte: Modificada de Haile e Papadopoulou (2007).

Nota: Blocos gênicos não relacionados estão agrupados em fitas distintas do DNA e são bidirecionalmente transcritos pela ação da RNA polimerase II. As setas horizontais demonstram o sentido da transcrição que ocorre em ambos os sentidos simultaneamente a partir da região de troca de fita indicada.

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

raros ou ausentes (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). Desta forma a RNA polimerase II inicia a transcrição a partir das SSR, progredindo através dos blocos gênicos gerando pré-mRNAs transcritos de forma policistrônica (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2003).

2.3.3 Processamento dos pré-mRNAs policistrônicos: *trans-splicing* e poliadenilação

De uma forma geral, nos pré-mRNAs de eucariotos o processamento se dá por um mecanismo denominado *cis-splicing*, onde as sequencias não codificantes, denominadas íntrons, são removidas. Como os mRNAs precursores de tripanossomatídeos não possuem íntrons, praticamente não ocorre *cis-splicing* e se faz necessário a ocorrência de outra forma de processamento. Para se tornarem mRNAs monocistrônicos maduros, todos os pré-mRNAs sofrem um processamento atrelado à transcrição, o *trans-splicing*, que ocorre de forma simultânea com a adição da cauda de poli-adenosinas, a cauda poli-A, durante a poliadenilação (CLAYTON, 2002).

Tanto o *trans-splicing* como a poliadenilação são processos conectados e o modo que isso se desenvolve ainda não é totalmente compreendido (CLAYTON, 2002). No mecanismo de *trans-splicing*, que ocorre ainda no núcleo, uma sequência de 39 nucleotídeos conhecida como mini-exon ou *spliced leader* (SL) é adicionada à extremidade 5' de todos os mRNAs maduros (LIANG *et al.*, 2003; PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006). Esta sequência é capaz de assumir uma estrutura em forma de grampo conservada e se caracteriza por possuir na sua extremidade 5' o radical 7-metil guanosina invertido (*cap*), típico dos mRNAs eucarióticos, adicionado de outros 4 nucleotídeos modificados, caracterizando o chamado *cap4*, descrito apenas nos tripanossomatídeos (ULLU; TSCHUDI, 1995). O gene do RNA SL contém o único promotor de RNA polimerase II conhecido (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). O processo de *trans-splicing* está acoplado com a poliadenilação, de forma que a adição da sequência SL à extremidade 5' de uma determinada região codificante ou ORF (*Open Reading Frame*) ocorre quase que simultaneamente com a adição da cauda poli-A na extremidade 3' da ORF anterior (ULLU; MATTHEWS; TSCHUDI, 1993). A seleção do sítio de poliadenilação é determinada principalmente pela presença de uma sequência de polipirimidinas nas regiões intergênicas (IR -

Intergenic Region), e ainda, pela presença de um sítio acceptor de *splicing* ativo entre 200 e 500 nucleotídeos depois desta (LIANG *et al.*, 2003; REQUENA, 2011).

2.4 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos possuem estratégias de adaptação específicas aos diferentes vetores e hospedeiros que afetam, precisando para isso sofrer alterações drásticas durante todo seu ciclo de vida. Não é de se estranhar então que possuam tecidos-alvo próprios em variados organismos, causando diferentes patologias. Isso só se faz possível pelas variações de sequências proteicas dentre seus ortólogos, pelas regiões não sintênicas de seus respectivos genomas e/ou por mudanças no seu padrão de expressão gênica que é altamente regulada (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

O controle do início da transcrição desempenha um papel central no controle da expressão gênica na grande maioria dos seres vivos. Entretanto, como já mencionado, tripanossomatídeos carecem de promotores clássicos para a RNA polimerase II, de tal forma que o controle nesse nível é basicamente nulo e a regulação se dá em sua quase totalidade pós-transcricionalmente. Podemos citar como formas principais de controle da regulação nesses protozoários o processamento diferencial dos mRNAs policistrônicos, o controle de exportação dos mRNAs maduros, a regulação da estabilidade dos mRNAs, o controle da tradução e modificações nas proteínas.

2.4.1 Processamento diferencial de pré-mRNAs

Como o *trans-splicing* e a poliadenilação são processos acoplados e também pelo fato dos genes co-transcritos não serem funcionalmente relacionados, a ideia de que haja regulação através do processamento dos pré-mRNAs é improvável. De fato são bem raros os exemplos de genes regulados a este nível (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Um mecanismo mais geral de controle da expressão gênica ligado ao *trans-splicing*, contudo, diz respeito ao controle da transcrição do gene codificante do SL-RNA. Esta é a molécula responsável pela doação do mini-éxon contendo o *cap4* e adicionado a região 5' de mRNAs maduros no *trans-splicing*. O gene do RNA SL contém o único promotor de RNA polimerase II

conhecido de tripanossomatídeos (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003). Foi demonstrado em *T. brucei* que sob condições de estresse por mudanças de pH ou por sua depleção via RNA de interferência (RNAi) a transcrição do gene SL-RNA é silenciada, levando a um decréscimo no *splicing* e diminuição dos níveis de vários mRNAs analisados (LUSTIG *et al.*, 2007). Este fenômeno demonstra que o silenciamento do SL-RNA pode ser crucial durante a diferenciação estágio-específica dos parasitas, visto que tais mudanças são inicialmente estressantes aos parasitas (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

2.4.2 Controle da exportação de mRNAs maduros

Os mRNAs maduros de tripanossomatídeos, assim como de eucariotos superiores, necessitam ser exportados para o citoplasma a fim de serem traduzidos. Sendo assim, a regulação a esse nível é claramente possível nestes parasitas (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

Pouca informação sobre a exportação de mRNAs em tripanossomatídeos está disponível. Em eucariotos superiores o *cap* do mRNA é ligado a um complexo nuclear de ligação ao *cap*, CBP80/20 antes de ser exportado. Em *T. brucei* já foi demonstrado que o mRNA processado é reconhecido por um complexo de ligação ao *cap* constituído de cinco proteínas, sendo uma delas homóloga à CBP20 (LI; TSCHUDI, 2005). Foi demonstrado recentemente que o ortólogo do gene de decaimento mediado por mutação sem-sentido NMD3 (*Nonsense-mediated Decay*) de *T. brucei* está envolvido não só no processamento e exportação de rRNA, como também na exportação de mRNAs (BÜHLMANN *et al.*, 2015).

2.4.3 Regulação da estabilidade dos mRNAs

Chegando ao citoplasma, os mRNAs maduros se associam a diferentes proteínas para distintas finalidades, tais como: transporte intracelular, armazenamento, degradação e tradução (REQUENA, 2011). A degradação dos mRNAs de eucariotos é geralmente iniciada pela deadenilação. Existem duas vias principais: uma onde a deadenilação, remoção da cauda poli-A, estimula a remoção do *cap*, o decapeamento, com subsequente degradação dos mRNAs via 5'-exonucleases. Na outra via a deadenilação leva a degradação via 3'-exonuclease,

que ocorre num complexo chamado exossomo. Essas vias, bem como todas principais proteínas envolvidas, com exceção das enzimas de decapeamento, foram identificadas em tripanossomatídeos (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

Duas vias de degradação de mRNAs são também encontradas em tripanossomatídeos (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). A primeira via apresenta regulação, é rápida e parece ser independente da deadenilação. Ocorre em mRNAs instáveis estágio-específicos e sua regulação parece envolver mecanismos específicos aos parasitas. A segunda via é constitutiva e dependente da deadenilação, operando mais lentamente sobre a degradação de mRNAs estáveis e provavelmente sobre uma subpopulação de mRNAs instáveis (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

Nos mRNAs maduros são encontradas regiões regulatórias, em sua maioria localizadas nas regiões não-traduzidas (UTRs - *Untranslated Regions*) 5' e 3', que apresentam interações específicas com diversas proteínas de ligação ao RNA (RBPs - *RNA binding proteins*), consideradas elementos *trans* (REQUENA, 2011). Essas regiões ou motivos são conhecidos como elementos-*cis* e estão envolvidos com diversas etapas do metabolismo dos mRNAs, seja em seu transporte, destinação intracelular ou em sua eficácia de tradução (KEENE, 2007).

Na maioria dos casos, a regulação estágio-específica em tripanossomatídeos é mediada pelas UTRs localizadas na porção 3' dos mRNAs (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Essa observação se torna mais pertinente pela constatação de que as UTRs dos tripanossomatídeos, principalmente as 3', são mais longas que as da maioria dos demais eucariotos (STILES *et al.*, 1999). De fato, a estabilização e degradação dos mRNAs é dependentes de fatores proteicos que reconhecem motivos encontrados em sua maioria nas porções 3' (MATA; MARGUERAT; BAHLER, 2005). Vários trabalhos têm demonstrado esses achados em *Leishmania* (MURRAY *et al.*, 2007; MYUNG *et al.*, 2002; ROCHETTE *et al.*, 2005; ZILKA *et al.*, 2001).

Alguns elementos *cis* estão diretamente relacionados à regulação de mRNAs durante as diferentes fases do desenvolvimento parasitário. Elementos de instabilidade ricos em uracila (UREs - *U-rich Instability Elements*) foram identificados nas UTRs 3' de mRNAs de *T. brucei*. Tais elementos são responsáveis pela regulação de transcritos durante o desenvolvimento parasitário, sendo estes estáveis durante a forma procíclica e instáveis na forma sanguínea (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

Recentemente foram descobertos, inicialmente em *L. major* (BRINGAUD *et al.*, 2007) e posteriormente em outras espécies de *Leishmania*, elementos conhecidos como SIDERs (*Short Interspersed Degenerated Retroposons*) que são sequências de DNA derivadas de extintos retrotransposons. Estes elementos são encontrados de maneira uniformemente dispersa nos genomas de espécies de *Leishmania* (REQUENA *et al.*, 2008; SMITH; BRINGAUD; PAPADOPOULOU, 2009) e apresentam semelhanças com retrotransposons com curtas repetições terminais (*Non-long Terminal Repeat Retroposons* ou *non-LTR Retroposons*) encontrados nos tripanossomatídeos em geral. Entretanto, os SIDERs são todos extintos e muito mais abundantes (70 vezes mais) e localizados preferencialmente nas UTRs 3' (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007), existindo duas subfamílias desses elementos. Os elementos SIDER1 parecem estar relacionados com o aumento da estabilidade dos mRNAs onde estão presentes (ROCHETTE *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2000), enquanto que a presença dos elementos SIDER2 está correlacionada com o decréscimo na estabilidade dos transcritos (BRINGAUD *et al.*, 2007). A presença dos SIDERs em espécies de *Leishmania* tem sido associada à complexa regulação pós-transcricional nestes organismos (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

Estruturas semelhantes a corpos de processamento ou *P-bodies* (*Processing Bodies*) estão presentes em tripanossomatídeos, contudo apresentam diferenças dos demais eucariotos e são pouco estudados (HOLETZ *et al.*, 2007). *P-bodies* e grânulos de estresse são compartimentalizações presentes no citoplasma de mamíferos onde mRNAs que não são traduzidos ou degradados são encaminhados (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Os *P-bodies* estão envolvidos com a degradação dos mRNAs, enquanto que nos grânulos os mRNAs podem se manter estocados/silenciados ou alternativamente serem encaminhados para a degradação ou então para a tradução (BALAGOPAL; PARKER, 2009).

A respeito da existência dos diferentes tipos de regulação citados atuando sobre os níveis de mRNAs, estudos de expressão gênica demonstram que somente 0,2 a 5% dos genes têm seus mRNAs diferencialmente expressos entre as fases promastigota e amastigota de *Leishmania*. Já a análise proteômica revela que mais de 18% das proteínas são diferencialmente expressas entre os diferentes estágios do ciclo de vida. Portanto, sugere-se que em *Leishmania* e outros tripanossomatídeos a regulação da expressão gênica atuando ao nível do mRNA

não seja tão relevante quanto a regulação da sua tradução em proteínas (COHEN-FREUE *et al.*, 2007; LEIFSO *et al.*, 2007; ROSENZWEIG *et al.*, 2008).

2.5 Tradução

A tradução ou síntese de proteínas é um processo imprescindível e inerente a todos os seres vivos, onde a informação genética transcrita do DNA, na forma de mRNAs, é traduzida em sequências de aminoácidos formando assim as proteínas. Uma complexa maquinaria é necessária para a ocorrência deste processo, composta pelo mRNA, RNAs transportadores, ribossomos e diversos fatores de tradução. A tradução pode ser subdividida em quatro etapas principais: iniciação da tradução, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos (MARINTCHEV; WAGNER, 2004).

O controle da expressão gênica durante a tradução é responsável por mudanças rápidas, reversíveis e espaciais nas concentrações celulares das proteínas (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010) e se faz presente em eventos celulares tais como crescimento, proliferação e desenvolvimento (GINGRAS *et al.*, 1999). A tradução pode ser regulada durante a iniciação, alongamento e terminação, entretanto, é principalmente durante sua iniciação que a regulação acontece, visto que é a etapa mais complexa do processo e a mais divergente entre os organismos vivos (ACKER; LORSCH, 2008). É durante a iniciação que ocorre a montagem do ribossomo, reconhecimento do mRNA maduro e identificação do códon AUG de iniciação da tradução (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010). Para que todo esse processo inicial ocorra perfeitamente se faz necessária a participação de pelo menos 12 eIFs, proteínas individuais ou complexos proteicos, muitos dos quais são conhecidos alvos de vias regulatórias (HINNEBUSCH; LORSCH, 2012).

Durante a iniciação da tradução eucariótica ocorre a montagem dos ribossomos 80S juntos aos mRNAs, nos quais o codon de iniciação sofre pareamento com o tRNA inicial no sítio P. Isso abrange duas etapas: 1) a formação do complexo de iniciação 48S que estabelece o pareamento codon-anticodon no sítio P da subunidade ribossomal 40S e; 2) junção do complexo 48S com a subunidade 60S. Na maioria dos mRNAs, o complexo 48S se forma por um mecanismo de escaneamento onde o complexo de pré-iniciação 43S se liga à região

proximal do *cap* presente na extremidade 5' do mRNA em uma etapa que envolve o desenovelamento da estrutura secundária 5' terminal do mRNA pelo eIF4A, eIF4B e eIF4F. O complexo 43S por sua vez compreende a subunidade 40S, o complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNAMet_i (eIF2-TC), eIF3, eIF1, eIF1A e possivelmente o eIF5. Após a sua associação ao mRNA, o complexo 43S então desliza sobre a UTR 5' no sentido 5' --> 3' até identificar o codón AUG. Após o reconhecimento deste, forma-se o complexo 48S, os fatores eIF5 e eIF5B promovem a hidrólise do GTP ligado ao eIF2, o desacoplamento dos eIFs e a junção com a subunidade 60S. Apesar de a maioria dos mRNAs sofrerem o mecanismo de escaneamento, alguns tem sua iniciação mediada por IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010).

2.5.1 Tradução nos tripanossomatídeos

O processo de iniciação da tradução é muito mais complexo do que foi descrito acima, com muitos fatores exercendo funções específicas em cada uma das etapas, sendo esse conhecimento proveniente principalmente de estudos realizados em eucariotos modelos mais conhecidos, como mamíferos, plantas e leveduras. Em tripanossomatídeos o conhecimento sobre função e caracterização dos fatores de iniciação são mais preliminares, apesar de terem avançado substancialmente a partir do sequenciamento dos principais genomas desse grupo de organismos, pois viabilizou a identificação inicial de vários fatores e seu posterior estudo. Ainda assim, no início desses estudos o conhecimento sobre a tradução era inferido indiretamente comparando as sequências de fatores de tradução com homólogos de eucariotos superiores (DE MELO NETO *et al.*, 2016).

Em *L. major*, *T. cruzi* e *T. brucei*, as três espécies de tripanossomatídeos mais bem estudadas, um dos focos principais nos estudos de fatores de tradução tem sido o complexo eIF4F, o principal responsável pelo reconhecimento dos mRNAs e seu direcionamento para a tradução. Nestes organismos foram identificadas sequências homólogas às diferentes subunidades do complexo eIF4F, que vem sendo estudadas nos últimos anos com impacto direto no conhecimento do processo de iniciação da tradução, como descrito a seguir. Apesar de possuírem diferentes graus de similaridade, estas sequências apresentam semelhanças entre as espécies de tripanosomatídeos, o que indica que elas devem ser conservadas e

desempenhem papéis importantes nestes parasitas (DHALLIA *et al.*, 2005; DE MELO NETO *et al.*, 2016).

2.5.2 Complexos eIF4F de tripanossomatídeos

Em tripanossomatídeos a tradução parece ser mediada por diferentes complexos semelhantes ao eIF4F igualmente ao observado em vários outros grupos de eucariotos. Esses complexos parecem possuir um importante papel durante a adaptação desses parasitas aos seus diferentes hospedeiros (FREIRE *et al.*, 2017). Assim, foi observada a ocorrência em tripanosomatídeos de múltiplos homólogos para as subunidades eIF4E (seis homólogos - EIF4E1, EIF4E2, EIF4E3, EIF4E4, EIF4E5 e EIF4E6) e eIF4G (cinco homólogos - EIF4G1, EIF4G2, EIF4G3, EIF4G4 e EIF4G5) do complexo, além de dois homólogos de eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII). Todos esses homólogos são conservados em diferentes espécies destes organismos e foi observado que são capazes de formarem distintos complexos semelhantes ao eIF4F. Esta multiplicidade de homólogos de eIF4E e eIF4G, contudo, não é encontrada em outros organismos unicelulares, bem como não é observada para outros homólogos de fatores de iniciação da tradução nos tripanosomatídeos. A existência de diversos homólogos aos eIFs nestes organismos reflete a complexidade do processo de tradução nos mesmos e levanta a hipótese de que os complexos por eles formados possuam um papel diferencial na tradução (DE MELO NETO *et al.*, 2016; FREIRE *et al.*, 2017).

O primeiro complexo eIF4F descrito em tripanossomatídeos usou como modelo *L. major* e a partir de experimentos de co-precipitação confirmou que o LmEIF4E4 e o LmEIF4G3 eram parceiros verdadeiros (YOFFE *et al.*, 2009). Mais tarde através de espectrometria de massas analisando LmEIF4E4 purificado de lisados de *L. major* confirmou a ocorrência *in vivo* do complexo LmEIF4E4/LmEIF4G3/LmEIF4AI e sua associação às PABPs 1 e 2, outros eIFs e proteínas ribossômicas, reforçando que esses fatores façam parte de um complexo de iniciação funcional (ZINOVIEV *et al.*, 2011). A interação entre EIF4E4 e EIF4G3 também foi confirmada em *T. brucei* através de *pull-downs* e imunoprecipitação, onde o TbEIF4E4 co-precipitou juntamente aos fatores TbEIF4G3 e TbEIF4AI (FREIRE *et al.*, 2011). Nesse mesmo trabalho foi descrito um segundo complexo eIF4F através da identificação do TbEIF4G4 como sendo um parceiro funcional do

TbEIF4E3, ambos capazes de co-precipitar com TbEIF4AI (FREIRE *et al.*, 2011). As interações EIF4E4-EIF4G3 e EIF4E3-EIF4G4 foram também confirmadas por Moura *et al.* (2015), bem como foram definidos os motivos de ligação dentre esses fatores. Acredita-se que o complexo eIF4F baseado na interação EIF4E3-EIF4G4 também esteja relacionado com a iniciação da tradução em tripanossomatídeos.

Existem outros complexos semelhantes ao eIF4F encontrados em tripanossomatídeos. Estes são formados pelos outros homólogos de eIF4G e eIF4E, como os EIF4E5 e EIF4E6 e os EIF4G1, EIF4G2 e EIF4G5, capazes de se associar especificamente em diferentes combinações em complexos semelhantes ao eIF4F, porém que não parecem estar envolvidos na tradução geral (FREIRE *et al.*, 2014a; 2014b). Já os fatores EIF4E1 e EIF4E2 são incapazes de formar complexos eIF4F, portanto não requeridos para a tradução em geral (DE MELO NETO *et al.*, 2016).

Uma série de estudos tem demonstrado que os fatores EIF4E4 e EIF4E3 e seus respectivos parceiros EIF4G3 e EIF4G4, bem como o EIF4A1 estão associados diretamente com tradução. Entretanto, o complexo eIF4F formado pela interação EIF4E4-EIF4G3 parece ter um papel mais central. Em *L. major* foi demonstrado a presença do LmEIF4E4 e LmEIF4E3 em polissomos (YOFFE *et al.*, 2006; YOFFE *et al.*, 2009). Foi observada também a interação do LmEIF4G3 diretamente ao complex eIF3, reforçando o papel do complexo LmEIF4E4-LmEIF4G3-LmEIF4AI-LmPABP1 na iniciação da tradução (LI *et al.*, 2017; MELEPPATTU *et al.*, 2015; REZENDE *et al.*, 2014). Em *T. brucei* tanto o TbEIF4E3 quanto o TbEIF4E4 e seus respectivos parceiros, além do TbEIF4AI, foram detectados livres e ligados aos polissomos, com o TbEIF4E4 mais abundante na fração polissômica (KLEIN *et al.*, 2015). Em *T. brucei* o EIF4G4 não parece ter um papel tão relevante na iniciação da tradução, visto que seu *knockdown* parece não ter impacto na síntese proteica. Entretanto, a ocorrência de alterações morfológicas e a perda da viabilidade celular após sua depleção e suas similaridades em sequência e estrutura com o EIF4G3, indicam sua participação como essencial para a sobrevivência das células. Já a depleção do EIF4G3 causou uma rápida redução da tradução total, indicando um papel central na iniciação da tradução (MOURA *et al.*, 2015). Em ensaios semelhantes, a depleção do TbEIF4E3 causou a morte celular de formas procíclicas e sanguíneas em *T. brucei*, com um aparente impacto na tradução nas formas procíclicas. Em contraste, a depleção do TbEIF4E4 causou a morte celular apenas nas formas sanguíneas, enquanto que a depleção simultânea do TbEIF4E4 e TbEIF4E1 induziu à uma quase

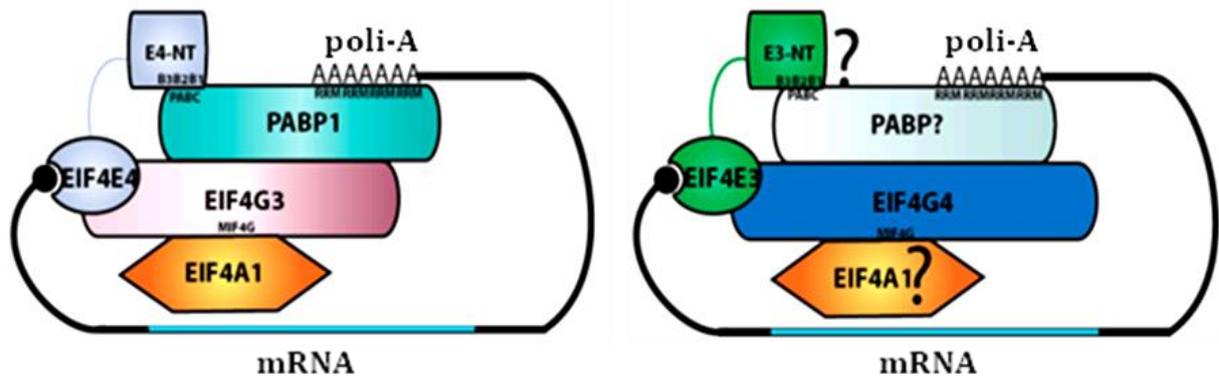
total parada da síntese e crescimento sem a morte celular (FREIRE *et al.*, 2011). Apesar da falta de efeitos ocasionados pela depleção via RNAi em formas procíclicas de *T. brucei*, em *L. infantum* o gene *EIF4E4* não pode ser deletado, pois o mesmo se mostra essencial para a viabilidade celular (DE MELO NETO *et al.*, 2015).

Os fatores EIF4E3 e EIF4E4 são alvos de múltiplos eventos de fosforilação em espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*. Tais eventos são direcionados principalmente à região N-terminal dessas proteínas (DE MELO NETO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2013; URBANIAK; MARTIN; FERGUSON, 2013). Ambos os fatores são expressos constitutivamente em diferentes estágios de crescimento dos parasitas, mas apresentam um padrão distinto em termos de fosforilação quando as fases exponencial e estacionária de crescimento em cultura são comparadas. Em *L. major* o LmEIF4E3 demonstra sua fosforilação preferencialmente durante a fase inicial de passagem e durante a fase estacionária, enquanto que o LmEIF4E4 tem sua fosforilação predominantemente durante a fase exponencial de crescimento, coincidindo com a fase ativa da síntese proteica. Resultados semelhantes aos encontrados em *T. brucei* para o TbEIF4E4, mas não para o TbEIF4E3 (PEREIRA *et al.*, 2013). Esse padrão de fosforilação também foi observado em *L. infantum*, onde o LiEIF4E4 fosforilado esteve presente durante a fase ativa de crescimento em promastigotas e amastigotas diferenciadas. Nesse mesmo estudo foi observada a ocorrência da defosforilação do LiEIF4E4 para ambos os tipos celulares durante a fase estacionária final. Além disso, foram identificados múltiplos resíduos de serina-prolina (SP) e treonina-prolina (TP) na extensão N-terminal do LiEIF4E4 como alvos dos eventos de fosforilação, padrão este associado às quinases do tipo MAP (*Mitogen Activated Protein*) e CDK (*Cyclin-dependent Kinase*). Foi demonstrado que essa fosforilação é independente da interação com o LiEIF4G3, mas dependente da interação entre LiEIF4E4 e a LiPABP1, através de três *boxes* presentes na região N-terminal do LiEIF4E4 (DE MELO NETO *et al.*, 2015).

Com base nos estudos disponíveis dois modelos de complexo eIF4F são propostos para tripanossomatídeos. O primeiro baseado na interação EIF4E4-EIF4G3 que está fortemente atrelada à PABP1, onde ocorre uma interação única e não identificada até então em outros eucariotos: a interação direta entre a PABP1 e o EIF4E4 (ZINOVIEV *et al.*, 2011). O segundo complexo eIF4F se forma a partir da interação EIF4E3-EIF4G4, porém ainda não está claro se uma associação com a

PABP2 ou outro homólogo da PABP ocorre, bem como a interação entre o EIF4G4 e EIF4A1 (Figura 5).

Figura 5 - Representação dos complexos semelhantes ao eIF4F envolvidos na tradução em tripanossomatídeos.



Fonte: Modificado de Freire *et al.* (2017).

Nota: O principal complexo eIF4F envolvido na tradução em tripanossomatídeos é formado pela interação entre EIF4E4 e EIF4G3, juntamente com o EIF4A1 e a PABP1. Uma composição similar talvez ocorra no segundo complexo eIF4F formado pelo EIF4E3 e EIF4G4, com EIF4A1 e homólogos da PABP.

2.6 Proteína de ligação à cauda poli-A (PABP)

As PABPs são as principais proteínas regulatórias que interagem com a cauda poli-A dos mRNAs e são encontradas apenas em eucariotos. Existem dois tipos de PABPs: a citoplasmática e a nuclear. A PABP citoplasmática (PABPC ou simplesmente PABP) possui uma organização de domínios conservada apresentando quatro motivos de reconhecimento de RNA (RRM - *RNA Recognition Motifs*), domínios globulares que estão presentes em outras RBPs. Já a PABP nuclear (PABPN) é estrutural e funcionalmente distinta e está envolvida principalmente na maturação e exportação de mRNAs a partir do núcleo (GOSS; KLEIMAN, 2013).

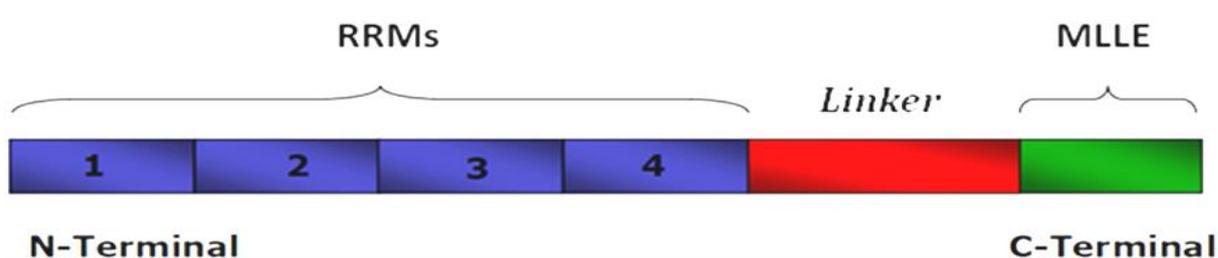
2.6.1 Estrutura das PABPs citoplasmáticas

A estrutura típica da PABP citoplasmática é altamente conservada em diferentes organismos e se caracteriza por uma região N-terminal que apresenta quatro RRM, uma região intermediária de conexão rica em prolina/glutamina e uma região C-terminal contendo um domínio chamado MLLE (anteriormente conhecido

como PABC) (ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013; KUHN; WAHLE, 2004). Os RRM's presentes na região N-terminal da PABP diferem em suas especificidades de ligação ao RNA e a proteínas, sendo os dois primeiros RRM's (1 e 2) responsáveis pela ligação específica ao poli-A e pela interação entre a PABP e o eIF4G (CHENG; GALLIE, 2007). Os RRM's 3 e 4 medeiam o reconhecimento de outras regiões que não a poli-A (SLADIC *et al.*, 2004). Cada um dos RRM's individualmente apresenta mais similaridade entre si em diferentes organismos do que entre os quatro tipos de um mesmo organismo, enfatizando que eles possuem funções distintas na célula (BURD; MATUNIS; DREYFUSS, 1991).

A região MLLE, apesar de não interagir com RNA, possui um domínio conservado que participa da estabilização dos mRNAs, da iniciação e terminação da tradução (WANG; GRUMET, 2004). O domínio MLLE funciona como uma região adicional para a ligação de proteínas que possuem uma sequência de 15 resíduos chamada de motivo de interação com PABP (PAM - *PABP Interaction Motif*), tais como o fator de término da tradução eRF3 (*Eukaryotic Translation Termination Factor 3*), reguladores negativos da tradução, como a PAIP1 e PAIP2 (*PABP-interacting Proteins*) e a poli-A nuclease (PAN - *Poly-A Nuclease*) 3' deadenilase (DERRY *et al.*, 2006; GOSS; KLEIMAN, 2013; KHALEGHPOUR *et al.*, 2001; ROY *et al.*, 2002). A região ligadora que conecta os RRM's e o domínio MLLE é o segmento menos conservado da PABP e está relacionado à ligação de múltiplas moléculas desse polipeptídeo à região poli-A (MELO *et al.*, 2003) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema geral da PABP em eucariotos.



Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: Em destaque a região N-terminal (em azul) que possui quatro domínios de ligação ao mRNA (RRMs) e na extremidade C-terminal (em verde) localiza-se o domínio denominado MLLE. Entre os domínios N e C-terminal encontra-se a região ligadora ou *linker* (em vermelho).

2.6.2 Aspectos das funções das PABPs

No princípio acreditava-se que as PABPs eram simplesmente proteínas que agiam como um escudo para que a cauda poli-A não fosse degradada. Estudos subsequentes demonstraram que as PABPs além de interagirem com a cauda poli-A, interagem também com outras sequências nos mRNAs e também com fatores proteicos, fazendo com que essa família de proteínas tenha um papel central em numerosas etapas da expressão gênica. Assim, elas participam efetivamente de todas as vias presentes no metabolismo dos mRNAs (GOSS; KLEIMAN, 2013), tais como a poliadenilação, exportação, iniciação e término da tradução, degradação, manutenção, regulação associada a microRNAs e durante o desenvolvimento (CHANG *et al.*, 2004; DUNN *et al.*, 2005; GOSS, KLEIMAN, 2013; HOSODA; LEJEUNE; MAQUAT, 2006).

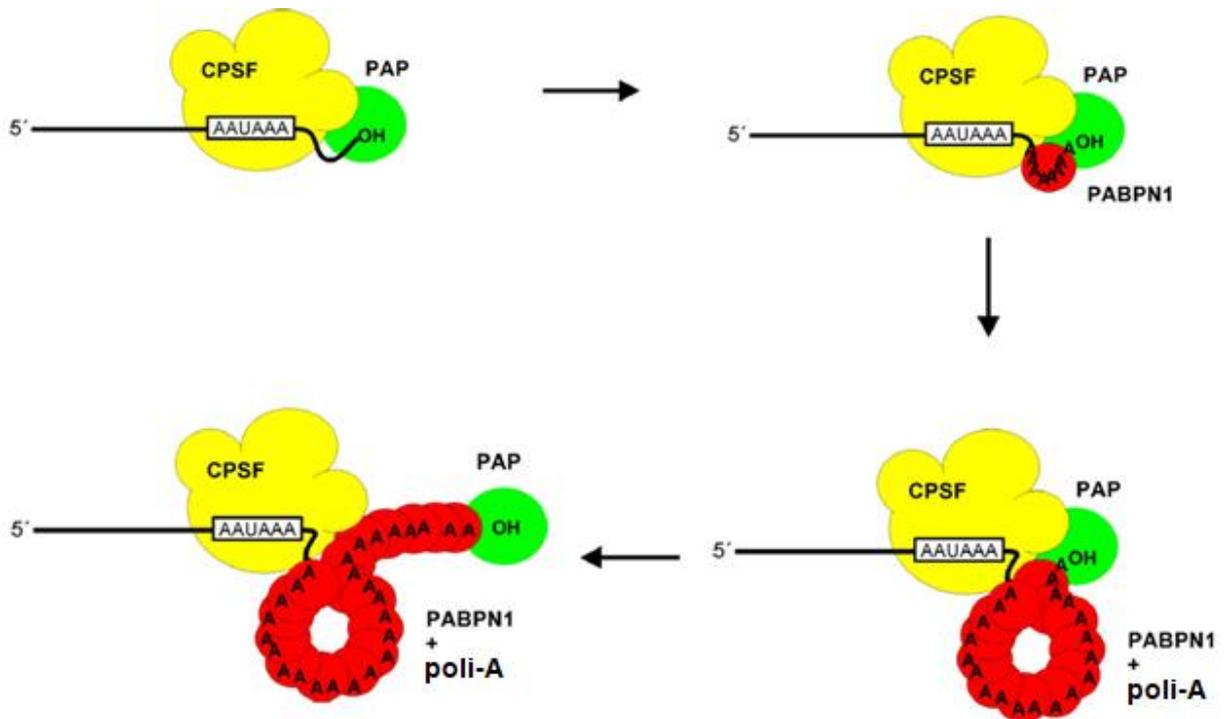
2.6.2.1 Poliadenilação

A grande maioria dos mRNAs sintetizados no núcleo apresentam uma cauda poli-A na região 3', que possui proximadamente 200-250 resíduos em mamíferos e 70-90 em leveduras (ECKMANN; RAMMELT; WAHLE, 2011). A cauda poli-A não é codificada pelos genes, sendo adicionada aos pré-mRNAs nascentes num processo de duas etapas que envolve uma clivagem sítio-específica do pré-mRNA e subsequente poliadenilação do segmento situado anteriormente ao produto de clivagem, na extremidade 3' do futuro mRNA maduro (EDMONDS, 2002; HALL, 2002). Este processo de clivagem e poliadenilação ocorre em um complexo proteico que inclui a poli-A polimerase (PAP) e outros fatores adicionais. Os fatores que regulam a PAP também atuam sobre outras enzimas, de tal forma que acabam por regular não só a poliadenilação como também determinam o tamanho da cauda poli-A (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003).

Em mamíferos, para que ocorra o processo de clivagem do pré-mRNA são necessárias várias proteínas, em especial o fator específico de clivagem e poliadenilação (CPSF - *Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*). Este se liga à região contendo o sinal de poliadenilação (AAUAAA) e recruta a PAP para dar início à adição de resíduos adenilados. Assim que são adicionados entre 11 e 14 resíduos, várias moléculas de PABPN1 começam a se ligar a cauda nascente. A

interação da PABPN1 à cauda poli-A possui um papel central em todo processo. Primeiramente, a PABPN1 impede que o CPSF se ligue a cauda poli-A, fazendo com que esse fator fique restrito à sequência sinal. Segundo, a PABPN1 mantém o CPSF e a PAP em um distanciamento adequado para que possam continuar interagindo, uma vez que a função estimulatória da CPSF na elongação diminui com o aumento da distância entre estas duas proteínas. A PABPN1 provavelmente facilita essa interação promovendo o dobramento correto do RNA durante a elongação (KELLER *et al.*, 2000). Por fim, a PABPN1 quando em contato com a PAP aumenta a estabilidade do complexo de poliadenilação (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003).

A PAP é uma enzima de ação não-processiva, isto é, a cada adição de resíduos de adenina ela se desliga da molécula de RNA. Porém, quando ligada em ambas as proteínas (CPSF e a PABPN1), forma um complexo estável que permite que a polimerase adicione a cauda poli-A em um único evento. Monômeros da PABPN1 continuam a se ligar à cauda poli-A até que o comprimento total desta seja alcançado. Nesse ponto, a PAP retoma sua forma não-processiva (KELLER *et al.*, 2000), e ocorre a disjunção do complexo de poliadenilação. Foi proposto que a PABPN só desfaz a ligação CPSF/PAP quando a cauda poli-A está toda coberta por moléculas de PABPN, de forma que a PABPN regularia o número de resíduos de adenina adicionados (KUHN *et al.*, 2009) (Figura 7).

Figura 7 - Modelo do mecanismo de controle do comprimento da cauda poli-A.

Fonte: Modificado de Eckmann, Rammelt e Wahle (2011).

Nota: A proteína CPSF se liga ao sinal de poliadenilação AAUAAA e recruta a PAP. Quando a cauda apresenta cerca de 12 nucleotídeos ocorre a ligação da primeira molécula de PABPN1 ao complexo. Conforme ocorre o crescimento da cauda, mais moléculas vão se ligando. O complexo formado faz com que o RNA se dobre de forma a manter o contato entre a CPSF e a PAP, permitindo assim que a cauda seja sintetizada de forma processiva. Quando a cauda poli-A atinge o comprimento de cerca de 250 resíduos, a PABPN1 não consegue se manter ligada ao complexo. Desta forma, o contato entre a CPSF e PAP se desfaz finalizando a elongação.

2.6.2.2 Exportação nuclear

O transporte do mRNA do núcleo para o citoplasma é essencial para a expressão gênica em eucariotos. O acoplamento entre a maturação do mRNA e sua exportação permite que apenas mRNAs funcionais sejam traduzidos, garantindo a precisão e rapidez da expressão (KATAHIRA, 2015). A falta de um sinal de poliadenilação funcional, bem como a inibição da poliadenilação pela ausência ou inatividade de fatores catalíticos específicos, causam a retenção de mRNAs no núcleo, tanto em mamíferos quanto em leveduras (DOWER; ROSBASH, 2002; HAMMELL *et al.*, 2002). Isso é um indício que a maturação nuclear dos mRNAs e exportação pode ser prejudicada através de eventos que interferem no processamento da região 3'. Um vez que a não poliadenilação do mRNA impede a ligação das PABPs, a retenção nuclear dos mRNAs pode ser correlacionada com as

PABPs, demonstrando sua importância na exportação dos mRNAs para o citoplasma (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003).

Pouco se sabe sobre o modo como a PABP participa na exportação de mRNAs, porém as PABPs podem facilitar a saída dos mRNAs através de interações críticas, como demonstrado pela Pab1p de leveduras que interagem com nucleoporinas específicas (ALLEN *et al.*, 2001) e com receptor de exportação nuclear Xpo1p (HAMMELL *et al.*, 2002) e a Nab2p que demonstra interação com Gfd1p, uma proteína associada a poro nuclear (UETZ *et al.*, 2000). Foi observado também que a Pab1p, que possui localização citoplasmática, pode migrar para o núcleo e esse comportamento parece se conservar evolutivamente, uma vez que é observado em humanos e leveduras em fissão (BRUNE *et al.*, 2005).

2.6.2.3 Iniciação da tradução

Assim que o mRNA é deslocado até o citoplasma, a PABP se liga à cauda poli-A promovendo interações entre as regiões 5' e 3' que são responsáveis pela iniciação da tradução. Durante essa iniciação uma série de eIFs atuam para permitir a montagem do complexo ribossômico sobre o mRNA. Na primeira etapa, o fator eIF4E (subunidade menor do complexo eIF4F) se liga ao *cap* presente na região 5' do mRNA, permitindo a ligação do eIF4G (subunidade maior do eIF4F) que recruta fatores adicionais como o eIF4A. A ação deste último remove estruturas secundárias na região não codificante do mRNA que impediriam o deslizamento da subunidade ribossomal 40S até o códon AUG de iniciação da tradução. O complexo eIF3 promove então a ligação da subunidade 40S ao mRNA e a PABP, que interage diretamente com a subunidade eIF4G, auxilia a ligação entre o *cap* e o complexo eIF4F. A interação PABP/eIF4G causa a circularização do mRNA e estabiliza o complexo de iniciação da tradução (VALASEK, 2012).

A interação entre as regiões 5' e 3' do mRNA foi inicialmente descrita em leveduras e posteriormente em humanos e plantas, através da demonstração da associação direta da PABP com o fator eIF4G (KAHVEJIAN; ROY; SONENBERG, *et al.*, 2001; GINGRAS *et al.*, 1999; PREISS; HENTZE, 2003). Diversos estudos sugerem mecanismos pelos quais a circularização do mRNA mediada pela PABP e outros fatores possam estimular a tradução. Em plantas a interação entre a PABP e o eIF4G ou eIF4B aumenta a atividade de ligação ao poli-A da PABP em 10 vezes e

umenta a afinidade do eIF4F ao 5' *cap* em 40 vezes (LE *et al.*, 1997a; WEI *et al.*, 1998). Além disso, a circularização do mRNA pode estar relacionada à reciclagem dos ribossomos da região 3' para a 5' do mesmo mRNA (SACHS, 2000). A combinação desses efeitos garante também a tradução preferencial de mRNAs que contenham tanto o *cap* quanto a cauda poli-A (BI; GOSS, 2000).

O mecanismo de iniciação descrito acima, porém, não é válido para a tradução de todos RNAs. Existem RNAs que não possuem a estrutura *cap* e, em alguns casos, até mesmo carecem da cauda poli-A, como ocorre para RNAs de alguns vírus (HELLEN, SARNOW, 2001). Esses RNAs geralmente apresentam IRES nas porções 5'. Alguns mRNAs celulares também tem IRES e geralmente são aqueles que possuem vantagens em termos de tradução sob condições onde a tradução geral está comprometida (GOSS; KLEIMAN, 2013).

Foi demonstrado que a interação entre a Pab1p e o eIF4G ocorre por meio dos RRM1 e 2 da Pab1p (que são os mesmos domínios necessários para o reconhecimento da poli-A) e do domínio amino-terminal do eIF4G (KUHN; WAHLE, 2004). Entretanto, muitos outros experimentos demonstram que a regulação da iniciação da tradução vai bem além da rede de interações entre as regiões 5' e 3' mediadas pela PABP e o eIF4G. Foi demonstrado em leveduras a viabilidade de mutantes da Pab1p nos quais a interação Pab1p-eIF4G não ocorria (TARUN *et al.*, 1997), bem como mutantes com defeitos na tradução dependente de poli-A, mas sem defeitos na ligação com o eIF4G (KESSLER; SACHS, 1998). Outra interação, conservada em animais e plantas, com o fator de iniciação eIF4B, também foi demonstrada como estimulatória da tradução uma vez que aumenta a afinidade da PABP pela cauda poli-A (CHENG; GALLIE, 2010; LE *et al.*, 2000; LE *et al.*, 1997a). Em plantas a interação PABP com os fatores de iniciação eIF4B e eIFiso4F (isoforma do eIF4F presente apenas em plantas) aumenta a atividade helicase e ATPase associadas a este último (BI; GOSS, 2000; CHENG; GALLIE, 2010).

Um modelo alternativo para o funcionamento da PABP sugere que esta seja também um regulador do recrutamento da subunidade 60S ao complexo de iniciação 40S. Estudos em leveduras indicam que a PABP controle o recrutamento da subunidade 60S regulando a atividade de duas helicases de RNA, Ski2p e Slh1p (SEARFOSS; DEVER; WICKNER, 2001). Alguns vírus podem também modular a estrutura e/ou atividade da PABP tais como o rotavírus que produz um análogo da PABP conhecido como NSP3 e desvia a rota de tradução para seu próprio uso

(GROFT; BURLEY, 2002) e as enteroviroses que são capazes de degradar a PABP e remover seu domínio de ligação no eIF4G, pela produção das proteases 2A e 3C (KUYUMCU-MARTINEZ; JOACHIMS; LLOYD, 2002). Além de seus efeitos globais na iniciação da tradução, as PABPs podem afetar seletivamente a tradução de mRNAs individuais. Elas podem se ligar a regiões oligoadeniladas presentes na região 5' UTR de seus próprios mRNAs, reprimindo sua tradução (HORNSTEIN *et al.*, 1999). A maioria desses experimentos foi descrita pra a caracterização da PABP1 em leveduras e plantas e, apenas recentemente, é que outros membros da família da PABP estão sendo investigadas (GOSS; KLEIMAN, 2013).

2.6.2.4 Terminação da tradução

O fator de terminação da tradução em eucariotos eRF1 é responsável pela catálise da hidrólise de polipeptídeos em resposta ao reconhecimento dos códons de parada pelos ribossomos. O eRF1 ao reconhecer algum dos códons de parada, que é a primeira etapa do término da tradução, sofre uma mudança conformacional pela ação da GTPase eRF3, resultando em sua ativação (ALKALAEVA *et al.*, 2006; KONONENKO *et al.*, 2010). Durante esse evento, a região amino-terminal do eRF3 interage diretamente com o domínio carboxi-terminal das PABPs citoplasmáticas. Essa interação parece aumentar a eficiência de terminação (COSSON *et al.*, 2002) e promover a reciclagem ribossômica para a tradução de um mesmo mRNA por inúmeras vezes (UCHIDA *et al.*, 2002). Esses dados fortalecem a ideia de que a PABP apresenta um papel no acoplamento dos eventos de iniciação e término da tradução (IVANOV *et al.*, 2016).

2.6.2.5 Controle da estabilidade e degradação dos mRNAs

As PABP estão envolvidas tanto em eventos de degradação quanto de manutenção/estabilização dos mRNAs. Sua interação com o eRF3 é fundamental para a tradução de maneira eficiente e pela regulação da estabilidade do mRNA (ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013). A interação eRF3-PABP parece minimizar a multimerização de monômeros da PABP à cauda poli-A, possivelmente através do favorecimento da ação de enzimas de encurtamento ao seu substrato e acoplando o término da tradução ao decaimento convencional dos mRNAs

(HOSHINO *et al.*, 1999). Quando a cauda poli-A atinge o tamanho de 10-15 resíduos ocorre a ativação dos mecanismos de degradação do mRNA (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003). A interação eRF3-PABP pode ser importante também na regulação e ativação da degradação do tipo NMD (ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013).

Existem várias formas de degradação do mRNA, sendo as mais comuns a deadenilação e o decapeamento que são seguidos da clivagem induzida por exonuclease. A PABP pode exercer um efeito estimulatório ou inibitório na deadenilação. Ela pode inibir o complexo CCR4-NOT (principal complexo multiproteico envolvido na deadenilação) e a poli-A ribonuclease (PARN) e pode estimular o complexo PAN2/3 responsável pelo truncamento das caudas poli-A recém-sintetizadas e pela degradação específica do mRNA RAD5 (WANG; KILEDJIAN, 2000). As deadenilases PAN2/PAN3 podem ser recrutadas pela interação direta entre a PABP e PAN3 e o complexo CCR4-NOT pode ser recrutado indiretamente pelas proteínas TOB1/2 (GROSSET *et al.*, 2000)

A etapa de decapeamento pode ser controlada predominantemente pela estabilização do complexo de ligação ao *cap* através da interação entre a PABP e o eIF4G, que torna o *cap* indisponível para a ação das enzimas dcp1 e dcp2. É sugerido que a PABP sozinha possa estericamente impedir a ligação de proteínas que ativam enzimas de decapeamento, como Lsm1p-7p (KORNER *et al.*, 1998). Outra proposta sugere que PABP afete a localização de transcritos dentro da célula, ligando-se a eles e não permitindo sua inclusão nos corpos de processamento onde ocorre a degradação (KUHN; WAHLE, 2004). Foi observado em leveduras que a PABP tanto pode inibir quanto estimular a remoção do *cap* dos mRNAs, uma vez que, após a retirada da cauda poli-A, ela auxilia no rearranjo das ribonucleoproteínas ou mRNPs (mRNAs associados à proteínas). Isso acaba por favorecer a ligação do complexo ativador deste processo que contém proteínas como a Lsm1p-Lsm7p e Pat1p (THARUN; PARKER, 2001; MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003). Esse rearranjo promove a ligação destes mRNPs com o complexo formado pelas proteínas Dcp1p-Dcp2p, criando um substrato para a degradação exonucleolítica 3'-5'/5'-3' (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003; SHETH; PARKER, 2003).

2.6.3 PABPs de tripanossomatídeos

A caracterização bioquímica inicial da PABP em tripanossomatídeos se iniciou com a identificação de homólogos individuais realizada em *T. cruzi* e *T. brucei* (BATISTA *et al.*, 1994; HOTCHKISS *et al.*, 1999) e, posteriormente, em *L. major* (BATES; KNUEPFER; SMITH, 2000). Através desses estudos duas cópias do gene para o homólogo encontrado nas espécies de *Trypanosoma* foram identificados e apenas uma cópia em *L. major*. Nesse último caso, foram identificadas duas formas da proteína, uma hiperfosforilada e outra hipofosforilada. Também foi demonstrada que a sequência dos homólogos de PABP de tripanossomatídeos apresenta similaridade com a de outros eucariotos, demonstrando sua conservação evolutiva.

Atualmente, é sabido que, nos tripanossomatídeos dois homólogos de PABP (PABP1 e PABP2) são encontrados conservados em *Leishmania* e *Trypanosoma* e um terceiro homólogo encontrado em espécies de *Leishmania*, mas não em *Trypanosoma* (PABP3). Dados recentes demonstram que, em *Leishmania*, a PABP1 parece ter um papel mais geral na tradução, executando predominantemente as funções atribuídas a PABP em outros organismos, via sua interação específica com a cauda poli-A e com o homólogo do fator de iniciação eIF4G mais diretamente implicado na tradução, o EIF4G3 (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). Em *T. brucei* foi demonstrado que a PABP1 e PABP2 apresentam funções não redundantes, bem como apresentam localização intracelular distintas e diferenças em sua distribuição na fração polissomal sob condições que alteram o metabolismo dos mRNAs (KRAMER *et al.*, 2013). Já as PABPs 2 e 3 de *Leishmania* interagem diretamente entre si, uma característica ainda nova para moléculas distintas dessa proteína, e com os mesmos mRNAs, porém distintos daqueles associados a PABP1. Além disso, ambas migram para o núcleo de células em condições de inibição da transcrição, sugerindo uma função nuclear que pode estar associada ao processamento dos mRNAs e/ou seu transporte núcleo-citoplasmático (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). Em espécies de *Leishmania* sp. Todos os três homólogos possuem tamanhos similares com pesos moleculares preditos de 62.7, 65.4 e 60.9 kDa para as PABPs 1, 2 e 3, respectivamente (DA COSTA LIMA, 2012).

Através de experimentos de imunoprecipitação dos três homólogos de PABP, seguido de análise por espectrometria de massa, observou-se proteínas homólogas de fatores de exportação nuclear e outras envolvidas no processamento de RNAs

preferencialmente associadas às PABPs 2 e/ou 3, reforçando que essas proteínas apresentam funções distintas além daquelas observadas para a PABP1. Além disso, quando RNAs foram extraídos dos produtos de imunoprecipitação e submetidos a sequenciamento em grande escala, observou-se que mRNAs co-precipitados com as PABPs 2 e 3 parecem estar preferencialmente associados com mRNAs cuja tradução ocorra durante a fase S do ciclo celular, como os mRNAs das histonas. Como as PABPs 2 e 3 também são encontradas associadas à polissomas, reforçando um papel na tradução, é possível que uma diferenciação funcional destas proteínas esteja associada à tradução preferencial de mRNAs com características particulares (tradução na fase S), como o caso dos mRNAs de histonas (DA COSTA LIMA, 2012).

2.7 Histonas

As histonas são proteínas altamente conservadas de caráter básico presentes nos núcleos de células de eucariotos que auxiliam no empacotamento do DNA. As histonas possuem um domínio globular e uma região amino-terminal mais flexível e a presença de uma grande quantidade de resíduos dos aminoácidos lisina (K) e arginina (R), que conferem uma carga total positiva para essas proteínas em pH fisiológico (WOLFFE, 1998). Existem cinco principais classes de histonas: H1, H2A, H2B, H3 e H4. Essas histonas em conjunto com a molécula de DNA formam estruturas conhecidas como nucleossomos, que juntamente com as proteínas não-histonas formam a cromatina (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Cada nucleossomo consiste em 146 pares de bases de DNA que envolvem um núcleo de oito histonas, formado por um tetrâmero H3-H3-H4-H4 e dois dímeros H2A-H2B. O DNA localizado entre os nucleossomos está associado a histona H1 (KOTHAPALLI, 2005).

As duas principais funções das histonas são permitir que todas as moléculas de DNA caibam dentro do pequeno espaço nuclear e modular o metabolismo da cromatina (AUSIÓ, 2006). A cromatina pode responder a vários estímulos externos, permitindo a regulação de processos relacionados ao DNA. Essa regulação se dá através de modificações nas caudas das histonas, que afetam a estrutura da cromatina, permitindo assim a ocorrência da regulação gênica, da replicação, da recombinação e do reparo do DNA (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). O termo

epigenética se refere a mudanças herdáveis sem que haja alterações na sequência de nucleotídeos do DNA. Sendo assim, modificações nas histonas são consideradas reguladores epigenéticos da cromatina (MARTIN; ZHANG, 2005).

Em tripanossomatídeos o início da transcrição se dá em regiões conhecidas como sítios de iniciação da transcrição (TSS - *Transcription Start Sites*), encontrados em regiões onde a transcrição ocorre de maneira divergente (em ambos os sentidos), conhecidas como SSR (CLAYTON, 2002). Essa observação sugere que fenômenos epigenéticos atuem na regulação gênica em tripanossomatídeos, papel este desempenhado por modificações nas histonas (WRIGHT; SIEGEL; CROSS, 2010). De fato, alguns trabalhos têm demonstrado a existência de modificações de histonas específicas, bem como a presença de variantes de histonas nos sítios TSS de maneira conservada (KAWAHARA *et al.*, 2008; JIN; FELSENFELD, 2007; SIEGEL *et al.*, 2009). Nas SSRs são encontradas variantes de histonas (H2AZ e H2BV), histona 4 com acetilação da lisina 10 (H4K10ac), histona 3 com acetilação nos resíduos K9 e K14 e trimetilação no K4, o fator de bromodomínio BDF3 e fatores de transcrição como o TRF4 e SNAP50 (SIEGEL *et al.*, 2009; WRIGHT; SIEGEL; CROSS, 2010). Nas regiões de término da transcrição são encontradas as histonas variantes H3V e H4V (SIEGEL *et al.*, 2009). Isso demonstra que modificações das histonas e histonas variantes desempenham um papel crucial tanto na iniciação, quanto no término da transcrição em tripanossomatídeos.

2.7.1 Controle da tradução de mRNAs de histonas

A tradução dos mRNAs de histonas em eucariotos superiores é diferenciada, pois esses mRNAs apresentam características únicas que não estão presentes em mRNAs de tripanossomatídeos. Em eucariotos superiores os mRNAs das histonas não são poliadenilados. Entretanto, possuem uma estrutura conservada de haste-e-volta no final da região 3', que assim como a cauda poli-A presente nos mRNAs de tripanossomatídeos, auxilia no controle do seu transporte, tradução e estabilidade. A eficiente tradução desses mRNAs é dependente das proteínas de ligação a haste-e-volta (SLBPs - *Stem-loop Binding Proteins*). As SLBPs parecem desempenhar um papel semelhante às PABPs na iniciação da tradução dos mRNAs. Entretanto, o mecanismo pelo qual as SLBPs estimulam a tradução não está bem definido (GORGONI *et al.*, 2005; ZHAO; HYMAN; MOORE, 1999).

Os mRNAs de histonas em tripanossomatídeos são sabidamente poliadenilados o que por si só representa uma diferença crítica em relação aos eucariotos superiores (GORGONI *et al.*, 2005; CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Como dito anteriormente, as PABPs 2 e 3 parecem possuir um papel único e diferenciado no controle do metabolismo de mRNAs distintos àqueles aos quais a PABP1 atua. É interessante notar que dados recentes não publicados de nossa equipe indicam que as PABPs 2 e 3 parecem agir sobre mRNAs poliadenilados de histonas, mas não sobre outros mRNAs também poliadenilados aos quais age a PABP1. Se confirmados, esses resultados indicam que, além da cauda poli-A, as PABPs 2 e 3 necessitam de outras regiões ou motivos presentes nos mRNAs parceiros para completarem suas interações e o seu reconhecimento.

3 JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, a doença do sono e as leishmanioses são consideradas endêmicas em populações de baixa renda em todo mundo. Estas fazem parte de um grupo de doenças negligenciadas e causam um grande impacto negativo em termos sociais e econômicos. Apesar de estarem presentes em todos os continentes e atingirem milhões de pessoas, pouco se é investido em pesquisa, produção de medicamentos e em seu controle. Sendo assim, permanecem incapacitando e vitimando milhares de pessoas anualmente.

Esse projeto teve como objetivo contribuir sobre o conhecimento da biologia básica dos tripanossomatídeos, buscando identificar semelhanças e diferenças moleculares em relação aos seus hospedeiros mamíferos. Dentre diversos aspectos relacionados ao nosso trabalho procuramos responder aos seguintes questionamentos: São as PABPs 2 e 3 essenciais para a viabilidade celular em *L. infantum*? Qual a real relevância da forma fosforilada da PABP1 na viabilidade celular em *L. infantum*? Quais os motivos presentes nas PABPs 1 e 2 relevantes para a funcionalidade e sobrevivência celular em *L. infantum*? A superexpressão de mutantes da PABP3 é capaz de interferir na dinâmica celular em *L. infantum*? São os homólogos de PABP capazes de se associar diferencialmente ao mRNA repórter possuindo regiões regulatórias de mRNAs de histonas?

Tendo como objeto de estudo as PABPs e considerando seu papel central no metabolismo dos mRNAs, esse estudo pode produzir conhecimentos relevantes para subsidiar o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas que poderão ser empregadas no controle desses patógenos.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Caracterizar homólogos da PABP em *L. infantum*, investigando sua necessidade para a viabilidade do microorganismo e avaliando aspectos da sua biologia básica, com a caracterização de eventos de fosforilação e a identificação de motivos funcionalmente relevantes e mRNAs alvos.

4.2 Específicos

- a) Avaliar se a expressão das PABPs 2 e 3 é essencial para a viabilidade celular de *L. infantum*.
- b) Avaliar o papel da fosforilação da PABP1 na capacidade desta proteína ser funcional em *L. infantum*.
- c) Identificar motivos funcionalmente relevantes nas PABPs 1 e 2 a partir da avaliação da capacidade de proteínas mutantes em complementar a ausência da proteína nativa induzida por deleção gênica.
- d) Avaliar proteínas mutantes da PABP3 após sua superexpressão em *L. infantum*.
- e) Construir mRNA repórter codificando proteína fluorescente com regiões regulatórias de mRNAs de histonas visando criar condições para avaliar sua associação diferencial aos três homólogos de PABP de *L. infantum*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Construção de cassetes das PABPs 2 e 3 para realização de nocautes gênicos

A primeira etapa deste trabalho foi avaliar a essencialidade das PABPs 2 e 3 para a viabilidade celular através de nocautes gênicos. Experimentos demonstrando a essencialidade da PABP1 já haviam sido realizados em estudos prévios, porém não há na literatura informações a respeito da essencialidade das PABPs 2 e 3 em *L. infantum*. Neste trabalho, buscou-se então, como primeiro objetivo, investigar se as PABPs 2 e 3 também são essenciais para a viabilidade deste patógeno. A estratégia experimental utilizada foi a mesma utilizada originalmente para a PABP1 e também para o EIF4E4, conforme publicado recentemente (DE MELO NETO *et al.*, 2015).

As sequências moldes utilizadas como referência para confecção dos *primers* utilizados na construção dos cassetes de nocaute estão depositadas no banco de dados *TriTrypDB*, sob os números de acesso *LinJ.35.4200* (PABP2) e *LinJ.25.0080* (PABP3). Para cada uma das IRs (*Intergenic Regions*) foram desenhados dois *primers*: um 5' *forward* e um 3' *reverse*. Também foram desenhados *primers* para amplificação das marcas de resistência higromicina e puromicina. Os genes para esses antibióticos, utilizados para essa etapa de PCR, estão presentes em plasmídeos já construídos e disponíveis em nosso laboratório. Os *primers* desenhados para a realização deste trabalho se encontram no apêndice A.

5.1.1 Amplificação convencional por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para realização do *mix* empregado nas amplificações das IRs dos genes de PABP utilizamos os reagentes do kit *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) da seguinte maneira: 0,2 µl (0,02 unidades/µl) da enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, 4 µl de tampão 5X *Phusion® GC* (concentração final 1X), 0,2 µl de MgCl₂ (concentração final 0,5 mM), 0,6 µl de DMSO (3 % do volume total) e 0,4 µl de dNTPs 10 mM (concentração final 200 µM), 1 µl de DNA molde (concentração final 1 ng/µl), 1 µl de cada uma dos *primers* a 25

mM (concentração final de 1,25 mM) e água *Milli-Q*® (Merk Millipore) livre de nuclease para um volume final de 20 µl. Durante todo preparo, os reagentes, bem como os tubos utilizados para realização das reações, permaneceram em gelo, sendo a enzima apenas retirada do freezer (-20 °C) para finalização do *mix*.

As PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: 1º) desnaturação inicial a 98 °C durante 3 minutos; 2º) 10 ciclos a 98°C por 30 segundos para desnaturar o DNA, 65-55 °C (*touchdown* com diminuição de 1 °C por ciclo) por 40 segundos para o anelamento dos *primers* e 72 °C por 60 segundos para extensão dos fragmentos; 3º) 30 ciclos a 98 °C por 30 segundos, 55°C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos; 4º) extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após as amplificações foi realizada eletroforese, onde os produtos das PCRs tiveram todo seu volume fracionado em gel de agarose 1%, corado com *SYBR*® *Safe DNA gel stain* (Life Technologies), e as bandas de interesse foram visualizadas através de luz ultravioleta (UV - *Ultraviolet*) em transiluminador. Constatado o funcionamento das reações, de acordo com o tamanho de banda observado e esperado, esses fragmentos foram excisados do gel e purificados utilizando o kit *GFX PCR DNA and Band Purification* (GE Healthcare Life Sciences), conforme recomendações do fabricante.

5.1.2 PCR de fusão

Após a purificação dos produtos das PCRs iniciais, as PCRs de fusão foram realizadas de duas formas: uma com etapa de pré-anelamento e outra sem esta etapa. Na primeira forma é realizada uma reação com volume final de 20 µl onde são colocados todos os reagentes do kit *Phusion*® *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs) como descrito anteriormente e 1 a 2 µl dos produtos de PCRs das marcas de resistência (higromicina e puromicina) e das IRs 5' e 3' das PABPs. As seguintes condições foram empregadas: 1º) 98 °C por 3 minutos; 2º) 10 ciclos a 98 °C por 30 segundos e 48 °C por 30 segundos; 3º) alongação final a 72 °C por 5 minutos. Enquanto se realizava o pré-anelamento, foi preparado o *mix* empregado para a PCR de fusão propriamente dita, como descrita previamente. Somado ao volume usado do *mix* (11,0 µl), foi acrescentado 7 µl do produto do pré-anelamento, 1 µl do *primer 5' forward* da IR '5 e 1 µl do *primer 3' reverse* da IR 3', onde o volume final da reação foi de 20 µl. Estas foram colocadas

em termociclador com controle da temperatura de rampagem em 2 °C/s, sob as seguintes condições: 1º) desnaturação inicial a 98 °C durante 3 minutos; 2º) 10 ciclos a 98 °C por 30 segundos para desnaturar o DNA, 68-58 °C ou 65-55 °C (*touchdown*) por 40 segundos para o anelamento dos *primers* e 72 °C por 60 segundos para extensão dos fragmentos; 3º) 30 ciclos a 98 °C por 30 segundos, 58 ou 55 °C por 40 segundos e 72 °C por 60 segundos; 4º) extensão final a 72 °C por 5 minutos.

A outra forma de PCR de fusão consistia em unir todos os fragmentos sem a etapa de pré-anelamento. Para isso foi preparado um *mix* como já descrito e acrescentados 1 µl dos *primers* externos das IRs 5' (5' *forward*) e 3' (3' *reverse*) das PABPs, 1 µl das IRs 5' e 3' purificadas dos mesmo genes e 1 µl de uma das marcas de resistência, reação essa para um volume final de 20 µl. A mesma programação *touchdown* já descrita foi empregada para estas reações.

Após o término das reações, as amostras foram corridas em sua totalidade em gel de agarose 1%. As bandas de interesse foram excisadas do gel para purificação como descrito anteriormente.

5.1.3 Clonagem dos cassetes construídos

Os cassetes provenientes das PCRs de fusão já purificados foram inicialmente tratados com a enzima *Taq Polimerase* para adição de dATPs em suas extremidades da seguinte forma: realização de *mix* contendo 0,1 µl da enzima, 0,2 µl de dATP, 0,4 µl de MgSO₄, 1 µl de tampão 10X e água livre de nuclease para um volume final de 5 µl, acrescidos de 5 µl dos cassetes fusionados purificados (reação final com 10 µl). As amostras foram colocadas em termociclador para realização de uma reação de ciclo único a 72° por 25 minutos. Após adição de adenosinas, foi realizada uma nova etapa de purificação, para retirar resquícios dos reagentes da PCR. As amostras foram submetidas a reação de ligação em plasmídeo comercial *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega), conforme recomendações do fabricante. O período da reação foi de 16 horas a 4°C. Bactérias *Escherichia coli* (Top 10 ou DH10B) quimiocompetentes foram transformadas com as reações de ligação através de choque térmico, onde se acrescentou 5 µl da amostra em 50 µl dessas células, sendo colocadas em gelo onde permaneceram por 30 minutos e, em seguida, em banho-maria a 37 °C durante 5 minutos. Foram adicionados 800 µl de meio SOC

(2% Bacto-triptona, 0,5 % extrato de bactéria/levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose), que permitiu a recuperação das bactérias quando incubadas a 37°C por 60 minutos, com os tubos sendo homogeneizados por inversão a cada 10 minutos. Após a recuperação em SOC, as células foram centrifugadas a 4 °C a 1630 x g por 3 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, deixando aproximadamente 100 µl a partir do qual as células foram ressuscitadas e semeadas em placas com meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml), previamente acrescidas de X-GAL/IPTG, necessário para seleção das colônias. A placa foi incubada a 37°C por 16 horas. As colônias formadas na placa foram utilizadas para se obter DNA plasmidial através do kit *GenElute™ Plasmid Miniprep* (Sigma), segundo recomendações do fabricante. Para a confirmação da clonagem, os DNAs extraídos foram submetidos à digestão com enzima *EcoRI* a 37 °C por 16 horas. As amostras que liberaram fragmentos nos tamanhos esperados após a digestão foram enviadas para sequenciamento automático no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). Os resultados foram analisados nos programas do pacote *DNASTar* (Lasergene). Após confirmação de que os cassetes apresentavam as sequências de DNA corretas, os plasmídeos foram digeridos com enzima de restrição *NotI* para liberação das construções utilizadas para realização das transfecções em *L. infantum*.

5.2 Construção de mutantes das PABPs 1, 2 e 3 para avaliação de sua influência sobre a dinâmica celular

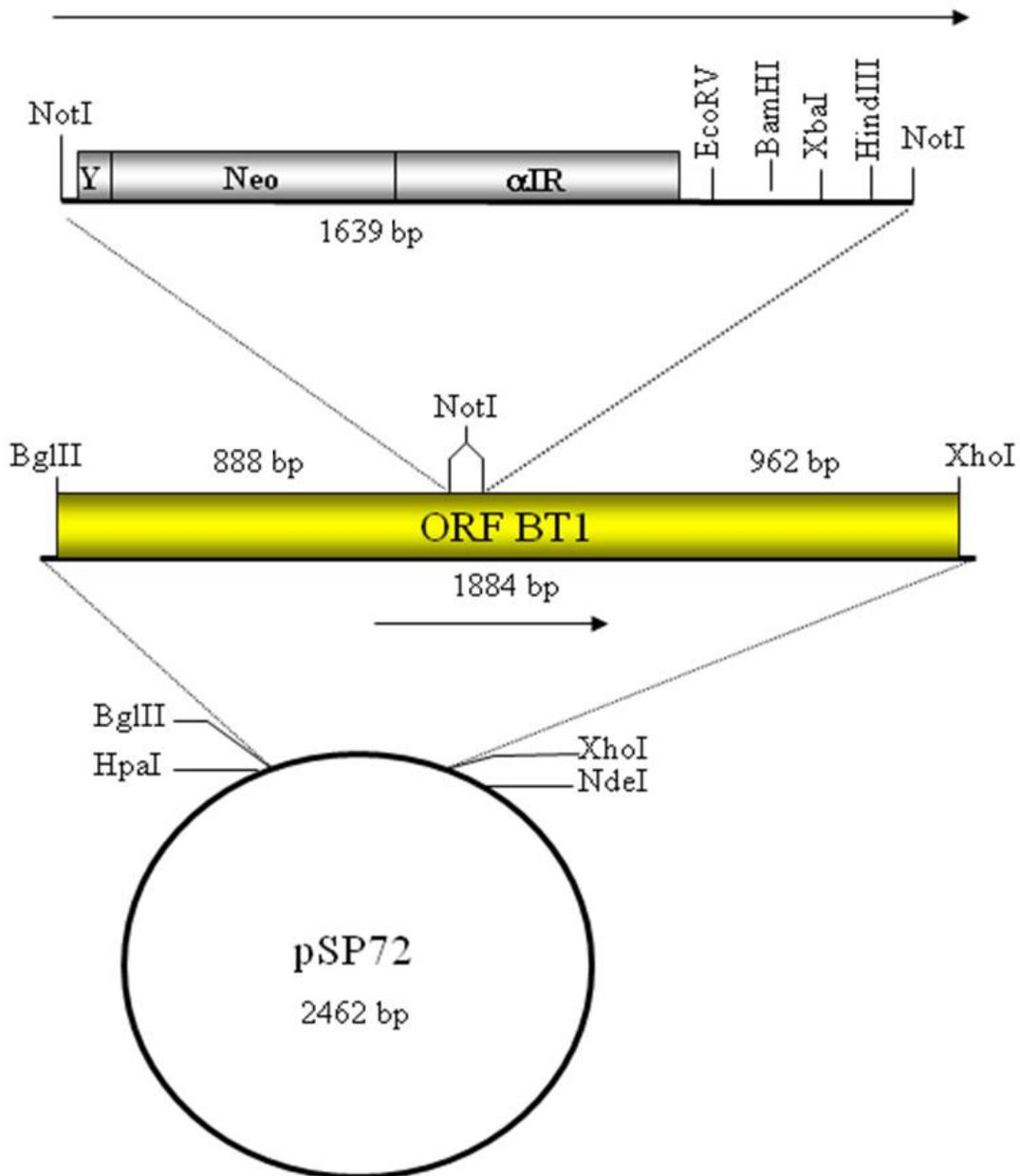
Para início da construção dos mutantes das PABPs 2 e 3 foi realizada a clonagem das regiões codificadoras dos genes selvagens *LinJ.35.4200* (PABP2) e *LinJ.25.0080* (PABP3) em *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega), pois o uso do DNA plasmidial como molde torna a reação mais eficaz e específica. Foi realizado então uma reação de PCR convencional utilizando a enzima *AccuPrime Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific) empregando *primers 5' Forward* com sítio de restrição *BamHI* e *3' Reverse* com sítio *HindIII* em suas extremidades. Para tal foi empregado o seguinte protocolo: 2,5 µl de *Buffer II*, 0,2 µl da enzima, 1 µl do DNA genômico de *L. infantum*, 1 µl *primer 5'*, 1 µl do *primer 3'* e água *Milli-Q®* (Merk Millipore) livre de nucleases para um volume final de 25 µl.

As PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: 1º) desnaturação inicial a 94 °C durante 2 minutos; 2º) 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos para desnaturar o DNA, 60 °C por 30 segundos para o anelamento dos *primers* e 72 °C por 2 minutos para extensão dos fragmentos; 3º) extensão final a 72 °C por 5 minutos. A enzima *AccuPrime* tem a vantagem de adicionar adenosinas ao final da amplificação, permitindo a ligação imediata ao plasmídeo de clonagem. Os plasmídeos clonados foram então sequenciados e checados.

A mutagênese foi realizada empregando o kit *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs). Após a PCR convencional (protocolo já descrito anteriormente) para a geração do *megaprimer*, foram utilizados entre 3 e 5 µl do *megaprimer* purificado na PCR final, para um volume final de 20 µl. Nas duas etapas de PCR realizadas foi empregado como molde 1 µl de DNA plasmidial na concentração de 50 ng/µl. Após a realização da PCR final foi realizada a clonagem das ORF mutadas em *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) e estas posteriormente foram subclonadas em *pSP-BT1-YneoalR*. Além dos mutantes, também foram subclonadas no mesmo plasmídeo as ORFs selvagens das PABPs 2 e 3.

Os mutantes dos homólogos de PABP foram clonados em *pSP-BT1-YneoalR* entre os sítios de *BamHI/HindIII*, de forma que ficaram posicionados após o gene de resistência à neomicina e flanqueados por sítios de processamento e poliadenilação. No plasmídeo em questão, este cassete se encontra posicionado dentro da sequência codificadora do gene *BT1* (codifica um transportador de Biopterina), que já foi demonstrado como capaz de mediar a expressão eficiente da proteína alvo. Como o gene *BT1* é originário de *L. infantum*, a excisão de todo o cassete (gene *BT1*, gene de resistência à neomicina e gene alvo, com sequências flanqueadoras) do plasmídeo resultante, via digestão com as enzimas *BglII* ou *HpaI* (extremidade 5') *XhoI* ou *NdeI* (extremidade 3'), permite sua transfecção e integração no locus *BT1* de *L. infantum*, selecionados pela adição de neomicina ao meio. O plasmídeo subclonado permitiu a expressão das respectivas proteínas fusionadas ao epítipo HA na sua extremidade C-terminal. Neste trabalho, os plasmídeos contendo os mutantes foram transfectados e mantidos de forma episossomal em múltiplas cópias (Figura 8).

Figura 8 - Plasmídeo *pSP-BT1-YneoαIR*.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

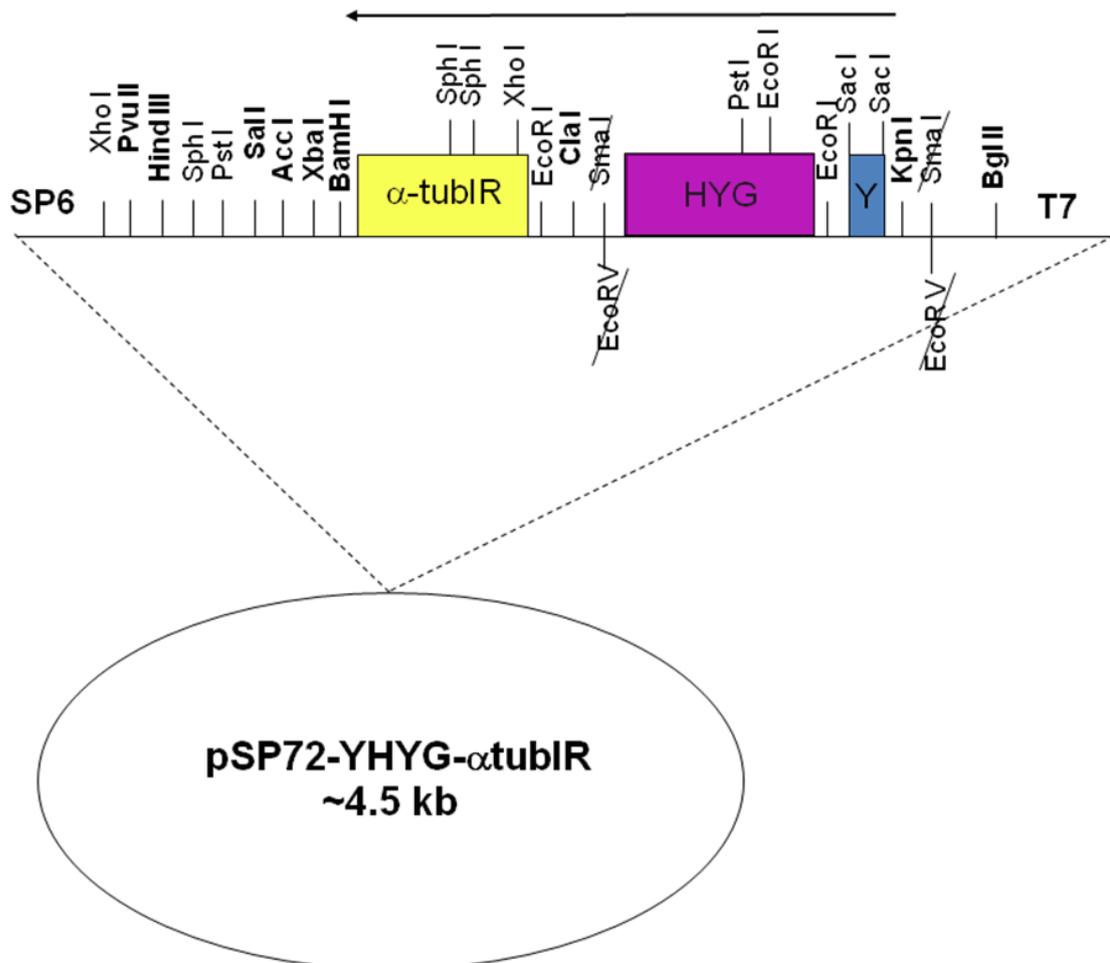
Nota: O *pSP-BT1-YneoαIR* possui aproximadamente 5951 bp (*base pair* ou par de base) e permite a clonagem do cassete dentro da sequência codificadora do gene *BT1* e apresenta a marca de resistência a neomicina.

5.3 Construção de genes repórteres para avaliação *in vivo* da associação entre as PABPs 2 e 3 e seus mRNAs alvos

Metodologia semelhante a descrita anteriormente foi empregada para construção de genes repórteres que serão empregados para avaliação *in vivo* da associação entre as PABPs 2 e 3 e seus mRNAs alvos. Esses fragmentos foram

unidos por PCR de fusão, em seguida foram clonados no plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) e enviados para sequenciamento. Após a confirmação da sequência, o cassete resultante foi então subclonado em *pSP72-YHYG- α tubIR* (Figura 9).

Figura 9 - Plasmídeo *pSP72-YHYG- α tubIR*.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: O *pSP72-YHYG- α tubIR* possui aproximadamente 4500 bp, permite a clonagem do cassete dentro do gene *BT1* e apresenta como marca de resistência a higomicina.

5.4 Superexpressão de proteínas selecionadas em linhagens de *L. infantum* geneticamente modificadas fusionadas ao epítipo HA

Foram realizadas transfectões das PABPs 1, 2 e 3 selvagens subclonadas em *pSP-BT1-YneoIR* para avaliar sua superexpressão em células selvagens de *L. infantum*. Além disso, essas mesmas construções foram transfectadas em células que já continham a construção do gene repórter (subclonados em *pSP72-YHYG-*

atubIR) e que haviam sido selecionadas clonalmente. A expressão das proteínas de ambas as construções plasmidiais foi avaliada por *Western-blot*.

5.5 Cultivo celular e transfecção

As células de *L. infantum* em sua forma promastigota foram cultivadas em meio Schneider com pH 7,2, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB), 0,2 % de hemina e 1 % de penicilina e estreptomicina, sendo repicadas a cada 3 ou 4 dias em tubos cônicos de 15 ml. Para a pré-seleção/seleção e manutenção das linhagens transgênicas foram empregados os antibióticos higromicina (Invitrogen) na concentração de 0,08 mg/ml de meio, puromicina (Sigma) 0,14 mg/ml e neomicina G418 (Sigma) 0,08 mg/ml. O crescimento dos parasitas foi monitorado por contagem em câmara de Neubauer, sendo mantidos em fase exponencial de crescimento por meio de repasses sucessivos.

Para transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos em tubos cônicos de 15 ml. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 5 ml de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM Na_2HPO_4 , 6 mM glicose e pH 7,05) e homogeneizado, seguido de uma nova etapa de centrifugação. Após o descarte do sobrenadante o sedimento foi ressuspendido agora em 400 μl do tampão HEPES-NaCl e transferido para cuvetas de 0,2 mm, as quais continham os cassetes ou plasmídeos em uma quantidade de 2 a 5 μg . Para controle negativo foram adicionados apenas os parasitas a cuveta, sem a presença de DNA. As cuvetas então permaneceram em gelo por 15 minutos e as amostras foram submetidas a eletroporação através do aparelho *BioRad Gene Pulser II* (BioRad), sendo realizados seis pulsos elétricos de 450 V, capacitância de 500 μF , com 200 ms de intervalos e 300 ms de duração. Após os pulsos, o material foi transferido para garrafas de cultura de 50 ml contendo 5 ml meio Schneider pH 7,2 e incubados a 26 °C por 24 horas. A pré-seleção foi realizada adicionando-se metade da concentração padrão dos antibióticos apropriados. A cultura foi então incubada novamente a 26 °C por 24 horas. Após esse período foi realizada a seleção final, onde 0,5 ml das culturas pré-selecionadas foram transferidas para novas garrafas contendo 4,5 ml de meio Schneider pH 7,2, sendo adicionados novamente os antibióticos necessários agora nas concentrações já descritas acima. As culturas

foram incubadas em estufa a 26 °C por aproximadamente 10 a 15 dias ou até apresentarem crescimento celular suficiente para realização de repasses celulares.

Após a realização dos nocautes de cópia única (SKO - *Single Knockout*) foi realizada a seleção clonal dessas linhagens em placas com Schneider sólido contendo higromicina (Invitrogen) na concentração de 0,08 mg/ml de meio. Assim que as colônias de *Leishmania* apresentaram bom crescimento foram realizados inóculos em meio líquido para posterior congelamento. A partir desses clones, foram realizadas as transfecções de complementação, empregando a neomicina G418 (Sigma) na concentração de 0,08 mg/ml de meio, e de duplos nocautes (DKO - *Double Knockout*), utilizando a puomicina (Sigma) na concentração de 0,14 mg/ml de meio.

Além do uso dos antibióticos para seleção, a eficiência das transfecções foi avaliada através de PCRs de confirmação para a PABP1 e por meio de *Southern-blot* para as PABPs 1 e 2, usando DNA genômico, extraído por meio de *DNAzol® Reagent* (Thermo Fisher Scientific) de cada uma das células transfectadas, como molde.

5.6 Obtenção de extrato total e *Western-blot*

Para os experimentos de *Western-blot*, diferentes linhagens de *L. infantum* tiveram seu crescimento acompanhado por cerca de 48 a 72 horas até atingirem 10^7 células/ml e então foram produzidos extratos totais utilizando aproximadamente 2×10^8 células. Essas células foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos e o sedimento lavado com tampão fosfato salino (PBS). Foi realizada nova centrifugação, onde o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10 % SDS, 1 M Tris-HCl, 50 % glicerol, azul de bromofenol, 50 µl/mL de 2-mercaptoetanol, pH 6,8) para concentração final de 5×10^5 células/µl.

Os extratos foram fracionados em SDS-PAGE 15 % (5×10^6 células) e transferidos para membrana de *PVDF Immobilon-P* (Merk Millipore). A membrana foi bloqueada em solução de leite 5,0 % em TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05 %, pH 7,5) a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos correspondentes por um determinado período e titulação, a depender da proteína a ser marcada, em solução de leite 5 % em TBS-Tween 20. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween

20, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase), numa diluição de 1:10000, em solução de leite 5 % em TBS-Tween 20 por uma hora, seguida de três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween 20. A membrana foi então banhada com solução quimioluminescente composta por 25 ml de luminol (1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5), adicionado de iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio para 0,03 %. Após secagem em papel filtro, a membrana foi exposta a filme autorradiográfico e revelada em solução Dektol 1:2 (Kodak®) até saturação, por cerca de 20-60 segundos. A reação foi interrompida com ácido acético, por 1 minuto e fixada em solução fixadora por 2 minutos.

5.7 Southern-blot

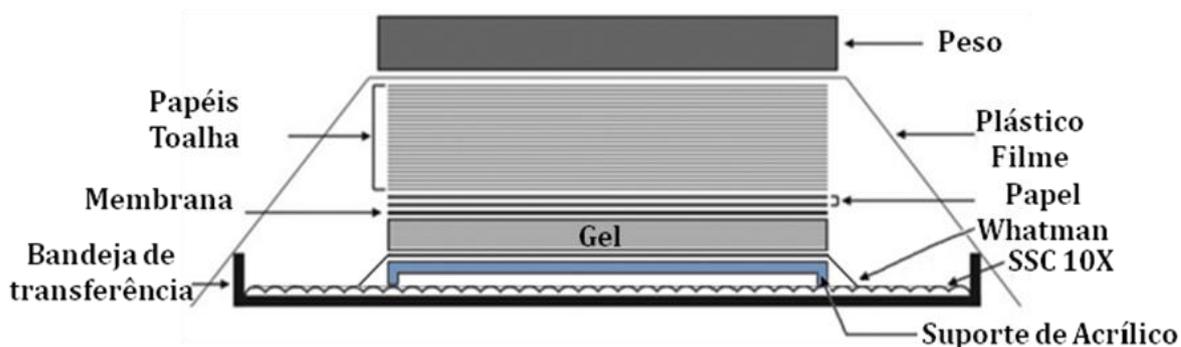
Inicialmente 20 ml dos diversos tipos celulares obtidos para PABP 1 e 2 foram cultivados até atingirem a densidade máxima em crescimento (fase *log*). Foram então centrifugadas a 1000 g por 5 minutos e tiveram seu DNA genômico extraídos empregando o reagente *DNAzol*® (Thermo Fisher Scientific). Em torno de 10 µg de DNA de cada amostra foi digerido com uma única enzima de restrição, gerando assim um perfil único de bandas. Para escolhermos as enzimas de restrição a serem empregadas utilizamos o programa *ApE* (*A plasmid Editor*).

Após a digestão, as amostras foram fracionadas em gel de agarose 1% por um período de 2 a 3 horas (120 V / 150 mA). Após a corrida, o gel foi tratado com HCl 0,25 N (tampão de depurinação), preparado pouco antes de seu uso, durante 10 min sob leve agitação a temperatura ambiente. O DNA foi então desnaturado com tampão alcalino (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) por 30 min. O gel foi então tratado com tampão neutralizante (0.5 M tris HCl pH 7 e 3 M NaCl) por 30 min.

O procedimento de transferência foi feito por capilaridade. Neste a membrana de nitrocelulose (*Hybond-N GE Healthcare*) foi previamente embebida solução de citrato salino padrão ou SSC 1X (*Standard Saline Citrate* - 0.15 M NaCl, 0.015 M citrato trisódio) por 10 min. O aparato de transferência foi montado sobre um suporte de acrílico presente dentro da bandeja de transferência contendo tampão SSC 10X (1,5 M NaCl, 0.150 M citrato trisódio). Sobre o suporte posicionamos um papel *Whatman* (GE Healthcare Life Sciences), de tal forma que, ao final da montagem de todo aparato, suas laterais tocassem o tampão contido na bandeja. Colocamos o gel

sobre o papel *Whatman* com o lado contendo os poços virado para baixo, certificando-se de não haver bolhas dentre o papel *Whatman* e o gel. Pussemos então a membrana previamente embebida sobre o gel e usamos um bastão de vidro para remover as bolhas entre o gel e a membrana. Duas folhas de papel *Whatman* previamente embebidas com tampão foram sobrepostas à membrana e removemos as bolhas presentes. Colocamos então uma pilha de papéis-toalha secos (cortados no tamanho do gel) sobre os papéis *Whatman*. Selamos a bandeja de transferência com plástico filme para evitar a evaporação do tampão durante a transferência. Por fim um peso (aproximadamente 500 g) foi colocado no topo do aparelho de transferência e o deixamos montado sobre uma superfície plana por 24-48 h AA temperatura ambiente (Figura 10).

Figura 10 - Aparato de transferência do *Southern-blot*.



Fonte: Modificado de Cai *et al.* (2013).

Nota: Podemos observar o modo de montagem do aparato de transferência.

Após a realização da transferência por capilaridade os poços foram marcados antes da remoção do gel desidratado. A membrana foi lavada com SSC 2X (0.30 M NaCl, 0.030 M citrato trisódico) e foi secada com folhas de papel *whatman* e então realizamos o *cross-link* do DNA usando luz UV por 30 s em câmara de UV na dosagem de 120 mJ/cm². A membrana foi então guardada a -20 °C.

Fizemos PCRs para amplificação das 5' IRs (como descrito em tópicos anteriores) das PABPs 1 e 2 e os produtos dessas reações foram usados como molde para produção das sondas. Para a realização das sondas empregamos o kit *Prime-a-Gene® Labeling System* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, substituindo a citosina do kit por citosina radioativa (dCTP α -32P/500 μ Ci - 18,5 MBq) (PerkinElmer). Foi feita a pré-hibridização da membrana por 30 min a 65 °C com tampão de hibridização *CHURCH* (0,5 M NaPi - 7% SDS com pH ajustado

em 6,8 com ácido ortofosfórico) e então realizamos a incubação *overnight* a 65 °C da membrana e das sondas radiomarcadas com o mesmo tampão. Após a hibridização fizemos a lavagem com tampão de lavagem *CHURCH* (80 ml NaPi 1 M), sendo duas lavagens por 15 min a temperatura ambiente e duas por 20 min a -65 °C. Por fim, foi realizada a exposição utilizando filme autoradiográfico com intensificador de imagem écran a -80 °C *overnight*.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Não houve manipulação de animais experimentais durante a realização deste projeto. Todos os anticorpos empregados já estavam disponíveis ou eram anticorpos comerciais.

7 RESULTADOS

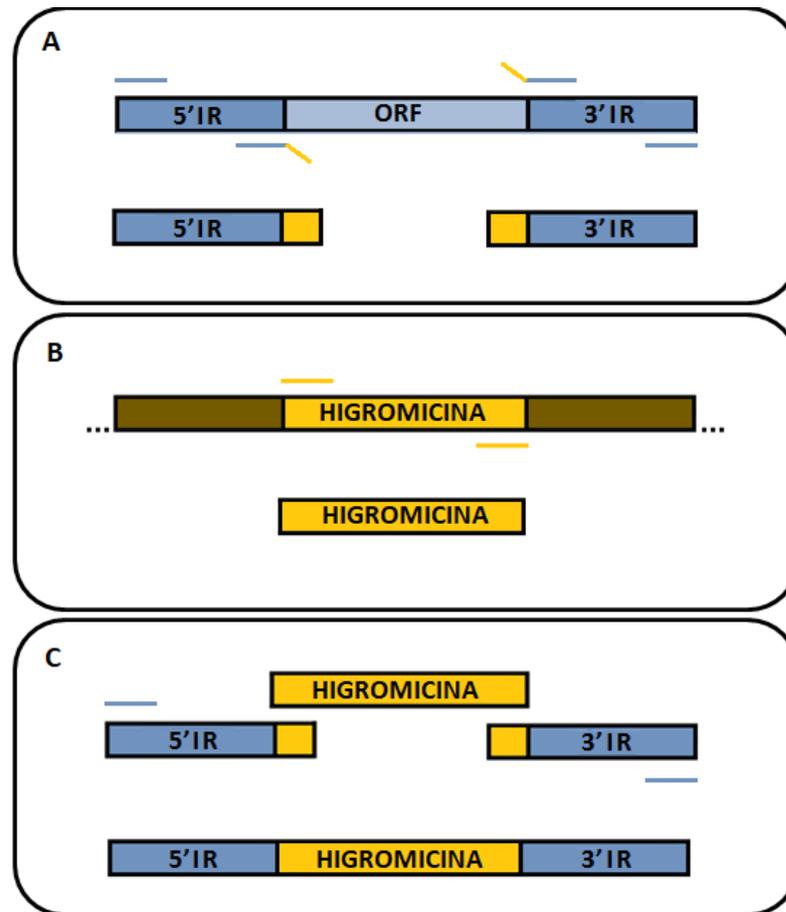
7.1 Avaliação da necessidade das PABPs 2 e 3 para a viabilidade da *L. infantum* em cultura

Apesar da evidente importância em se estudar aspectos diferenciados da biologia básica dos tripanossomatídeos, o que nos auxiliaria no entendimento de sua biologia básica e também dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença em seres humanos e outros organismos, poucos estudos são encontrados a respeito das PABPs nesses organismos e pouco se sabe sobre suas funções, principalmente em relação aos homólogos 2 e 3 de *Leishmania*.

7.1.1 Construção de cassetes para realização de nocautes gênicos das PABPs 2 e 3

Para avaliar a relevância dos genes das PABPs 2 e 3 para a viabilidade celular em *L. infantum* foram realizadas construções destes genes, onde a região codificante foi substituída pelas regiões codificantes dos seguintes genes de resistência a antibióticos: higromicina para o SKO e puromicina para o DKO. Para tal, foi realizado o desenho de *primers* que possibilitassem amplificar aproximadamente 500 pares de bases (bp - *base pair*) (PABP2) e 600 bp (PABP3) das regiões 5' e 3' IRs dos genes codificantes dessas PABPs. Para estas ampliações, e também das sequências codificadoras das marcas de resistência à higromicina e puromicina, foram realizadas reações convencionais de PCR. As ampliações produziram fragmentos de DNA nos tamanhos esperados: 5' IR - 455 bp e 3' IR - 472 bp para o gene *PABP2*; 5' IR - 598 bp e 3' IR - 579 bp para o gene *PABP3*; gene *higromicina* - 1026 bp; gene *puromicina* - 600 bp. Em seguida, foi realizada uma nova etapa de PCR empregada para fundir os fragmentos obtidos, de forma que as IRs 5' e 3' das PABPs 2 e 3 flanqueassem uma das marcas de resistência. Esse tipo de PCR é conhecido como PCR de fusão ou SOE (*Splicing Overlapping Extension*) (Figura 11).

Figura 11 - Representação da PCR de fusão.

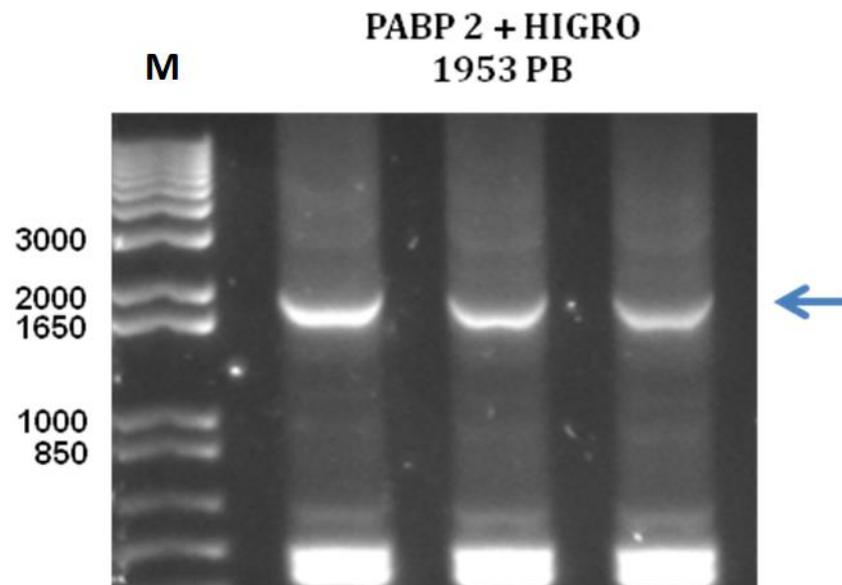


Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: A) Na primeira etapa são produzidos as IRs 5' e 3' com trechos da marca de resistência; B) Na segunda etapa é produzida a marca de resistência; C) Na terceira e última etapa, os produtos de PCR das duas primeiras reações são unidos e amplificados utilizando os primers 5' forward da 5' IR e o 3' reverse da 3' IR.

Após as PCRs de fusão, as amostras foram analisadas em gel de agarose para a constatação da presença de bandas nas alturas esperadas: *PABP2* + *higromicina* - 1953 bp; *PABP2* + *puromicina* - 1527 bp; *PABP3* + *higromicina* - 2203 bp; *PABP3* + *puromicina* - 1777 bp. Produto da *PABP2* + *higromicina* está representado na figura 12.

Figura 12 - PCR de fusão das IRs do gene PABP2 e da região codificante do gene de resistência à higromicina.



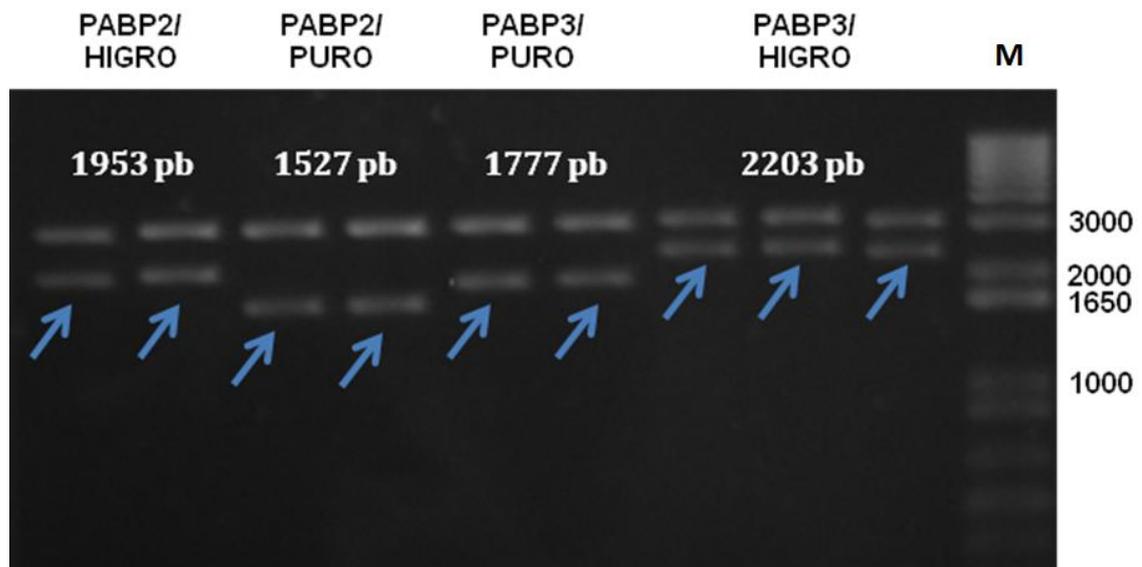
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. A seta azul demonstra a posição do cassete obtido.

Legenda: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega).

Os fragmentos de PCR gerados foram em seguida clonados em vetor plasmidial *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) e sequenciados. Após confirmação das sequências, os plasmídeos resultantes foram digeridos com enzima de restrição *NotI* para liberação das construções que foram utilizadas para realização das transfecções em *L. infantum* (Figura 13).

Figura 13 - Digestão com enzima de restrição *NofI* dos plasmídeos contendo os cassetes para realização das transfecções SKO e DKO das PABPs 2 e 3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. As setas azuis demonstram as posições dos cassetes obtidos.

Legenda: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega).

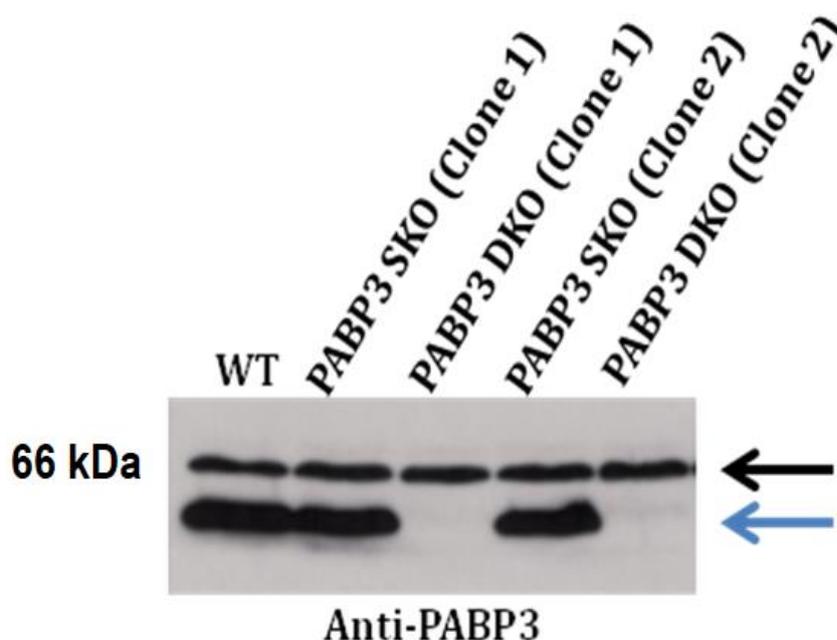
7.1.2 Transfecção e avaliação da viabilidade de *L. infantum* após deleção dos genes codificantes das PABPs 2 e 3.

Para avaliar diretamente a necessidade das PABPs 2 e 3 para a viabilidade de *L. infantum* experimentos de transfecção foram então realizados, onde inicialmente se utilizou as construções geradas com o gene de resistência à higromicina para a deleção da primeira cópia dos genes codificantes de cada proteína. Para ambas foi possível a deleção da primeira cópia dos respectivos genes, gerando linhagens SKO que foram então clonadas para a geração de múltiplos clones SKO para cada proteína. Em seguida, novos eventos de transfecção foram realizados tentando-se gerar linhagens com a deleção da segunda cópia dos respectivos genes (DKO), utilizando-se as construções geradas com o gene de resistência à puromicina.

Para a PABP2 não foi observado crescimento celular após a segunda transfecção, indicando que o DKO não permitiu a sobrevivência das células. Para a PABP3 foram recuperadas células na presença de ambos os antibióticos, higromicina e puromicina, indicando que tanto o SKO quanto o DKO foram viáveis. Para avaliarmos a eficácia dos SKOs e DKOs da PABP3, foram realizados ensaios

de *Western-blot*. Para tal, as diferentes linhagens de *L. infantum* tiveram seu crescimento acompanhado por cerca de 48 a 72 horas e então utilizadas na produção de extratos totais. Foram então realizados ensaios de *Western-blot* para avaliação do SKO e DKO da PABP3 em *L. infantum*. Em conjunto a este ensaio, como o anticorpo policlonal empregado no *Western-blot* contra a PABP3 sabidamente possui marcação cruzada com a PABP2, foi investigado se a deleção da PABP3 implicaria em mudanças no perfil de expressão da PABP2. Os resultados confirmam a presença da PABP3 nos clones SKO, seu desaparecimento nas células submetidas ao DKO e a viabilidade celular sob estas condições. Pode-se demonstrar também que o nocaute de ambas as cópias da PABP3 não influencia no nível de expressão da PABP2 (Figura 14).

Figura 14 - *Western-blot* realizado para avaliar a eficiência do SKO e DKO da PABP3 em *L. infantum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

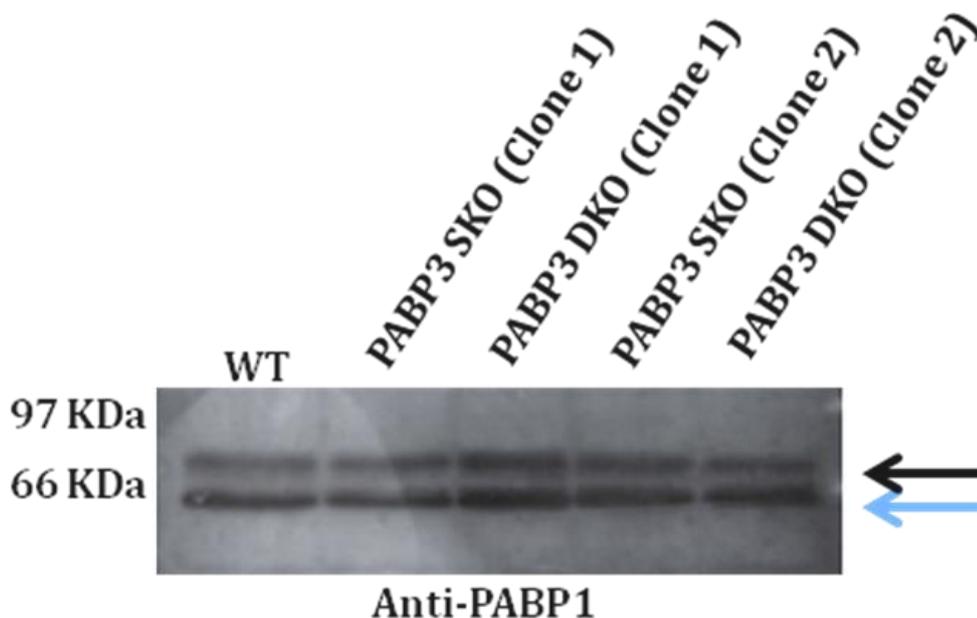
Nota: Foi empregado anticorpo policlonal anti-PABP3 (1:2000) que reconheceu a proteína PABP3 na posição esperada de 60,9 kDa (seta azul), quando presente nos extratos. O reconhecimento cruzado da PABP2 na posição de 65,4 kDa pelo anticorpo empregado está indicado pela seta preta. A numeração à esquerda indica a posição e tamanho (em kDa) do marcador de peso molecular empregado.

Legenda: WT = *Wild Type* *L. infantum* selvagem; SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

Para investigar se a realização do DKO da PABP3 teria alguma influência sobre o perfil de expressão da PABP1, foi realizado também *Western-blot* com o

anticorpo anti-PABP1. O nocaute de ambas as cópias da PABP3 não foi capaz de causar mudanças no nível de expressão da PABP1, tanto para sua forma fosforilada quanto para a não fosforilada (Figura 15).

Figura 15 - Western-blot realizado para avaliar possíveis mudanças no perfil de expressão da PABP1 após realização do SKO e DKO da PABP3 em *L. infantum*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Foi empregado anticorpo policlonal anti-PABP1 (1:2000) que reconheceu a forma não fosforilada da PABP1 na posição esperada de 62,7 kDa (seta azul), bem como sua forma fosforilada de maior peso molecular (seta preta). A numeração à esquerda indica a posição e tamanho (em kDa) do marcador de peso molecular empregado.

Legenda: WT = *Wild Type* *L. infantum* selvagem; SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

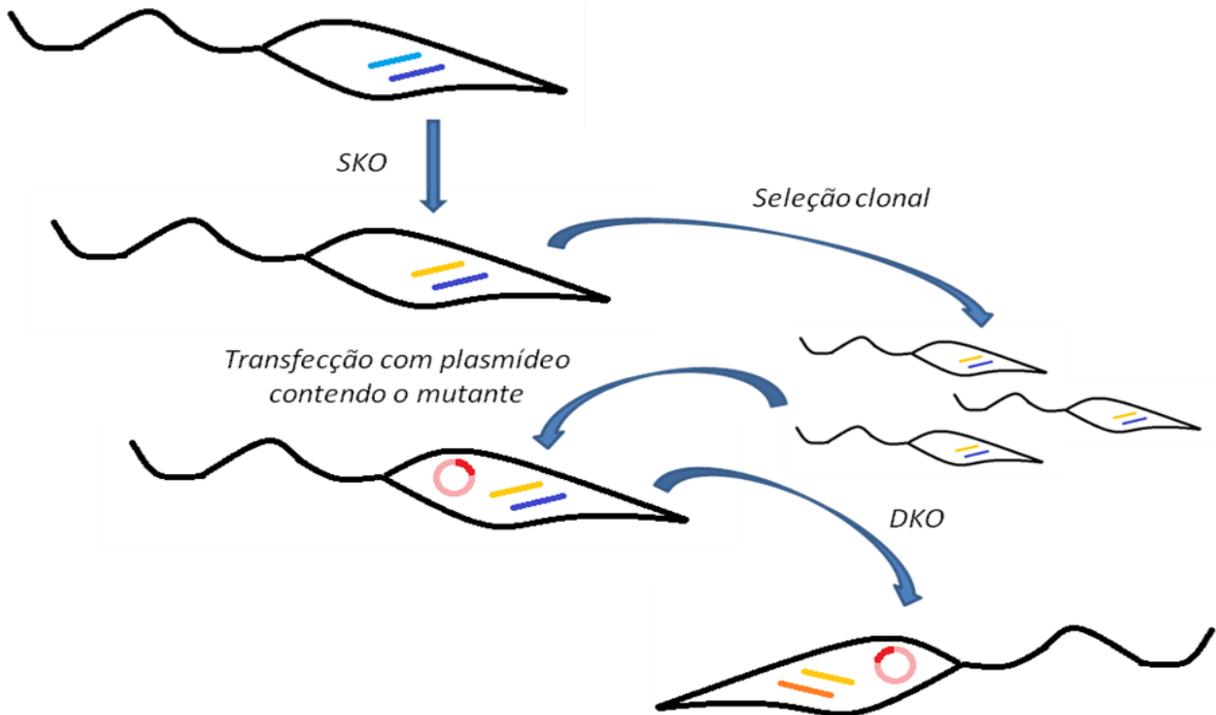
Os resultados alcançados indicam então a essencialidade da PABP2 para a *L. infantum* e confirmam, pela primeira vez, que a PABP3 não é necessária para o crescimento ou viabilidade do parasita, ao menos em sua forma promastigota. Esses resultados sugerem assim que a PABP3 apresenta uma função distinta em relação à PABP1 e um papel de menor relevância em relação à sua parceira PABP2.

7.2 Impacto da fosforilação da PABP1 na sua capacidade de complementar a deleção da proteína endógena

Com relação a PABP1, um primeiro questionamento investigado nesse estudo diz respeito ao impacto de eventos de fosforilação na sua função. A PABP1 é o único homólogo em tripanossomatídeos que apresenta modificações pós-traducionais, possuindo uma forma não fosforilada e outra fosforilada, indicando a existência de uma regulação específica direcionada. Estudos prévios identificaram os sítios alvos dessa fosforilação como motivos do tipo SP ou TP equivalentes aos descritos previamente para o EIF4E4 de *L. infantum* alvo de eventos equivalentes de fosforilação (DE MELO NETO *et al.*, 2015). Como o DKO da PABP1 não é viável a abordagem escolhida para se investigar o papel dessa fosforilação no modo de ação da proteína foi baseada na estratégia de transfecção de complementação utilizando uma proteína mutagenizada por mutagênese dirigida aos sítios de fosforilação.

7.2.1 Descrição do ensaio de complementação

Na complementação, as células selvagens de *L. infantum* são inicialmente transfectadas para obtenção do SKO (transfecção integrativa), com a deleção da primeira cópia do gene *PABP1*. Após esta etapa, é realizada a seleção clonal de células SKO para realização das transfecções de complementação (transfecção episomal) com um plasmídeo expressando a PABP1 recombinante marcada com o epítipo HA. Esta proteína recombinante pode ser idêntica à proteína nativa endógena ou apresentar mutações em motivos específicos, como os sítios de fosforilação. Após a transfecção de complementação as células foram selecionadas e, em seguida, são realizados os DKOs (transfecção integrativa). Caso os mutantes sejam capazes de suprir as necessidades das células (após remoção de ambas as cópias endógenas), as células permanecem vivas e se multiplicam, demonstrando se os mutantes são ou não capazes de complementar a função do gene deletado (Figura 16).

Figura 16 - Estratégia de complementação empregada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Inicialmente a higromicina (em amarelo) é integrada ao genoma da célula, substituindo uma das duas cópias do homólogo da PABP. Em seguida, são realizadas as complementações com os mutantes que são transfectados de maneira episossomal (em rosa e vermelho). Por fim, a puromicina (em laranja) é integrada substituindo a segunda cópia do gene endógeno, permanecendo assim apenas o gene mutado na célula presente no plasmídeo.

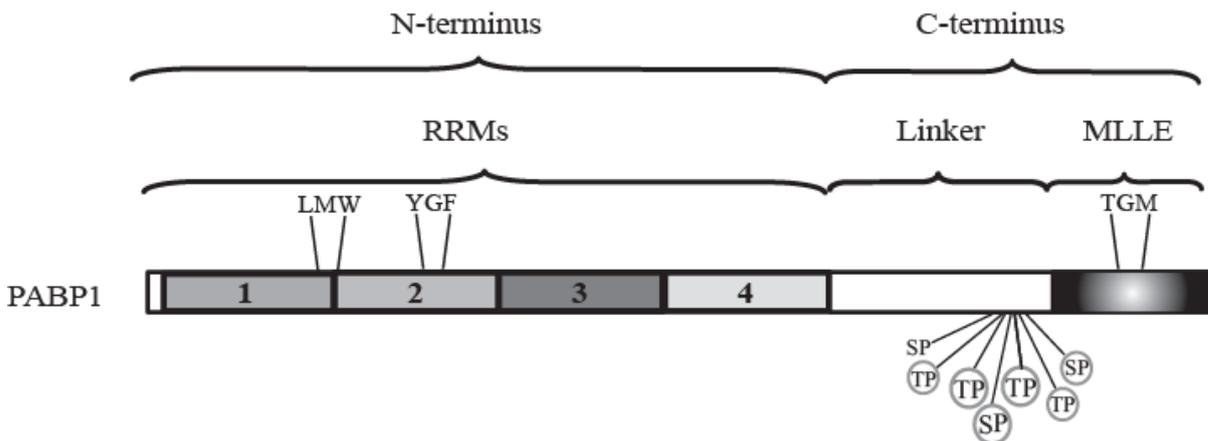
Legenda: SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

7.2.2 Avaliação da expressão do mutante de fosforilação da PABP1 em células submetidas ao duplo nocaute do gene endógeno

O primeiro mutante de PABP1 empregado em nosso estudo foi desenhado para impedir a ocorrência de fosforilação desta proteína, através da substituição de seis dos sete sítios alvos presentes na sua região *linker*, onde duas serinas e quatro treoninas foram substituídas por alaninas (de Melo Neto e colaboradores, resultados prévios) (Figura 17). Este mutante foi avaliado em ensaios de complementação conforme descrito e o crescimento celular após o segundo evento de nocaute da proteína endógena (DKO), na presença do mutante, foi um indicativo de que a proteína mutante era capaz de complementar a ausência da proteína endógena. Este ensaio foi realizado de forma comparativa com a complementação com um plasmídeo contendo o gene selvagem, utilizado como controle positivo do

experimento. Inicialmente fizemos o SKO seguidos pela seleção clonal e em seguida fizemos as complementações com o mutante ou proteína selvagem, por fim, os DKOs para múltiplos clones distintos.

Figura 17 - Representação da localização das mutações realizadas para a PABP1 de *L. infantum*.



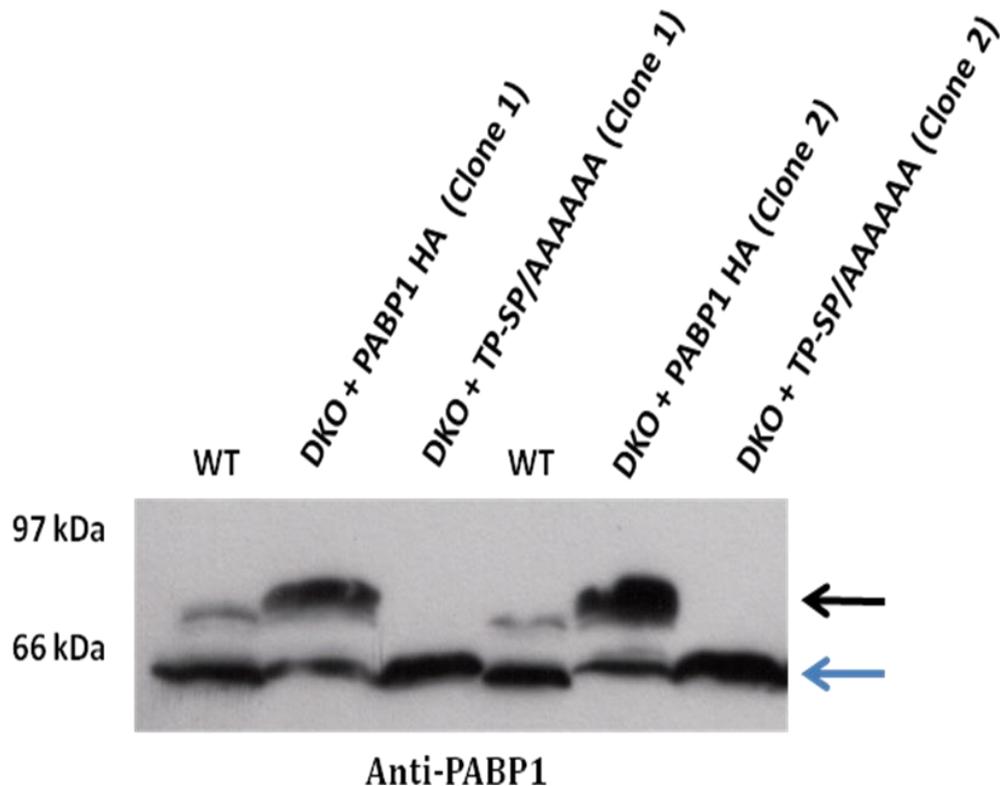
Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Podemos observar a localização das mutações empregadas para construção dos mutantes, bem como a região exclusiva com os motivos de fosforilação (TP-SP) na região *linker* da PABP1. Seis (circulados) dos sete aminoácidos preditos como alvos de eventos de fosforilação foram substituídos por alaninas. Apenas seis aminoácidos foram substituídos por limitação da metodologia empregada.

Legendas: RRM = motivo de reconhecimento de RNA; MLE = domínio da região C-terminal; LMW = leucina-metionina-triptofano; YGF = tirosina-glicina-fenilalanina; TGM = treonina-glicina-metionina; SP = serinas; TP = Treoninas.

Em seguida, confirmamos a capacidade do mutante DKO + TP-SP/AAAAAA (mutante de desfosforilação) da PABP1, em substituir a função do gene endógeno através de *Western-blot* utilizando anticorpo policlonal específico para a PABP1. Os clones carregando o mutante em questão deixaram de expressar a forma fosforilada da PABP1, demonstrado pela ausência da banda mais alta referente à forma fosforilada da proteína (Figura 18).

Figura 18 - *Western-blot* de clones contendo o mutante DKO + TP-SP/AAAAAA (mutante de desfosforilação) da PABP1.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Foi empregado anticorpo policlonal anti-PABP1 (1:1000) que reconheceu a forma não fosforilada da PABP1 na posição esperada de 62,7 kDa (seta azul), bem como sua forma fosforilada de maior peso molecular (seta preta). Podemos observar a forma não fosforilada em todos os extratos. Entretanto, a forma fosforilada está ausente em ambos os clones contendo o mutante DKO + TP-SP/AAAAAA, enquanto que podemos observar sua presença nos extratos de células selvagens de *L. infantum* e no DKO superexpressando a PABP1 selvagem. A numeração à esquerda indica a posição e tamanho (em kDa) do marcador de peso molecular empregado.

Legendas: WT = *Wild Type* *L. infantum* selvagem; SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

7.3 Avaliação do papel de motivos selecionados da PABP1 na manutenção da sua função biológica

7.3.1 Descrição dos motivos mutagenizados

Existem poucos estudos avaliando quais as regiões presentes nos parceiros das PABPs de tripanossomatídeos que participam da interação entre as PABPs e eles, sendo ainda mais escassos na literatura trabalhos avaliando quais as regiões das PABPs envolvidas com tais interações. Como próximo passo de nosso estudo,

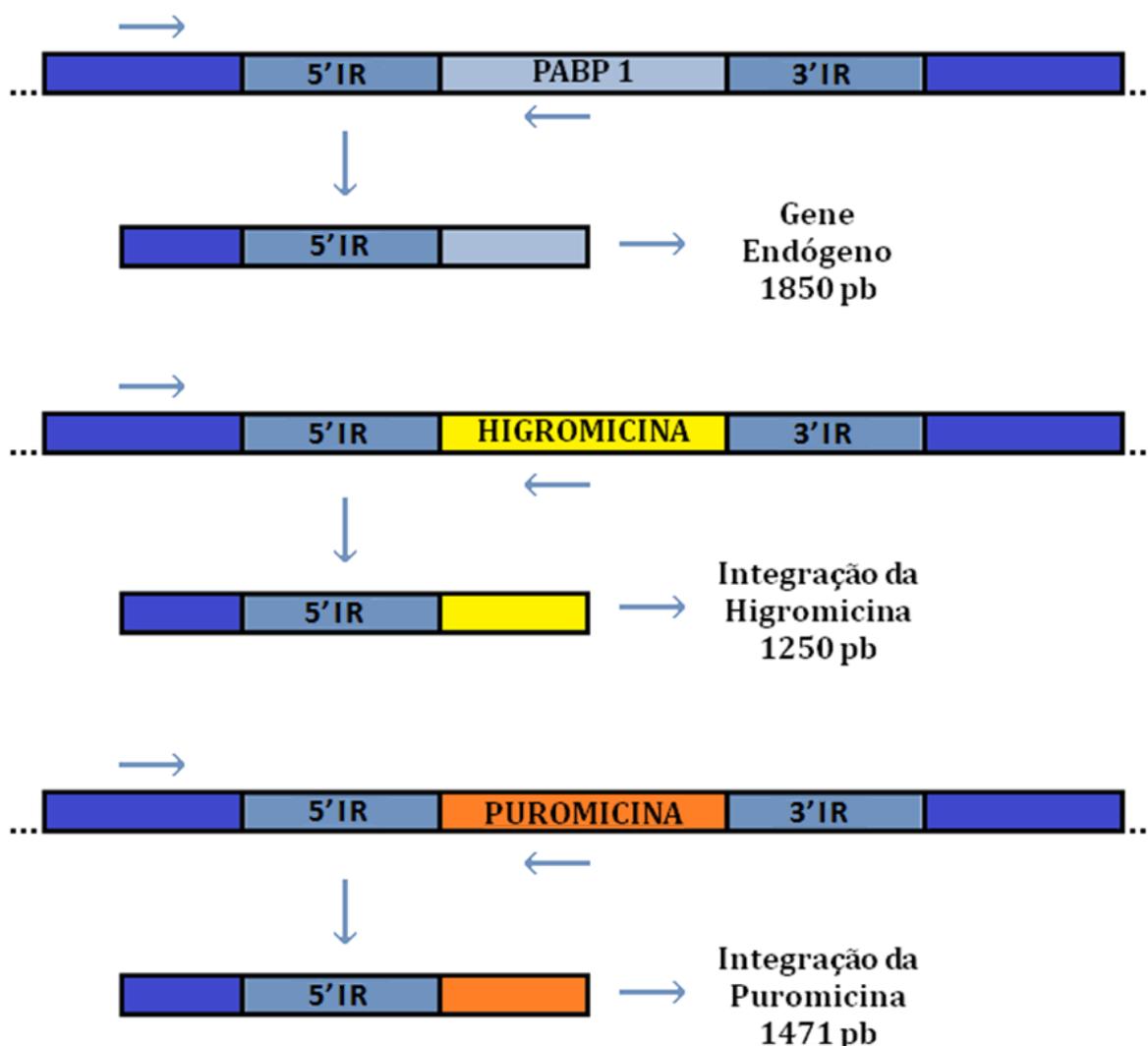
foram avaliados mutantes da PABP1 para as duas regiões principais que compõem as PABPs: região N-terminal onde se encontram os RRM1 a 4 e a região C-terminal MLE (PABC). Trabalhos prévios já haviam identificado motivos potencialmente relevantes para a função da PABP1, construídos por mutagenese sítio dirigida. Três tipos diferentes de mutantes foram gerados, sempre com a substituição dos resíduos selecionados por alaninas e direcionados a motivos identificados como possivelmente relevantes para a função da PABP1, porém não envolvidos com sua fosforilação. O primeiro motivo, leucina-metionina-triptofano (LMW) se localiza em um segmento entre os RRM1 e 2 da PABP1, segmento este que em outros organismos se mostrou mediar a ligação entre a PABP e homólogos de eIF4G e eIF4B (KUHN; WAHLE, 2004). O segundo motivo, a tirosina-glicina-fenilalanina (YGF), é parte do motivo RNP2 de RRM2 e inclui resíduos que foram implicados na ligação e reconhecimento de poli-A (CHENG; GALLIE, 2007). Um terceiro motivo, escolhido por se localizar no centro conservado do domínio MLE, consiste em treonina-glicina-metionina (TGM). Estes três motivos também estão indicados na representação da PABP1 na figura 17.

7.3.2 Avaliação da capacidade de mutantes da PABP1 de complementar a ausência do gene endógeno

Para se avaliar os diferentes mutantes de PABP1, foram realizados novos ensaios de complementação, novamente utilizando como controle positivo o plasmídeo com o gene selvagem. Foram utilizados os mesmos clones SKOs já descritos, seguidos pela complementação com os diferentes mutantes e controles. Após a realização de todas as etapas de transfecções, todos os tipos celulares contendo os mutantes se mostraram viáveis, embora diferenças na velocidade de crescimento foram observadas. Estas diferenças serão adequadamente investigadas a partir de curvas de crescimento em experimentos futuros. A avaliação da eficácia das transfecções foi realizada através de PCRs de confirmação para demonstrar a presença ou não da cópia endógena da PABP1, da integração da higromicina e da puromicina (Figura 19). Estas PCRs foram realizadas com DNA total extraído das culturas de células transfectadas e fazem uso de um *primer* que se anela no gene da PABP1, mas em região externa aquela incluída no fragmento amplificado da região intergênica (5' IR), juntamente com *primers* que se anelam na região codificadora do

próprio gene da PABP1 e dos genes de resistência à higromicina ou puromicina. Desta forma, fragmentos distintos são amplificados em sítios correspondentes ao gene endógeno da PABP1 e aos respectivos genes de resistência a antibióticos, quando presentes.

Figura 19 - Representação das PCRs de confirmação realizadas para PABP1.



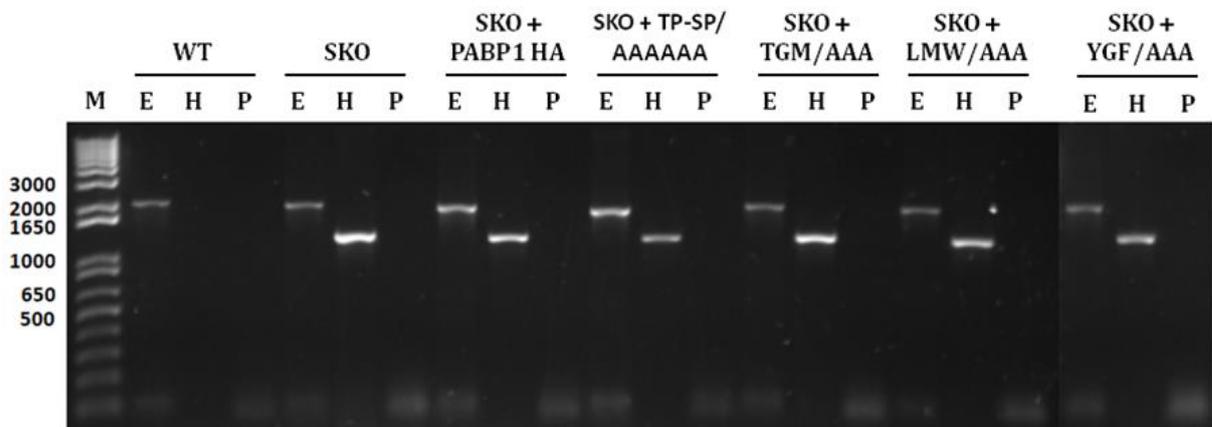
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: observa-se o local de anelamento dos *primers* desenhados para confirmação da presença do gene endógeno, da integração da marca de resistência da higromicina e puromicina, bem como os tamanhos de fragmentos esperados para mutantes da PABP1.

Com a análise em gel dos produtos de PCR amplificados para confirmar os eventos de integração, pode-se observar que as transfecções realizadas foram eficientes e que os cassetes se inseriram no genoma das células da maneira prevista. Demonstrou-se assim ampliações de fragmentos nos tamanhos previstos para confirmação da presença do gene endógeno da PABP1 (1850 bp) e da

integração das marcas de resistência à higromicina (1250 bp) e à puromicina (1471 bp) (Figuras 20 e 21). Podemos confirmar ainda através dos resultados obtidos que houve duplicação do gene endógeno para os mutantes DKO + LMW/AAA e DKO + YFG/AAA, uma vez que mesmo após a inserção do gene de resistência à puromicina, o gene endógeno se manteve presente e foi detectado pela reação de PCR (Figura 21).

Figura 20 - Eletroforese das PCRs de confirmação para *L. infantum* selvagem e SKOs com e sem as complementações com as construções mutantes da PABP1.

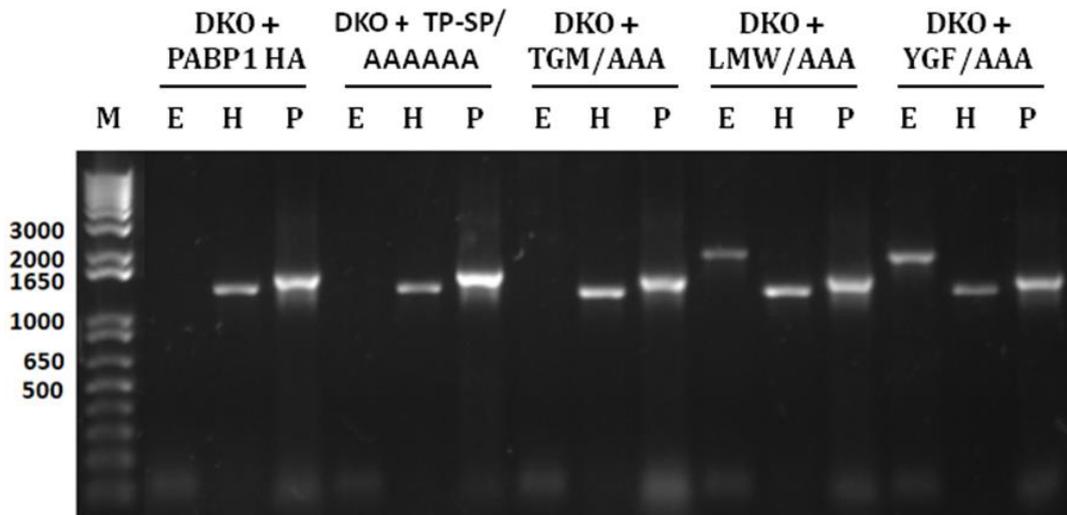


Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Podemos observar a presença do gene endógeno em todos os tipos celulares e a presença da marca de resistência à higromicina em todos os SKOs realizados.

Legendas: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega); WT = Wild Type/ *L. infantum* selvagem; SKO = Single Knockout sem complementação; E = Gene endógeno; H = Gene com marca de resistência à higromicina; P = Gene com marca de resistência à puromicina.

Figura 21 - Eletroforese das PCRs de confirmação para os DKO's da PABP1.



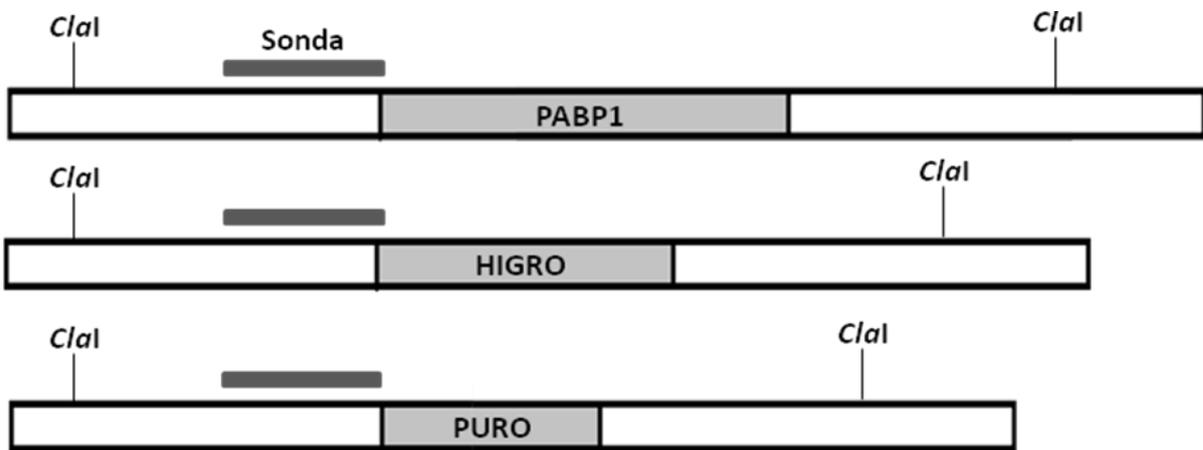
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Podemos observar a presença da marca de resistência à higromicina e puromicina em todos os DKO's realizados, bem como a presença do gene endógeno nos mutantes LMW/AAA e YGF/AAA indicando a ocorrência de duplicação gênica.

Legendas: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega); E = Gene endógeno; H = Gene com marca de resistência à higromicina; P = Gene com marca de resistência à puromicina.

Fizemos também a confirmação e análise dos mutantes da PABP1 através de *Southern-blot* utilizando o mesmo DNA total extraído das culturas de células transfectadas. Para a PABP1 realizamos a digestão com a enzima de restrição *Clal* que libera um perfil de de bandas de aproximadamente 4000 bp para confirmação do gene endógeno, 3350 bp para a marca de resistência à higromicina e 3000 bp para a puromicina, quando se usa como sonda um fragmento gênico equivalente ao segmento da 5' IR da PABP1 originalmente utilizada na construção dos cassetes de deleção gênica (Figura 22).

Figura 22 - Representação do local de atuação da enzima de restrição *Clal* para mutantes da PABP1.

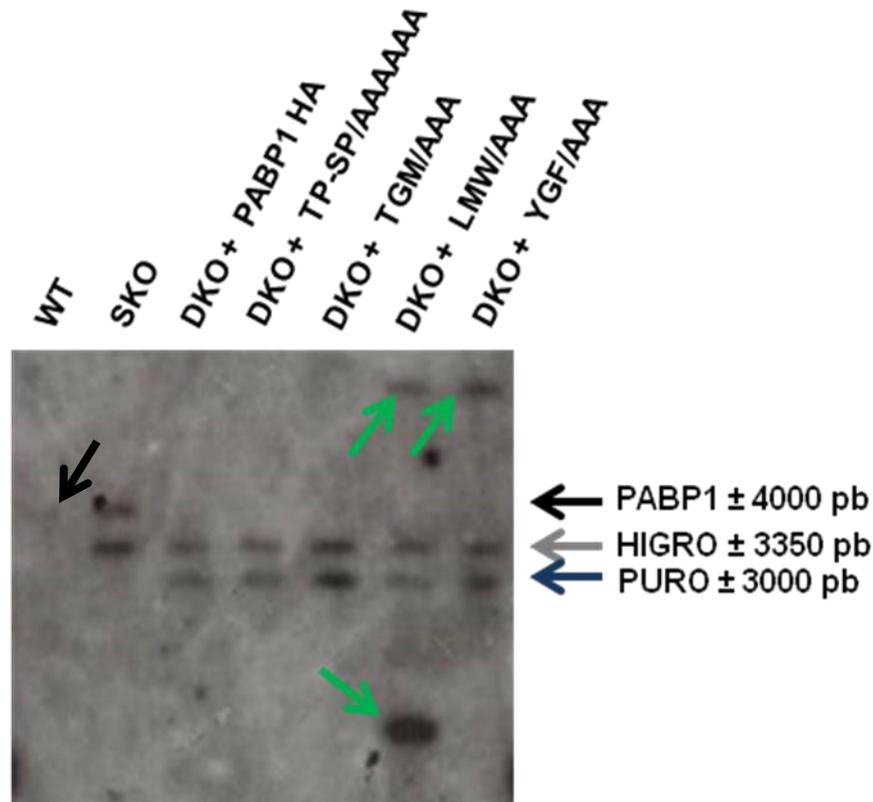


Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: As sondas empregadas foram realizadas usando como molde aproximadamente 500 bp da IR 5' precedendo imediatamente a *ORF* do gene PABP1 ou das marcas de resistência empregadas.

A análise dos resultados para essa técnica sugeriu, novamente, que há indícios de duplicação do gene endógeno para os mutantes DKO + LMW/AAA e DKO + YGF/AAA, pela presença de marcações extras que demonstram a presença de trechos dos fragmentos investigados em outras regiões do genoma, além das que eram esperadas pelo perfil de digestão pela *Clal* (Figura 23).

Figura 23 - *Southern-blot* empregado para análise das transfecções com mutantes da PABP1.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Podemos observar que as células selvagens (WT) apresentam apenas os genes endógenos marcados* com ± 4000 bp (setas pretas), que o SKO apresenta a marcação do gene endógeno e da higromicina com ± 3350 bp (seta cinza), enquanto que todos os DKOs com as construções mutantes apresentam as marcações dos genes de resistência à higromicina e à puromicina com ± 3000 bp (seta azul). Podemos observar a presença de marcações extras (setas verdes) para os mutantes DKO + LMW/AAA e DKO + YGF/AAA, que nos sugerem a ocorrência de duplicação gênica.

*A marcação está menos evidente que as demais, mas está presente.

Legenda: WT = *Wild Type/ L. infantum* selvagem; SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

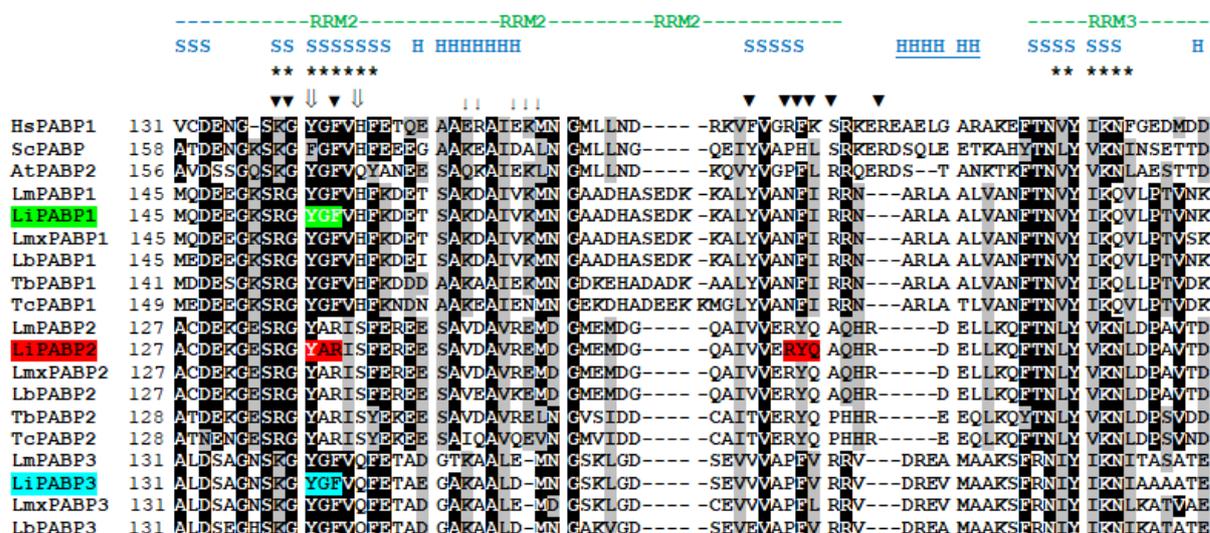
Levando-se em conta os mutantes LMW/AAA (localizado no RRM1) e YGF/AAA (RRM2) da PABP1 pudemos observar que as células submetidas ao DKO, que foram complementadas com as construções mutantes, foram viáveis. Entretanto, através dos resultados obtidos pelas PCRs de confirmação e *Southern-blot* demonstramos que ocorreu duplicação do gene endógeno da PABP1. Esse resultado nos sugere que os motivos LMW e YGF são essenciais para a função desempenhada pela PABP1, uma vez que a viabilidade celular só foi possível através da permanência do gene endógeno em regiões não convencionais no genoma.

7.4 Avaliação do impacto de mutações sobre motivos selecionados da PABP2 na sua capacidade de complementar a deleção da proteína endógena

7.4.1 Seleção das regiões mutagenizadas da PABP2

Visando identificar também na PABP2 motivos críticos para sua função, partiu-se para ensaios de complementação, como realizado para a PABP1. Para isso, inicialmente foi realizada a escolha de resíduos a serem mutagenizados na PABP2. Essa escolha se procedeu pelo conhecimento prévio de algumas regiões tidas como relevantes e também pela comparação das sequências das PABPs de tripanossomatídeos entre si e com outros organismos (Figura 24).

Figura 24 - Alinhamento *ClustalW* comparando as sequências de tripanossomatídeos com homólogos de PABPs de humanos, leveduras e plantas.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

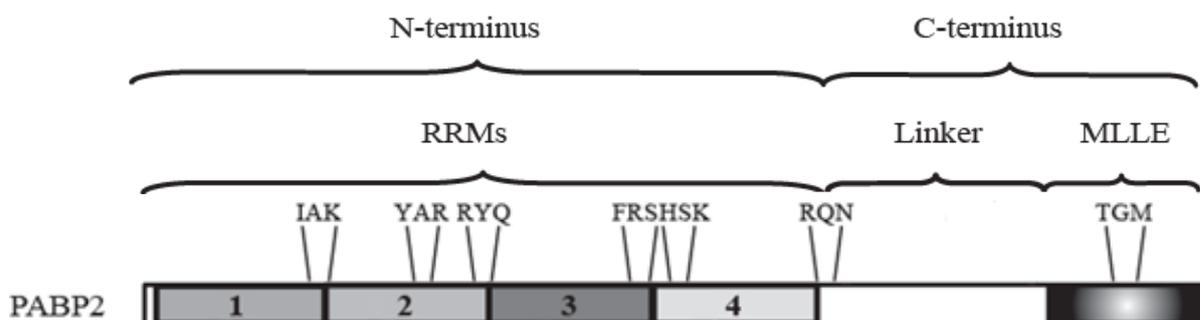
Nota: Podemos observar que existem resíduos conservados e exclusivos para cada um dos homólogos, bem como sequências presentes em ambos os homólogos que estão presentes em regiões consideradas críticas para intermediação de interações com parceiros (não presente no trecho do alinhamento demonstrado). Em destaque estão alguns dos sítios que foram mutagenizados onde podemos observar diferentes aminoácidos em regiões correspondentes para PABP1 (YGF em verde), PABP2 (YAR em vermelho) e PABP3 (RYQ em azul) e regiões únicas como o RYQ na PABP2 (em vermelho).

Legendas: RRM = motivo de reconhecimento de RNA; YGF = tirosina-glicina-fenilalanina; YAR = tirosina-alanina-arginina; RYQ = arginina-tirosina-glutamina; Hs = *Homo sapiens*; Sc = *Saccharomyces cerevisiae*; At = *Arabidopsis thaliana*; Lm = *Leishmania major*; Li = *Leishmania infantum*; Lmx = *Leishmania mexicana*; Lb = *Leishmania braziliensis*; Tb = *Trypanosoma brucei*; Tc = *Trypanosoma cruzi*.

A seleção dos resíduos a serem mutagenizados na PABP2 foi baseada naqueles sabidamente envolvidos com propriedades importantes da proteína e/ou selecionados com base em características previstas como relevantes, seja por

mediarem interação proteína/proteína, proteína/RNA ou serem possíveis sítios de localização nuclear. Alguns dos resíduos foram escolhidos por estarem presentes em regiões divergentes nos homólogos de PABPs de tripanossomatídeos e identificados após o alinhamento e comparação das suas sequências. Ao mesmo tempo levaram-se em conta também os resíduos mutagenizados na PABP1 e que tiveram maior resultado no experimento de complementação. Ao todo foram construídos sete mutantes para a PABP2, nas suas duas regiões principais, N-terminal e C-terminal: isoleucina-alanina-lisina (IAK), tirosina-alanina-arginina (YAR), arginina-tirosina-glutamina (RYQ), fenilalanina-arginina-serina (FRS), histidina-serina-lisina (HSK), arginina-glutamina-asparagina (RQN) e treonina-glicina-metionina (TGM). Destes, um motivo escolhido por se localizar no centro conservado do domínio MLLE, consiste no TGM, e é o único encontrado na PABP1. Todas as regiões mutagenizadas continham três pares de bases, onde os aminoácidos originais foram substituídos por três alaninas (AAA) (Figura 25). A partir desses dados, fizemos o desenho dos *primers* necessários para a obtenção das mutações nas regiões selecionadas.

Figura 25 - Representação da localização das mutações realizadas para a PABP2 de *L. infantum*.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

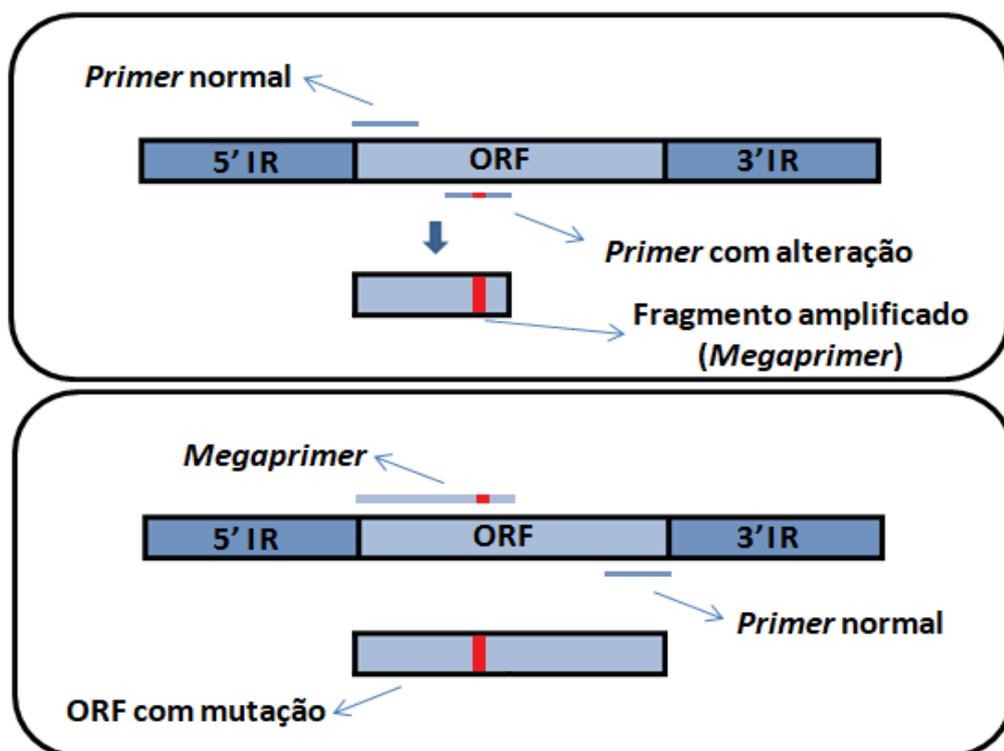
Nota: Podemos observar a localização de alguns dos mutantes identificados em regiões exclusivas da PABP2, como os mutantes RYQ, FRS, HSK e RQN.

Legendas: RRM = motivo de reconhecimento de RNA; MLLE = domínio da região C-terminal; IAK = isoleucina-alanina-lisina; YAR = tirosina-alanina-arginina; RYQ = arginina-tirosina-glutamina; FRS = fenilalanina-arginina-serina; HSK = histidina-serina-lisina; RQN = arginina-glutamina-asparagina; TGM = treonina-glicina-metionina.

7.4.2 Geração dos mutantes no gene codificante da PABP2

As diferentes mutagêneses do gene da PABP2 foram realizadas por meio de PCRs fazendo uso de *primers* desenhados especificamente para este fim. Inicialmente foram realizadas PCR convencionais (protocolo já descrito anteriormente) utilizando *primers* que, ao final da amplificação, produziram fragmentos de tamanho variado (de acordo com os mutantes) que apresentaram a mutação de interesse. Esses fragmentos são denominados de *megaprimers*. Os *megaprimers* foram então purificados e utilizados como *primers forward* ou *reverse* em novas etapas de PCR que produziram os mutantes finais (Figura 26).

Figura 26 - Representação do processo de mutagênese empregado.

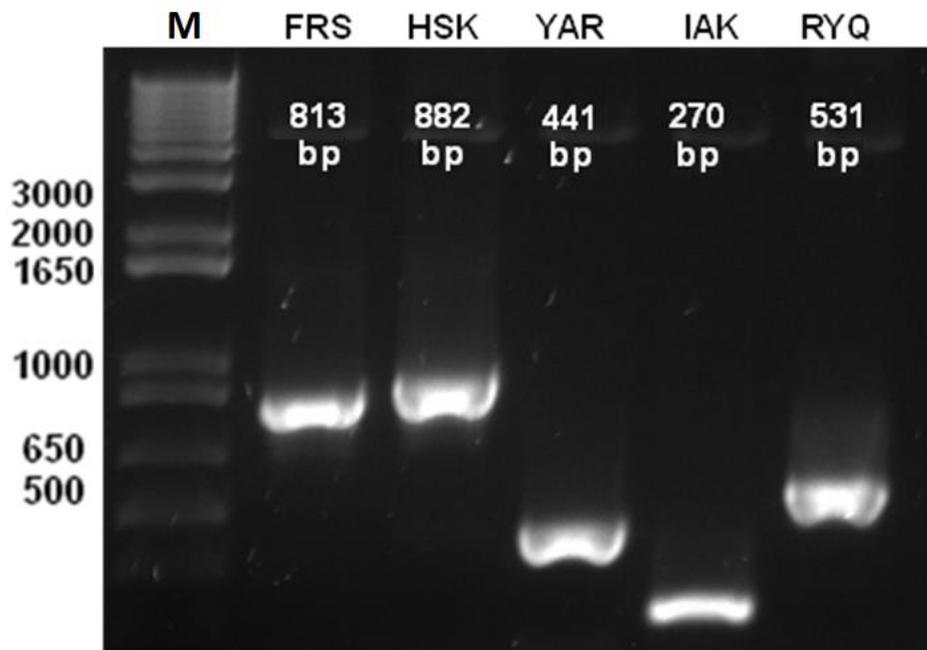


Fonte: elaborado pelo autor.

Nota: Inicialmente é realizada a amplificação do *megaprimer* que é purificado e empregado como *primer* na reação seguinte, onde finalmente é obtida a ORF completa do gene com a mutação inserida.

Fizemos as PCRs de amplificação dos *megaprimers* para os mutantes da PABP2, que produziram fragmentos nos tamanhos esperados, como demonstrado na figura 27, onde obtivemos os *megaprimers* para os mutantes FRS (813 bp), HSK (882 bp), YAR (441 bp), IAK (270 bp) e RYQ (531 bp).

Figura 27 - PCRs para ampliações de *megaprimers* de mutantes da PABP2.



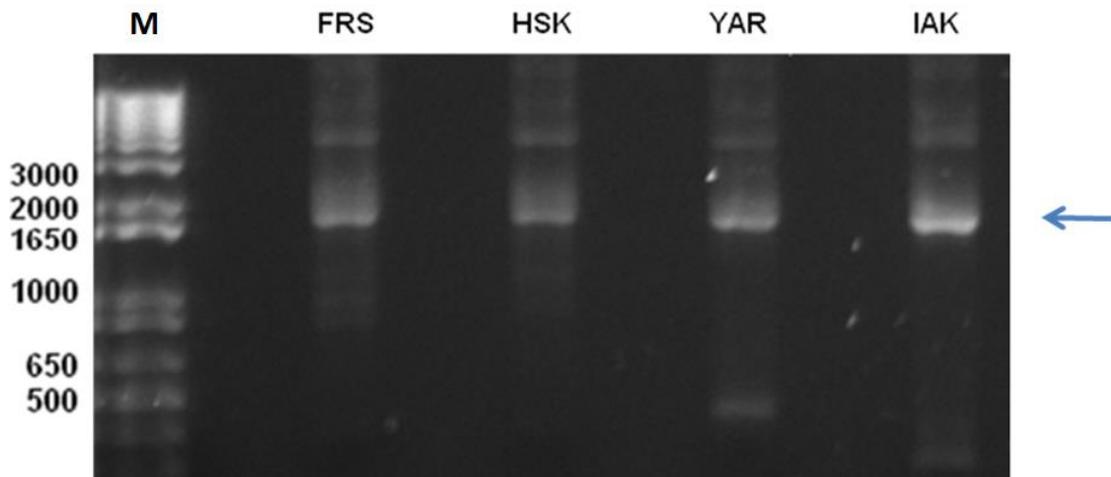
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Podemos observar a amplificação dos fragmentos nos tamanhos esperados.

Legendas: M = Marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Promega); FRS = fenilalanina-arginina-serina; HSK = histidina-serina-lisina; YAR = tirosina-alanina-arginina; IAK = isoleucina-alanina-lisina; RYQ = arginina-tirosina-glutamina.

Os cassetes dos mutantes da PABP2, obtidos através da segunda etapa de PCR empregando os *megaprimers*, apresentaram o tamanho esperado de 1767 bp (Figura 28).

Figura 28 - PCRs para amplificação final dos cassetes contendo os genes mutantes da PABP2.



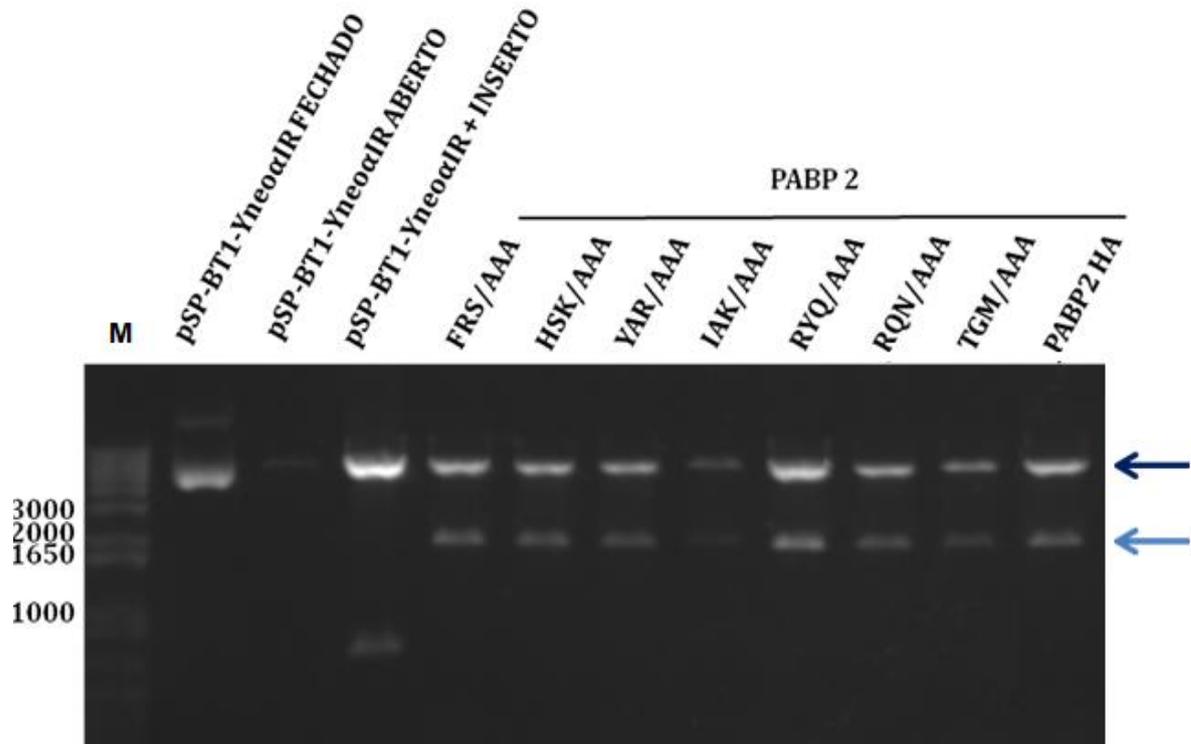
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Podemos observar a amplificação dos fragmentos no tamanho esperado de 1767 bp (seta azul).

Legendas: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega); FRS = fenilalanina-arginina-serina; HSK = histidina-serina-lisina; YAR = isoleucina-alanina-lisina; IAK = isoleucina-alanina-lisina.

Os cassetes mutantes da PABP2 foram então clonados em plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) e sequenciados. Após confirmação das sequências, esses plasmídeos foram digeridos com enzimas *Bam*HI e *Hind*III para liberação dos mutantes que foram subclonados no plasmídeo *pSP-BT1-Yneo*IR. Os mutantes subclonados foram então digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e aqueles que liberaram fragmentos no tamanho esperado de 1767 bp foram enviados para sequenciamento (Figura 29). Confirmadas as sequências, estes cassetes foram preparados para a realização das transfecções.

Figura 29 - Digestão dos mutantes contruidos para a PABP2 subclonados em *pSP-BT1-Yneo α IR*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Todos os mutantes contruidos foram digeridos e liberaram os fragmentos nos tamanhos esperados de 1767 bp (azul claro). Também foram analisados os plasmídeos fechado, aberto e aberto contendo um inserto qualquer como controles. A banda mais alta corresponde ao plasmídeo *pSP-BT1-Yneo α IR* isoladamente com aproximadamente 5951 bp (seta azul escuro).

Legendas: M = Marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Promega); FRS = fenilalanina-arginina-serina; HSK = histidina-serina-lisina; YAR = tirosina-alanina-arginina; IAK = isoleucina-alanina-lisina; RYQ = arginina-tirosina-glutamina; RQN = arginina-glutamina-asparagina; TGM = treonina-glicina-metionina.

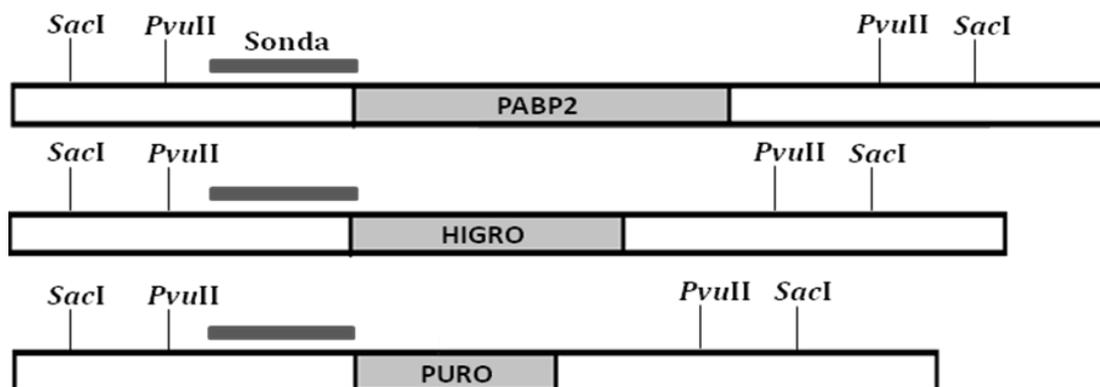
7.4.3 Ensaios de complementação e avaliação dos mutantes da PABP2 quanto à funcionalidade da proteína

Como descrito para a PABP1, para os ensaios de complementação, fizemos primeiro os SKOs da PABP2 seguidos pela seleção clonal. Após esta etapa fizemos as complementações com os mutantes e, por fim, os DKOs, sendo cada complementação realizada para dois clones distintos de SKO da PABP2. Após a realização de todas as etapas de transfecções, todos os tipos celulares contendo os mutantes se mostraram viáveis, exceto o DKO + TGM/AAA. Nesse caso, não conseguimos obter células viáveis pela realização do DKO, mesmo após inúmeras tentativas com clones distintos. No caso dos demais mutantes, diferenças na

velocidade de crescimento foram ainda observadas e serão adequadamente investigadas a partir de curvas de crescimento em experimentos futuros.

Para os seis mutantes onde se obteve crescimento da *L. infantum* após o segundo nocaute, fizemos a confirmação e análise da deleção dos genes da PABP2 através de *Southern-blot*, novamente como descrito para a PABP1. Nesse caso, realizamos digestões com as enzimas de restrição *PvuII* ou *SacI* que liberam, respectivamente, perfis de bandas de aproximadamente 3266 e 4342 bp para confirmação do gene endógeno, 2534 e 3610 bp para a marca de resistência à higromicina e 2108 e 3184 bp para a puromicina (Figura 30). A sonda utilizada nestes experimentos foi novamente a região 5' IR utilizada na construção dos cassetes de nocaute.

Figura 30 - Representação do local de atuação das enzimas de restrição *SacI* e *PvuII* para mutantes da PABP2.



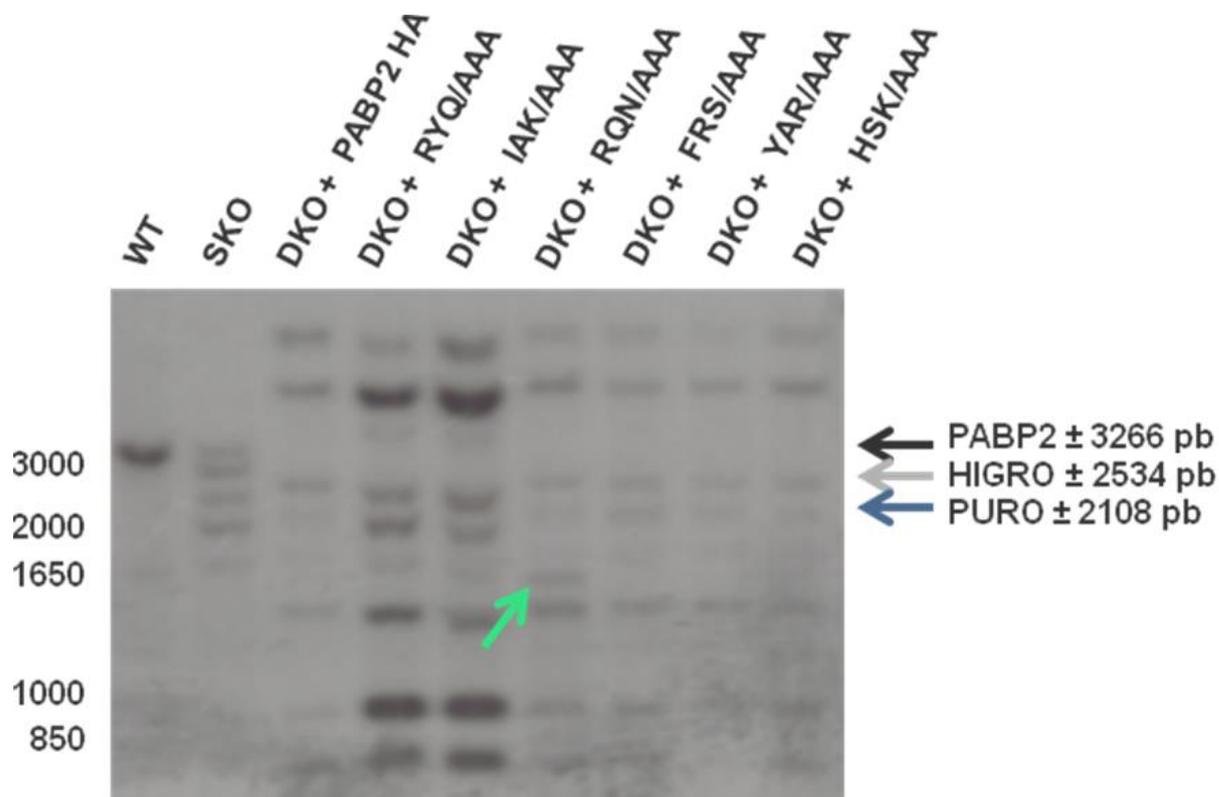
Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: As sondas empregadas foram realizadas usando como molde aproximadamente 500 bp da IR 5' precedendo imediatamente a ORF do gene PABP2 ou das marcas de resistência empregadas.

Após a revelação do filme autorradiográfico pudemos observar um perfil complexo e pouco claro para o experimento com a digestão com a enzima *PvuII* (Figura 31), mas a digestão com a enzima *SacI* (Figura 32) foi de mais fácil compreensão. A conclusão desses experimentos é que há indícios da presença do gene endógeno com o mutante RQN/AAA mesmo após o duplo nocaute. Neste, a presença de marcação adicional para o gene endógeno, além daquelas esperadas para higromicina e puromicina, pelo perfil de digestão pelas enzimas *PvuII* e, principalmente, a *SacI*, sugerem a ocorrência de eventos de duplicação gênica. Em relação aos demais mutantes avaliados para a PABP2, os mutantes IAK/AAA

(RRM1) e YAR/AAA (RRM2) da PABP2 permitiram o nocaute duplo e geraram culturas viáveis sem a indicação de ocorrência de duplicação do gene endógeno. Isso nos indica que as mesmas regiões tidas como críticas para a função da PABP1 não apresentam a mesma importância para a PABP2. Da mesma forma, os experimentos de complementação com os mutantes RYQ/AAA (localizado na parte final do RRM2); FRS/AAA (localizado na parte final do RRM3) e HSK/AAA (domínio presente entre os RRM3 e 4), todos geraram culturas viáveis sem a presença do gene endógeno. Novamente estes resultados indicam que os motivos RYQ, FRS e HSK não são críticos para a função da PABP2.

Figura 31 - Southern-blot empregado para análise das transfecções com mutantes da PABP2 após digestão com *PvuII*.

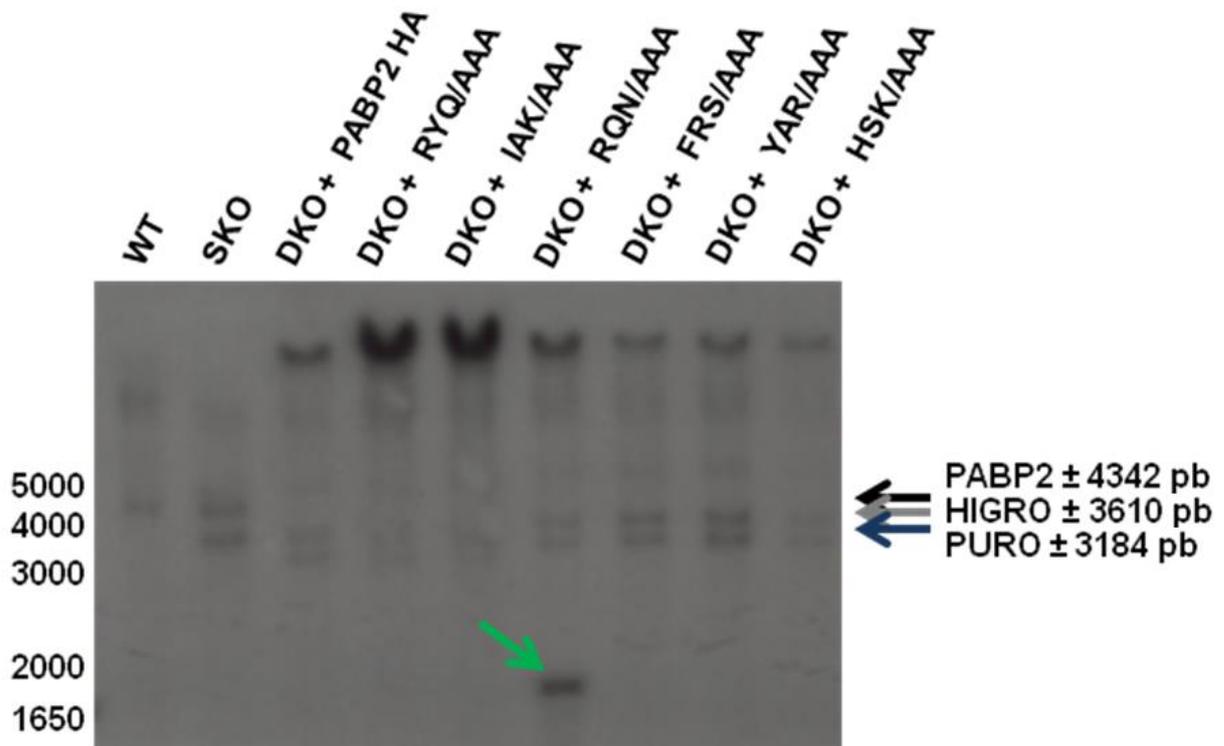


Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Podemos observar que células selvagens (WT) apresentam apenas os genes endógenos marcados com ± 3266 bp (seta preta), que o SKO apresentam a marcação do gene endógeno e da higromicina com ± 2534 bp (seta cinza), enquanto que todos os DKOs com as construções mutantes apresentam as marcações dos genes de resistência à higromicina e à puromicina com ± 2108 bp (seta azul). Podemos observar a presença de marcação extra (seta verde) para o mutante DKO + RQN/AAA, que nos sugere a ocorrência de duplicação gênica.

Legenda: WT = *Wild Type*/ *L. infantum* selvagem; SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

Figura 32 - *Southern-blot* empregado para análise das transfecções com mutantes da PABP2 após digestão com *SacI*.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Podemos observar que células selvagens (WT) apresentam apenas os genes endógenos marcados com ± 4342 bp (seta preta), que o SKO apresentam a marcação do gene endógeno e da higromicina com ± 3610 bp (seta cinza), enquanto que todos os DKOs com construções mutantes apresentam as marcações das marcas de resistência à higromicina e à puromicina com ± 3184 bp (seta azul). Podemos também observar a presença de marcação extra (seta verde) para o mutante DKO + RQN/AAA, que nos sugere a ocorrência de duplicação gênica.

Legenda: WT = *Wild Type/ L. infantum* selvagem; SKO = *Single Knockout*; DKO = *Double Knockout*.

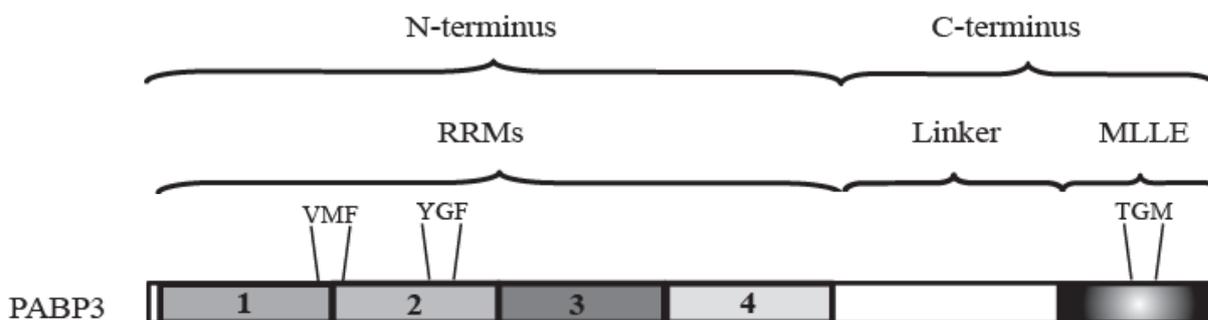
7.5 Avaliação de mutações sobre motivos selecionados da PABP3 na sua expressão em *L. infantum*

7.5.1 Seleção das regiões mutagenizadas da PABP3

Em seguida foi realizada a escolha de resíduos a serem mutagenizados na PABP3, visando novamente identificar motivos críticos para sua função a despeito de não ser possível realizar o ensaio de complementação com esta proteína, por não ser essencial para a viabilidade do parasita. Ao todo foram construídos três mutantes para a PABP3, direcionados a motivos equivalentes àqueles testados para a PABP1 (VMF/AAA, YGF/AAA e TGM/AAA). A escolha dos motivos equivalentes aos da PABP1 se deu por conta da mutação em um destes motivos na PABP1 (o motivo YGF) induzir um efeito dominante negativo no crescimento do parasita e que

foi eliminado na presença de mutação em um segundo motivo (TGM), indicando sinergismo de função entre eles (de Melo Neto *et al.*, comunicação pessoal). As posições dos motivos selecionados estão ilustradas na figura 33.

Figura 33 - Representação da localização das mutações realizadas para a PABP3 de *L. infantum*.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

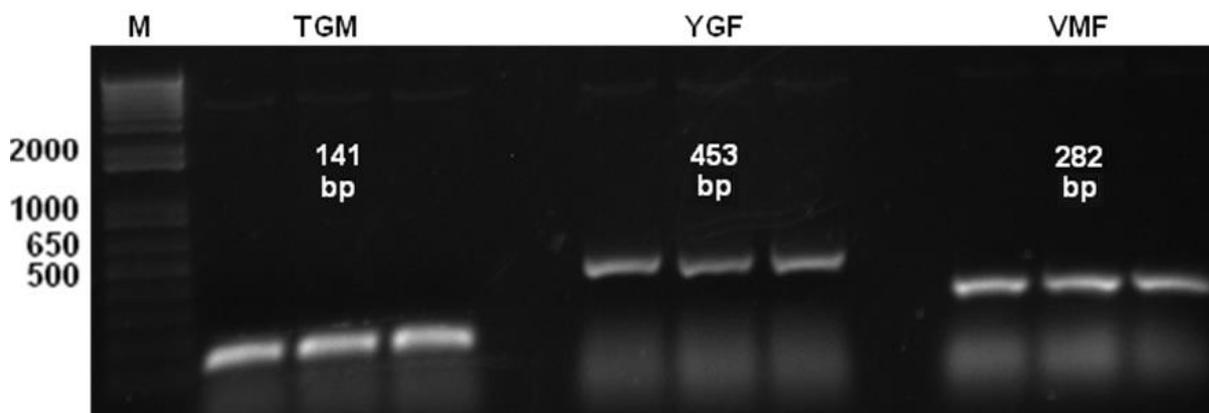
Nota: Podemos observar que nas regiões equivalentes dos RRM 1 e 2 a PABP3 apresenta resíduos distintos em relação às PABPs 1 e 2, enquanto que ocorre a conservação do domínio TGM nos três homólogos.

Legendas: RRM = motivo de reconhecimento de RNA; MLE = domínio da região C-terminal; VMF = valina-metionina-fenilalanina; YGF = tirosina-glicina-fenilalanina; TGM = treonina-glicina-metionina.

7.5.2 Geração dos mutantes no gene codificante da PABP3

A abordagem para a geração dos mutantes da PABP3 foi equivalente a descrita para a PABP2. Desta forma, PCRs para amplificação dos *megaprimers* para mutagênese do gene da PABP3 produziram fragmentos nos tamanhos esperados, como demonstrado na figura 34, onde obtivemos os *megaprimers* para os mutantes TGM (141 bp), YGF (453 bp) e VMF (282 bp).

Figura 34 - PCRs de amplificação dos *megaprimers* de mutantes da PABP3.



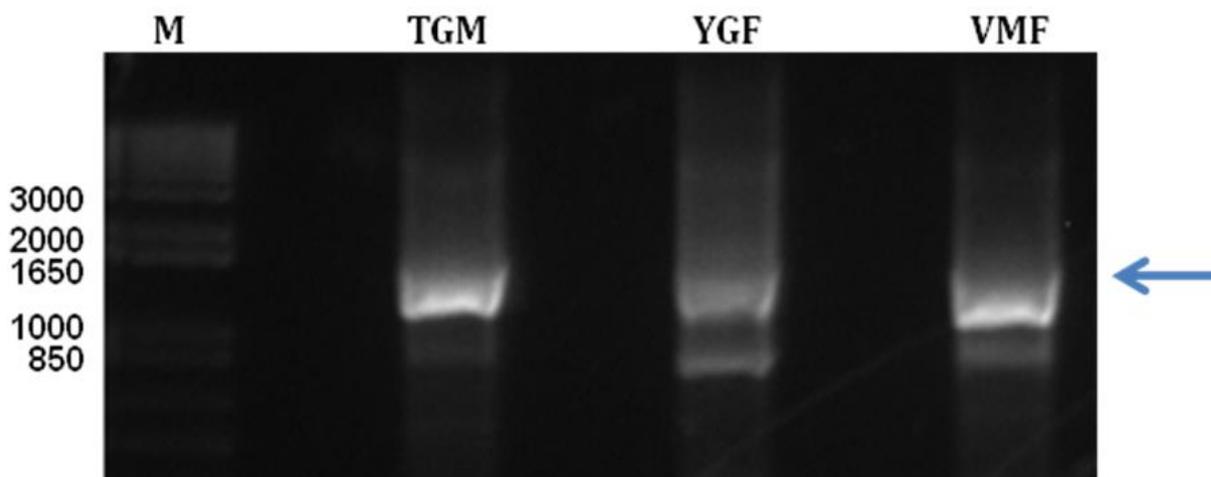
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Podemos observar a amplificação dos fragmentos nos tamanhos esperados.

Legendas: M = Marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Promega); TGM = treonina-glicina-metionina; YGF = tirosina-glicina-fenilalanina; VMF = valina-metionina-fenilalanina.

Os cassetes dos mutantes de PABP3, obtidos através da segunda etapa de PCR empregando os *megaprimers*, apresentaram o tamanho esperado de 1644 bp (Figura 35).

Figura 35 - PCRs para amplificação final dos cassetes contendo os genes mutantes da PABP3.



Fonte: Elaborado pelo autor.

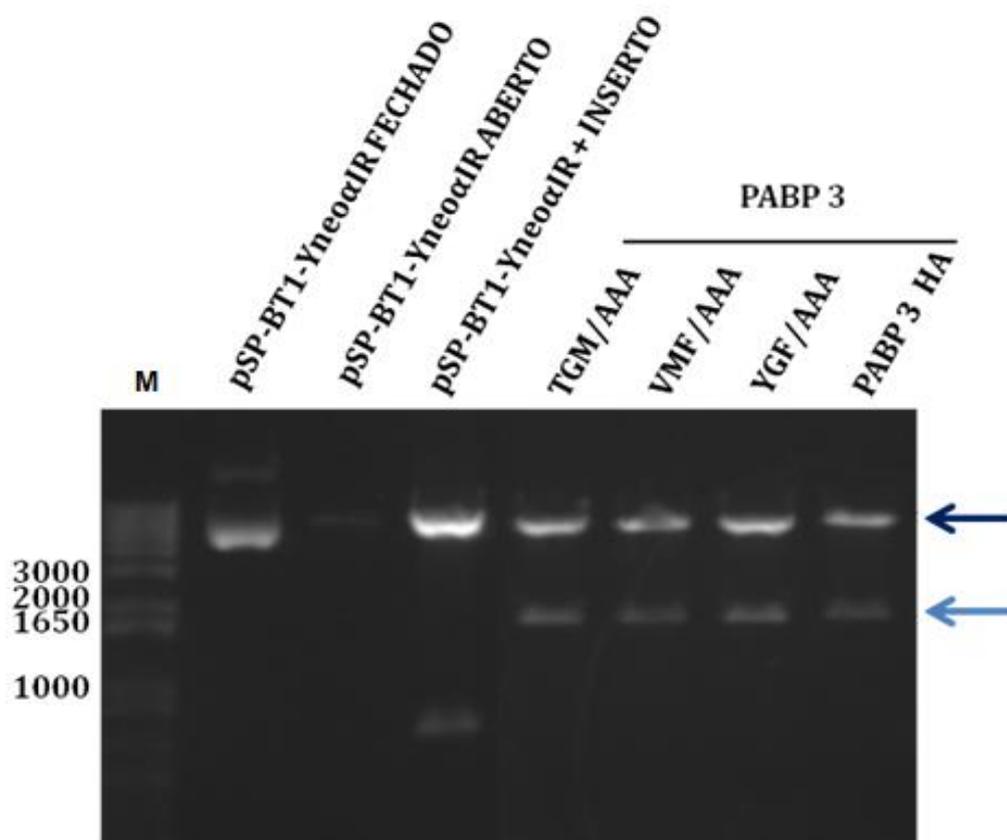
Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Podemos observar a amplificação dos fragmentos no tamanho esperado de 1644 bp (seta azul).

Legendas: M = Marcador de peso molecular *1 Kb DNA Ladder* (Promega); TGM = treonina-glicina-metionina; YGF = tirosina-glicina-fenilalanina; VMF = valina-metionina-fenilalanina.

Os cassetes mutantes da PABP3 foram em seguida clonados em plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega) e sequenciados. Após confirmação das

sequências, esses plasmídeos foram digeridos com enzimas *Bam*HI e *Hind*III para liberação dos mutantes que foram subclonados no plasmídeo *pSP-BT1-YneoαIR*. Os mutantes subclonados foram então digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e aqueles que liberaram bandas no tamanho esperado de 1644 bp foram enviados para sequenciamento (Figura 36). Confirmadas as sequências, os cassetes produzidos foram preparados para a realização das transfecções.

Figura 36 - Digestão dos mutantes contruídos para a PABP3 subclonados em *pSP-BT1-YneoαIR*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. Todos os mutantes contruídos foram digeridos e liberaram os fragmentos nos tamanhos esperados de 1644 bp (azul claro). Também foram analisados os plasmídeos fechado, aberto e aberto contendo um inserto qualquer como controles. A banda mais alta corresponde ao plasmídeo *pSP-BT1-YneoαIR* isoladamente com aproximadamente 5951 bp (seta azul escuro).

Legendas: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega); TGM = treonina-glicina-metionina; VMF = valina-metionina-fenilalanina; YGF = tirosina-glicina-fenilalanina.

7.5.3 Transfecção e expressão dos mutantes da PABP3 em *L. infantum*

Para a PABP3, diferentemente do que foi realizado para as PABPs 1 e 2, apenas realizamos os SKOs, seguidos pela seleção clonal, e então foram realizadas as transfecções dos SKOs com os mutantes e a proteína controle não mutada, para dois clones cada. Por se tratar de uma proteína não essencial, não se realizou a transfecção posterior para obtenção de DKOs. Todos os tipos celulares se mostraram viáveis sob condições de superexpressão dos mutantes empregados e as linhagens geradas devem ser usadas em experimentos futuros para se monitorar eventuais alterações de crescimento celular, como observadas para alguns dos mutantes da PABP1.

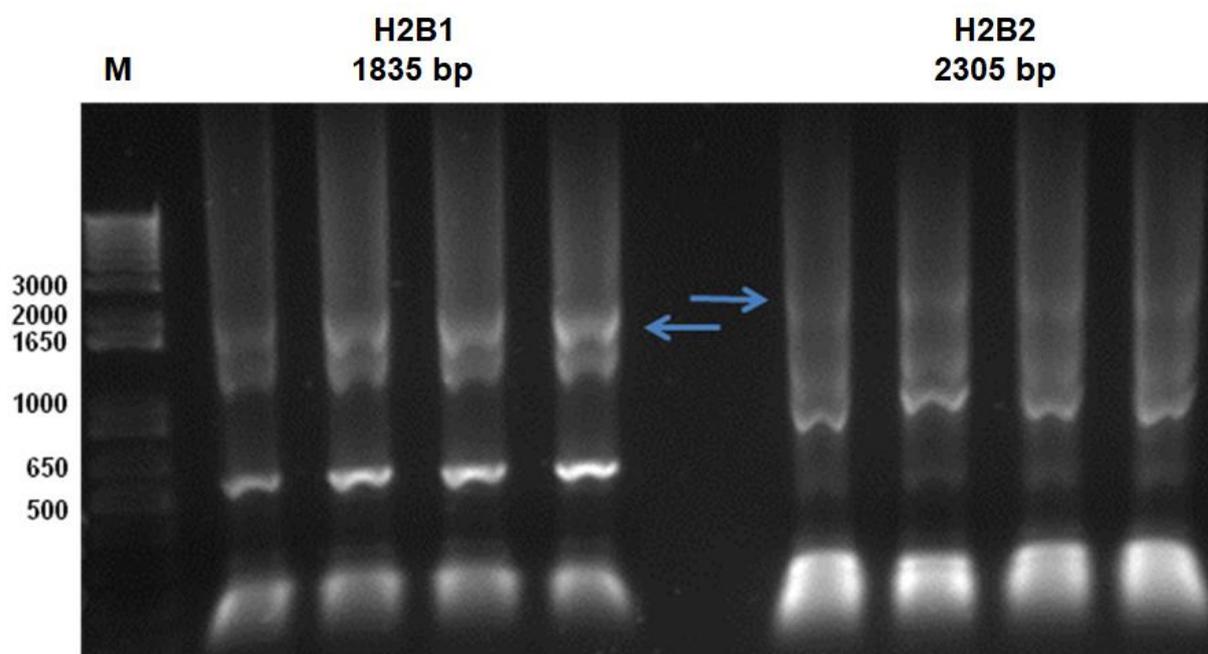
7.6 Avaliação da expressão de gene repórter regulado por sequências regulatórias de histonas e potencialmente associado às PABPs 2 e 3

7.6.1 Construção de gene repórter da *GFP* flanqueado por regiões intergênicas de genes de histonas

Tendo em vista a indicação prévia de associação preferencial das PABPs 2 e 3 com mRNAs codificantes de histonas em *Leishmania*, a última etapa desse trabalho se propôs a avaliar a especificidade dessa interação. Nesse sentido buscou-se construir um gene quimérico consistindo de regiões não traduzidas de mRNAs de histonas flanqueando a região codificante de um gene reporter com o intuito de se avaliar sua interação com os diferentes homólogos de PABP de *L. infantum*. Para essa finalidade selecionamos dois genes de histonas de *L. infantum* identificados como associados às PABPs 2 e 3 através de experimentos prévios de imunoprecipitação: *LinJ.19.0040* (histona *H2B*) e *LinJ.19.0030* (histona *H2B*), que serão chamados aqui de *H2B1* e *H2B2*, respectivamente. Para o gene *H2B1*, fizemos a montagem das IRs 5' e 3' de forma a flanquearem o gene repórter codificando para a proteína fluorescente verde ou *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Para tal, desenhamos *primers* específicos para amplificar integralmente as IRs 5' e 3' do gene *H2B1* e *primers* para amplificar a região codificante do gene *GFP*. Foi empregada metodologia semelhante à descrita anteriormente para obtenção dos cassetes de deleção para nocaute das PABPs 2 e 3, por PCR de fusão, conforme

esquematizado na figura 11. As IRs dos genes das histonas *H2B1* e *H2B2* de *L. infantum* foram amplificadas, juntamente com a região codificante do gene *GFP*. As amplificações produziram fragmentos de DNA nos tamanhos esperados: *H2B1*: 5' IR - 580 bp e 3' IR - 535 bp; *H2B2*: 5' IR - 535 bp e 3' IR - 1050 bp; *GFP*: 720 bp. Em seguida, esses fragmentos foram purificados e realizaram-se as PCRs de fusão para união dos mesmos fragmentos. Após as PCRs, as amostras foram fracionadas em gel de agarose e, depois de constatada a presença de bandas nas alturas esperadas (*H2B1*: 1835 bp e *H2B2*: 2305 bp), essas foram cortadas do gel para posterior purificação (Figura 37).

Figura 37 - PCR de fusão das IRs dos genes *H2B1* e *H2B2* com a região codificante do gene *GFP*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: As amostras foram migradas em gel de agarose 1 % através da técnica de eletroforese. As setas azuis demonstram as posições dos cassetes obtidos para *H2B1* (1835 bp) e *H2B2* (2305 bp).

Legendas: M = Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder (Promega).

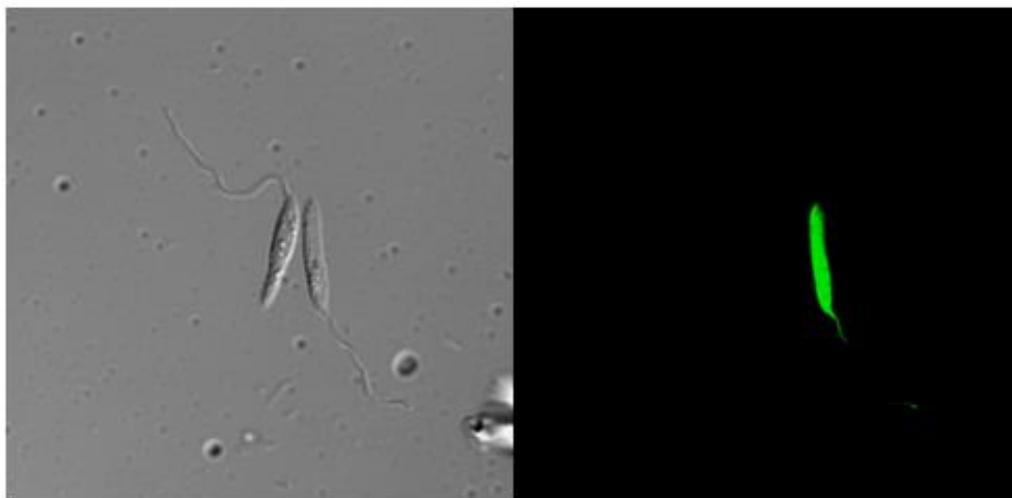
Os cassetes foram então clonados em plasmídeo *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega). Em seguida foram digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* e aqueles que liberaram cassetes com tamanho esperado foram enviados para sequenciamento. Após o sequenciamento foi observado que apenas os clones da *H2B1* estavam corretos e que a obtenção do gene *H2B2* não foi possível. O fragmento da *H2B1* foi então subclonado dentro do gene *BT1* do plasmídeo *pSP72-*

YHYG-atubIR que pode ser usado para integração no locus *BT1* (Figura 9), após transfecção integrativa ou então ser mantido na forma episomal. Os plasmídeos resultantes foram enviados para sequenciamento para confirmação da integridade das sequências e, em seguida, foram realizadas transfecções em *L. infantum* para então ser realizada a seleção clonal.

7.6.2 Avaliação da expressão da GFP do gene repórter *H2B1/GFP* em curva de crescimento de *L. infantum*

Para avaliar a funcionalidade da construção gerada com o gene *GFP* flanqueado por sequências intergênicas do gene *H2B1*, culturas de *L. infantum* transfectadas com a respectiva construção, foram produzidas e alíquotas retiradas para se avaliar a expressão da proteína fluorescente. Foi realizada microscopia confocal nas células transfectadas para se observar a eficiência das transfecções através da visualização da fluorescência a partir da expressão da *GFP* do gene repórter *H2B1/GFP* (Figura 38). Células expressando a *GFP* foram observadas junto com outras sem a expressão dessa proteína, indicando que a expressão do gene *GFP* não é constitutiva e pode estar sujeita a mecanismos de regulação, como é o caso dos mRNAs de histonas.

Figura 38 - Células de *L. infantum* transfectadas com o gene repórter *H2B1/GFP* observadas em microscopia confocal.



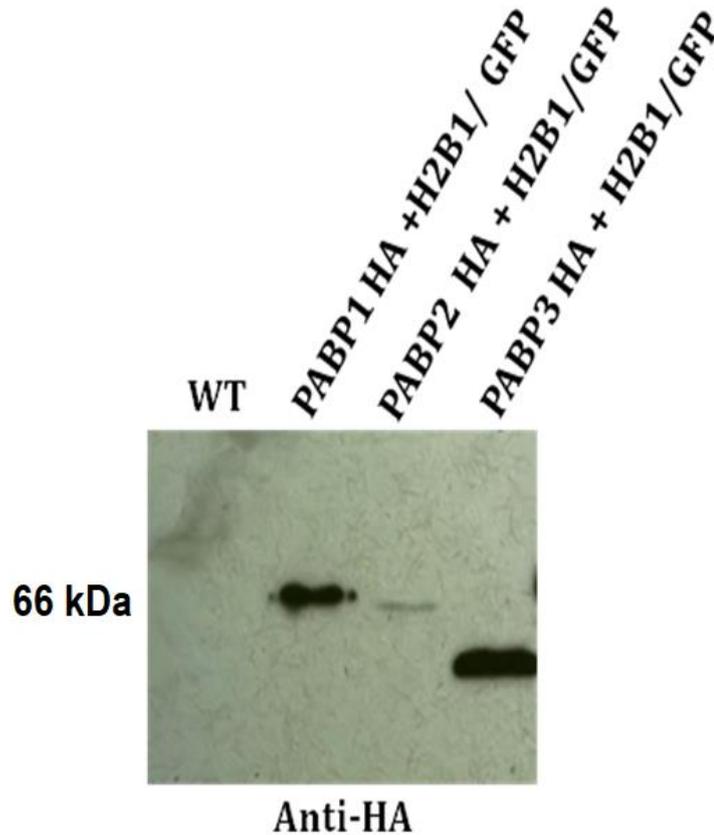
Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Podemos observar células expressando ou não o gene *GFP* (com ou sem fluorescência) após excitação por laser.

7.6.3 Geração de linhagens expressando homólogos de PABP fusionados a HA co-expressando ou não o gene repórter *H2B1/GFP*

Com o intuito de se avaliar em ensaios futuros a associação dos três homólogos de PABP com o mRNA repórter codificando para a proteína GFP, foram empregados dois clones de células contendo o gene repórter *H2B1/GFP* para a realização de co-transfecções com as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA em *pSP-BT1-YneoalR*. Realizamos então *Western-blots* para confirmação da superexpressão das PABPs e da GFP nas células contendo ambas as construções. Pudemos observar que houve expressão tanto das PABPs 1, 2 e 3, através da revelação das bandas correspondentes com anti-HA (Figura 39), quanto da GFP pelo uso de anticorpo anti-GFP (Figura 40).

Figura 39 - Western-blot de extratos de células co-transfectadas com os plasmídeos contendo o gene repórter *H2B1/GFP* (*pSP72-YHYG-atubIR*) e contendo as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA (*pSP-BT1-YneoIR*) reveladas com anti-HA.

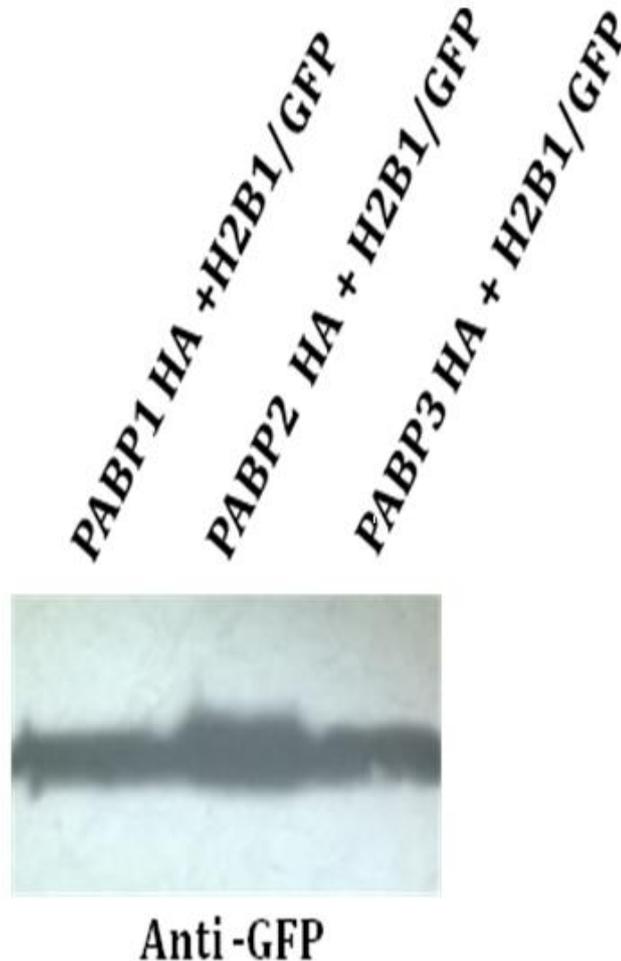


Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Foi utilizado anticorpo anti-HA (1:3000) que foi capaz de revelar a presença do epítipo HA em todos os extratos celulares testados. Como todas as construções apresentam o HA, estas possuem um tamanho superior aos preditos originalmente para as proteínas (PABP1 = 62,7; PABP2 = 65,4; PABP3 = 60,9). Além disso, a forma fosforilada da PABP1 altera não só o peso molecular, como o *fold*ing da proteína, fazendo com que esta migre menos no gel SDS-PAGE. Foi utilizado como controle extrato de células selvagens. A numeração à esquerda indica a posição e tamanho (em kDa) do marcador de peso molecular empregado.

Legendas: WT = *Wild Type/ L. infantum* selvagem.

Figura 40 - Western-blot de extratos de células co-transfectadas com os plasmídeos contendo o gene repórter *H2B1/GFP* (*pSP72-YHYG-atubIR*) e contendo as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA (*pSP-BT1-YneoalR*) reveladas com anti-GFP.



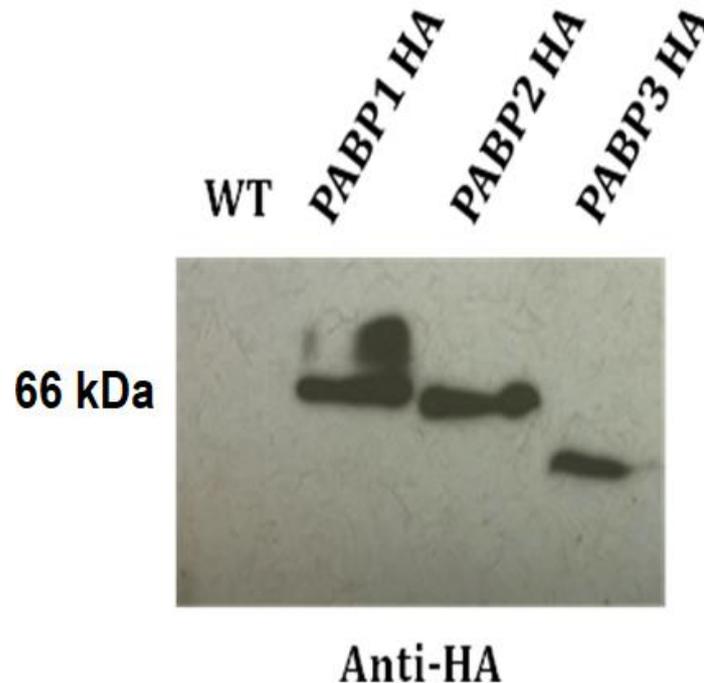
Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Foi utilizado anticorpo anti-GFP (1:3000) que foi capaz de revelar a presença da proteína GFP em todos os extratos celulares testados no tamanho estimado de 26,4 kDa.

Ao mesmo tempo também foram realizadas transfecções das três PABPs selvagens fusionadas ao epítipo HA (*pSP-BT1-YneoalR*) em *L. infantum* selvagem. Culturas das células transfectadas foram então utilizadas para a produção de extratos citoplasmáticos e a presença dos homólogos de PABP avaliada por ensaios de *Western-blot*. Fomos capazes de observar a ocorrência de expressão das PABPs 1, 2 e 3, através da revelação das bandas correspondentes utilizando anticorpo anti-HA (Figura 41). Ambas as abordagens de construções serão empregadas

posteriormente para realização de imunoprecipitações e RT-PCRs para confirmação da identidade de RNAs associados às PABPs e também verificar com qual homólogo de PABP a construção do mRNA repórter se associa.

Figura 41 - Western-blot de extratos de células selvagens transfectadas com plasmídeo *pSP-BT1-YneoalR* contendo as PABPs 1, 2 e 3 selvagens fusionadas ao epítipo HA reveladas com anti-HA.



Fonte: Elaborado pelo autor em conjunto com membros do grupo.

Nota: Foi utilizado anticorpo anti-HÁ (1:3000) que foi capaz de revelar a presença do epítipo HA em todos os extratos celulares testados. Como todas as construções apresentam o HA, estas possuem um tamanho superior aos preditos originalmente para as proteínas (PABP1 = 62,7; PABP2 = 65,4; PABP3 = 60,9). Além disso, a forma fosforilada da PABP1 altera não só o peso molecular, como o *fold*ing da proteína, fazendo com que esta migre menos no gel SDS-PAGE. Foi utilizado como controle extrato de células selvagens. A numeração à esquerda indica a posição e tamanho (em kDa) do marcador de peso molecular empregado.

Legendas: WT = *Wild Typel L. infantum* selvagem.

8 DISCUSSÃO

Tripanossomatídeos causam uma grande variedade de doenças em diferentes organismos e são submetidos a diferentes habitats nos hospedeiros intermediários e definitivos, habitando ambientes intra e extracelulares durante essas trocas de hospedeiro. Para sobreviver a essas extremas mudanças ambientais é assumido que a regulação estágio específica de seus genes seja fundamental (GUERRA *et al.*, 2011).

As PABPs são polipeptídeos multifuncionais altamente conservados encontrados exclusivamente em eucariotos (IVANOV *et al.*, 2016; KHANAM *et al.*, 2006). Tipicamente, eucariotos unicelulares apresentam uma única cópia do gene codificando a PABP citoplasmática, enquanto que em eucariotos superiores é encontrado um maior número de genes, tais como em humanos (cinco) (BHATTACHARJEE; BAG, 2012) *Caenorhabditis elegans* (três) (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003) e em *Arabidopsis thaliana* (oito) (BELOSTOTSKY, 2003).

A identificação de três PABPs em espécies de *Leishmania* sugere que além de sua função de ligação à cauda poli-A dos mRNAs, estas proteínas possuam funções especializadas adicionais *in vivo* (MANGUS; EVANS; JACOBSON, 2003), tais como diferentes funções na tradução e/ou metabolismo de mRNAs. Além disso, devido aos mecanismos de regulação não usuais desses organismos é provável que as PABPs de *Leishmania* apresentem tanto funções conservadas quanto divergentes em relação aos homólogos de eucariotos superiores (BATES; KNUEPFER; SMITH, 2000).

8.1 Avaliação da essencialidade de homólogos da PABP de *L. infantum*

Nossos experimentos demonstraram a essencialidade da PABP2 em células promastigotas de *L. infantum*, visto que as células transfectadas com os DKO não foram viáveis. Existem alguns trabalhos que contemplam diferenças marcantes ao nível de função e atuação das PABPs 1 e 2 em tripanossomatídeos, que reforçam a essencialidade dos dois homólogos, bem como experimentos semelhantes aos realizados nesse trabalho para outros organismos. Como exemplo, foi observado em *T. brucei*, através do *knockdown* por meio de RNAi, que as PABPs 1 e 2 são

independentemente necessárias para a sobrevivência celular, demonstrando que estes homólogos não apresentam funções redundantes (DA COSTA LIMA, 2012).

Outros trabalhos fortalecem a ideia de essencialidade e de não redundância das PABPs 1 e 2. Foi demonstrado que ambas apresentam localização diferencial nos grânulos de ribonucleoproteínas (*ribonucleoproteins* - RNP), onde a PABP1 se encontra nos grânulos de estresse em resposta a choque térmico, enquanto que a PABP2 se localiza exclusivamente nos grânulos de RNP relacionados aos *P-bodies*, como os *P-bodies* citoplasmáticos induzidos por choque térmico ou inibição do processamento de mRNAs, e em grânulos de estresse induzidos por inanição ou grânulos perinucleares. Esses dados sugerem que as PABPs interajam com diferentes grupos de mRNAs com distintos destinos em situações de indução de grânulos RNP ou de repressão da tradução (KRAMER *et al.*, 2013). Também foi observada uma co-localização da PABP2 com o EIF4E1 e da PABP1 com EIF4E4 e EIF4G3 após indução de grânulos de RNP em *T. brucei*, o que novamente é um forte indicativo de que essas proteínas participem de diferentes vias que interagem com diferentes grupos de mRNAs (KRAMER *et al.*, 2013).

Outro ponto importante sobre as diferenças dentre as PABPs se faz pela sua localização intracelular. Foi demonstrado que, em *Leishmania*, as PABPs 2 e 3 se acumulam no núcleo quando a transcrição é inibida pela actinomicina D (DA COSTA LIMA, 2012), enquanto que há pouco acúmulo da PABP1 (BATES; KNUEPFER; SMITH, 2000). Também se observou que, quando a maturação do mRNA é inibida por sinefugina, a PABP2 é encontrada no núcleo, mas não a PABP1. Quando somado ao tratamento com sinefugina é realizado choque térmico, a maior parte da PABP2 é acumulada no núcleo, enquanto que a PABP1 permanece no citoplasma, principalmente nos grânulos de estresse por choque térmico (KRAMER *et al.*, 2013). É sugerido que a ocorrência do acúmulo de PABPs no núcleo se correlacione com o acúmulo de mRNAs no núcleo, sendo um indicativo de exportação nuclear de mRNAs dependente de PABPs (BURGESS *et al.*, 2011).

Já em relação à PABP3, este trabalho demonstra de maneira inédita que esse homólogo não é necessário para a sobrevivência de formas promastigotas de *L. infantum*. Esse resultado corrobora dados prévios os quais sugerem que a PABP3 atue de forma redundante e/ou complementar às funções esperadas para a PABP2 (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). A partir da constatação de que espécies de *Trypanosoma* apresentam dois homólogos da PABP e que três são encontrados em

Leishmania, Kramer *et al.* (2013) realizaram um levantamento filogenético das PABPs para investigar a origem dessa diferença. Os resultados sugerem algum nível de redundância evolucionária entre as PABPs em *Kinetoplastida*, uma vez que nenhum dos ortólogos está conservado em todas as espécies. Sabendo-se que as PABPs 1 e 2 são essenciais em espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania*, nosso resultado ratifica a ideia de que a PABP2 possui um papel central e que a PABP3 tenha uma função secundária ou complementar em relação a PABP2, não sendo assim essencial para as células.

8.2 Avaliação do papel da fosforilação na função da PABP1

A fosforilação de ribonucleoproteínas está envolvida no controle das atividades de ligação do RNA, localização celular e formação de complexos ribonucleoproteicos (BROOK *et al.*, 2012). Modificações pós-traducionais nas PABPs já foram descritas em vários organismos como em levedura, ouriço, trigo (fosforilação para os três primeiros organismos citados) e seres humanos (BROOK *et al.*, 2012; DRAWBRIDGE; GRAINGER; WINKLER, 1990; LE; BROWNING; GALLIE, 2000; LE *et al.*, 1997b), porém pouco se sabe sobre as possíveis funções que tais modificações nas PABPs possam desempenhar.

Em plantas o estado fosforilado da PABP não só influencia a ligação cooperativa com a cauda poli-A como também determina a interação específica com aqueles fatores já identificados como capazes de interagir com a PABP (MELO *et al.*, 2003; LE; BROWNING; GALLIE, 2000). Brooks *et al.* (2012) sugerem que as numerosas modificações encontradas na PABP1 de humanos tenham o potencial de diversificar ou alterar sua função. Além disso, sugerem que algumas modificações possam controlar a ocorrência de modificações adicionais e que o status no padrão de modificações pode ser regulado em resposta a estímulos externos e/ou a processos biológicos distintos.

Em trabalhos anteriores foram observados os eventos associados à fosforilação da PABP1 de promastigotas de *L. amazonensis* na presença de inibidores de transcrição, processamento de mRNAs, tradução, proteases e ainda inibidor de fosfatases. Após a incubação com os inibidores de síntese e processamento de RNA (actinomicina D e sinefugina), observou-se uma diminuição na fosforilação global da PABP1 (mais forte para a sinefugina), ocorrendo a

completa defosforilação após 24 horas. Na incubação com inibidores de tradução (cicloheximida e puromicina), não ocorreu mudança no padrão de fosforilação logo após o início da exposição, porém houve defosforilação após 24 horas, provavelmente associada à morte celular. Através do uso de inibidores de proteases e fosfatase não foram observadas diferenças após a incubação, exceto para o ácido ocadáico em que um aumento da forma fosforilada foi constatado. Esses resultados sugerem que a formação de novos mRNAs pode estimular a fosforilação da PABP1, enquanto que a síntese proteica não é necessária para que a fosforilação inicial desta proteína ocorra (DA COSTA LIMA, 2012).

Apesar de ser sugestivo que a forma fosforilada da PABP1 apresente um papel relevante em outros organismos e também em tripanossomatídeos, foi demonstrado em nosso estudo, de forma pioneira, que a completa depleção da fosforilação foi compatível com a sobrevivência celular, o que nos sugere que, ao menos em promastigotas de *L. infantum*, a forma fosforilada da PABP1 desempenha um papel secundário ou complementar frente a sua forma não fosforilada.

8.3 Avaliação do impacto de mutantes de PABP1 e PABP2 na interação com poli-A

A partir de mutantes construídos e testados em nosso trabalho pudemos constatar alguns pontos divergentes e interessantes comparando-se as PABPs 1 e 2 no que concerne ao seu potencial de ligação à cauda poli-A. Os resultados obtidos com os mutantes LMW/AAA (localizado no RRM1) e YGF/AAA (RRM2) da PABP1 e seus equivalentes na PABP2 (IAK/AAA e YAR/AAA) demonstraram que estes motivos presentes nos RRM1 e 2 da PABP1 são essenciais para sua função, enquanto que as mesmas regiões nos mesmos RRM1 não parecem exercer uma ação determinante para a funcionalidade da PABP2.

Até o momento as principais funções atribuídas aos RRM1 e 2 das PABPs estão relacionados com a ligação de alta afinidade com a cauda poli-A dos mRNAs, sendo o RRM2 o mais importante para que a ligação ocorra, embora o mesmo sozinho tenha sua capacidade de ligação diminuída (CHENG; GALLIE, 2007; IMATAKA; GRADI; SONENBERG, 1998; KESSLER; SACHS, 1998). Foi demonstrado que as três PABPs de *Leishmania* e a PABP2 de *T. brucei* apresentam afinidade com a poli-A. Todavia, ortólogos da PABP2 geralmente possuem

substituições em resíduos de aminoácidos que são essenciais para o reconhecimento da poli-A (DA COSTA LIMA, 2012; GUERRA *et al.*, 2011). Essas substituições podem impactar na força de interação dessas proteínas com a poli-A em algumas situações, tal como observado em *L. major*, onde a PABP1 apresenta maior afinidade com a poli-A em relação às PABPs 2 e 3 (DA COSTA LIMA, 2012). Além disso, a divergência presente no RRM2 da PABP2 é sugestiva de uma diferenciação funcional em comparação com a PABP1, que pode implicar numa interação com subgrupos distintos de RNAs e parceiros proteicos, sem perder as atividades associadas ao domínio MLLE (DA COSTA LIMA, 2012). Falando-se especificamente da PABP1 de *L. infantum* foi demonstrado que esta conserva o domínio principal presente em outras PABPs e mantém suas propriedades de interação com a poli-A (GUERRA *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos em nosso estudo estão de acordo com o que era esperado, uma vez que a PABP1 de *L. infantum* apresenta alta homologia com as PABPs de outros eucariotos, incluindo mamíferos e outros parasitas (GUERRA *et al.*, 2011). Sendo assim, presume-se que a PABP1 de *L. infantum* atue de forma semelhante à PABP1 de eucariotos superiores, exercendo as funções a ela atribuídas que geralmente envolvem sua ligação à cauda poli-A dos mRNAs. Da mesma forma, enfatiza que a PABP2 deva usar de outras regiões que não os RRMs 1 e 2 como pontos críticos para suas interações centrais.

8.4 Impacto dos mutantes de PABP1 e PABP2 no entendimento da interação com homólogos de eIF4E e outros parceiros

Foram identificados dois complexos semelhantes ao eIF4F padrão em tripanossomatídeos, baseados nas interações entre EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 cujas características indicam sua participação na tradução (FREIRE *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015; YOFFE *et al.*, 2009; ZINOVIEV *et al.*, 2011). Através de experimentos em espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, a PABP1 tem sido associada com o complexo EIF4E4/EIF4G3 que parece fazer parte do principal complexo eIF4F envolvido no início da tradução nesses organismos. Além disso, foi observada uma nova interação específica entre o EIF4E4 e a PABP1 nesses organismos, que ainda não foi encontrada em outros eucariotos (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; ZINOVIEV *et al.*, 2011).

Recentemente, foi demonstrado pelo grupo através de ensaios de *pull-down* a interação da PABP2 com o EIF4E3 em *Leishmania* (dados não publicados), bem como a associação da PABP2 com EIF4E3 e EIF4G4 através da imunoprecipitação destes isoladamente, seguidos de espectrometria de massas em *T. brucei* (BEZERRA, 2017). Esses dados são sugestivos e reforçam a ideia de que as PABPs 1 e 2 participam de processos distintos na iniciação proteica, possuindo formas de interações e parceiros diferenciados.

O mutante TGM/AAA localizado na região MLLE foi compatível com a viabilidade celular na ausência da proteína endógena, sugerindo que tal região não seja essencial para a funcionalidade da PABP1. Entretanto, foi demonstrado recentemente por nosso grupo que o local de ligação presente na PABP1 envolvido na interação com o EIF4E4 é justamente o motivo TGM. Sendo assim, a proteína resultante do mutante TGM/AAA é incapaz de se ligar ao EIF4E4. A ligação direta da PABP1 de *Leishmania* ao EIF4E4 é desconhecida para outros eucariotos (ZINOVIEV *et al.*, 2011). Essa interação parece ser mais forte que a ligação entre EIF4E4 e EIF4G3 e aparentemente mais importante para a função desempenhada pelo EIF4E4 *in vivo* (DE MELO NETO *et al.*, 2015). Devido à sugestiva importância da interação entre a PABP1 e o EIF4E4 é improvável que sua abolição não tenha um impacto significativamente negativo sobre a célula. É possível que exista algum mecanismo de compensação onde a PABP2 e/ou 3 possa desempenhar o papel da PABP1 nesse tipo de situação. Outra possibilidade é que alguma outra proteína assumira o papel do EIF4E4 ou ainda que outro complexo acabe sendo envolvido, visto que já foram identificados vários homólogos para cada uma das proteínas de complexos semelhantes ao eIF4F que até então não possuem função definida ou conhecida.

No caso da PABP2, a falta de complementação com o mutante TGM/AAA é sugestiva de que esse domínio seja fundamental para a função da PABP2, diferentemente do evidenciado para a PABP1. Além da possível função de complementação citada anteriormente em relação à PABP1, o domínio TGM da PABP2 deve ser essencial para que interações realizadas unicamente por essa proteína ocorram. Sendo assim, estudos mais aprofundados sobre esse domínio da PABP2 devem ser realizados para identificação e caracterização de possíveis parceiros.

Outro motivo aparentemente essencial para a função da PABP2 é o motivo RQN localizado no início da região *linker*, logo após o RMM 4, um motivo que se apresenta totalmente conservado nas espécies de *Leishmania* alinhadas e parcialmente conservado em *T. brucei* e *T. cruzi*. A região *linker* é o segmento menos conservado nas PABPs e em mamíferos essa região parece estar associada ao processo de multimerização onde várias PABPs se associam estando ligadas à cauda poli-A (MELO *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2012). Em trabalho anterior do grupo foi realizada um proteína truncada da PABP2 (GST-PABP2NT₁₋₃₇₄) contendo os 374 aminoácidos iniciais para se avaliar a associação entre ela e a PABP2 nativa (DA COSTA LIMA, 2012). Foi demonstrado que a proteína truncada ainda era capaz de se associar à proteína nativa e que a associação entre elas era independente de RNA. O domínio RQN é representado pelos aminoácidos de posição 371 a 373 da proteína GST-PABP2NT₁₋₃₇₄. Pode ser que a região logo após o RMM 4 e o início da região *linker* da PABP2 seja essencial não só para a ligação entre duas ou mais moléculas de PABP2 (multimerização), bem como na mediação da interação com os seus parceiros centrais.

Tão interessante quanto esses achados é o fato de que os motivos IAK (RRM1) e YAR (RRM2) da PABP2 foram nocauteados e viáveis sem a ocorrência de duplicação do gene endógeno (confirmado por *Southern-blot*), ao contrário do observado para seus equivalentes na PABP1 (LMW/AAA no RRM1 e YGF/AAA no RRM2). Isso nos indica que as mesmas regiões tidas como críticas para a função da PABP1 não apresentam a mesma importância para a PABP2 e vice-versa.

Apesar de alguns domínios aparentemente não serem essenciais para a sobrevivência de células promastigotas de *L. infantum*, todos os mutantes viáveis (com ou sem ocorrência de duplicação do gene endógeno) para as PABPs 1 e 2 tiveram impacto na velocidade de crescimento e possivelmente na morfologia celular (dados não mostrados). Isso nos demonstra que tais regiões apresentam alguma relevância, seja como pontos auxiliares de interação para parceiros diversos associados a outros domínios ou por interferirem na montagem/conformação da proteína. Além disso, não podemos descartar uma função de maior importância para esses domínios em outros estágios evolutivos da *L. infantum*.

8.5 Avaliação da expressão do mRNA repórter *H2B1/GFP*

A proposta da última etapa desse trabalho foi avaliar a interação das PABPs 1, 2 e 3 ao gene repórter *H2B1/GFP*, construído fusionando regiões intergênicas de genes histonas com a região codificadora da proteína fluorescente GFP. A expressão, aparentemente, não constitutiva da GFP, é sugestiva de uma possível expressão regulada, é um indício que o mRNA repórter está apresentando comportamento semelhante aos dos mRNAs de histonas, mas isso ainda precisa ser comprovado. Para as etapas seguintes, todas as construções necessárias para a realização experimental, bem como os tipos celulares que serão empregados foram finalizados, testados e se mostraram adequados para a execução dos experimentos. Entretanto não houve tempo hábil para a finalização desses, de forma que em breve iremos realizar as imunoprecipitações e então realizaremos RT-PCRs para confirmação dos RNAs associados, bem como *Western-blot* direcionados para identificação da proteína proveniente do gene repórter. Estes experimentos, se bem sucedidos, podem fornecer informações importantes sobre elementos de sequência que podem estar envolvidos na associação preferencial de homólogos de PABP à mRNAs específicos e podem ajudar a definir melhor como estas proteínas se diferenciam entre si e em relação ao que é conhecido em outros eucariotos.

9 CONCLUSÃO

- a) A PABP2 apresenta um papel crítico para o funcionamento e sobrevivência celular, enquanto que a PABP3 deve possuir uma importância secundária para a viabilidade em formas promastigotas de *L. infantum*.
- b) A PABP1 é um homólogo essencial para a viabilidade celular. No entanto, sua forma fosforilada demonstra não ser crucial para a sobrevivência de formas promastigotas de *L. infantum*.
- c) Motivos presentes nos RRM1s 1 e 2 demonstram ter função crítica para a funcionalidade da PABP1, assim como observado na PABP1 de outros eucariotos. Já a PABP2 apresenta motivos cruciais distintos aos da PABP1, presentes no início da região *linker* e na região MLLE, sugerindo que esta proteína possui formas de interação e funções diferenciadas, bem como parceiros e alvos distintos em relação à PABP1.
- d) Formas promastigotas superexpressando mutantes da PABP3 foram viáveis sem nenhum prejuízo aparente na dinâmica celular.
- e) A presença das IRs 5' e 3' do gene *H2B* parece ser capaz de manter um efeito regulatório semelhante ao original sobre o gene repórter *GFP*, controlando sua expressão de maneira dependente do ciclo celular.

REFERÊNCIAS

- ACKER, M. G.; LORSCH, J. R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochemical Society transactions**, Londres, v. 4, p. 653-657, 2008.
- ALKALAEVA, E. Z. *et al.* *In vitro* reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. **Cell**, Cambridge, v. 125, n. 6, p. 1125-1136, 2006.
- ALLEN, N. P. *et al.* Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 31, p. 29268-29274, 2001.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, San Francisco, 7(5):e35671, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365071/pdf/pone.0035671.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.
- AUSIÓ, J. Histone variants-the structure behind the function. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, Londres, v. 5, n. 3, p. 228-243, 2006.
- AWASTHI, A.; MATHUR R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research**, Nova Déli, v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.
- BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. **Current Opinion in Cell Biology**, Filadélfia, v. 21, n. 3, p. 403-408, 2009.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDE, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, Pequim, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.
- BARBEIRO. Disponível em: <<http://guararapesnoticias.blogspot.com/2014/09/acao-conjunta-faz-busca-por-colonias-de.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.
- BATES, E. J.; KNUEPFER, E.; SMITH, D. F. Poly(A)-Binding Protein I of *Leishmania*: Functional Analysis and Localisation in Trypanosomatid Parasites. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 28, n. 5, p. 1211-1220, 2000.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.
- BATISTA, J. A. *et al.* Characterization of a *Trypanosoma cruzi* Poly(A)-Binding Protein and Its Genes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 67, n. 10, p. 301-312, 1994.
- BELOSTOTSKY, D. A. Unexpected Complexity of Poly(A)-Binding Protein Gene Families in Flowering Plants: Three Conserved Lineages That Are at Least 200 Million Years Old and Possible Auto- and Cross-Regulation. **Genetics**, Austin, v. 163, n. 1, p. 311-319, 2003.

BESTEIRO S. *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.

BEZERRA, M. J. R. **Análise das interações proteína-proteína e proteína-mRNA de homólogos selecionados do fator de iniciação da tradução eIF4E de *Trypanosoma brucei***. 2017. Tese (Doutorado) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

BHATTACHARJEE, R.B.; BAG, J. Depletion of nuclear poly(A) binding protein PABPN1 produces a compensatory response by cytoplasmic PABP4 and PABP5 in cultured human cells. **PLoS One**, San Francisco, 7(12):e53036, 2012. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534090/pdf/pone.0053036.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

BI, X.; GOSS, D. J. Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 23, p. 17740-17746, 2000.

BRINGAUD, F. *et al.* Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 3, n. 9, p. 1291-1307, 2007.

BROOK, M. *et al.* The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. **The Biochemical Journal**, Londres, v. 441, n. 3, p. 803-812, 2012.

BRUNE, C. *et al.* Yeast Poly(A)-Binding Protein Pab1 Shuttles Between the Nucleus and the Cytoplasm and Functions in MRNA Export. **RNA**, Nova Iorque, v. 11, n. 4, p. 517-531, 2005.

BÜHLMANN, M. *et al.* NMD3 regulates both mRNA and rRNA nuclear export in African trypanosomes via an XPO1-linked pathway. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 43, n. 9, p. 4491-4504, 2005.

BURD, C. G.; MATUNIS, E. L.; DREYFUSS, G. The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 11, n. 7, p. 3419-3424, 1991.

BURGESS, H. M. *et al.* Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. **Journal of Cell Science**, Londres, v. 124, n. 19, p. 3344-3355, 2011.

CAI, D. *et al.* A Southern Blot Assay for Detection of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA from Cell Cultures. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1030, p. 151-161, 2013.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in Kinetoplastid Protozoa: Why Be Normal? **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, n. 13, p. 1231-1240, 2003.

CHANG, T. *et al.* UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. **Genes and Development**, Woodbury, v. 18, n. 16, p. 2010-2023, 2004.

CHENG, S.; GALLIE, D. R. Competitive and Noncompetitive Binding of EIF4B, EIF4A, and the Poly(A) Binding Protein to Wheat Translation Initiation Factor EIFiso4G. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 49, n. 38, p. 8251-8265, 2010.

CHENG, S.; GALLIE, D. R. EIF4G, EIFiso4G, and EIF4B Bind the Poly(A)-Binding Protein Through Overlapping Sites Within the RNA Recognition Motif Domains. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 35, p. 25247-25258, 2007.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **European Molecular Biology Organization**, Londres, v. 21, n. 8, p. 1881-1888, 2002.

CLAYTON, C. E. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 96-106, 2014.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 93-101, 2007.

COHEN-FREUE, G. *et al.* Global gene expression in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1077-1086, 2007.

COSSON, B. *et al.* Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 22, n. 10, p. 3301-3315, 2002.

DA COSTA LIMA, T. D. **Abordagens moleculares voltadas a caracterização funcional dos homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) em espécies de *Leishmania* sp.** 2012. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

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

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

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

DE MELO NETO, O. P. *et al.* Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) Species. In: HERNÁNDEZ, G.; JAGUS, R. (Ed.) **Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 435-475.

DEPLEDGE, D. O. *et al.* Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, 3(7):e476, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2701600/pdf/pntd.0000476.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

DERRY, M. *et al.* Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. **Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology**, Woodbury, v. 71, p. 537-543, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, Filadélfia, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DHALIA, R. *et al.* Translation Initiation in *Leishmania major*: Characterisation of Multiple EIF4F Subunit Homologues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 23-41, 2005.

DOWER, K.; ROSBASH, M. T7 RNA polymerase-directed transcripts are processed in yeast and link 3' end formation to mRNA nuclear export. **RNA**, Nova Iorque, v. 8, n. 5, p. 686-697, 2002.

DRAWBRIDGE, J.; GRAINGER, J. L.; WINKLER, M. M. Identification and Characterization of the Poly(A)-Binding Proteins From the Sea Urchin: a Quantitative Analysis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 10, n. 8, p. 3994-4006, 1990.

DUNN, E. *et al.* Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. **Genes and Development**, Woodbury, v. 19, n. 1, p. 90-103, 2005.

ECKMANN, C. R.; RAMMELT, C.; WAHLE, E. Control of poly(A) tail length. **Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA**, Hoboken, v. 2, n. 3, p. 348-361, 2011.

EDMONDS, M. A history of poly A sequences: from formation to factors to function. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, Nova Iorque, v. 71, p. 285-389, 2002.

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

EL-SAYED, N. M. *et al.* Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**, Nova Iorque, v. 309, n. 5733, p. 404-409, 2005.

FREIRE, E. R. *et al.* eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, Nova Iorque, v. 20, n. 8, p. 1272-1286, 2014a.

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

FREIRE, E. R. *et al.* The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. **Pathogens**, Basel, 6(4):E55, 2017. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5750579/pdf/pathogens-06-00055.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

FREIRE, E. R. *et al.* *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 13, n. 7, p. 896-908, 2014b.

GHEDIN, E. *et al.* Gene Synteny and Evolution of Genome Architecture in Trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 183-191, 2004.

GINGRAS, A. C. *et al.* Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. **Genes and Development**, Nova Iorque, v.13, n. 11, p. 1422-1437, 1999.

GORGONI, B. *et al.* The stem-loop binding protein stimulates histone translation at an early step in the initiation pathway. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, Hoboken, v. 11, n. 7, p. 1030-1042, 2005.

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

GROFT, C. M.; BURLEY, S. K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 1273-1283, 2002.

GROSSET, C. *et al.* A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a *c-fos* RNA coding determinant via a protein complex. **Cell**, Cambridge, v. 103, n. 1, p. 29-40, 2000.

GUERRA, N. *et al.* Identification and functional characterization of a poly(A)-binding protein from *Leishmania infantum* (LiPABP). **Federation of European Biochemical Societies letters**, Amsterdam, v. 585, n. 1, p. 193-198, 2011.

HAILE, S; PAPADOPOULOU, B. Developmental Regulation of Gene Expression in Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, Londres, v. 10, n. 6, p. 569-577, 2007.

HALL, T. M. Poly(A) tail synthesis and regulation: recent structural insights. **Current Opinion in Structural Biology**, Londres, v. 12, n. 1, p. 82-88, 2002.

HAMMELL, C. M. *et al.* Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 22, n. 18, p. 6441-6457, 2002.

HELLEN, C. U. T.; SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. **Genes and Development**, Nova Iorque, v. 15, n. 13, p. 1593-1612, 2001.

HINNEBUSCH, A. G.; LORSCH, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, 4(10): a011544, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3475172/pdf/cshperspect-TRA-a011544.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

HOLETZ, F. B. *et al.* Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Nova Iorque, v. 356, n. 4, p. 1062-1067, 2007.

HORN, D. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. **BioMed Central genomics Genomics**, Londres, 9:2, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2217535/pdf/1471-2164-9-2.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

HORNSTEIN, E. *et al.* The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5-terminal oligopyrimidine tract motif. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 3, p. 1708-1714, 1999.

HOSHINO, S. *et al.* The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 24, p. 16677-16680, 1999.

HOSODA, N; LEJEUNE, F.; MAQUAT, L. Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 26, n. 8, p. 3085-3097, 2006.

HOTCHKISS, T. L. *et al.* *Trypanosoma brucei* poly(A) binding protein I cDNA cloning, expression, and binding to 5' untranslated region sequence elements. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 117-129, 1999.

IMATAKA, H.; GRADI, A.; SONENBERG, N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-

dependent translation. **European Molecular Biology Journal**, Oxford, v. 17, n. 24, p. 7480-7489, 1998.

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

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, Nova Iorque, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Londres, v. 11, n. 2, p. 113-127, 2010.

JIN, C.; FELSENFELD, G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. **Genes and Development**, Woodbury, v. 21, n. 12, p. 1519-1529, 2007.

KAHVEJIAN, A.; ROY, G.; SONENBERG, N. The MRNA Closed-Loop Model: the Function of PABP and PABP-Interacting Proteins in MRNA Translation. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, Nova Iorque, v. 66, p. 293-300, 2001.

KATAHIRA, J. Nuclear Export of Messenger RNA. **Genes**, Basel, v. 6, n. 2, p. 163-184, 2015.

KAWAHARA, T. *et al.* Two essential MYST-family proteins display distinct roles in histone H4K10 acetylation and telomeric silencing in trypanosomes. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 69, n. 4, p. 1054-1068, 2008.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 8, n. 7, p. 533-543, 2007.

KELLER, R. W. *et al.* The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. **Journal of Molecular Biology**, Londres, v. 297, n. 3, p. 569-583, 2000.

KESSLER, S.H.; SACHS, A. B. RNA Recognition Motif 2 of Yeast Pab1p Is Required for Its Functional Interaction With Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 18, n. 1, p. 51-57, 1998.

KHALEGHPOUR, K. *et al.* Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 205-216, 2001.

KHANAM, T. *et al.* Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. **RNA Biology**, Georgetown, v. 3, n. 4, p. 170-177, 2006.

KLEIN, C. *et al.* Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with Initiation Factors and RNA-Binding Proteins. **PLoS One**, San Francisco, 10(8):e0135973, 2015. Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4545788/pdf/pone.0135973.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

KOELLER, C. M; HEISE, N. The sphingolipid biosynthetic pathway is a potential target for chemotherapy against Chagas disease. **Enzyme Research**, Londres, 2011: 648159, 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/Madalena/Downloads/648159.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2018.

KONONENKO, A. V. *et al.* GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 548-558, 2010.

KORNER, C. G. *et al.* The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. **European Molecular Biology Journal**, Oxford, v. 17, n. 18, p. 5427-5437, 1998.

KOTHAPALLI, N. Biological functions of biotinylated histones. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Amsterdam, v. 16, n. 7, p. 446-448, 2005.

KRAMER S. *et al.* Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. **PLoS One**, San Francisco, 8(1):e54004, 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559699/pdf/pone.0054004.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

KUHN, U. *et al.* Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-Binding Protein Regulating the Interaction Between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 34, p. 22803-22814, 2009.

KUHN, U.; WAHLE, E. Structure and Function of Poly(A) Binding Proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1678, n. 2-3, p. 67-84, 2004.

KUYUMCU-MARTINEZ, N. M.; JOACHIMS, M.; LLOYD, R. E. Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. **Journal of Virology**, Baltimore, v. 76, n. 5, p. 2062-2074, 2002.

LE, H. *et al.* Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding affinity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 26, p.16247-16255, 1997a.

LE, H. *et al.* The Wheat Poly(A)-Binding Protein Functionally Complements Pab1 in Yeast. **European Journal of Biochemistry**, Berlim, v. 243, n. 1-2, p. 350-357, 1997b.

LE, H.; BROWNING, K. S.; GALLIE, D. R. The Phosphorylation State of Poly(A)-Binding Protein Specifies Its Binding to Poly(A) RNA and Its Interaction With Eukaryotic Initiation Factor (EIF) 4F, EIFiso4F, and EIF4B. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 23, p. 17452-17462, 2000.

LEIFSO, K. *et al.* Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 35-46, 2007.

LI, H.; TSCHUDI, C. Novel and essential subunits in the 300-kilodalton nuclear cap binding complex of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 25, n. 6, p. 2216-2226, 2005.

LI, K. *et al.* The eIF3 complex of *Trypanosoma brucei*: Composition conservation does not imply the conservation of structural assembly and subunits function. **RNA**, Nova Iorque, v. 23, n. 3, p. 333-345, 2017.

LIANG, X. H. *et al.* Trans and Cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LIN, J. *et al.* Nanopore detachment kinetics of poly(A) binding proteins from RNA molecules reveals the critical role of C-terminus interactions. **Biophysical Journal**, Nova Iorque, v. 102, n. 6, p. 1427-1434, 2012.

LINDER, P. Yeast RNA Helicases of the DEAD-Box Family Involved in Translation Initiation. **Biology of the Cell**, Paris, v. 95, n. 3-4, p. 157-167, 2003.

LUSTIG, Y. *et al.* Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in *Trypanosoma brucei*. **European Molecular Biology Organization Reports**, Oxford, v. 8, n. 4, p. 408-413, 2007.

MANGUS, D. A.; EVANS, M. C.; JACOBSON, A. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. **Genome Biology**, Londres, v. 4, n. 7, p. 1-44 (e223), 2003.

MANNAERT, A. *et al.* Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 370-376, 2012.

MARINTCHEV, A.; WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Quarterly Reviews of Biophysics**, Londres, v. 37, n. 3-4, p. 197-284, 2004.

MARTIN, C.; ZHANG, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, Londres, v. 6, n. 11, p. 838-849, 2005.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, 2010:525241, 2010.

Disponível em:

< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2821653/pdf/JBB2010-525241.pdf> >.

Acesso em: 03 nov. 2018.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 11, n. 5, p. 1291-1299, 2003.

MATA, J.; MARGUERAT, S.; BAHLER, J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 30, n. 9, p. 506-514, 2005.

MELEPPATTU, S. *et al.* The eIF3 complex of *Leishmania*-subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 43, n. 13, p. 6222-6235, 2015.

MELO, E. O. *et al.* Identification of a C-terminal poly(A)-binding protein (PABP)-PABP interaction domain. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 47, p. 46357-46368, 2003.

MOSCA TSÉ-TSÉ. Disponível em:
<<http://zoologicovirtualdokoba.blogspot.com/2014/05/mosca-tse-tse.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

MOSQUITO-PALHA. Disponível em:
<<http://zoologicovirtualdokoba.blogspot.com/2014/05/mosca-tse-tse.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

MOURA, D. M. N. *et al.* Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA Biology**, Georgetown, v. 12, n. 3, p. 305-319, 2015.

MURRAY, A. *et al.* Regions in the 3' untranslated region confer stage-specific expression to the *Leishmania mexicana* a600-4 gene. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 153, n. 2, p. 125-132, 2007.

MYUNG, K. S. *et al.* Comparison of the Post-transcriptional Regulation of the mRNAs for the Surface Proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 19, p. 16489-16497, 2002.

OLIN-SANDOVAL, V.; MORENO-SÁNCHEZ, R.; SAAVEDRA, E. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. **Current Drug Targets**, Hilversum, v. 11, n. 12, p. 1614-1630, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en>. Acesso em: 14 mar. 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, 2017. (Fact sheets, n. 375). Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene Transcription in Trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 135-141, 2006.

PEACOCK, C. S. *et al.*, Comparative Genomic Analysis of Three *Leishmania* Species That Cause Diverse Human Disease. **Nature Genetics**, Nova Iorque, v. 39, n. 7, p. 839-847, 2007.

PEREIRA, M. M. C. *et al.* The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 2, p. 82-86, 2013.

PIGOTT, D. M. *et al.* Global distribution maps of the Leishmaniases. **eLife**, Cambridge, 3:e02851, 2014. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103681/pdf/elife02851.pdf>>.
Acesso em: 03 nov. 2018.

PREISS, T.; HENTZE, W. Starting the Protein Synthesis Machine: Eukaryotic Translation Initiation. **Bioessays**, Cambridge, v. 25, n. 12, p. 1201-1211, 2003.

REQUENA, J. M. *et al.* The SIDER2 elements, interspersed repeated sequences that populate the *Leishmania* genomes, constitute subfamilies showing chromosomal proximity relationship. **BioMed Central Genomics**, Londres, 9:263, 2008. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2424063/pdf/1471-2164-9-263.pdf>>.
Acesso em: 03 nov. 2018.

REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)**, Searington, v.16, p. 2069-2085, 2011.

REZENDE, A. M. *et al.* The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates - Identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. **BioMed Central Genomics**, Londres, 15:1175, 2014. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320536/pdf/12864_2014_Article_6982.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2018.

ROCHETTE, A. *et al.* Characterization and developmental gene regulation of a large gene family encoding amastin surface proteins in *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 2, p. 205-220, 2005.

ROSENZWEIG, D. *et al.* Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 22, n. 2, p. 590-602, 2008.

ROY, G. *et al.* Paip1 interacts with Poly(A) binding protein through two independent binding motifs. **Molecular Cell Biology**, Baltimore, v. 22, n. 11, p. 3769-3782, 2002.

SACHS, A. Physical and functional interactions between the mRNA cap structure and the poly(A) tail. In: Sonenberg, N.; Hershey, J. W.; Mathews, M. B. (Ed.) **Translational Control of Gene Expression**. Laurel Hollow: Cold Spring Harbor Laboratory, 2000. p. 447-465.

SEARFOSS, A.; DEVER, T. E.; WICKNER, R. Linking the 3 poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 21, n. 15, p. 4900-4908, 2001.

SHETH, U.; PARKER, R. Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. **Science**, Nova Iorque, v. 300, n. 5620, p. 805-808, 2003.

SIEGEL, T. N. *et al.* Four histone variants mark the boundaries of polycistronic transcription units in *Trypanosoma brucei*, **Genes and Development**, Woodbury, v. 23, n. 9, p. 1063-1076, 2009.

SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The Evolution and Diversity of Kinetoplastid Flagellates. **Trends Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

SLADIC, R. *et al.* Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. **European Journal of Biochemistry**, Amsterdam, v. 271, n. 2, p. 450-457, 2004.

SMITH, M.; BRINGAUD F.; PAPADOPOULOU, B. Organization and evolution of two SIDER retroposon subfamilies and their impact on the *Leishmania* genome. **BioMed Central Genomics**, Londres, 10:240, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689281/pdf/1471-2164-10-240.pdf>>. Acesso em: 03 nov. 2018.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, Londres, 10(1):82, 2017. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312593/pdf/13071_2017_Article_2028.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2018.

STILES, J. K. *et al.* Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Londres, v. 93, n. 8, p. 781-807, 1999.

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: Related Protozoan Pathogens, Different Diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

TARUN, S. Z.; SACHS A. B. Binding of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (EIF4E) to EIF4G Represses Translation of Uncapped MRNA. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 17, n. 12, p. 6876-6886, 1997.

TEIXEIRA, S. M. *et al.* Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 1, p. 1-17, 2012.

THARUN, S.; PARKER, R. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 8, n. 5, p. 1075-1083, 2001.

UCHIDA, N. *et al.* A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 52, p. 50286-50292, 2002.

UETZ, P. *et al.* A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, Londres, v. 403, n. 6770, p. 623-627, 2000.

ULLU, E.; MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C. Temporal order of RNA-processing reactions in trypanosomes: rapid trans splicing precedes polyadenylation of newly synthesized tubulin transcripts. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 13, n. 1, p. 720-725, 1993.

ULLU, E.; TSCHUDI, C. Accurate modification of the trypanosome spliced leader cap structure in a homologous cell-free system. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 20365-20369, 1995.

URBANIAK, M. D.; MARTIN, D. M. A.; FERGUSON, M. A. J. Global quantitative SILAC Phosphoproteomics Reveals Differential Phosphorylation Is Widespread between the Procyclic and Bloodstream Form Lifecycle Stages of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 12, n. 5, p. 2233-2244, 2013 .

VALASEK, L. S. 'Ribozoomin'-translation initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). **Current Protein and Peptide Science**, Hilversum, v. 13, n. 4, p. 305-330, 2012.

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 Molecular Biology**, Dordrecht, v. 54, n. 1, p. 85-98, 2004.

WANG, Z; KILEDJIAN, M. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 20, n.17, p. 6334-6341, 2000.

WEI, C. C. Wheat germ poly(A) binding protein enhances the binding affinity of eukaryotic initiation factor 4F and (iso)4F for cap analogs. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 37, n. 7, p. 1910-1916, 1998.

WOLFFE, A. **Chromatin**: structure and function. (3.ed.). San Diego: Academic Press, 1998.

WRIGHT, J. R.; SIEGEL, T. N.; CROSS, G. A. M. Histone H3 trimethylated at lysine 4 is enriched at probable transcription start sites in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 141-144, 2010.

WU, Y. *et al.* A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 345-357, 2000.

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

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

ZHAO, J.; HYMAN, L.; MOORE, C. Formation of mRNA Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 63, n. 2, p. 405-445, 1999.

ZILKA, A. *et al.* Developmental Regulation of Heat Shock Protein 83 in *Leishmania*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 51, p. 47922-47929, 2001.

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

APÊNDICE A - LISTA DE PRIMERS

GFP Forwad	5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGG 3'
GFP Reverse	5' TTACTIONGTACAGCTCGTCCATGC 3'
HIGROMICINA F	5' ATGAAAAAGCCTGAACTCACCG 3'
HIGROMICINA R	5' CTATTCCTTTGCCCTCGGACG 3'
PUROMICINA F	5' ATGACCGAGTACAAGCCCACG 3'
PUROMICINA R	5' TCAGGCACCGGGCTTGCGGG 3'
H2B1.5F	5' CAAAAGCTTAGGTTTGATAGCAGAGAAG 3'
H2B1.5'R	5' AGGAGCGGGAACGAGTGGTAGGTGGTGTGAGGGGGGTGGG 3'
H2B1.3'F	5' ACCTGCTCGACATGTTTATTACCGGTTTTTCGGATGCCGT 3'
H2B1.3'R	5' CCGGGATCCGGTGGTGTGAGGGGGGTGGG 3'
H2B2.5'F	5' CAAAAGCTTACCGGTTTTTCGGATGCCGT 3'
H2B2.5'R	5' AGGAGCGGGAACGAGTGGTAGGTGGTGTGAGGGGGGTGGGG 3'
H2B2.3'F	5' ACCTGCTCGACATGTTTATTACCGGTTTTTCGGATGCCGT 3'
H2B2.3'R	5' CCGTCTAGATATCCGCAAACGATGGGCCG 3
H2B1 e H2B2 - 5' interno (Reverse)	5' TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGTGGTGTGAGGGGGGTGGG 3"
H2B1 e H2B2 - 3' interno (Foward)	5' TGGACGAGCTGTACAAGTAAACCGTTTTTCGGATGCCGT 3'
PABP1 5'UTR F	5' CTCCCGCCCTCGTTTTCCGCTT 3'
PABP1 5'UTR R + HIGRO	5' GTGAGTTCAGGCTTTTTTATTGAGTGAAGTGAAGAGA 3 '
PABP1 3'UTR F + HIGRO	5' GTCCGAGGGCAAAGGAATAGGCGAGAAGCCAGCAGGCGCC 3'
PABP1 5'UTR R + PURO	5' GTGGGCTTGTACTCGGTCATTTGAGTGAAGTGAAGAGA 3'
PABP1 3'UTR F + PURO	5' CCCGCAAGCCCGGTGCCTGAGCGAGAAGCCAGCAGGCGCC 3'
PABP1 3'UTR R	5' TTGTCGTACCCGCCAACGCTC 3'
PABP2 5'UTR F	5' GTAGTYGTTCCYCMYCCTCCT 3'
PABP2 5'UTR R + HIGRO	5' GTGAGTTCAGGCTTTTTTATTGAGTGAAGTGAAGAGA 3'
PABP2 3'UTR F + HIGRO	5' GTCCGAGGGCAAAGGAATAGGCGAGAAGCCAGCAGGCGCC 3'
PABP2 5'UTR R + PURO	5' GTGGGCTTGTACTCGGTCATTTGAGTGAAGTGAAGAGA 3'
PABP2 3'UTR F + PURO	5' CCCGCAAGCCCGGTGCCTGAGYSAGCGKCTMACCAAAC 3'
PABP2 3'UTR R	5' TCATCYCTCAGAAGMACAAC 3'
PABP2 - F BamHI	5' GGATCCATGGCCTTTACTGGTCCGAAT 3'
PABP2 - F BamHI – CC	5' GGATCCATGGCCTTTACTGGTCCGAATCC 3'
PABP2 - R HindIII	5' AAGCTTAACGCTCATGTGACGGTTTCCAG 3'
5' F UTR mut PABP2	5' GTCAGTGCAGCTCTTTTTGCAAG 3'
3' R UTR mut PABP2	5' CAAGCACGGGAGTAGAGTGC 3'
5' F Interno PABP2	5' GATGCAGTCTCTGATGCCACAG 3'
3' R Interno PABP2	5' CTTGCTGAACATCTCCTTCAGTGC 3'
5' INTERNAL PABP2 SEQUENCING	5' TCTCGACGTGAGCCGCTTCC 3'
3' INTERNAL PABP2 SEQUENCING	5' CGAAGGGCGTACGTGACGAA 3'

5'-PABP2-MEGAPRIMER	
(FRS-AAA)	5' CCTCTCGACGTGAGCCGCGCCGCCGCTCGCGAGGAGCGCCAGCGCG 3'
5'-PABP2-MEGAPRIMER	
(HSK-AAA)	5' CGTGAGCGCGCGCAGCAGGCCGCGCGTACCCGAACCTGTACGTCA 3'
5'-PABP2-MEGAPRIMER	
(TGM-AAA)	5' TCTGTGGCCGCCAAGATCGCGGCTGCGCTTCTCGAGATGGACAAC 3'
5'-PABP2-MEGAPRIMER	
(RQN-AAA)	5' CTTGCAAGGATGCGCGCGCCGCGGGCCTCGAGGAGCGCAGCAAGC 3'
5'-PABP2-MEGAPRIMER	
(RQN-AAA)*	5' CTTGCAAGGATGCGCGCGCCGCGGCCCTCGAGGAGCGCAGCAAGC 3'
3'-PABP2-MEGAPRIMER	
(FRS-AAA)	5' GCGCTGGCGCTCCTCGCGAGCGGCGGGCGCGGCTCACGTCGAGAGGG 3'
3'-PABP2-MEGAPRIMER	
(HSK-AAA)	5' GACGTACAGGTTCTGGGTACGCGGCGGCCTGCTGCGCGCGCTCACGG 3'
3'-PABP2-MEGAPRIMER	
(YAR-AAA)	5' CTCGCGCTCGAAGGAGATGGCGGCGGCCGCGAGACTCGCCCTTC 3'
3'-PABP2-MEGAPRIMER	
(IAK-AAA)	5' CGAGGGTCTGCGCTGGATCGCGGCGGCGGAGGTAGCGAGAGCCG 3'
3'-PABP2-MEGAPRIMER	
(RYQ-AAA)	5' CTCGTCACGGTGTGGGCCGCGGCGGCTTCCACGACGATCGCCTGG 3'
PABP3 5'UTR F	5' GAAAYAYGAARKGAATCCTAC 3'
PABP3 5'UTR R + HIGRO	5' GTGAGTTCAGGCTTTTTTCATYGCTGCTGTGTGTCMGTGTG 3'
PABP3 3'UTR F + HIGRO	5' GTCCGAGGGCAAAGGAATAGGYGCGRGGACATGGTAGTGYC 3'
PABP3 5'UTR R + PURO	5' GTGGGCTTGTACTCGGTTCATYGCTGCTGTGTGTCMGTGTG 3'
PABP3 3'UTR F + PURO	5' CCCGCAAGCCCGGTGCCTGAGYGCGRGGACATGGTAGTGYC 3'
PABP3 3'UTR R	5' ACACKCMGAGTGAAAYASAGG 3'
PABP3 - F BamHI	5' GGATCCATGGTGGTCCCAGTGCAAC 3'
PABP3 - R HindIII	5' AAGCTTGTGGCCAGTGTGCTGCTGAA 3'
5' F UTR mut PABP3	5' CTTGAGTGTGATGGTGGCCGTACC 3'
3' R UTR mut PABP3	5' GGGACAACAACACGTGTCTTCATCTC 3'
5' F Interno PABP3	5' GATGCCACAGTTCATGTCTGGCC 3'
3' R Interno PABP3	5' GCTCCTTGGCATTAAATAGCAGTATCC 3'
5' INTERNAL PABP3	
SEQUENCING	5' AGCACGAGGCCGCGTCCAG 3'
3' INTERNAL PABP3	
SEQUENCING	5' GCTCCTTCATGATGGCACAC 3'
5'-PABP3-MEGAPRIMER	
(TGM-AAA)	5' TCCAATGCCGCGAAGATTGCGGCTGCGCTGCTTGAGATGAGCCGC 3'
3'-PABP3-MEGAPRIMER	
(YGF-AAA)	5' GGCTGTCTCGAACTGCACGGCGGCGGCCCTTCGAGTTGCCTGCC 3'
3'-PABP3-MEGAPRIMER	
(VMF-AAA)	5' GAGCGGGTCGCGGATGGAGGCCGCGGCGCGGATTTGGAGCCCTGGT 3'
Primer 17	5' GGATCCATGGCTGCTGCTGTCCAGGAAG 3'
Primer 25	5' TCACCATCACACGGCAGCTC 3'
Primer 38.1	5' ACGCACATAGAGGAGAACCCCG 3'

Primer 38-GAGG 5' GAGGCCACAGCCGCGCTATTCAGTC 3'

Primer 40 5' GTTGCGGGGCGCGGAGGTCT 3'

44 5' CCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAG 3'

-----RRM3----- RRM3----- RRM3----- RRM3----- RRM3-----

		HHHHHHHHH	H SSSSSSS	S	SSS SSSSS	HH HHHHH		SSSS	HHHH	
					*** *****					
HsPABP1	205	ERLKDLEKFK	GPALSVKVMT	D-ESGKSKGF	GVVSPERHED	AKAVDEMNG	KELN----	G	KQIYVGRACK	KVEROTELKR
ScPABP	233	EQFOELFAKF	CPITVSASLEK	D-ADGKLGKF	GVVNERKHED	AKAVBALND	SELN----	G	EKLYVGRACK	KNERMHVLRK
AtPABP2	229	DDLKNAFGEY	GKITSAVVMK	D-GEGKSKGF	GVVNFENADD	AARAVESLNG	HKFD----	D	KEWYVGRACK	KSERETE LRV
LmPABP1	221	DVIEKFAKFK	GGITSAACK	D-KSGR--VF	AFCNFERHDD	AKAVBAMHD	HHIDGITAPG		EKLYVGRACK	RSERLIALRQ
LiPABP1	221	EVIEKFAKFK	GGITSAACK	D-KSGR--VF	AFCNFERHDD	AKAVBAMHD	HHIDGITAPG		EKLYVGRACK	RSERLIALRQ
LmxPABP1	221	EVIEKFAKFK	GGITSAACK	D-KSGR--VF	AFCNFERHDD	AKAVBAMHD	HHIDGITAPG		EKLYVGRACK	RSERLIALRQ
LbPABP1	221	EVIEKFAKFK	GGITSAACK	D-KSGR--VF	AFCNFERHDD	AKAVBAMHD	HHIDGITAPG		EKLYVGRACK	RSERLIALRQ
TbPABP1	217	DVIEKFAKFK	GGITSAACK	D-KNGR--AF	AFCNFERHDD	AKAVBAMHD	QFVEGVTPQG		EKLYVGRACK	RSERLIALRQ
TcPABP1	226	EVIEKFAKFK	GGITSSATCK	D-KNGR--VF	AFCNFERHED	AKAVBASHE	QFVDGVVPPG		EKLYVGRACK	RSERLIALRQ
LmPABP2	197	EKLRAFPAKY	GEVSSAKVRD	LGAAQSEAGL	GVVAFORHED	AARAVBELNG	KECE-IAKAG		SPLDVSRFRS	R-ERQRDRER
LiPABP2	197	EKLRAFPAKY	GEVSSAKVRD	LGAVQSEAGL	GVVAFORHED	AARAVBELNG	KECE-ISKAG		SPLDVSRFRS	R-ERQRDRER
LmxPABP2	197	EKLRAFPAKY	GEVSSAKVRD	LGAVQSEAGL	GVVAFORHED	AARAVBELNG	KECE-IAKAG		SPLDVSRFRS	R-ERQRDRER
LbPABP2	197	EKLRAFPAKY	GEVSSAKVRD	LGAVQSEAGL	GVVAFORHED	AARAVBELNG	KECE-IAKAG		SPLDVSRFRS	R-ERQRDRER
TbPABP2	198	EKLKVEVSPF	GEVTSKVRD	LAGRP-TVGF	GVVAFATHEA	AARAVBELDD	KESE-LAKEG		MKLSVCRFRS	R-ERQRDRER
TcPABP2	198	EKLKVEVSPF	GEVTSKVRD	LAGRP-TVGF	GVVAFATHEA	AARAVBELDE	KESE-LAKEG		MKLSVCRFRS	R-ERQRDRER
LmPABP3	202	ADVKAIVEEF	GKVSLSFLSE	H-ARFP-TKF	ALVAFEBEHA	AVKALIAALNE	SEESGLTEKA		VKLVCRAALS	KSERDREKKK
LiPABP3	202	ADVKAIAEKF	GKVSLSFLSE	H-APFP-TKF	ALVAFEBEHA	AVKALIAALNE	SEESGLTEKA		AKLVVCRAALS	KSERDREKKK
LmxPABP3	202	ADVKTIVETF	GKVSLSFLSE	H-APFP-TKF	ALVAFEBEHA	AVKALIAALNE	SEESGLTEKA		AKLVVCRAALS	KSERDREKKK
LbPABP3	202	VDMRTTLEKE	GKVSLSFLAE	H-APFL-TKF	ALVAFEBEHA	AVKALIAALNE	SEESGLTEEA		VKLVCRAALS	KSERDREKKK

-----RRM4----- RRM4----- RRM4----- RRM4----- RRM4-----

		H	SSSSS	SS	HH HHHHHHHHH	SSSSSSS	S	SSSS	SSSSS	HHH	HHHH
					*** **			****	****		
HsPABP1	279	KFEQMRDRI	TRYCGNLYV	RNLDDGIDDE	RURKEEPPFG	TITSAKVM-M	EGGRS-RGFG		FVCFSSPBEA	TKAVTEMNGR	
ScPABP	307	QYEAYRLEKM	AKYCGNLYV	RNLDDSVDE	RURKEEPPFG	TITSAKVMRT	ENGKS-RGFG		FVCFSTPBEA	TKAITERNQQ	
AtPABP2	303	RYEONLKEAA	DKFOSSNLYV	RNLDPISIDE	KURKEEPPFG	TVTSSKVRD	PNGTS-RGSG		FVAFATPBEA	TEAMSQLSGK	
LmPABP1	298	KYMCHCS---	---LGNLYV	RNFDPPEFTGA	DLELEKEYG	EVKSCRVMVS	ESGVS-RGFG		FVSESNADBA	NAALREMNGR	
LiPABP1	298	KYMCHCS---	---LGNLYV	RNFDPPEFTGA	DLELEKEYG	EVKSCRVMVS	ESGAS-RGFG		FVSESNADBA	NAALREMNGR	
LmxPABP1	298	KYMCHCS---	---LGNLYV	RNFDPPEFTGA	DLELEKEYG	DVKSCRVMVS	ESGAS-RGFG		FVSESNADBA	NAALREMNGR	
LbPABP1	298	KYMCHCS---	---LGNLYV	RNFDPPEFTGA	DLELEKEYG	DVKSCRVMVS	ESGAS-RGFG		FVSESNADBA	NAALREMNGR	
TbPABP1	294	KYMCHCS---	---LGNLYV	RNFDAEPTTEK	DLELEKEYG	VIRSCRVMTD	ANGIS-RGFG		FVSESNADCA	NAALREMNGR	
TcPABP1	303	KYMCHCS---	---LGNLYV	RNFDPPEFTTE	DLELEKEYG	VIRSCRVMTD	ANGNS-RGFG		FVSESNADCA	NAALREMNGR	
LmPABP2	276	ORRERAAQ---	---HSKYPNLYV	RGFDDTVISE	RURKEEPPFG	ETVSVTVMD	KETGVSRCFG		FVSMKDNAA	SCAIOELNGS	
LiPABP2	276	ORRERAAQ---	---HSKYPNLYV	RGFDDTVISE	RURKEEPPFG	ETVSVTVMD	KETGVSRCFG		FVSMKDNAA	SCAIOELNGS	
LmxPABP2	276	ORRERAAQ---	---HSKYPNLYV	RGFDDTVISE	RURKEEPPFG	ETVSVTVMD	KETGVSRCFG		FVSMKDNAA	SCAIOELNGS	
LbPABP2	276	ORRERAAQ---	---HSKYPNLYV	RGFDDTVISE	RURKEEPPFG	ETVSVTVMD	KETGVSRCFG		FVSMKDNAA	SCAIOELNGS	
TbPABP2	276	LRREAAQ---	---HSKYPNLYV	RNFDDTVISE	RURKEEPPFG	ETVSVTVMD	KATRVSRQFG		FVSEKQSSAA	ACAIOELHGS	
TcPABP2	276	LRREAAQ---	---HSKYPNLYV	RNFDDTVISE	RURKEEPPFG	ETVSVTVMD	RATRVSRQFG		FVSEKQSSAA	SCAIOELHGS	
LmPABP3	280	AASLYN---	---HGRNLYV	RHLRDDITDD	RURKEEPPFG	KITSCAIME	PNGTL-RGFA		FVCFEDKQHA	SAAIERSLNGH	
LiPABP3	280	AASLYN---	---HGRNLYV	RHLRDDITDD	RURKEEPPFG	KITSCAIME	PNGTF-RGFA		FVCFEDRQHA	SAAIERSLNGH	
LmxPABP3	280	AASLYN---	---HGRNLYV	RHLRDDITDD	RURKEEPPFG	KITSCAIME	PNGTF-RGFA		FVCFEDRQHA	SAAIERSLNGH	
LbPABP3	280	TASLYN---	---HGRNLYV	RHLRDDITDD	RURKEEPPFG	KITSCAIME	SNGSL-RGFA		FVCFEDKQHA	TAAMRELNHG	

-----RRM4-----

		S SSSS								
HsPABP1	357	IVA--TKPLV	VATAQRKEDR	QAHITNQYMD	RMASVRAVFN	PVINPYQAP	PSGYFMAAIP	QTQN-RAAYV	PPSQIAQLRP	
ScPABP	386	IVA--CKPLV	VATAQRKEDR	RSQIAQQIQA	RNDLR-----	-----YQQAT	AA----AAAA	AAGM-PGQFM	PPMFYGVMP	
AtPABP2	382	MIE--SKPLV	VATAQRKEDR	RVRQAQFSQ	VRPVA-----	-----MQPSV	GPRMPVYPPG	GGIGQQMFY	QQAPPAMIP	
LmPABP1	371	MLN--CKPLV	VNTAQRDOR	YTMURLQFQ	RLOQMMR---	-----QMHQPM	PFVGS----Q	GRPMRGRG-G	ROQLGGRAG	
LiPABP1	371	MLN--CKPLV	VNTAQRDOR	YTMURLQFQ	RLOQMMR---	-----QMHQPM	PFVGS----Q	GRPMRGRG-G	ROQLGGRAG	
LmxPABP1	371	MLN--CKPLV	VNTAQRDOR	YTMURLQFQ	RLOQMMR---	-----TMHQPM	PFVGG----Q	GRPMRGRG-G	ROQLGGRAG	
LbPABP1	371	MLN--CKPLV	VNTAQRDOR	YTMURLQFQ	RLOQMMR---	-----QMHQPM	PFVGG----Q	GRPMRGRG-G	ROQLGGRAG	
TbPABP1	367	MLN--CKPLV	VNTAQRDOR	LTMURLQFQ	RLOQMMH---	-----HMHP-P	PFQMPGHLPQ	RRNARSGGRG	NRPHPRQQP	
TcPABP1	376	MLN--CKPLV	VNTAQRDOR	FMMURLQFQ	RLOQMMR---	-----RMHS-L	PFVSHGHLQ	RNNARGTORG	GGGGGVGGG	
LmPABP2	353	TFLS-PRPLV	VTYALRRDAR	RQNDDE-RSK	QFRVRON---	PMGGPGMGAM	-PPIGFMGF-	QMFNNVMMP	MNPRVPIIMP	
LiPABP2	353	TFLS-PRPLV	VTYALRRDAR	RQNDDE-RSK	QFRVRON---	PMGGPGMGAM	-PPIGFMGF-	QMFNNVMMP	MNPRVPIIMP	
LmxPABP2	353	TFLS-PRPLV	VTYALRRDAR	RQNDDE-RSK	QFRVRON---	PMGGPGMGAM	-PPIGFMGF-	QMFNNVMMP	MNPRVPIIMP	
LbPABP2	353	TFLC-PRPLV	VTYALRRDAR	RQNDDE-RSK	QFRVRON---	PMGGPGMGAM	-PPVGFMGF-	QMFNSVMMP	MSPRVPIIMP	
TbPABP2	353	TALG-PRPLV	VTYALRRDAR	RQTEEDMRNK	QPRVROP---	PMGGLMGGAM	GPQLSFMNPP	AMFN--GMHF	MNTRMFMMP	
TcPABP2	353	TALG-PRPLV	VTYALRRDAR	RQTEEDMRNK	QPRVROP---	PMGSLMGGAM	GPQLGFMGFQ	AMFN--GVVF	VNPRMSMMP	
LmPABP3	353	PLEHSRKLPLV	VSHAEQRDOR	---IRLQOR	RAAMR-----	-----HQRSM	APLMN----T	FPCQWRPHPF	PHMVPPMPP	
LiPABP3	353	PLEHSRKLPLV	VSHAEQRDOR	---IRLQOR	RAAMR-----	-----HQRSM	VPPMN----T	FPCQWRPHPF	PHMVPPMPP	
LmxPABP3	353	SLDNSRKLPLV	VSCAEQRDOR	---IRLQOR	RAAMR-----	-----HQRSM	APPMN----T	FPCQWRPHPF	SHMAPPMP	
LbPABP3	353	SLESSRKLPLV	VSCAEQRDOR	---IRLQOR	RAAMR-----	-----HOTRM	APPMN----T	FPCQWRPHPF	PHMVPPMPP	

HsPABP1	434	SPRWTAQGAR	PHPFQNMPGA	IRPAAPRFPF	STMRPASSQV	PRVMSTQRVA	NTSTQTVGPR	PAAAAAATP	AVRTVQYKY
ScPABP	448	-----R	GVFEN----	----GPN----	-----	-----	---QQNPM	GGMPKNGMPP	QFRNGEYVG-
AtPABP2	450	QP-----GY	GyQQQLVPGM	RPGGGVVBSF	FMP-----	-----	MVQPOQORPG	GGRRPGGIQH	SOQONPMQQ
LmPABP1	437	HP-----	-----	--MPMPSQQ	P-----	-----	---QAPAQPO	GFATPSAVG-	FVQATPKHSP
LiPABP1	437	HP-----	-----	--MPMPSQQ	P-----	-----	---QAPAQPO	GFATPSAVG-	FVQATPKHSP
LmxPABP1	437	HP-----	-----	--MPMPSQQ	POA-----	-----	-FVQAPVQPO	GFATPSAVG-	FVQATPKHSP
LbPABP1	437	HP-----	-----	--MPMPSQQ	S-----	-----	-----Q	GFATPSAVG-	FVQATPKHSP
TbPABP1	437	QP-----	-----	--QPEPQPL	ATT-----	-----	-VPPAAHSV	MFTAPSMGFS	AVPRTQASP
TcPABP1	446	GA-----	-----	--GRIQAPP	MP-----	-----	--PPVQD--	MFTAPSMAF-	APPRTQPSF
LmPABP2	426	NGMNGIGGMN	GMGMNGVGG	VGGMGGMGM	GGMGG----	----MGMGG	MGGMGSVGGM	GGMARPMAPN	AMSQMRSRPM
LiPABP2	426	NGMNGIGGMN	GMGMNGVGG	VGGMGGMGM	GGMG----	-----	--GMGGVGGM	GGMARPMAPN	AMSQMRSRPM
LmxPABP2	426	NGMNGIGGMN	GMGMNGVGG	VGGMGGVGGV	GGMGG----	----VGGVGG	VGAMGGVGGM	GGMARPMAPN	AMSQMRSRPM
LbPABP2	426	NGMNGIGGMN	GMGMNGMNG	MGGMGGM--	-----	-----	--GMGTVGGM	GGMRPMAPN	AMSQMRSRPM
TbPABP2	426	-----	-----	-----	-----	-----	---TMG-M	GGPMRPMGPT	PMNQVRARP
TcPABP2	426	-----	-----	-----	-----	-----	---PMG-M	GGQLRPMGPT	PMNQVRARP
LmPABP3	416	PP-----	-----	----PNNM	G-----	-----	--MPQFVSGP	MIRRPVMEPH	LMQGEPMRPP
LiPABP3	416	PP-----	-----	----PNNM	G-----	-----	--MPQFVSGP	MIRRPVMEPH	LMQGEPMRPP
LmxPABP3	416	PP-----	-----	----PNNM	G-----	-----	--MPQFVSGP	MIRRPVMEPH	LMQGEPMRPP
LbPABP3	416	PP-----	-----	----PNNM	G-----	-----	--MPQFVSGP	MMRRPVMDAH	PROGEMRPP

-----PABC-----PABC-----

HsPABP1	514	AAGVRNPOQH	LNAQPOVTMO	QPAVHVQGE	FL-----	-----	HHHHHHH	TASMLASAPF	EQOKMLGER	LEPLIQAMHF
ScPABP	483	-----	-----	---VPPQGGF	PRN-----	-----	-----	-ANDNNQFYQ	QKORQALGED	LYKKVSAKTS
AtPABP2	507	QMHPGRMFR	YPOGRGSGD	VPPYDMGNM	PLTI-----	-----GA	-----	LASNLNATF	EQORTMLGEV	LYPLVEQVEA
LmPABP1	474	GD-----	-----	--VEETPLP	PITP-----	-----	-----	--QELESMSF	QBORAAALGDR	LELKVYEIAP
LiPABP1	474	GD-----	-----	--VEETPLP	PITP-----	-----	-----	--QELESMSF	QBORAAALGDR	LELKVYEIAP
LmxPABP1	478	GD-----	-----	--AEETPLP	PITP-----	-----	-----	--QELESMSF	QBORAAALGDR	LELKVYEIAP
LbPABP1	468	QI-----	-----	--VEETPLP	PITP-----	-----	-----	--QELESMSF	QBORAAALGDR	LELKVYEIAP
TbPABP1	479	AI-----	-----	--APDTPPLP	PISA-----	-----	-----	-EDLQMSV	DEORAAALGDR	LYIKVHELAP
TcPABP1	483	GV-----	-----	--APDTPPLP	PITA-----	-----	-----	-EDLRSMSV	DEORAAALGDR	LYIKVFEIAP
LmPABP2	497	PQ-----	-----	--KPPMQLM	POQHQ----	-QAPP-QGQN	LAAVLANLNP	EQOKNVLGER	LYSYIVRSHP	
LiPABP2	488	PQ-----	-----	--KPPMQLM	POQHQ----	-QAPP-QGQN	LAAVLANLNP	EQOKNVLGER	LYSYIVRSHP	
LmxPABP2	497	PQ-----	-----	--KPPMQLM	POQHQ----	-QAPP-QGQN	LAAVLANLNP	EQOKNVLGER	LYSYIVRSHP	
LbPABP2	482	PQ-----	-----	--KPPMQLM	POQHQ----	-QPPP-QGQN	LAAVLANLNP	EQOKNVLGER	LYSYIVRSHP	
TbPABP2	451	PQ-----	-----	--RPPMQSMM	APQQQSHPOI	PQPPVAQGQN	LSTVLASMTF	EQOKNVLGER	LYNYIVRNNP	
TcPABP2	451	PQ-----	-----	--RPPMQPIIM	APPPQ----	PQSLASQGQN	LSTVLANLTF	EQOKNVLGER	LYNHIVAINP	
LmPABP3	451	NR-----	-----	-YTOARBOYP	POQ-----	-----	---RODGV	DMNYLSTLSF	EQOKNYLGBL	LYSRIPLPLES
LiPABP3	451	NR-----	-----	-YTOPREOYP	POQ-----	-----	---RODGV	DMNYLSTLSF	EQOKNYLGBL	LYSRIPLPLES
LmxPABP3	451	NR-----	-----	-YTOPREOYP	POQ-----	-----	---RODGV	DMDYLSTLSF	EQOKNYLGBL	LYSRIPLPLES
LbPABP3	451	NR-----	-----	-YTYPREOYQ	POQPOQ----	PQPPRODGI	DVNYLNTLSF	EQOKNYLGBL	LYSRIIMPVES	

-----PABC-----PABC-----PABC-----

HsPABP1	575	--TLAGKITG	MLELDNSEI	LHMLSEPEST	RSKVDAAVAV	LQAEQAKEAA	QKAVNSATGV	PTV
ScPABP	523	NEEAAGKITG	MILDLPQEV	FPULESDEL	EQHYKEASAA	YESFK-KEQE	QOTEQA----	---
AtPABP2	572	--ESAARVTG	MLELDQTEV	LHLLSEPAI	KARVAEAMDV	DRSVAAGGAT	EQLASLNL-	---
LmPABP1	515	--ELAPKITG	MLEMKPREA	YELLDQKRL	EERVTEALCV	LKAHQTA---	-----	---
LiPABP1	515	--ELAPKITG	MLEMKPREA	YELLDQKRL	EERVTEALCV	LKAHQTA---	-----	---
LmxPABP1	519	--ELAPKITG	MLEMKPREA	YELLDQKRL	EDRVTEALCV	LKAHQTT---	-----	---
LbPABP1	509	--ELAPKITG	MLEMKPREA	YELLDQKRL	EERVTEALCV	LKAHQTV---	-----	---
TbPABP1	520	--DHAPKITG	MLEMNPREA	LALLSNPKLM	HERVTEALCV	LKVFASSA---	-----	---
TcPABP1	524	--DHAPKITG	MLEMDLRBA	FTLLTNQLL	QEKVTEALCV	LKAHESTA---	-----	---
LmPABP2	549	--SVAAKITG	MLEMDNAET	LNLDSPTML	DSKLAEAQDV	LNRHMSV---	-----	---
LiPABP2	540	--SVAAKITG	MLEMDNSEI	LNLDSPTML	DSKLAEAQDV	LNRHMSV---	-----	---
LmxPABP2	549	--SVAAKITG	MLEMDNSEI	LNLDSPTML	DSKLAEAQDV	LNRHMSV---	-----	---
LbPABP2	534	--SVAAKITG	MLEMDNSEI	LNLDSFVML	DSKLAEAQDV	LNRHMSV---	-----	---
TbPABP2	510	--SFAARVTG	MLEMDNSEI	LNLLDNHSLL	DTRVCEALDV	LNRHIGM---	-----	---
TcPABP2	505	--AAAARVTG	MLEMDNGEI	LNLLDTPGUL	DARVCEALEV	LNRHMNV---	-----	---
LmPABP3	499	--SNAAKITG	MLEMSREET	FETLDHFAL	LSKIOEANAV	LOOHTGN---	-----	---
LiPABP3	499	--SNAAKITG	MLEMSREET	FETLDHFAL	LSKIOEANAV	LOOHTGN---	-----	---
LmxPABP3	499	--SNAAKITG	MLEMSREET	FETLDGFAL	LSKIOEANAV	LOOHTGN---	-----	---
LbPABP3	507	--FNAAKITG	MLEMSREET	FETLRDHFAL	LAKIOEANAV	LOOHSGN---	-----	---

APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO

RNA BIOLOGY
2018, VOL. 15, NO. 6, 739–755
<https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1445958>



RESEARCH PAPER



Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation

Oswaldo P. de Melo Neto^a, Tamara D. C. da Costa Lima^b, Kleison C. Merlo^a, Tatianny P. Romão^a, Pollyanna O. Rocha^a, Ludmila A. Assis^a, Larissa M. Nascimento^a, Camila C. Xavier^a, Antonio M. Rezende^a, Christian R. S. Reis^a and Barbara Papadopoulou^c

^aInstituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil; ^bCentro Universitario Tabosa de Almeida, UNITA, Caruaru, Pernambuco, Brazil; ^cCHU de Quebec Research Center and Department of Microbiology-Infectious Disease and Immunology, Laval University, Quebec, QC, Canada

ABSTRACT

The Poly-A Binding Protein (PABP) is a conserved eukaryotic polypeptide involved in many aspects of mRNA metabolism. During translation initiation, PABP interacts with the translation initiation complex eIF4F and enhances the translation of polyadenylated mRNAs. Schematically, most PABPs can be divided into an N-terminal RNA-binding region, a non-conserved linker segment and the C-terminal MLE domain. In pathogenic *Leishmania* protozoans, three PABP homologues have been identified, with the first one (PABP1) targeted by phosphorylation and shown to co-immunoprecipitate with an eIF4F-like complex (EIF4E/EIF4G3) implicated in translation initiation. Here, PABP1 phosphorylation was shown to be linked to logarithmic cell growth, reminiscent of EIF4E4 phosphorylation, and coincides with polysomal association. Phosphorylation targets multiple serine-proline (SP) or threonine-proline (TP) residues within the PABP1 linker region. This is an essential protein, but phosphorylation is not needed for its association with polysomes or cell viability. Mutations which do impair PABP1 polysomal association and are required for viability do not prevent phosphorylation, although further mutations lead to a presumed inactive protein largely lacking phosphorylated isoforms. Co-immunoprecipitation experiments were carried out to investigate PABP1 function further, identifying several novel protein partners and the EIF4E4/EIF4G3 complex, but no other eIF4F-like complex or subunit. A novel, direct interaction between PABP1 and EIF4E4 was also investigated and found to be mediated by the PABP1 MLE binding to PABP Interacting Motifs (PAM2) within the EIF4E4 N-terminus. The results shown here are consistent with phosphorylation of PABP1 being part of a novel pathway controlling its function and possibly translation in *Leishmania*.

ARTICLE HISTORY

Received 31 July 2017
Revised 21 December 2017
Accepted 13 February 2018

KEYWORDS

Leishmania; translation; phosphorylation; protein-protein interaction; translation initiation factor; polyadenylate-binding protein

Introduction

The trypanosomatids constitute a group of parasitic flagellated protozoans which include major human pathogens belonging to the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*. These organisms are characterized by a complex biology and singular molecular aspects rarely encountered in other eukaryotes. Unique features include polycistronic transcription and regulation of gene expression based mainly on post-transcriptional mechanisms, targeting events such as mRNA stability and translation [1–7]. A major target for regulation is possibly the initiation stage of protein synthesis where a number of eukaryotic translation initiation factors are known to act [8]. Paramount among those is the translation initiation factor eIF4F, a complex of three distinct subunits including the RNA helicase eIF4A, the cap binding protein eIF4E and the scaffolding subunit eIF4G. During translation, eIF4F binds to the mRNA and facilitates the recruitment of the small ribosomal subunit to its 5' end [9–12]. A key eIF4F partner is the cytoplasmic Poly-A Binding Protein (PABPC or simply PABP), a conserved eukaryotic protein involved in multiple cellular functions

associated with the metabolism of messenger RNAs, including mRNA polyadenylation/deadenylation, export, surveillance, degradation, and translation [13–20]. At the initiation stage of protein synthesis, PABP is responsible for the enhanced translation of polyadenylated mRNAs, facilitating their recruitment by the translation machinery. In model eukaryotes, this is accomplished through a direct interaction between PABP and eIF4F. In mammals, yeasts and plants the interaction between eIF4F and PABP is mediated through the eIF4G subunit [10,13,14,16,20].

Schematically, PABPs are formed by a N-terminal region, a non-conserved linker segment and the unique C-terminal MLE domain, originally called PABC (for reviews see [10,13,14,16,20]). The N-terminal region consists of roughly two-thirds of the protein and contains four conserved RNA binding domains (RRMs) positioned in tandem, each defined by the presence of two highly conserved RNP motifs (RNP1 and RNP2) [21,22]. The PABP RRM1 and 2 are responsible for the specific binding to poly-A and also mediate the protein's interaction with eIF4G [23–26].

CONTACT Oswaldo P. de Melo Neto opmn@cpqam.fiocruz.br Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz. Av. Prof. Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária – Campus da UFPE, Recife, PE, 50740–465, Brazil; Barbara Papadopoulou barbara.papadopoulou@crchul.ulaval.ca Department of Microbiology and Immunology, Laval University Research Center in Infectious Disease, RC-709, CHUL Research Center (CHUQ) 2705 Laurier Blvd. Quebec, QC, G1V 4G2, Canada.

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

© 2018 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group