

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

STÉPHANNY SALLOMÉ SOUSA OLIVEIRA

ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DOS FATORES EIF4G3 E
EIF4G4 COM PROTEÍNAS PARCEIRAS NA INICIAÇÃO DA
TRADUÇÃO EM *Leishmania infantum*

RECIFE

2020

STÉPHANNY SALLOMÉ SOUSA OLIVEIRA

**ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DOS FATORES EIF4G3 E EIF4G4 COM
PROTEÍNAS PARCEIRAS NA INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM *Leishmania*
*infantum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Dr. Christian Robson de Souza Reis

Coorientador (a):

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Dr^a. Danielle Maria Nascimento Moura

RECIFE

2020

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- O48a Oliveira, Stéphanny Sallomé Sousa.
Análise das interações dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 com proteínas parceiras na iniciação da tradução em *Leishmania infantum* / Stéphanny Sallomé Sousa Oliveira. — Recife: [s.n.], 2021.
100 p. : il., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientador: Christian Robson de Souza Reis; coorientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto, coorientadora: Danielle Maria Nascimento Moura.

1. *Leishmania infantum*. 2. Deleção de Genes. 3. Biossíntese de proteínas. 4. Fator de Iniciação Eucariótico 4G. 5. Proteínas de Protozoários. I. Christian Robson de Souza, Reis. II. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. III. Moura, Danielle Maria Nascimento. IV. Título.

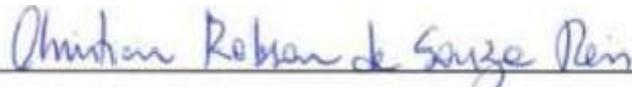
STÉPHANNY SALLOMÉ SOUSA OLIVEIRA

ANÁLISE DAS INTERAÇÕES DOS FATORES EIF4G3 E EIF4G4 COM
PROTEÍNAS PARCEIRAS NA INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM *Leishmania*
infantum

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 03/03/2020

BANCA EXAMINADORA



Dr. Christian Robson de Souza Reis — Orientador
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Rafael Dhalia — Membro Interno
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz



Dra. Isabelle Freire Tabosa Viana — Membro Externo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, um menino colocado à frente de fenômenos naturais que impressionam como se de um conto de fadas se tratassem (CURIE, 1903).

OLIVEIRA, Stéphanny Sallomé Sousa. **Análise das interações dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 com proteínas parceiras na iniciação da tradução em *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2020.

RESUMO

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados que apresentam regulação da expressão gênica pós-transcricional. Em eucariotos, a iniciação da tradução começa com a ligação do complexo eIF4F (formado pelas proteínas eIF4A, eIF4E e eIF4G) ao *cap* presente na região 5' dos mRNAs, permitindo seu reconhecimento pelo ribossomo. Em tripanosomatídeos, foram identificados cinco homólogos da subunidade eIF4G e dois deles, o EIF4G3 e EIF4G4, têm características compatíveis com o processo de tradução. Este trabalho teve por objetivo avaliar a viabilidade de células de *Leishmania infantum* submetidas à deleção dos genes EIF4G3 e EIF4G4 e caracterizar as interações das proteínas correspondentes e seus ligantes *in vivo*. Em ensaios de nocaute gênico, a deleção de um dos alelos de EIF4G3 e EIF4G4 não provocou alterações na morfologia e no crescimento celular. Em seguida, foram obtidas células promastigotas de *L. infantum* superexpressando as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens ou mutantes em sítios de ligação para às proteínas parceiras EIF4E e EIF4A. Os resultados mostraram que às proteínas EIF4G3 e EIF4G4 foram expressas em duas isoformas, em perfil similar as proteínas endógenas. Entretanto, o mutante do EIF4G3 que não liga ao EIF4A1, apresentou uma isoforma e um perfil de expressão protéica diminuída. Os complexos coprecipitados *in vivo* foram identificados através de espectrometria de massas. Os dados mostram que as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens interagem com seus parceiros EIF4E e EIF4A1, respectivamente, como já descrito. A associação com proteínas ribossomais e fatores de tradução, com os complexos eIF3 e eIF2, sugerem que as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 estão envolvidas com a tradução. A análise dos mutantes do EIF4G3 demonstrou que os mesmos não interagiram com seus parceiros EIF4E e EIF4A1, e também com outros componentes da maquinaria de tradução. Este trabalho permitiu avançarmos na função das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 na tradução, a partir das suas interações com demais proteínas em tripanosomatídeos.

Palavras – chave: *Leishmania infantum*. Biossíntese de proteínas. eIF4

OLIVEIRA, Stéphanny Sallomé Sousa. **Analysis of the interactions of the factors EIF4G3 and EIF4G4 with partner proteins in the initiation of translation in *Leishmania infantum***. Dissertation (Academic Master's Degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2020.

ABSTRACT

Trypanosomatids are flagellated protozoa that have post-transcriptional gene expression regulation. In eukaryotes, the initiation of translation begins with the binding of the eIF4F complex (formed by the proteins eIF4A, eIF4E and eIF4G) to the cap present in the 5' region of the mRNAs, allowing its recognition by the ribosome. In trypanosomatids, five homologues of the eIF4G subunit were identified and two of them, EIF4G3 and EIF4G4, have characteristics compatible with the translation process. This work aimed to evaluate the viability of *Leishmania infantum* submitted to the deletion of the EIF4G3 and EIF4G4 genes and to characterize the interactions of the corresponding proteins and their ligands in vivo. In gene knockout assays, the deletion of one of the EIF4G3 and EIF4G4 alleles did not cause changes in morphology and cell growth. Then, *L. infantum* promastigote cells were obtained overexpressing the wild or mutant EIF4G3 and EIF4G4 proteins at binding sites to the partner EIF4E and EIF4A proteins. The results showed that EIF4G3 and EIF4G4 proteins were expressed in two isoforms, in a similar profile to endogenous proteins. However, the EIF4G3 mutant that does not bind to EIF4A1, showed an isoform and a decreased protein expression profile. In vivo co-precipitated complexes were identified by mass spectrometry. The data show that the wild-type EIF4G3 and EIF4G4 proteins interact with their partners EIF4E and EIF4A1 as already described. The association with ribosomal proteins and translation factors, with the eIF3 and eIF2 complexes, suggests that the EIF4G3 and EIF4G4 proteins are involved with translation. The analysis of the EIF4G3 mutants showed that they did not interact with their partners EIF4E4 and EIF4A1, and also with other components of the translation machinery. This work allowed us to advance in the function of EIF4G3 and EIF4G4 proteins in translation from their interactions with other proteins in trypanosomatids.

Key words: *Leishmania infantum*. Translation initiation. eIF4G

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas morfológicas da <i>Leishmania spp</i>	26
Figura 2. Esquema de classificação do gênero <i>Leishmania</i>	27
Figura 3. Ciclo da <i>Leishmania spp</i>	30
Figura 4. Formação dos mRNAs maduros nos tripanosomatídeos.	32
Figura 5. Formação dos complexos envolvidos na etapa de iniciação da tradução	36
Figura 6. Esquema do eIF4G e seus principais sítios de ligação a outras proteínas	36
Figura 7. Esquema representativo de complexos do tipo eIF4F nos tripanosomatídeos.....	37
Figura 8. Fluxograma ilustrando as etapas do trabalho	43
Figura 9. Esquema ilustrativo da deleção do gene alvo endógeno através da integração do gene de resistência por recombinação homóloga	47
Figura 10. Análise comparativa de sequências do EIF4G3 e EIF4G4 de diferentes espécies de tripanosomatídeos.....	52
Figura 11. Expressão protéica das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens e mutantes na forma promastigota de <i>Leishmania infantum</i>	54
Figura 12. Curvas de crescimento de células de <i>Leishmania infantum</i> expressando EIF4G3 e EIF4G4 em fusão com HA.	55
Figura 13. Análise dos níveis de crescimento e perfil de expressão dos mutantes do fator EIF4G3 de <i>L. infantum</i>	56
Figura 14. Obtenção de lisados expressando o EIF4G3 e EIF4G4 de <i>L. infantum</i> e ensaio de imunoprecipitações dos genes selvagens e mutantes fusionados ao epítipo HA.	57
Figura 15. Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que interagem com os mutantes do EIF4G3 de <i>L.infantum</i>	60

Figura 16. Gel de agarose 1% mostrando os cassetes de deleção gênica purificado utilizados no <i>single knockout</i>	66
Figura 17. Esquema representativo de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação do <i>single knockoute - SKO</i>	66
Figura 18. Gel de agarose a 1% confirmando o <i>single knockout</i> nos homólogos EIF4G de <i>Leishmania infantum</i>	67
Figura 19. Ensaio de complementação do EIF4G3 e EIF4G4 possuindo apenas um alelo gênico	68
Figura 20. Análise dos níveis de crescimento das linhagens com apenas uma cópia endógena do EIF4G3 complementada com construções contendo o gene selvagem e mutantes com <i>tag HA</i>	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista com construções plasmidiais e cassetes de expressão gênica disponíveis	44
Quadro 2. Lista de antibióticos e suas respectivas concentrações utilizadas neste trabalho para seleção de células promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	47
Quadro 3. Sequência de <i>oligonucleotídeos</i> utilizados para confirmação do <i>single knockout (SKO)</i>	48
Quadro 4. Linhagens obtidas superexpressando os homólogos EIF4G selvagens e mutantes de <i>L. infantum</i>	53
Quadro 5. Análise de proteínas identificadas por espectrometria de massa que coprecipitam com o EIF4G3 selvagem de <i>Leishmania infantum</i>	58
Quadro 6. Análise comparativa das proteínas identificadas por espectrometria de massa que coprecipitam com o EIF4G4 selvagem e seus mutantes em <i>Leishmania infantum</i>	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
DKO	<i>Doble knockout</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
eIFs	<i>Eukaryotic Initiation Factor</i>
HA	Hemaglutinina
HEAT	Huntingtina (envolvida na doença de Huntington), EF3 (Fator de Elongação 3), PR/65A (subunidade A da proteína Fosfatase 2), e mTor/FRAP (molécula sensível à rapamicina)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IP	Imunoprecipitação
kDa	Kilodaltons
LB	Luria Bertani
LV	Leishmaniose visceral
m ⁷ GTP	<i>7-methylguanosine Triphosphate (7-metilguanosina trifosfato)</i>
mA	Miliamperes
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
PABP	<i>Poly-A Binding Protein</i>
Pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PKDL	Leishmaniose dérmica pós- calazar
PTM	<i>Post-translational modifications</i>
PVDF	<i>Polyvinylidene fluoride</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

RPM	Rotação por minuto
SDS-	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SKO	<i>Single knockout</i>
SL	<i>Spliced leader</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
tRNA	RNA transportador
UTR	<i>Untranslated region</i>
WB	<i>Western blot</i>
WT	<i>Wild type</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. REFERENCIAL TEÓRICO	25
2.1 Aspectos gerais dos tripanosomatídeos	25
2.2 O gênero <i>Leishmania</i> , suas espécies e manifestações clínicas	27
2.3 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	29
2.4 Características biológicas dos tripanosomatídeos	31
2.5 Biossíntese protéica e atuação do complexo eIF4F	33
2.5.1 Subunidade eIF4G de eucariotos	35
2.6 Modificações pós-traducionais	39
3. JUSTIFICATIVA	41
4. OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo Geral	42
4.2 Objetivos específicos	42
5. METODOLOGIA	43
5.1 Construções plasmidiais	43
5.1.1 Extração de DNA a partir dos diferentes vetores plasmidiais	45
5.2 Cultivo celular	45
5.3 Obtenção de linhagens para superexpressão	46
5.4 Obtenção de linhagens para estudos de deleção e complementação gênica	47
5.5 Curva de proliferação celular de <i>L. infantum</i>	48
5.6 Obtenção de extrato total	48
5.7 Preparação de lisados celulares	49
5.8 Ensaio de imunoprecipitação (IP)	49
5.9 <i>Western – blot</i> (WB)	50

5.10 Análise por espectrometria de massas	51
6. RESULTADOS	52
6.1 Perfil de expressão proteica dos homólogos EIF4G selvagens e mutantes em <i>Leishmania infantum</i>	53
6.1.1 Proteínas associadas ao homólogo EIF4G3 de <i>L. infantum</i>	57
6.1.2 Proteínas associadas aos mutantes do homólogo EIF4G3 de <i>L. infantum</i>	60
6.2 Proteínas associadas ao homólogo EIF4G4 selvagem de <i>L. infantum</i>	63
6.3 Análise fenotípica após deleção gênica dos homólogos EIF4G de <i>Leishmania infantum</i>	65
7. DISCUSSÃO	70
8. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados, mais conhecidos pelas espécies patogênicas pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, responsáveis por doenças de impacto mundial como as leishmanioses, doença do sono e doença de Chagas (DNDi, 2017). Estes organismos exibem particularidades biológicas e moleculares, incluindo a transcrição policistrônica e *trans-splicing* para produzir RNAm monocistrônicos típicos com um *cap4* na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3' (DE MELO NETO *et al.*, 2016). A ausência de promotores para a RNA polimerase II e de fatores de transcrição clássicos de eucariotos sugerem que esses microrganismos possuem uma grande dependência de processos pós-transcricionais para regular a sua expressão gênica, dentre esses processos estão: o processamento de mRNAs e sua tradução em proteínas (JÄGER; MUIÁ; CAMPETELLA, 2008; KRAMER; CARRINGTON, 2011).

Na maioria dos eucariotos, o processo de iniciação da tradução se dá pela formação do complexo eIF4F, que apresenta três subunidades: o eIF4E, a proteína de ligação ao *cap*, o eIF4G, a proteína de suporte responsável pela formação do complexo; e o eIF4A, a proteína helicase que desfaz as estruturas secundárias na região 5' UTR dos mRNAs. O complexo eIF4F reconhece o *cap* na extremidade 5' dos mRNAs pela ação do eIF4E, e também a extremidade 3' dos mRNAs, via interação do eIF4G e a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP). Por fim, o complexo eIF4F medeia a interação do mRNA com a subunidade ribossomal 40S através da associação eIF4E-eIF4G-eIF3 (PRÈVÔT; DARLIX; OHLMANN, 2003; HINNEBUSCH, 2014).

Em tripanosomatídeos, foram identificados diferentes homólogos para as subunidades eIF4E, eIF4G e eIF4A do complexo eIF4F e para proteína de ligação à cauda poli A, a PABP. Destes, alguns apresentam papel compatível com a tradução, enquanto outros assumem outras funções que precisam ser melhor investigadas (DHALLIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2006; DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2014). Os homólogos de eIF4G (EIF4G1 a 5) compartilham o domínio central MIF4G/HEAT1 conservado em mamíferos, plantas e leveduras. As proteínas EIF4G3 e EIF4G4 demonstraram se associar com os homólogos do eIF4E, EIF4E4 e

EIF4E3, respectivamente, e também apresentam outras características em comum, tais como uma região N-terminal curta e localização citoplasmática (FREIRE *et al.*, 2017). A partir do estudo de interações entre estas proteínas, foram identificados dois complexos do tipo eIF4F distintos, um centrado nas interações entre EIF4E4 / EIF4G3 / EIF4AI e o outro na interação EIF4E3 / EIF4G4 / EIF4A (PEREIRA *et al.*, 2013). No estudo da função destas proteínas em *Trypanosoma brucei*, foi demonstrado que o EIF4G3 e o EIF4G4 são essenciais para a viabilidade celular, entretanto apenas o EIF4G3 está envolvido num complexo eIF4F relacionado com a tradução da célula. A proteína EIF4G4 também parece estar relacionada à manutenção da morfologia celular, uma vez que sua depleção conduz a múltiplas anormalidades (MOURA *et al.*, 2015). Deste modo, existe uma diferença nas funções das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 na tradução que precisam ser melhor investigadas. Para estudar o papel dessas proteínas na tradução, este projeto propôs analisar a expressão dos homólogos EIF4G3 e EIF4G4, selvagens e com mutações em resíduos de aminoácidos selecionados a partir de estudos prévios, em curvas de crescimento da forma promastigota de *Leishmania infantum*. Posteriormente, foram realizados ensaios de interação *in vivo* para identificação de possíveis parceiros ligantes por meio das técnicas de imunoprecipitação e espectrometria de massas. Outro ponto abordado neste estudo foi analisar o efeito do nocaute gênico de uma das cópias do EIF4G3 e EIF4G4, a fim de se avaliar a capacidade dos mutantes substituírem a proteína nativa através de ensaios de complementação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A síntese de proteínas, ou tradução, é um mecanismo no qual diferentes proteínas se ligam para mobilizar o ribossomo ao mRNA e tem início com a formação do complexo eIF4F (EIF4G, EIF4E e EIF4A) no RNA mensageiro. A tradução vem sendo explorada como alvo terapêutico para tratamento de doenças infecciosas e câncer através do uso de moléculas específicas que bloqueiam algumas de suas etapas, como a interação entre as subunidades do complexo eIF4F.

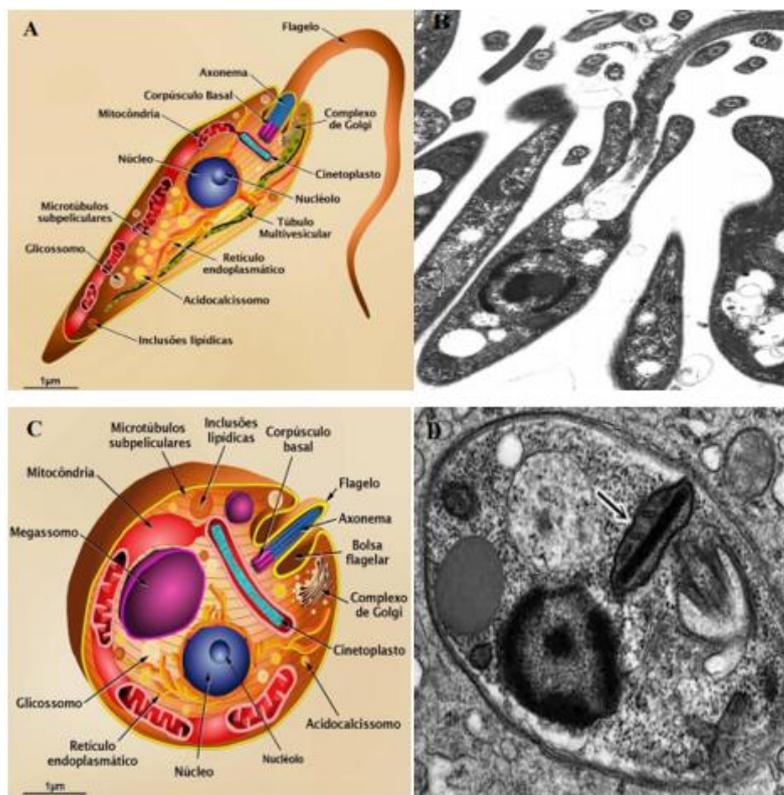
2.1 Aspectos gerais dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são parasitas eucarióticos, classificados dentro da ordem Kinetoplastida (filo Euglenozoa, supergrupo Excavata), com destaque para os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (BATES, 2007). Estes microrganismos possuem espécies importantes de patógenos humanos, responsáveis por doenças de impacto mundial como *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da doença do sono; *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas e *Leishmania spp.*, que causam as Leishmanioses Visceral e Cutânea (YOFFE *et al.*, 2006; DEAN *et al.*, 2015).

Embora unicelulares, os tripanosomatídeos possuem ciclos de vida complexos, com formas evolutivas distintas associadas a hospedeiros vertebrados e invertebrados (McCALL; McKERROW, 2014). Além disso, o cinetoplasto, organela responsável por armazenar o DNA mitocondrial destes parasitas, participa de um complexo cinetoplasto-flagelo no qual sua posição em relação ao núcleo em conjunto com outras características como as formas evolutivas e suas dimensões caracterizam os gêneros individualmente (POVELONES *et al.*, 2014; LOPES *et al.*, 2010).

O gênero *Leishmania* possui duas formas principais que se alternam durante o ciclo de vida: promastigota, uma forma móvel e alongada, dotada de um flagelo e adaptada para a existência extracelular dentro do tubo digestório do inseto; e a amastigota, formas ovoides com flagelo rudimentar, especializadas na sobrevivência intracelular nos macrófagos do hospedeiro mamífero (ROCHA, 2013) (Figura 1).

Figura 1. Formas morfológicas da *Leishmania spp*



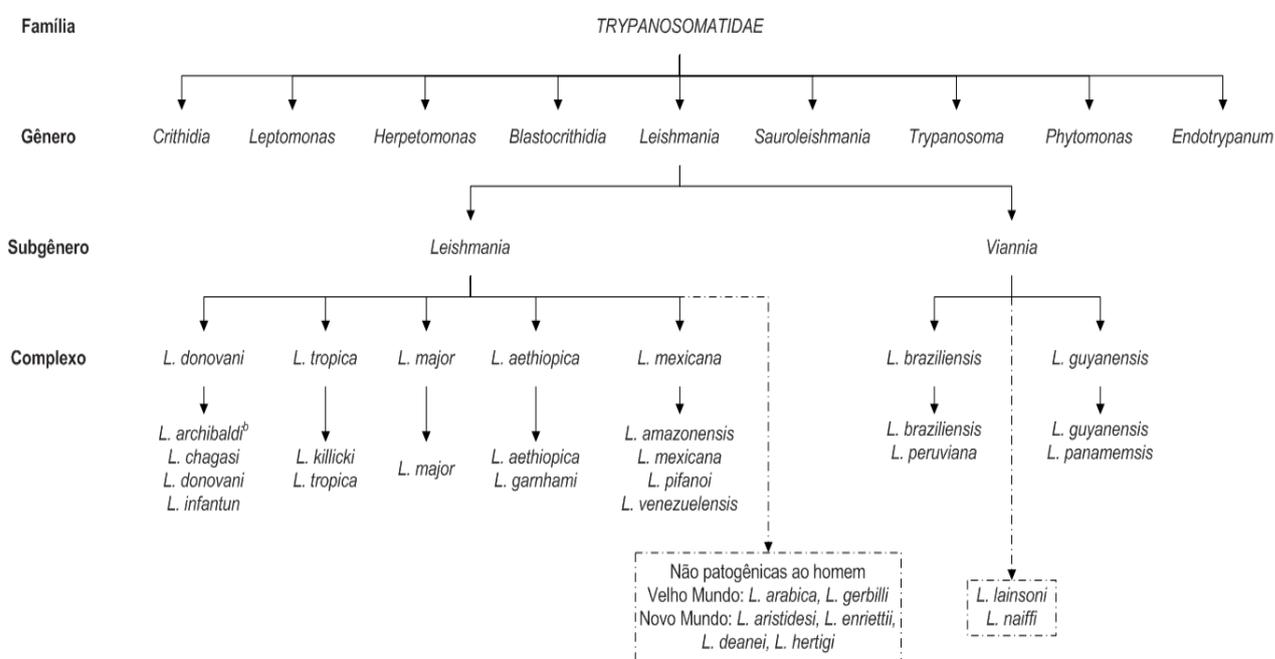
Nota: Formas evolutivas da *Leishmania spp.* sendo representadas esquematicamente (A e C) e por imagens de microscopia eletrônica de transmissão (B e D), respectivamente. Promastigota (A e B); amastigota (C e D) com destaque para o cinetoplasto indicado pela seta.

A mudança de hospedeiro expõe o parasita a diferentes condições ambientais, tais como temperatura e pH, produzindo uma diferenciação morfológica, o que conseqüentemente demanda uma resposta celular rápida para a sobrevivência do parasita (YOFFE *et al.*, 2006). Essa resposta depende da regulação fina da expressão gênica, que nesse grupo de organismos não ocorre na etapa de transcrição, diferentemente de outros organismos eucariotos. Portanto, a maioria dos processos associados à regulação da expressão gênica nesses organismos ocorre no nível pós-transcricional (CLAYTON, 2014). Outro aspecto que caracteriza a biologia básica dos tripanosomatídeos é sua organização gênica em grandes unidades de transcrição unidirecionais, transcritas policistronicamente. Os pré-mRNAs resultantes são maturados por *trans-splicing* e poliadenilação, para produzir mRNA monocistronicos típicos com uma *cap4* na extremidade 5' e uma cauda poli-A na extremidade 3' (CLAYTON, 2016; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

2.2 O gênero *Leishmania*, suas espécies e manifestações clínicas

As leishmanioses são causadas por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*, e a parte mais caracterizada deste gênero é a seção *Euleishmania* composta pelos subgêneros: *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania* (BATES, 2007). O subgênero *Leishmania* tem quatro complexos principais de espécies: *L. donovani* (que inclui a espécie *L. infantum*), *L. tropica*, *L. major* e *L. mexicana*. Atualmente, 54 espécies de *Leishmania* são conhecidas e pelo menos 21 delas são patogênicas para humanos (AKHOUNDI *et al.*, 2016) (Figura 2).

Figura 2. Esquema de classificação do gênero *Leishmania*



Fonte: CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014.

Nota: Classificação do gênero *Leishmania* com destaque para os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* que infectam mamíferos.

Classificada como uma doença negligenciada e endêmica em grandes áreas dos trópicos, subtropicais e da bacia do Mediterrâneo, a leishmaniose é atribuída principalmente a vários fatores de risco, como: condições ambientais, socioeconômica, comportamentos demográficos e humanos. Sua estimativa mundial é de 12 milhões de novos casos por ano, destes casos estão associados cerca 2 milhões a lesões cutâneas, 500 mil a leishmaniose visceral e um número de mortes anuais que chega a 50 mil, sendo superada apenas pela malária dentre as doenças

parasitárias (ORYAN; AKBARI, 2016). As apresentações clínicas distintas estão associadas à diversidade das espécies do parasita, bem como à capacidade do indivíduo desencadear uma resposta imunológica à infecção parasitária.

A leishmaniose pode assumir caráter antroponótico ou zoonótico, de acordo com o reservatório do parasita, sendo ele humano ou animal, respectivamente (FAHRION *et al.*, 2018). Muitas espécies estão adaptadas a ciclos secundários ou peridomésticos, com animais sinantrópicos ou domésticos participando do ciclo de transmissão, que envolve flebotomíneos antropofílicos. Este é o caso, por exemplo, do ciclo de transmissão de *L. braziliensis* em algumas áreas endêmicas de colonização humana antiga e também de *L. infantum* (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Será descrito com mais detalhes sobre a leishmaniose visceral e as espécies responsáveis por suas manifestações clínicas dando ênfase a *L. infantum*, por ser o foco principal deste trabalho.

A espécie *L. infantum*, presente tanto no Velho quanto no Novo Mundo e *L. donovani*, presente no Velho Mundo, são as principais espécies responsáveis pelos casos de leishmaniose visceral - LV, a forma mais grave da doença, cuja transmissão ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos da espécie *Phlebotomus* e *Lutzomyia longipalpis*, em que o cão é o principal reservatório (CNUUDE *et al.*, 1994, AKHOUNDI *et al.*, 2016; DE CASTRO *et al.*, 2016).

As manifestações clínicas da LV podem variar desde assintomáticas até a doença progressiva, causando letalidade. A variedade dessas manifestações decorrentes da infecção depende da habilidade que o parasita tem em evadir-se dos mecanismos de defesa, mediante complexa interação com o hospedeiro (SAHA *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Os pacientes portadores da LV apresentam febre, suores noturnos, palidez e aumento do volume abdominal decorrente da hepatoesplenomegalia, fraqueza, anorexia, astenia, pigmentação cutânea, perda de peso, anemia, leucopenia e trombocitopenia que podem progredir rapidamente em semanas ou meses; as crianças afetadas apresentam diarreia crônica característica e retardo de crescimento (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

As manifestações hematológicas observadas em pacientes são prováveis que tenham uma etiologia multifatorial, mas como as causas não são claramente entendidas, a abordagem terapêutica preconizada para pacientes que apresentam sangramentos em decorrência da LV é empírica, inespecífica e parece pouco eficaz em grande proporção de casos (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Além disso, os pacientes podem desenvolver uma variação da LV conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar (PKDL), caracterizada por uma erupção cutânea inflamatória, tendo sua etiologia associada a algumas hipóteses como subtratamento, exposição à luz UVB e etnia (ISMAIL *et al.*, 2006; KHALIL *et al.*, 2013).

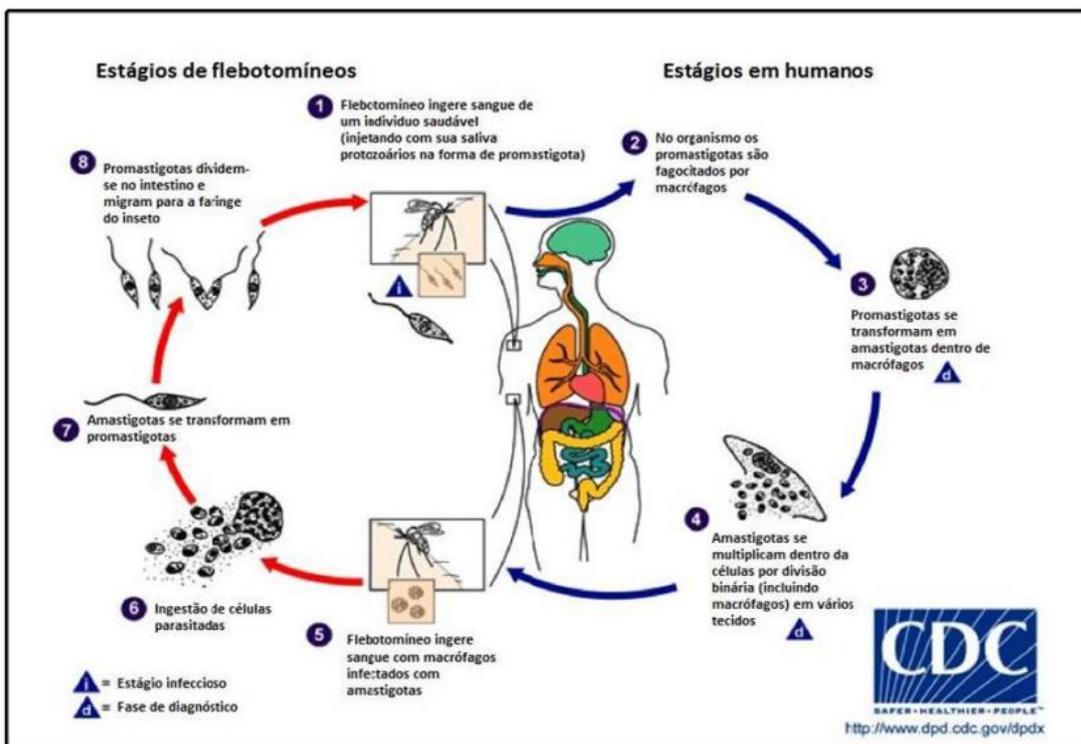
A LV é uma doença emergente em indivíduos desnutridos ou portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (COSTAL *et al.*, 2018). Alguns fatores relacionados ao hospedeiro e ao ambiente podem influenciar a prevalência da coinfeção LV-HIV. O HIV e a *Leishmania* compartilham um mecanismo imunopatológico, comprometendo as células dendríticas e os macrófagos. Este fato contribui para a replicação de ambos os patógenos, acelerando a progressão da LV e do HIV (GARG *et al.*, 2009). Portanto, discute-se, se a co-infecção LV/HIV resultaria de infecção primária ou de reativação de infecção latente, uma vez que a infecção primária por *Leishmania* poderia favorecer a imunossupressão em paciente previamente infectado pelo HIV ou, de modo igual, a infecção latente por *Leishmania* poderia ser reativada pela depleção imunológica da AIDS (MARQUES *et al.*, 2007; PAREDES *et al.*, 2003).

2.3 Ciclo biológico da *Leishmania*

A principal via de infecção para a leishmaniose é pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas (BATES, 2007). Nos flebótomos, o desenvolvimento do parasita ocorre no canal alimentar com a formação da forma móvel, flagelada e alongada promastigota. A promastigota multiplica-se e amadurece no intestino médio do inseto, passando por vários estágios - procíclico, nectomonato, leptomonato, haptomonato – até que se tornem promastigotas metacíclicas, que são infecciosas para o hospedeiro vertebrado (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007; BATES, 2004).

Durante a hematofagia, as formas promastigotas presentes nas glândulas salivares do flebotomo fêmea são inoculadas na junção derme-epiderme do hospedeiro vertebrado. Nesse local, ocorre a fagocitose dos parasitos, que irão se transformar em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), entre elas o macrófago (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). No interior dessas células, as formas amastigotas multiplicam-se e rompem as células fagocíticas para infectar outras células, acabando por danificar todo o sistema reticulo-endotelial podendo persistir por todo o tempo de vida do hospedeiro, com risco provável de acarretar lesões cutâneas e viscerais (SACHDEVA, 2016). (Figura 3)

Figura 3. Ciclo da *Leishmania spp*



Fonte: Center for Disease Control. EUA, 2017. (Disponível em: <http://www.cdc.gov/dpdx/>).

Nota: O hospedeiro vertebrado ao ser picado pelo vetor é infectado pela formas promastigotas metacíclicas que penetram nos macrófagos e multiplicam-se transformando-se em amastigotas. Os macrófagos se rompem e liberam estas formas. O vetor ingere os macrófagos infectados com as amastigotas que são liberadas no intestino e se diferenciam em promastigotas procíclicas. Estas se multiplicam e se diferenciam em metacíclicas que migram para a válvula faríngea e o ciclo se repete.

2.4 Características biológicas dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos fazem parte de um grupo de protistas que se separaram muito cedo da linhagem evolutiva eucariótica. Esta evolução independente resultou no desenvolvimento de uma ampla gama de características celulares e moleculares únicas para este grupo, sendo estas em níveis de organização e expressão gênica (LUKES *et al.*, 2014). A publicação das sequências genômicas, complementadas por análises transcriptômicas e proteômicas do *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania major*, denominados *TriTryps*, favoreceu a intensificação de análises comparativas, permitindo uma maior compreensão da biologia destes protozoários (JACKSON, 2015).

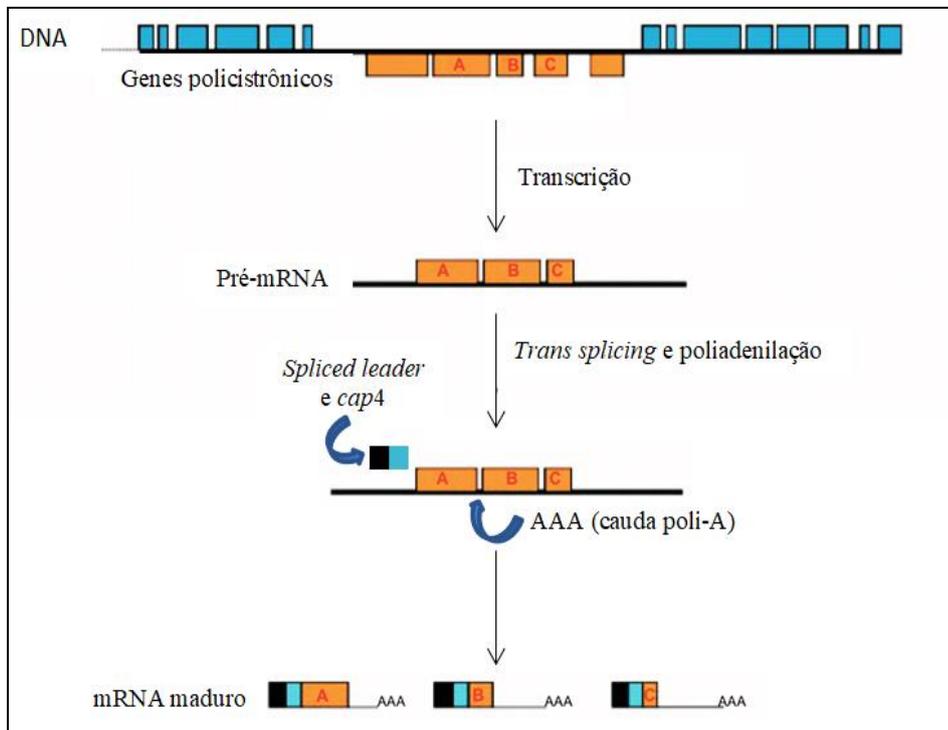
Os *TriTryps* apresentam uma alta conservação na organização dos genes, assim como um grande número de genes em comum. Então, especula-se que o alto grau de conservação genômica entre os diferentes tripanosomatídeos seja devido a algum tipo de pressão seletiva que deva restringir o rearranjo dos genes, tais como a incidência relativamente baixa de recombinação sexual, a organização policistrônica ou a replicação, porém a razão de tal fenômeno ainda não está bem clara (GHEDIN *et al.*, 2004; EL-SAYED *et al.*, 2005).

Os genes codificadores de proteínas nesses organismos são organizados em longos agrupamentos unidirecionais, incluindo múltiplos genes que são transcritos pela RNA polimerase II. O curto espaçamento entre os genes dentro do agrupamento indica a ausência de promotores individuais e a capacidade de transcrição gênica independente. O início deste processo é geralmente bidirecional, ocorrendo em regiões que são marcadas pela presença de histonas variantes específicas. (KOLEV; ULLU; TSCHUDI, 2014; MASLOV *et al.*, 2018).

Os RNAs policistrônicos nascentes possuem locais de clivagem posicionados na região 3' de cada parte codificante, permitindo a separação dos mRNAs monocistrônicos. A clivagem do transcrito neste local permite a poliadenilação da extremidade 3' do pré-mRNA à montante, mas também libera a extremidade 5' do pré-mRNA à jusante para que ocorra o *trans-splicing* (GÜNZL, 2010). Como resultado do *trans-splicing*, os transcritos recebem na sua extremidade 5' uma sequência de 39 nucleotídeos denominada *Spliced-Leader* – *SL* ou mini-éxon. A

presença da sequência *SL* tem dois propósitos: adicionar o *cap* aos mRNAs e formar, juntamente com a poliadenilação na região 3', os mRNAs maduros (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; KRAMER; CARRINGTON, 2011) (Figura 4).

Figura 4. Formação dos mRNAs maduros nos tripanosomatídeos.



Fonte: Adaptado de (DA SILVA; CANO, 2017).

Nota: Os genes transcritos pela RNA polimerase II formam o pré-mRNA policistrônico, que é processado por meio do mecanismo de *trans-splicing*. Neste, a sequência *spliced leader* e a estrutura *cap* modificada, *cap4*, é adicionada ao mRNA. A partir do *trans-splicing*, os pré-mRNAs são separados, na região 5' é adicionado *spliced leader* em conjunto com o *cap4* e, em paralelo, ocorre a poliadenilação na região 3'. Com estas etapas, o mRNA se torna maduro e monocistrônico e pronto para ser utilizado na etapa da tradução.

A estrutura *cap4* presente em todos os mRNAs de tripanosomatídeos consiste em metilações nos quatro primeiros nucleotídeos do *Spliced-Leader* e duas metilações nas bases nitrogenadas da primeira adenosina e quarta uridina. Esse estado de hipermetilação do *cap* não foi descrito em nenhum outro grupo de eucariotos (BANGS *et al.*, 1992; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012). Além do que, a presença do *cap4* pode proteger os mRNAs da degradação e possibilitar o seu transporte do núcleo para o citoplasma, com um papel fundamental no processo de biossíntese protéica (FREIRE *et al.*, 2017).

2.5 Biossíntese protéica e atuação do complexo eIF4F

A maioria dos mRNAs eucarióticos são definidos em suas extremidades 5' e 3' pela presença do *cap* e da cauda poli-A, respectivamente. Essas estruturas estão envolvidas em diferentes aspectos do metabolismo do mRNA e ambas são necessárias para o reconhecimento eficiente do mesmo pela maquinaria de tradução (DE MELO NETO *et al.*, 2015). Sendo um dos processos celulares mais bem conservados e dentre os mais complexos nos eucariotos superiores, o processo de tradução envolve um grande número de diferentes macromoléculas e é controlado por vários fatores que atuam em quatro etapas principais: Iniciação, Alongamento, Terminação e Reciclagem de ribossomos (ACKER; LORSCH, 2008; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). A etapa de iniciação é predominantemente vista como a etapa mais complexa, servindo assim, como alvo para uma variedade de sinais regulatórios (ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012) (Figura 5).

tripanosomatídeos (HERNÁNDEZ; VAZQUEZ-PIANZOLA, 2005; PARSYAN *et al.* 2011; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Nestes protozoários, foram identificados diferentes homólogos do complexo eIF4F para as subunidades eIF4E, eIF4G e eIF4A e para proteína de ligação a cauda poli A (PABP). Embora a PABP não seja uma integrante oficial do complexo eIF4F, sua interação com este complexo é considerada essencial devido sua ligação ao mRNA e consequente circularização do transcrito (BROWNING; BAILEY-SERRES, 2015). Destes homólogos, alguns apresentam papel compatível com a tradução, enquanto outros parecem assumir outras funções que precisam ser melhor investigadas (DHALLIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2006; DA COSTA LIMA *et al.*, 2010; FREIRE *et al.*, 2014; FREIRE *et al.*, 2017).

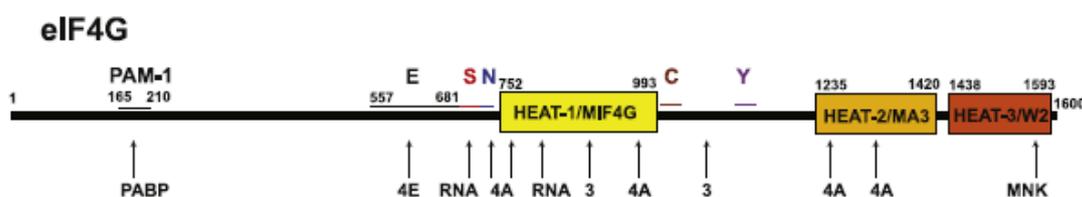
2.5.1 Subunidade eIF4G de eucariotos

O fator eucariótico de iniciação eIF4G possui um papel central na iniciação da tradução em eucariotos devido a sua capacidade de interagir com outras proteínas, promovendo a formação do complexo eIF4F. Uma das interações mais importantes acontece com o eIF4E, sendo um ponto chave para o controle da tradução, e que foi identificado como um alvo da atuação de drogas para reprimir o processo de tradução (GRÜNER *et al.*, 2016). Na proteína eIF4G, uma sequência curta com cerca de 15 aminoácidos, contendo um motivo conservado Y(X4)LΦ, no qual X é um aminoácido qualquer e Φ é um resíduo hidrofóbico, é considerado o motivo de ligação ao eIF4E descrito em eucariotos superiores (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008; RHOADS, 2009). Além disso, o eIF4G recruta o complexo eIF3, que está associado à subunidade ribossômica 40S e também interage com a PABP na extremidade 3' do mRNA, permitindo uma circularização do transcrito (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009).

Em células humanas, foram relatados dois homólogos do eIF4G: o eIF4GI e eIF4GII, que são ativos na tradução *cap*-dependente (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009; LIBERMAN; MARASH; KIMCHI, 2009). A proteína eIF4GI humana possui aproximadamente 1600 aminoácidos e pode ser dividida em três regiões: N-terminal (aminoácidos 1 a 612), central (aminoácidos 613 a 1090) e C-terminal (aminoácidos 1091 a 1560), de acordo com um padrão de clivagem gerado

por proteases virais (PRÉVÔT *et al.*, 2003). Na região N-terminal, está presente o sítio de ligação conservado ao eIF4E; no segmento central contém o domínio característico MIF4G, também conhecido como domínio HEAT-1, que se liga a eIF4A; e no C-terminal, possui tanto o domínio MA3 (HEAT-2), também envolvido na ligação a eIF4A e o domínio W2 (HEAT-3) (GROSS *et al.*, 2003; BELLSOLELL *et al.*, 2006). (Figura 6)

Figura 6. Esquema do eIF4G e seus principais sítios de ligação à outras proteínas



Fonte: adaptado MARINTCHEV, 2009.

Nota: O eIF4G1 possui na sua região N-terminal os sítios de ligação à PABP e eIF4E. Na região central desta proteína encontra-se o domínio central de ligação ao eIF4A, além de uma região de ligação a RNA (RRM) e do sítio de ligação ao eIF3. Já na sua porção C-terminal se encontram um segundo sítio de ligação ao eIF4A (apenas em mamíferos) e o sítio de ligação da proteína Mnk1 (quinase de eIF4E). O eIF4G humano é formado por três domínios HEAT: HEAT-1/MIF4G, HEAT-2/MA3 e HEAT-3/W2.

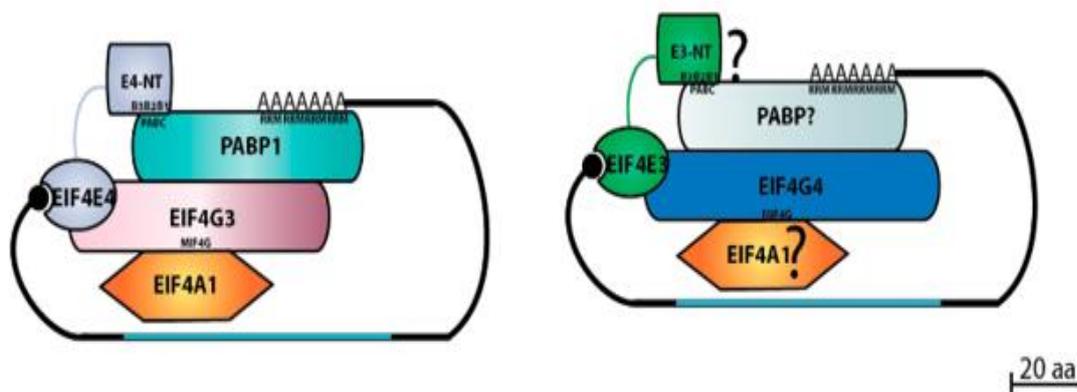
2.6 Homólogos da subunidade eIF4G em tripanosomatídeos

Nos tripanosomatídeos foram identificados cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1-5) que compartilham o domínio central conservado MIF4G, também presente nas sequências de mamíferos, plantas e leveduras. Porém, dois deles, EIF4G3 e EIF4G4, possuem além do domínio MIF4G conservado, uma sequência N-terminal curta, assim como uma região C-terminal que apresenta similaridade entre si (DHALLIA *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2015). A única diferença mais relevante identificada nas sequências de EIF4G3 e EIF4G4 na região C-terminal é a presença de trechos ricos em Q (glutamina) ou N/Q (asparagina/glutamina) localizados imediatamente após o domínio MIF4G nos homólogos do EIF4G4, que são mais perceptíveis nas duas sequências de *Trypanosoma* (MOURA *et al.*, 2015).

As proteínas EIF4G3 e EIF4G4 foram identificadas em dois complexos do tipo eIF4F distintos, centrados nas interações com homólogos do eIF4E: EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI e EIF4E3/EIF4G4/EIF4AI (PEREIRA *et al.*, 2013). Do ponto

de vista funcional, foi visto que, em *T. brucei*, a diminuição dos níveis de EIF4G3 afeta o crescimento celular e a síntese protéica, já a depleção do EIF4G4 não causa mudanças evidentes na tradução, embora também seja uma proteína essencial para a manutenção do crescimento e morfologia celular (MOURA *et al.*, 2015). Os resultados apontam que o homólogo EIF4G3 apresenta um grande potencial de atuar diretamente no principal complexo da iniciação da tradução, e que o EIF4G4 participe de processos relacionados a outras funções celulares (MOURA *et al.*, 2015). A Figura 7 ilustra de forma esquemática os dois complexos do tipo eIF4F descritos em tripanosomatídeos envolvidos na tradução.

Figura 7. Esquema representativo de complexos do tipo eIF4F nos tripanosomatídeos



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

Nota: À esquerda, o complexo formado pelos homólogos EIF4G3, EIF4E4, EIF4A1 e PABP1, envolvido com o processo de iniciação da tradução e à direita, aquele formado pelas proteínas EIF4G4 e EIF4E3 possivelmente interagindo ainda com a PABP2 e EIF4A1, com papel ainda não bem caracterizado.

Inicialmente foi descrito que as ligações entre as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 com os homólogos EIF4E ocorreriam através da região N-terminal dos homólogos EIF4G (YOFFE *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2015). Com base nessa informação inicial, foram propostos dois candidatos a motivos de ligação ao EIF4E presente nas proteínas EIF4G. O primeiro motivo estaria presente no N-terminal do EIF4G3 entre as posições 20 e 26 (YPGFSLD) em *Leishmania*, onde mutações nos resíduos de tirosina (Y), leucina (L) e fenilalanina (F) dentro deste motivo anulam completamente a ligação ao EIF4E4 (YOFFE *et al.*, 2009).

O segundo motivo foi proposto por meio de estudos de bioinformática das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 que compartilham resíduos de ligação ao eIF4E em posições equivalentes em ambos eIF4Gs (I8 e R9 em EIF4G3; I25 e L26 em EIF4G4). Este motivo foi demonstrado através de ensaios *in vitro* de interação protéica do tipo *pull-down*, sendo possível avaliar a ligação entre as proteínas mutantes do EIF4G3 e EIF4G4 a seus parceiros correspondentes em *L. major*. O mesmo trabalho confirmou *in vivo*, no modelo de *T. brucei*, que mutações direcionadas a esses resíduos efetivamente aboliram a interação com seus parceiros eIF4E (MOURA *et al.*, 2015).

Observou-se ainda que a PABP1 também é capaz de se ligar diretamente ao EIF4G3, porém ainda não foram identificados os domínios responsáveis por essa ligação (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010). Além disso, ensaios de complementação gênica, que expressaram versões mutantes destas proteínas em *L. infantum* confirmaram que a interação entre EIF4E4/PABP1 é ainda mais importante para o processo de tradução nos tripanosomatídeos do que a interação EIF4E4/EIF4G3, reforçando as diferenças no processo de tradução destes protozoários e mostrando ser um potencial alvo para um inibidor específico de síntese protéica (DE MELO NETO *et al.*, 2015).

Ainda em relação à formação do complexo de iniciação da tradução do tipo eIF4F em tripanosomatídeos, a interação EIF4G/EIF4A foi previamente estudada. Ensaios demonstraram que um dos homólogos de eIF4A, o EIF4AI, liga-se especificamente ao domínio MIF4G do EIF4G3 (DHALLIA *et al.*, 2005) e ao EIF4G4 (MOURA *et al.*, 2015). Essa ligação envolve os domínios MIF4G e C-terminal e aparenta ser mais forte ao EIF4G3 que ao EIF4G4. Essas ligações foram confirmadas *in vivo* utilizando o modelo de *T. brucei* (FREIRE *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015). Ensaios de interação demonstraram que tanto o EIF4G3 quanto o EIF4G4 são capazes de se ligar ao EIF4AI através de um motivo contendo a sequência de aminoácidos LNK, presente no domínio MIF4G de ambas as proteínas, e que é similar ao descrito em outros eucariotos (MOURA *et al.*, 2015).

2.6 Modificações pós-traducionais

Após a biossíntese protéica, a atividade das proteínas passa a ser controlada pelos seus níveis de expressão e degradação, mas também pelo processamento covalente específico e seletivo denominado, modificação pós-traducional (*Post-translational modification* – PTM) (JENSEN, 2004). As PTMs alteram as propriedades de uma proteína por clivagem proteolítica ou pela adição de um grupamento modificador a um ou mais resíduos aminoácidos (MANN; JENSEN, 2003).

Estudos demonstram que modificações como fosforilação, metilação, acetilação, glicosilação e ubiquitinação foram relatadas em diferentes modelos de estudo modulando interações moleculares, a função, localização e estabilidade das proteínas (ROSENZWEIG *et al.*, 2008). Em metazoários, proteínas pertencentes ao complexo eIF4F são reguladas ativamente por fosforilação e uma alteração na regulação destas, promove uma tradução exacerbada de um conjunto específico de mRNAs que codificam proteínas-chaves envolvidas na tumorigênese (FISHER, 2009).

A combinação de diferentes PTMs origina uma população protéica heterogênea, tornando a caracterização completa e quantificação precisa de proteínas modificadas após a tradução cada vez mais rigorosa e complexa (JENSEN, 2004). Deste modo, para a análise das modificações, é necessário identificar a proteína de interesse, utilizando técnicas de imunodeteção com anticorpos específicos, ou por espectrometria de massas (MS - *mass spectrometry*) (MANN; JENSEN, 2003).

Nos tripanosomatídeos foram revelados padrões diferenciados de fosforilação, sugerindo que as enzimas quinases e fosfatases também participem do processo de diferenciação celular, além de considerar sua influência no processo infeccioso através da interação parasito-hospedeiro (BENGS *et al.*, 2005; NAULA, *et al.*, 2005). Em muitos casos, os aminoácidos modificados e as enzimas responsáveis pela modificação foram caracterizados, mas essa informação em tripanosomatídeos ainda é limitada, sendo necessário estudos mais aprofundados para esclarecer o papel das PTMs na sobrevivência destes parasitas (ROSENZWEIG *et al.*, 2008).

Em *T. brucei*, através de análise da expressão dos fatores EIF4E3 e EIF4E4 por *western blot*, foi possível observar que estes se apresentavam sob a forma de no mínimo duas bandas, mas que o padrão destas diferiam ao longo de uma curva de crescimento (MALVEZZI, 2010). Em diferentes espécies de *Leishmania*, observou-se que o EIF4E3 é visto como uma isoforma de alto peso molecular que diminui sua intensidade ao longo da curva de crescimento, mas volta a ser evidenciada na fase estacionária. Em contraste, o EIF4E4 apresenta uma banda de maior peso molecular ao longo da curva, a qual desaparece na fase estacionária, onde é possível observar apenas as isoformas de migração mais rápida (PEREIRA *et al.*, 2013; DE MELO NETO *et al.*, 2015).

Estudos anteriores demonstraram previamente a presença de modificação pós-traducional, do tipo fosforilação, na PABP1 (BATES *et al.*, 2000). Através da busca por fosfoproteínas em *T. brucei*, ensaios de alto rendimento mostraram que as PABPs 1 e 2 foram fosforiladas e apresentaram para cada proteína, diversos resíduos individuais direcionados ao processo de fosforilação (KRAMER *et al.*, 2013).

A expressão de ambas as PABPs foram avaliadas através de curvas de crescimento em células promastigotas de *L. Infantum* e estas foram representadas constitutivamente ao longo de toda a curva, mas apenas a PABP1 é claramente vista apresentando mais de uma isoforma. O padrão de isoformas encontrados na PABP1 se diferencia, no qual a banda de peso molecular mais alto é intensa ao longo da curva até a fase exponencial, mas ausente ou muito fracamente expressa na fase estacionária (DE MELO NETO *et al.*, 2018).

Outro fator associado ao processo de tradução, o eIF4B, teve seu perfil de expressão também avaliado por curva de crescimento e foi vista a presença de isoformas na fase estacionária compatíveis com fosforilação. Para confirmar tal evento de modificação pós-traducional, o mesmo foi analisado através de ensaio de purificação de fosfoproteínas e análise eletroforética bidimensional. O eIF4B foi encontrado ligando-se especificamente à coluna de purificação de fosfoproteínas e migrou como múltiplos pontos com diferenças de tamanho e pontos isoelétricos confirmando eventos de fosforilação (DE AQUINO, 2015)

3. JUSTIFICATIVA

Este estudo teve o intuito de contribuir para o conhecimento de mecanismos essenciais para a sobrevivência dos tripanosomatídeos, visando estudar os domínios de ligação envolvidos na interação entre proteínas de um complexo do tipo eIF4F. Em eucariotos, a subunidade eIF4G tem papel central na formação do complexo de iniciação da tradução, entretanto pouco se sabe sobre a função dos homólogos dessas proteínas em tripanosomatídeos. Deste modo, este trabalho, utilizando o modelo de *Leishmania infantum*, investigou se os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 tem papel ativo na síntese protéica nos tripanosomatídeos e/ou se participam de outros processos metabólicos. A partir da identificação das proteínas parceiras que foram coprecipitadas com os homólogos EIF4G, poderão ser identificados alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos e moléculas inibidoras para controle destes patógenos. Dentro deste contexto, este estudo buscou identificar semelhanças e diferenças moleculares em relação aos seus hospedeiros mamíferos, contribuindo ainda para um maior entendimento dos mecanismos associados ao processo de iniciação da tradução em eucariotos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a função dos homólogos dos fatores de iniciação da tradução EIF4G3 e EIF4G4, selvagens e mutantes, no crescimento celular e na associação a parceiros funcionais em células de *Leishmania infantum*.

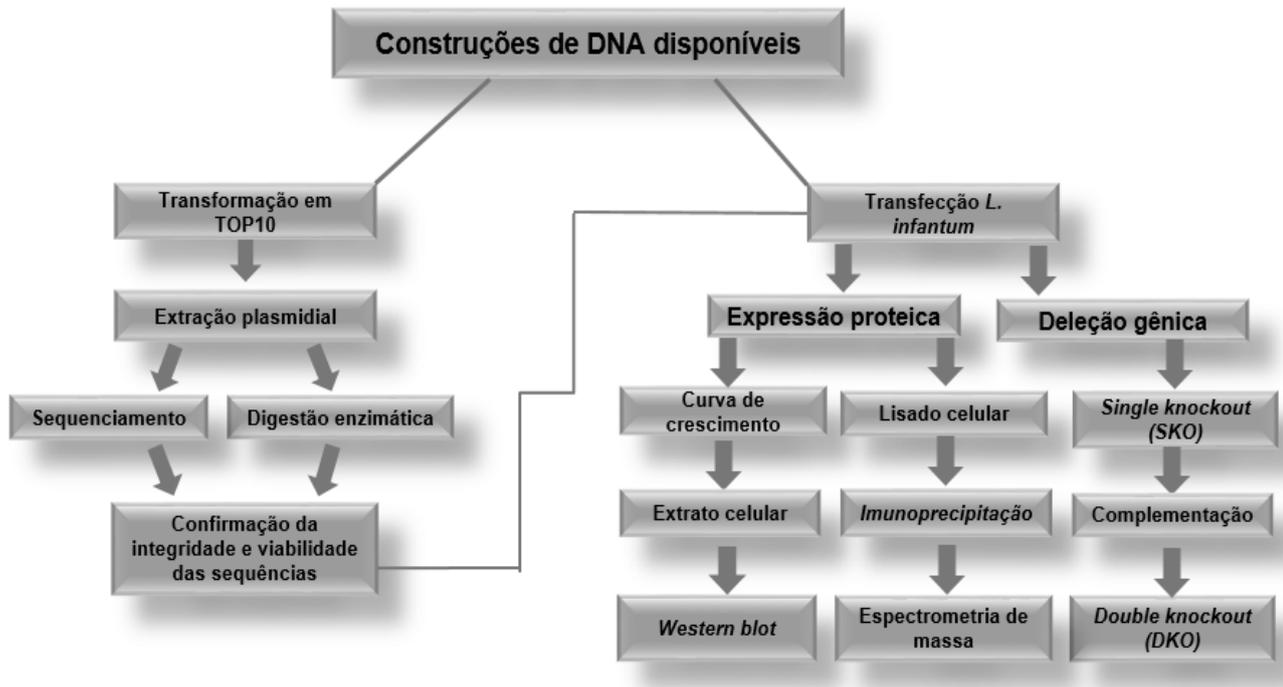
4.2 Objetivos específicos

- Analisar a superexpressão das proteínas EIF4G3 e EIF4G4, selvagens e mutantes em sítios de ligação aos parceiros EIF4E e EIF4A em células de *Leishmania infantum*;
- Identificar as proteínas ligantes do EIF4G3 e EIF4G4, selvagens e mutantes descritos nas formas promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar capacidade dos mutantes do EIF4G3 e EIF4G4 complementar a ausência da proteína nativa.

5. METODOLOGIA

Para um maior entendimento desta seção, o fluxograma das metodologias abordadas está representado na figura 8.

Figura 8. Fluxograma ilustrando as etapas do trabalho



5.1 Construções plasmidiais

As construções contendo os genes EIF4G3 e EIF4G4 usadas neste trabalho já se encontravam disponíveis no laboratório (dados não publicados) (Quadro 1).

Quadro 1. Lista com construções plasmidiais e cassetes de expressão gênica disponíveis

Construções disponíveis para superexpressão protéica (dados não publicados)		
Construção plasmidial pSP-BT1-Y-Neo-α	Resíduos de aminoácidos que sofreram mutação	Localização e possível função do resíduo mutado
EIF4G3 ^{wt} - HA	Wild type	Proteína completa – sem mutação
EIF4G3 ^{IR} - HA	IR8-9AA	N- terminal, interação com EIF4E4
EIF4G3 ^{FSL} - HA	FSL23-25AAA	N- terminal, interação com EIF4E4
EIF4G3 ^{LNK} - HA	LNK67-69AAA	HEAT-1/MIF4G, interação com EIF4A1
EIF4G4 ^{wt} - HA	Wild type	Proteína completa – sem mutação
EIF4G4 ^{FSL} - HA	FSL40-42AAA	N- terminal, interação com EIF4E3
EIF4G4 ^{LNK} - HA	LNK91-93AAA	HEAT-1/MIF4G, interação com EIF4A1
Construções disponíveis para ensaio de deleção gênica		
Δ EIF4G3	Cassetes de deleção gênica SKO - 5'UTR+higromicina+3'UTR DKO - 5'UTR+puromicina+3'UTR	
Δ EIF4G4		

Fonte: a autora, 2019.

As construções utilizadas para análise da superexpressão protéica foram desenvolvidas através de mutagênese sítio dirigidas e visaram modificar os motivos de ligação dos homólogos de *Leishmania infantum* EIF4G3 e EIF4G4 os seus parceiros ligantes EIF4E4 e EIF4E3, respectivamente, bem como o EIF4A1. Os fragmentos gênicos foram subclonados no vetor de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa, o qual permite uma expressão constitutiva dos genes em níveis aumentados.

Os cassetes de deleção gênica foram obtidos através de reações de PCR e contêm 500 pb das regiões 5' e 3' UTR dos genes alvos a serem deletados, bem como genes de resistência a higromicina. Após obtenção dos cassetes, os mesmos

foram inseridos no vetor de clonagem pGEMT-*Easy* de acordo com as instruções do fabricante.

5.1.1 Extração de DNA a partir dos diferentes vetores plasmidiais

As construções plasmidiais nos vetores pSP-BT1-Y-Neo-alfa e pGEMT-*Easy* foram utilizadas no processo de transformação da cepa quimiocompetente de *Escherichia coli* TOP10, através de choque térmico para inserção do DNA exógeno. Para isto, utilizou-se 5µl de DNA à 50µl de células competentes que foram submetidos à 30 minutos no gelo e 5 minutos à 37°C. Posteriormente, a solução foi semeada em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo ampicilina (100 µg/mL) e as placas incubadas em estufa à 37°C por aproximadamente 16 horas. As colônias foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas em agitador orbital à 37°C por aproximadamente 16 horas. Em seguida, a extração plasmidial foi realizada utilizando o kit *PureYield Plasmid Miniprep System* (Promega), conforme orientações do fabricante.

As amostras de DNA foram enviadas para a plataforma de sequenciamento de DNA, disponível no Núcleo de Pesquisa Tecnológicas (NPT) do Instituto Aggeu Magalhães e processadas em Sequenciador Automático de DNA utilizando o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®). Em paralelo, as amostras foram submetidas a ensaios de digestão enzimática, fazendo uso das enzimas de restrição específicas. Após confirmação da integridade e viabilidade das sequências, foi possível avançar com as etapas subsequentes.

5.2 Cultivo celular

Formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram cultivadas em meio Schneider pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), e solução de hemina 0,2% v/v (Sigma-Aldrich Co.) e mantidas em estufa a 26°C. O crescimento dos parasitas foi monitorado por contagem em câmara de Neubauer, sendo os mesmos mantidos em fase exponencial de crescimento por meio de repasses sucessivos. Estas culturas foram usadas em experimentos de modificação genética

através da técnica de transfecção dos parasitas com as construções plasmidiais citadas no quadro 1.

5.3 Obtenção de linhagens para superexpressão

Para cada transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram utilizadas para a realização de eletroporação com o DNA recombinante. A cultura celular foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, lavada com 1 mL de tampão Hepes-NaCl pH 7,05 (Hepes 20 mM, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, Na₂PO₄ 0,7 mM e glicose 20 mM) e ressuspendida em 450 µl do mesmo tampão. Em seguida, as células foram repassadas para cuvetas de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) contendo de 5 a 10 µg do DNA plasmídial circular ou 2 a 5 µg do DNA linear a ser transfectado e então, mantidas no gelo durante 10 minutos. Para o controle negativo foi utilizado o mesmo procedimento, porém sem a presença de DNA.

As células foram eletroporadas com 1 pulso de 450 Volts e capacitância de 450 µF, utilizando o eletroporador *Gene Pulser Xcell™ system* (BIO-RAD). Após o choque, o material foi repassado para uma garrafa de cultura de 25 cm² contendo 5 mL de meio Schneider pH 7,2 e incubado a 26°C, por 24 horas. Em seguida, foi realizada a pré-seleção dos transfectantes, onde foi adicionado 5 mL de meio Schneider à cultura juntamente com a metade da quantidade do antibiótico utilizado para seleção da linhagem. Após 24 horas, 1 mL das células pré-selecionadas foram transferidas para uma garrafa de cultura contendo 9 mL de meio Schneider pH 7,2 juntamente com a concentração final (quadro 2) do antibiótico utilizado. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 26°C e acompanhadas durante 5 a 10 dias até que as células fossem selecionadas e se tornassem viáveis para um repasse celular.

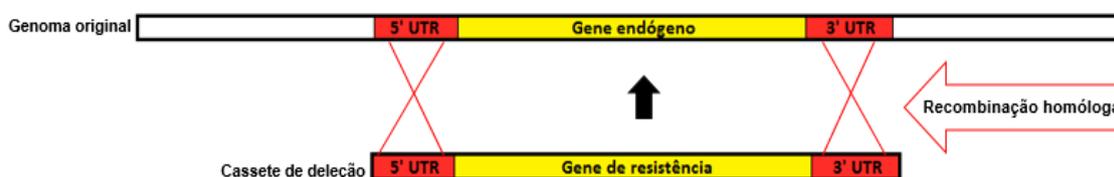
Quadro 2. Lista de antibióticos e suas respectivas concentrações utilizadas neste trabalho para seleção de células promastigotas de *Leishmania infantum*

Construções	Antibióticos	Concentração final
Superexpressão	Neomicina (G418 - InvivoGen®)	80 µg/mL
Deleção gênica	Higromicina (InvivoGen®)	80 µg/mL
	Puromicina (Sigma®)	140 µg/mL

5.4 Obtenção de linhagens para estudos de deleção e complementação gênica

Para a deleção gênica foi adotada a estratégia de recombinação homóloga sítio-específica utilizando cassetes contendo a 5' UTR+ gene de resistência + 3' UTR do gene alvo a ser deletado (Figura 9).

Figura 9. Esquema ilustrativo da deleção do gene alvo endógeno através da integração do gene de resistência por recombinação homóloga



Os cassetes disponíveis em nosso laboratório clonados no vetor plasmidial pGEMT-*Easy* foram submetidos à digestão enzimática; para aquele com marca de resistência à higromicina foi utilizado a enzima *Not I*, sendo então purificado e utilizado para transfectar células da forma promastigota de *L. infantum*. Em seguida, as linhagens foram submetidas à seleção clonal em placa Schneider - ágar adicionado dos antibióticos de seleção específicos. Para confirmação do nocaute de uma das duas cópias gênicas (*single knockout – SKO*), o DNA genômico do parasita foi extraído e submetido à reação de PCR utilizando oligonucleotídeos específicos como demonstrado no quadro 3.

Quadro 3. Sequência de *oligonucleotídeos* utilizados para confirmação do *single knockout (SKO)*

Oligonucleotídeo	Sentido	Sequência 5'- 3'
Δ EIF4G3	<i>Forward</i>	CATGCGAAGCCTTCACCCT
Δ EIF4G4	<i>Forward</i>	TGTTGACTCCCCTCATCTCC
Higromicina	<i>Reverse</i>	ATCGCCTCGCTCCAGTCAATG

Após a conclusão desta etapa, os genes selvagens e mutantes contidos nas construções plasmidiais foram avaliados quanto à sua capacidade de substituir a função dos genes endógenos através do ensaio de complementação.

5.5 Curva de proliferação celular de *L. infantum*

As linhagens transgênicas utilizadas para análise da superexpressão protéica e as linhagens complementadas dos ensaios de deleção gênica, tiveram sua proliferação celular monitoradas através de curvas de crescimento. Inicialmente, foi realizado um repique prévio onde 1×10^6 células de *L. infantum* foram diluídas em meio Schneider para um volume final de 10 mL. A cultura foi mantida em tubo cônico de 50 mL até que atingissem a fase estacionária.

Após todas as linhagens estarem em fase estacionária, foi realizada uma nova diluição para a cultura-teste com a mesma quantidade de células e então contadas em câmara de Neubauer nos pontos 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. Em cada ponto, foram retirados extratos celulares totais em uma concentração final de 2×10^5 célula/ μ l para análise do perfil de expressão de cada proteína estudada.

5.6 Obtenção de extrato total

Para a avaliação da expressão protéica, foram obtidos extratos totais das linhagens transgênicas, onde aproximadamente 1×10^8 células/mL foram centrifugadas a 3000 *rpm* por 5 minutos. O sedimento foi lavado com 1 mL de PBS

(tampão fosfato salino) e ressuspendido em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 µl/mL de 2-mercaptoetanol) para concentração final de 1×10^6 célula/µl. As alíquotas foram submetidas à fervura a 100°C por 5 minutos e armazenadas à 80°C, para posterior fracionamento em gel SDS-PAGE e análise por ensaio de *western-blot*.

5.7 Preparação de lisados celulares

Para a obtenção da fração citoplasmática de células de *L. infantum*, cerca de $1,5 \times 10^9$ células promastigotas foram coletadas e centrifugadas à 4°C por 5 minutos a 3000 *rpm*, o sedimento foi lavado com PBS e transferido para tubos de microcentrifuga; em seguida ressuspendido em 550 µl de tampão de lise com inibidor de protease EasyPack® (Roche).

Para a lise, as células foram submetidas ao processo de cavitação utilizando cilindro de alta pressão de nitrogênio, onde o gás dissipa-se pela célula através de bolhas preservando todos os componentes citoplasmáticos e expandindo a membrana celular até que sofram a troca de pressão e consequente ruptura da mesma liberando os seus componentes.

A pressão atmosférica utilizada foi de 70 *Bar* que permaneceu no compartimento por 30 minutos, sob refrigeração. Quando submetidas à troca de pressão, o lisado celular é coletado em um tubo cônico. Posteriormente, as amostras são transferidas para tubos de microcentrifugação e centrifugadas à 4°C por 10 minutos à 13.300 *rpm*. O sobrenadante, correspondente à fração citoplasmática solúvel, coletado para utilização dos mesmos na produção dos imunoprecipitados e alíquotas para análise da eficiência do processo foram ressuspendidos em tampão de corrida para avaliação por *western-blot*.

5.8 Ensaio de imunoprecipitação (IP)

Para obtenção dos imunoprecipitados, foram realizados três experimentos de forma independente, utilizando os lisados celulares das linhagens transgênicas selvagens e mutantes dos homólogos EIF4G3 e EIF4G4, assim como células de *L. infantum* não transfectadas como controle negativo. Foram utilizadas também,

Beads Magnéticas Anti-HA (Pierce™) de acordo com o protocolo do fabricante, uma vez que as proteínas apresentam o epítipo HA. Aproximadamente 5 µl das beads foram lavadas em tampão PBS e em seguida incubadas com 250 µl de lisado por 30 minutos à 4°C. Após este processo, houve a separação do lisado da resina, que foi denominado depletado e a resina foi lavada três vezes com PBS adicionado de inibidor de protease para remoção das ligações inespecíficas. Alíquotas do lisado celular original, do lisado depletado após a imunoprecipitação e a resina foram preparadas para avaliação por *Western-Blot* e envio para análise por espectrometria de massas.

5.9 Western – blot (WB)

Os extratos protéicos obtidos de células de *L. infantum*, bem como as amostras proveniente dos lisados e imunoprecipitações, foram submetidas a ensaio de WB. Após fracionamento em gel SDS-PAGE 15% e transferência para membrana de PVDF (100 mA por 1 hora), esta foi bloqueada em solução de leite desnatado a 5% em TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5) sob agitação por uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário monoclonal anti-HA (Abcam®) na diluição de 1:5000 em solução de composição igual à usada para o bloqueio, durante 16 horas à 4°C, sob agitação. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween 20, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo na diluição de 1:3000 (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase), sob agitação por uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada novamente como descrita anteriormente.

Posteriormente a membrana foi submersa por 3 minutos em 25 ml de solução quimioluminescente de revelação (25 ml de luminol a 1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5; adicionado de iodofenol diluído em DMSO para uma concentração final de 0,4 mM; peróxido de hidrogênio a 0,03%). Em seguida, a membrana foi seca em papel filtro, e exposta a filme *Biomax Light* (Kodak®) e revelada em solução Dektol 1:2 (Kodak®) até saturação, por cerca de 3 minutos. Para a análise de WB, também foi utilizada a solução quimioluminescente comercial *Immobilon forte western HRP substrate* para que fosse possível sua revelação no

iBright™ FL1500 *Imaging System* (Thermo Fisher Scientific), com tempo de exposição determinado pelo equipamento.

5.10 Análise por espectrometria de massas

Após a confirmação da eficiência das IPs através de ensaios de WB, o material do imunoprecipitado foi aplicado em gel SDS-PAGE 12% e a migração foi interrompida após a entrada das amostras na fase de resolução do gel, antes que houvesse fracionamento das proteínas em estudo. Em seguida, o gel foi corado com azul de Coomassie Blue 250-R (*staining*) e descorado durante 12h com a solução descorante.

As bandas contendo o produto das IPs foram excisadas do gel e conservadas em água ultrapura para envio à subunidade RPT02H - Espectrometria de Massas da Rede de Plataformas Tecnológicas/ Fiocruz - PR no Instituto Carlos Chagas. A análise dos peptídeos foi baseada em nanocromatografia líquida acoplada a eletropulverização e espectrometria de massas em tandem (nanoLC-ESI-MS/MS), utilizando o espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (*Thermo Scientific*). A identificação de proteínas foi baseada nos bancos de dados de sequência de proteínas de *L. infantum* (*L. infantum* JPCM5, versão de 13 de julho de 2018, disponível no TriTrypDB).

Para a análise dos resultados obtidos pela espectrometria de massas, os dados brutos passaram por um processo de refinamento, onde todas as proteínas que possuíam zero no parâmetro “LFQ *intensity*” em uma das réplicas (de três experimentos independentes) foram excluídas da tabela. Para validar a especificidade dos ensaios de IP, para cada polipeptídeo, foi calculada a razão da intensidade de massa gerada das proteínas marcadas com HA pelo controle negativo. Os logaritmos da base 2 (Log2) foram obtidos a partir da razão gerada e apenas os valores >1 foram considerados. Os peptídeos foram identificados por meio dos números de acesso presente no banco de dados de tripanosomatídeos, TriTrypDB *database* (<https://tritrypdb.org>) e os dados de localização foram baseados nos seus ortólogos de *T. brucei* disponíveis na base de dados TrypTag (<http://tryptag.org>).

6. RESULTADOS

Dados obtidos por diferentes grupos de pesquisa apontam que as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 em tripanosomatídeos participam de complexos do tipo EIF4F a partir da interação com os parceiros EIF4E4 e EIF4E3, respectivamente, assim como da interação das proteínas EIF4Gs com o EIF4A1. Os sítios de interação do EIF4G aos seus parceiros foram mapeados em trabalhos prévios, assim como foi identificado que a proteína EIF4G3 tem função relacionada à tradução e o EIF4G4 ainda não tem função claramente definida. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a função dos homólogos dos fatores de iniciação da tradução EIF4G3 e EIF4G4, selvagens e mutantes, no crescimento celular e na associação a parceiros funcionais em células de *L. infantum*.

Inicialmente, nesta seção de resultados, apresentamos um alinhamento com as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 de *L. infantum* ressaltando as diferentes construções selvagens e mutantes utilizadas neste trabalho (Figura 10). Os resíduos na região N-terminal (IR que corresponde ao EIF4G3 e FSL para ambos os homólogos em *L. infantum*) estão envolvidos na ligação ao EIF4E e no domínio MIF4G (resíduos LNK), responsável pela ligação ao EIF4A1, baseados em dados prévios publicados para *L. major* e *T. brucei* (MOURA et al., 2015).

Figura 10. Análise comparativa de seqüências do EIF4G3 e EIF4G4 de diferentes espécies de tripanosomatídeos.

LiEIF4G3	1	-----	-----M	QFTVEQIRSV	RNNYLEP-PY	PCFSLDEVVR	RRRL-----	TQTKLVRGEN	AWVAKG-TAQ	53
LmxEIF4G3	1	-----	-----M	QFTVEQIRSV	RNNYLEP-PY	PCFSLDEVVR	RRRL-----	TQTKLVRGEN	AWVAKG-TAQ	53
LbEIF4G3	1	-----	-----M	QFTVEQIRSV	RNNYLEP-PY	PCFSLDEVVR	RRRL-----	TQTKLVRGEN	AWVAKG-TAQ	53
TbEIF4G3	1	-----	-----MH	VYTIIDQILEL	RSLYPEP-PY	PCFSLDEEACR	RKKQ-----	TQTKLVRGPN	AWAARG-SAK	54
TcEIF4G3	1	-----	-----MH	VYSIQQILEV	RSMYKDA-PY	PCFSLDEEACR	RKKM-----	TQTKLVRGAN	AWVARG-SAK	54
LiEIF4G4	1	MLFNLRGIVP	QKEEKVKN--	QMTLADILAF	RDWTWAI-PE	PMFSLERVIL	TARLEKQRKA	EIPKLVMSEN	GFRVRDKKDM	77
LmxEIF4G4	1	MLFNLRGIVP	QKEEKVKN--	QMTLADILAF	RDWTWAI-PE	PMFSLERVIL	TARLEKQRKA	EIPKLVMSEN	GFRVRDKKDM	77
LbEIF4G4	1	MLFNLRGIVP	QKEEKVKN--	QMTLADILAF	RDWTWAI-PE	PMFSLERVIL	TARLETKRKA	EIPKLVMSEN	GFRVRDKKEM	77
TbEIF4G4	1	MLFKPRGVTS	NDPRYAGGSR	LMSVSDLLAY	RDWTRGRPEP	ESFSLAQIIF	DARAADCKPV	VTEKLVMSEN	GFKVSRDSI	80
TcEIF4G4	1	MLFKPRGVTS	NDPKYAGNSR	IMTLPDLLAY	RDTWKER-LS	DIESLGRITF	AARAASKPA	APEKLVMTSN	GFKVKDRDAI	79

-HEAT-1-

LiEIF4G3	54	TTEWVQRLL	HGTLNKLTEE	NKDIMIDKLL	TKELFATEDI	MNMVNIIFK	KALDEPENSK	LYAGVCHSLA	LYEANVLRDG	133
LmxEIF4G3	54	TTEWVQRLL	HGTLNKLTEE	NKDIMIDKLL	TKELFATEDI	MNMVNIIFK	KALDEPENSK	LYAGVCHSLA	LYEANVLRDG	133
LbEIF4G3	54	TTEWAQRLL	HGTLNKLTEE	NRDILVGKLL	TKELFATEDI	MNMVNIIFK	KALDEPENSK	LYAGVCHSLA	LYEATVLRDG	133
TbEIF4G3	55	TTEWVERLV	YGSLNKLSAA	NFNEIVSQLQ	TNTIFSSDEM	LKKTVSIIFN	KALGEPENSN	VYAGLCYKLA	EYEVSLNVQ	134
TcEIF4G3	55	TTEWVERLV	YGSLNKLSAA	NFDDMVAKLQ	TEVVFSTKET	LNIAVRIIFK	KALDEPECCK	SYAGVCYKLA	EFVGLTAAK	134
LiEIF4G4	78	DASELELRV	QGSLNKLTDK	NFDVAVVEAL	SPDLVNLPLV	LKGAVDIIFN	KAVAEPVFSG	IYAQLCQRIK	VYEQDLVAEA	157
LmxEIF4G4	78	DASELELRV	QGSLNKLTDK	NFDVAVVEAL	SPDLVNLPLV	LKGAVDIIFN	KAVAEPVFSG	IYAQLCQRIK	VYEQDLVAEA	157
LbEIF4G4	78	NAAELELRV	QGSLNKLTDK	NFDVAVVEAL	SPDLVNLPLV	LKGAVNIIFN	KAVAEPVFSG	IYAQLCQRIK	VYEQDLVTEA	157
TbEIF4G4	81	DSLBRGVRV	QSLNKLTEW	NFDVVVQTVL	TPDIIINNEV	VKDVVRIIYE	KALMEPVFAG	LYARMCFSIV	RFEYRYRTKF	160
TcEIF4G4	80	APSERGVRV	QSLNKLTES	NFDLIAKAIL	VPEIILNAV	VADVVRITVD	KALVEPVFAG	LYARLCYMIV	RVEYDRSTQ	159

-----HEAT-1/MIF4G-----

Nota: Alinhamento no Clustal W dos homólogos de EIF4G3 e EIF4G4 em diferentes espécies de tripanosomatídeos, destacando regiões de homologia fora do domínio HEAT-1/MIF4G. Os aminoácidos idênticos em mais de 60% das seqüências são destacados em cinza escuro, enquanto os aminoácidos definidos como similares, baseados na matriz BLO-SUM 62, em mais de 60% das seqüências, são mostrados em cinza claro. As duas regiões consenso, candidatas a ligação com o EIF4E, estão representadas pelos quadros 1 e 2, em vermelho. ▼ indica os resíduos de aminoácidos conservados que foram mutados em EIF4G3 e EIF4G4 de *L.infantum*, a fim de investigar suas interações com os homólogos de eIF4E e eIF4A.

A partir dessa etapa foram feitas duas abordagens. A primeira, incluiu a expressão das proteínas recombinantes EIF4G3 e EIF4G4 fusionadas a HA em *L. infantum*, com obtenção de curvas de crescimento para as linhagens obtidas. Em seguida, foi realizada a imunoprecipitação e espectrometria de massas dos complexos obtidos que permitiu identificar proteínas que são semelhantes ou diferencialmente expressas entre os selvagens e os mutantes. A segunda abordagem, foi a obtenção de linhagens transgênicas com o nocaute gênico de uma das cópias dos genes EIF4G3 e EIF4G4, que foram complementadas com cópias dos genes selvagens e mutantes em vetor plasmidial, para futura deleção da segunda cópia dos genes endógenos alvos.

6.1 Perfil de expressão proteica dos homólogos EIF4G selvagens e mutantes em *Leishmania infantum*

A partir da transfecção de células promastigotas de *Leishmania infantum* com plasmídeos contendo os genes selvagens e mutantes EIF4G3 e EIF4G4, foram geradas as linhagens expressando as diferentes proteínas descritas no quadro 4.

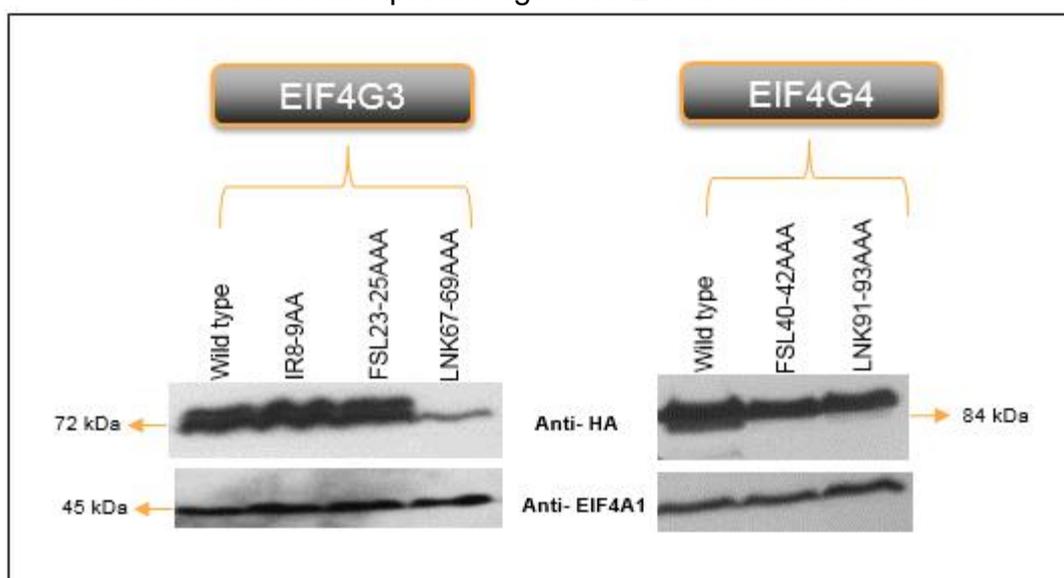
Quadro 4. Linhagens obtidas superexpressando os homólogos EIF4G selvagens e mutantes de *L. infantum*

Linhagens obtidas	Tamanho da proteína kiloDaltons (kDa)
<i>L</i> EIF4G3 ^{wt} - HA	~72 kDa
<i>L</i> EIF4G3 ^{IR} - HA	
<i>L</i> EIF4G3 ^{FSL} - HA	
<i>L</i> EIF4G3 ^{LNK} - HA	
<i>L</i> EIF4G4 ^{wt} - HA	~84 kDa
<i>L</i> EIF4G4 ^{FSL} - HA	

<i>L</i> EIF4G4 _{LNK} - HA	
-------------------------------------	--

Em seguida, ensaios de *western blot* confirmaram a expressão dos genes selvagens e mutantes, gerando proteínas de acordo com o tamanho predito de ~72 kDa para EIF4G3 e ~84 kDa para EIF4G4 (Figura 11). Além das isoformas no tamanho esperado, foram identificadas a presença de isoformas compatíveis com modificações pós-traducionais no EIF4G3_{WT} e seus mutantes, com exceção do EIF4G3_{LNK}. Além disso, a proteína EIF4G3_{LNK} também apresentou expressão reduzida quando comparado aos demais, como é possível visualizar na figura 11, levantando a hipótese de que a proteína mutante seja menos estável e pode estar sendo degradada com mais facilidade.

Figura 11. Expressão protéica das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens e mutantes na forma promastigota de *Leishmania infantum*



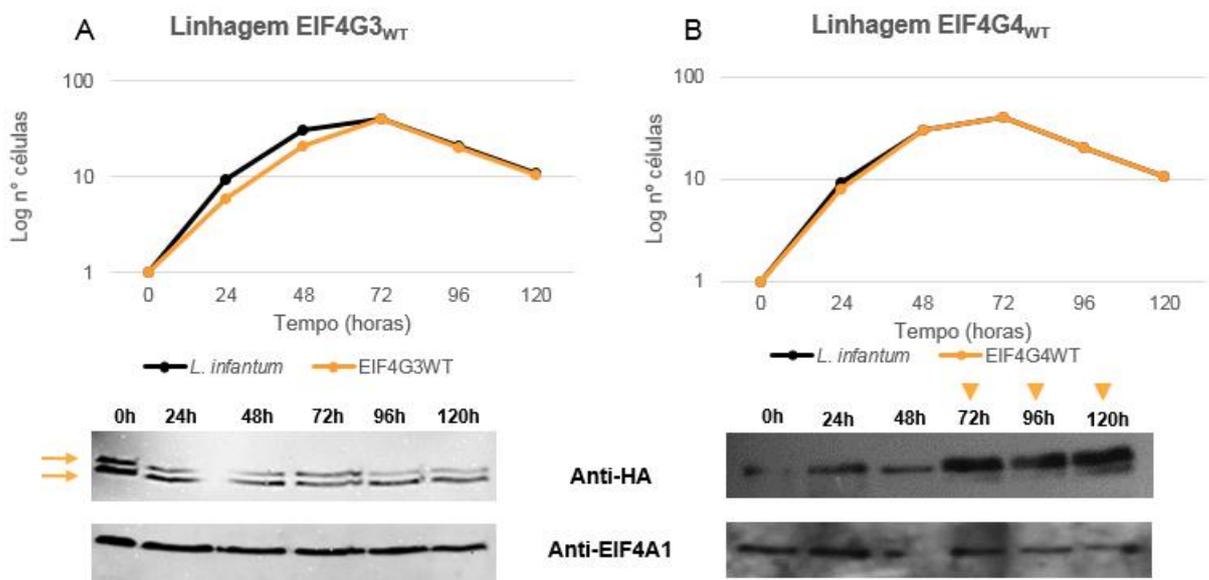
Fonte: elaborado pela autora

Nota: Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-HA para identificação das proteínas selvagens e mutantes fusionadas ao epítipo HA e soro policlonal de coelho contra o EIF4A1 para controle de carga.

As células de *L. infantum* superexpressando o EIF4G3 e EIF4G4 selvagens em fusão com o epítipo HA foram analisadas em curvas de crescimento para identificar o padrão de crescimento das diferentes linhagens, bem como avaliar o perfil de expressão durante as fases de crescimento das mesmas por imunodeteção com anticorpo monoclonal contra o epítipo HA.

Os resultados mostram que a expressão das proteínas selvagens não tiveram influência na proliferação celular e, quanto ao perfil de bandas, o homólogo EIF4G3 foi expresso ao longo de toda a curva apresentando isoformas compatíveis com modificações pós-traducionais (Figura 12 - A). A taxa de crescimento das linhagens expressando as proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens foi similar a linhagem controle *L. infantum*. O EIF4G4 também se mostrou expresso ao longo de toda a curva, entretanto, a segunda isoforma foi expressa de forma tardia, podendo ser identificada a partir de 72 horas (Figura 12 - B).

Figura 12. Curvas de crescimento de células de *Leishmania infantum* expressando EIF4G3 e EIF4G4 em fusão com HA.



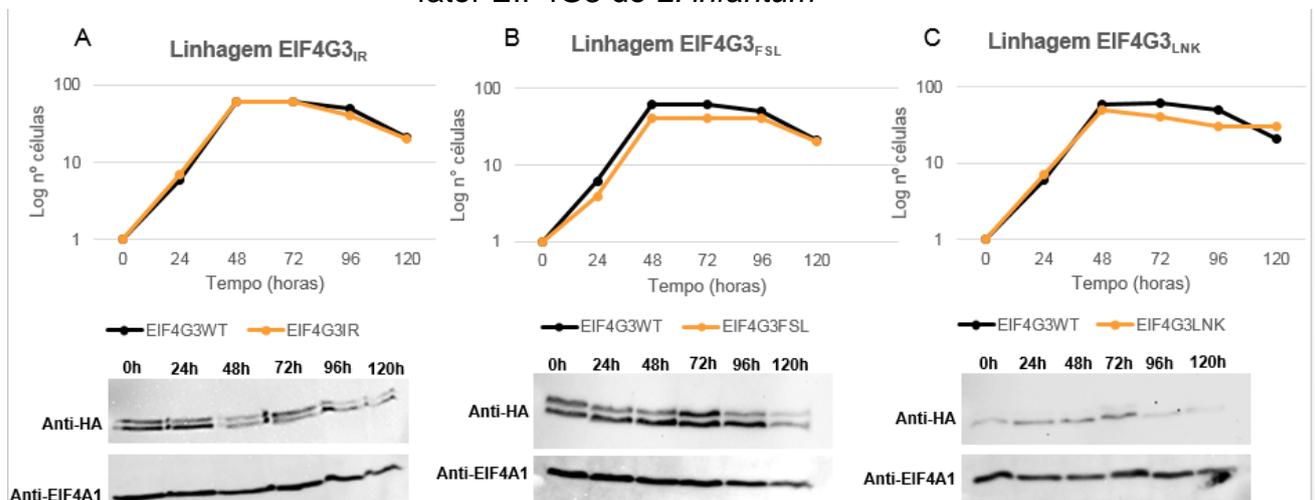
Fonte: elaborado pela autora

Nota: **A)** Na parte superior, o gráfico representa a taxa de proliferação celular da linhagem transgênica expressando o EIF4G3_{WT} comparada a linhagem selvagem de *L. infantum*. Na parte inferior, o resultado de *western blot* destaca as isoformas do EIF4G3 (setas) **B)** Na parte superior, o gráfico representa a taxa de proliferação celular da linhagem transgênica expressando o EIF4G4_{WT} comparada a linhagem selvagem de *L. infantum*. Na parte inferior, o resultado de *western blot* destaca as isoformas do EIF4G4. ▼ representa os pontos que a isoforma do EIF4G4 começa a ser expressa. O EIF4A1 que foi usado como controle de carga.

Posteriormente, as linhagens contendo mutações na proteína EIF4G3 tiveram sua taxa de crescimento analisadas através de curvas e os perfis de expressão foram comparados ao da proteína selvagem. Os dados revelam que EIF4G3_{IR} teve seu crescimento similar ao EIF4G3_{WT}, porém em relação ao mutante EIF4G3_{FSL}, foi

possível observar que seu crescimento teve uma pequena redução comparada ao selvagem, mas que ao chegar na fase estacionária, seus níveis praticamente se igualam. Os mutantes referidos acima se mostraram expressos constitutivamente ao longo da curva gerada sob a forma de duas bandas. A linhagem EIF4G3_{LNK} mostra uma discreta diminuição no seu crescimento a partir da fase exponencial, entretanto ocorre uma significativa diminuição nos níveis de expressão desta proteína em todos os pontos da curva, a qual é detectada apenas por uma banda (Figura 13).

Figura 13. Análise dos níveis de crescimento e perfil de expressão dos mutantes do fator EIF4G3 de *L. infantum*

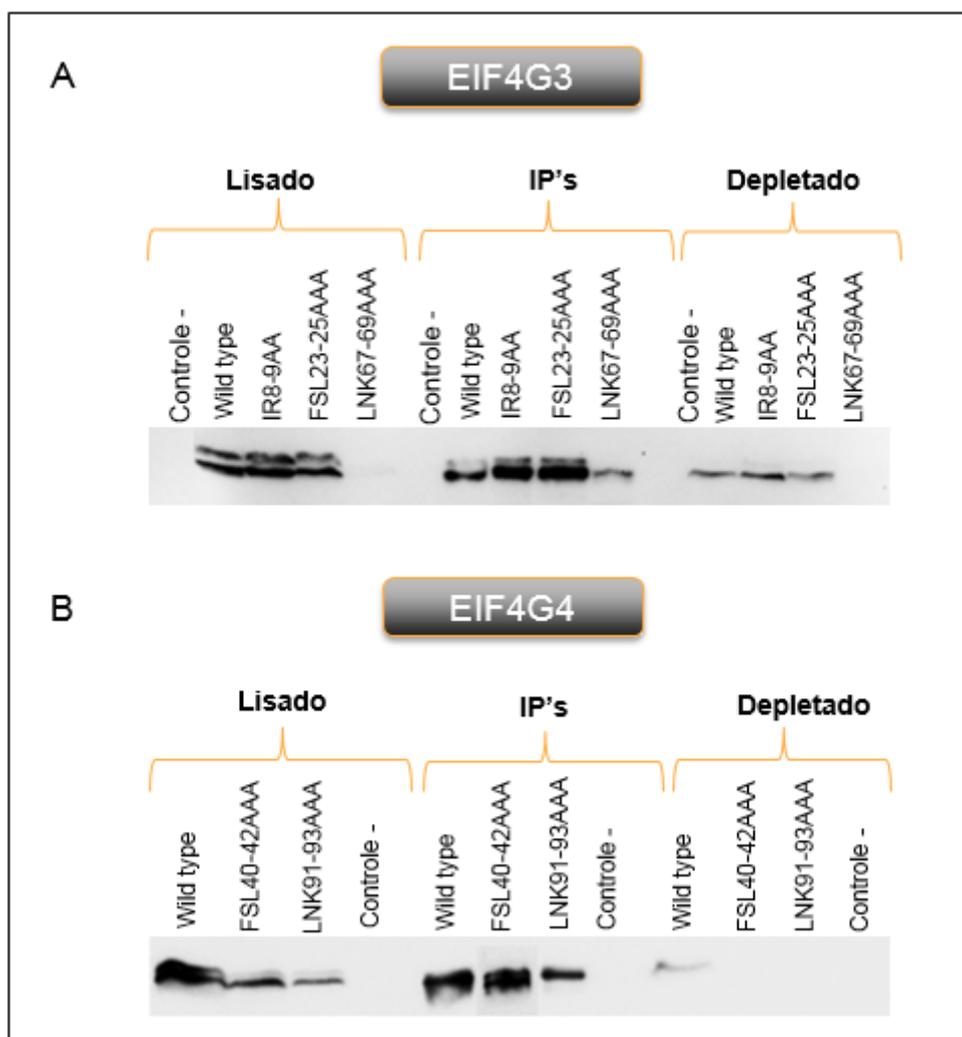


Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: Na parte superior, o gráfico representa a taxa de proliferação celular da linhagem transgênica expressando o EIF4G3_{IR} (A), EIF4G3_{FSL} (B) e EIF4G3_{LNK} comparada a linhagem expressando o EIF4G3_{WT} de *L. infantum*. Na parte inferior, o resultado de *western blot* destaca o perfil de expressão de cada mutante ao longo da curva de crescimento.

Após a confirmação da superexpressão das proteínas utilizadas neste trabalho, alíquotas de culturas foram usadas na obtenção de lisados celulares por cavitação e através de ensaios de *western blot* demonstrou-se que os mesmos apresentavam proteínas EIF4G3 e EIF4G4 em quantidades adequadas para etapa de imunoprecipitação (Figura 14). Por fim, as amostras imunoprecipitadas foram analisadas através de espectrometria de massas, com o intuito de avaliar os diferentes complexos formados (Figura 14).

Figura 14. Obtenção de lisados expressando o EIF4G3 e EIF4G4 de *L. infantum* e ensaio de imunoprecipitações dos genes selvagens e mutantes fusionados ao epítipo HA.



Fonte: elaborado pela autora

Nota: Na ordem as amostras utilizadas para o ensaio por *Western blot* são: Lisado, IP e depletado dos homólogos EIF4G3 (A), EIF4G4 (B) e suas respectivas variantes.

6.1.1 Proteínas associadas ao homólogo EIF4G3 de *L. infantum*

Os dados resumidos no quadro 5 consideram as proteínas que coprecipitaram com o EIF4G3_{WT} e se apresentaram enriquecidas em relação ao controle negativo.

Quadro 5. Análise de proteínas identificadas por espectrometria de massa que coprecipitam com o EIF4G3 selvagem de *Leishmania infantum*.

EIF4G3 selvagem			
ID	Descrição da proteína	Localização pelo TrypTag	LOG2 >1
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
LINF_160022100	EIF4G3 - fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	+∞
LINF_300009600	EIF4E4 - fator de iniciação da tradução eucariótica 4E	Citoplasma	+∞
LINF_350055900	PABP1 - proteína 1 de ligação a poli (A)	Citoplasma	2,3
LINF_010012900	EIF4A1 - fator de iniciação eucariótico 4a	Citoplasma (irregular)	1,4
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NA TRADUÇÃO			
LINF_360007700	EIF3L - fator 3 de iniciação da tradução eucariótica, subunidade L	Citoplasma (25%)	+∞
LINF_360081900	EIF3C - fator 3 de iniciação da tradução eucariótica subunidade 8	Citoplasma (irregular)	+∞
LINF_170005000	EIF3A - proteína hipotética - conservada	Não há dados	4,5
LINF_360047700	EIF3I - fator 3 de iniciação da tradução eucariótica subunidade 2	Citoplasma (irregular)	3,4
LINF_170020200	EIF3B - fator de iniciação da tradução	Citoplasma	2,8
LINF_110017700	ERF3 – fator 3 de liberação eucariótico	Citoplasma	+∞
LINF_340008600	EIF5 - fator de iniciação da tradução eucariótica 5	Citoplasma (irregular)	2,0
LINF_340014200	EF1-beta – fator de alongamento 1-beta	Citoplasma (forte, <10%)	2,0
LINF_360007100	EF2-2 – Fator de alongamento 2	Citoplasma (irregular)	1,3
LINF_250005800	PABP3 – proteína 3 de ligação a poli (A)	Grânulos de RNA	2,3
LINF_360070500	EIF4G4 - fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	1,6
PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS			
LINF_340035700	Proteína ribossomal L3	Não há dados	+∞
LINF_040014500	60S proteína ribossomal L10	Citoplasma	+∞
LINF_360046400	40S proteína ribossomal S27-1	Citoplasma	+∞
LINF_220005300	60S proteína ribossomal L11 (L5 - L16)	Citoplasma (irregular); nucléolo	3,9
LINF_130017300	40S proteína ribossomal S4	Não há dados	3,7
LINF_260006700	60S proteína ribossomal L7	Citoplasma (irregular)	3,3
LINF_070010600	60S proteína ribossomal L7a	Não há dados	3,2
LINF_330016500	40S proteína ribossomal S3	Citoplasma (pontos)	2,9
LINF_360060700	40S proteína ribossomal SA	Citoplasma; citoplasma flagelar (fraco)	2,6
LINF_350023900	60S proteína ribossomal L5	Citoplasma (irregular)	2,5
LINF_260013800	40S proteína ribossomal S16	Não há dados	2,0
LINF_060011400	60S proteína ribossomal L23a	Citoplasma (irregular); nucléolo	1,8
LINF_360015200	40S ribossomal protein S18	Citoplasma; lúmen nuclear	1,7
LINF_340009500	Proteína ribossomal S25	Nucléolo (25%); Citoplasma (25%)	1,4
LINF_300039100	60S proteína ribossomal L9	Não há dados	1,4
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA			
LINF_320013000	NRBD - Proteína de ligação ao RNA	Citoplasma (irregular, <10%)	3,5
LINF_250008000	RBP43 - Proteína de ligação ao RNA	Citoplasma; nucléolo	1,4

		(50%)	
RNA HELICASES			
LINF_070008800	DBP2B_ DEAD/H RNA helicase dependente de ATP	Nucléolo (forte)	+∞
LINF_350036300	RNA helicase dependente de ATP	Não há dados	2,3
LINF_080005700	DEAD/H RNA helicase dependente de ATP	Não há dados	1,8
LINF_320009100	HEL67-Dpb1 - RNA helicase dependente de ATP	Citoplasma (fraco)	1,2
OUTRAS PROTEÍNAS			
LINF_110005600	Proteína contendo o domínio GRIP	Não há dados	+∞
LINF_150007600	Lisil-tRNA sintetase	Endocítico	+∞
LINF_360047300	Glicil-tRNA sintetase	Citoplasma	+∞
LINF_110010500	mRNA cap guanina-N7 metiltransferase	Não há dados	+∞
LINF_360048900	Subunidade proteolítica do complexo hslVU - treonina peptidase - Clã T (1) - família T1B	Citoplasma; lúmen nuclear	+∞
LINF_100007100	MPK10_ Proteína quinase ativada por mitogênio 10	Não há dados	1,5
LINF_360014300	MKK5_ proteína quinase quinase ativada por mitogênio	Não há dados	1,3

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: As proteínas que compõem a tabela estão divididas de acordo com seu tipo e as destacadas em **negrito** são as que interagiram de forma exclusiva com o homólogo EIF4G3 selvagem. O símbolo +∞ representa o limite da variável tendendo ao infinito.

Como esperado, o EIF4G3 foi a proteína mais abundante dentre todos os peptídeos identificados e podemos observar que o mesmo interage com as proteínas do complexo EIF4F previamente identificadas tais como o EIF4E4, EIF4A1, a PABP1 e proteínas associadas (RBP43 - LINF_250008000; NRBD - LINF_320013000). Destaca-se também a coprecipitação de outros fatores de tradução como o eIF5, eRF3 e fatores de alongamento 1 e 2. Várias subunidades do fator eIF3 (subunidades L (LINF_360007700), C (LINF_360081900), A (LINF_170005000), I (LINF_360047700) e B (LINF_170020200) foram imunoprecipitadas com o EIF4G3.

Chama a atenção o aparecimento de outros homólogos de subunidades do complexo EIF4F, como a PABP3 e o EIF4G4, este último sugerindo uma possível interação EIF4G/4G que necessita ser melhor investigada. Em se tratando de outras proteínas envolvidas na etapa de iniciação, várias proteínas ribossomais estavam presentes no imunoprecipitado e destacamos a proteína ribossomal 40S - S4 (LINF_130017300) por se associar ao eIF3 na formação do pré-complexo 43S, além de algumas RNAs helicases, cujo papel precisa ser melhor investigado.

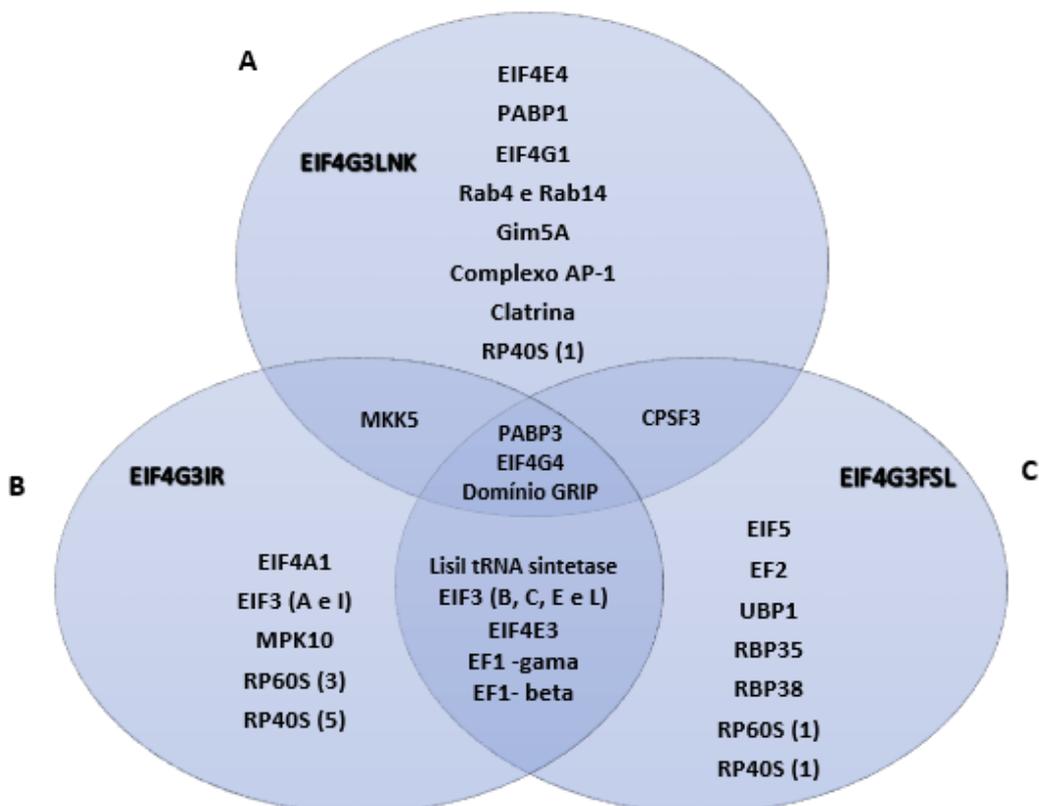
Uma proteína contendo um domínio GRIP, as enzimas mRNA cap guanina-N7 metiltransferase e amino-acil tRNA sintetases (LINF_150007600 e LINF_360047300) apresentaram alto valor de enriquecimento, demonstrando forte interação com a proteína EIF4G3.

6.1.2 Proteínas associadas aos mutantes do homólogo EIF4G3 de *L. infantum*

Em relação às análises *in vivo* das proteínas mutantes do EIF4G3, foi possível observar que as mutações selecionadas interferiram no padrão de ligação dos seus parceiros funcionais. Este trabalho apresenta resultados inéditos, uma vez que nenhum trabalho prévio tinha avaliado o perfil dos complexos formados utilizando mutações nas proteínas EIF4G que bloqueiam as ligações aos parceiros do EIF4F.

Após o processamento dos dados, as proteínas identificadas no imunoprecipitado de cada construção mutada, foram resumidas e estão representadas no diagrama de Venn (Figura 15).

Figura 15. Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que interagem com os mutantes do EIF4G3 de *L. infantum*.



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: No diagrama de Venn, são listadas de forma resumida as proteínas relacionadas à tradução, identificadas por espectrometria de massa nos imunoprecipitados dos mutantes de interação do EIF4G3 aos parceiros EIF4E4 e EIF4A1. É possível observar as proteínas que coprecipitaram em comum entre os mutantes, assim como de forma independente.

Como era esperado, as análises dos dados referentes ao mutante EIF4G3_{IR} (Figura 15-B), foi possível confirmar uma clara inibição da interação com seu parceiro funcional, o EIF4E4, pois os peptídeos referentes a esta proteína não foram identificados na amostra. As proteínas que coprecipitaram com EIF4G3_{IR} estão descritas no anexo I. Além de não interagir com a proteína EIF4E4, como já esperado, a mutação IR foi suficiente para abolir a interação do complexo com outras proteínas essenciais para a biossíntese protéica como PABP1 (LINF_350055900), eIF5 (LINF_340008600) e o eRF3 (LINF_110017700), porém a ligação com os fatores de alongamento 1 e 2 permanecem inalteradas. Em relação ao eIF3, todas as subunidades identificadas no EIF4G3 selvagem se mantiveram, mas uma nova subunidade foi identificada, a EIF3E (LINF_280029900). A presença dos homólogos PABP3 e EIF4G4 permanecem com valores de enriquecimento similares ao EIF4G3 selvagem, mas é especialmente relevante a presença do EIF4E3, envolvido na formação de segundo complexo EIF4F, possivelmente envolvido no processo de tradução em parceria com o EIF4G4.

A interação com proteínas ribossomais e RNAs helicases sofreram pouca ou nenhuma interferência, visto que elas coprecipitaram de forma similar ao EIF4G3_{WT}. A grande maioria das proteínas que interagiram de forma exclusiva com a proteína em sua versão mutada são classificadas como hipotéticas, com localizações que variam de citoplasmática à endocítica, o que dificulta o estabelecimento de suas funções.

Em relação à mutação EIF4G3_{FSL} (Figura 15-C), esta também inibiu a ligação com o homólogo EIF4E4, como esperado, e interferiu também na interação com a PABP1 e o eRF3, o que ocorre de forma similar no mutante EIF4G3_{IR}. As proteínas que coprecipitaram com EIF4G3_{FSL} estão descritas no anexo II.

Em contraste com o mutante EIF4G3_{IR}, o eIF5 se mantém coprecipitado com o EIF4G3_{FSL}, porém o EIF4A1 apresenta valor de enriquecimento muito abaixo do ponto de corte escolhido, indicando que a ligação desta proteína ao complexo é

mais fraca. É observada uma leve alteração na interação com o eIF3 fazendo com que subunidades como o eIF3a e eIF3i deixem de se ligar, mas a subunidade eIF3e que foi identificada no EIF4G3_{IR}, permanece interagindo com o mutante em estudo. Além disso, a ligação com outras subunidades homólogas do complexo EIF4F, inclusive o EIF4E3, são mantidas.

É importante ressaltar que o perfil de interação com proteínas ribossomais foi significativamente alterado. Dentre as proteínas que coprecipitaram de forma exclusiva com o EIF4G3_{FSL}, estão proteínas hipotéticas e ainda destacamos proteínas envolvidas na estabilização do mRNA como a UBP1 (LINF_250010200), RBP35 (LINF_350037400) e RBP38 (LINF_240017400), bem como o motivo de reconhecimento do mRNA (LINF_030010000). Além do fator de especificidade de clivagem e poliadenilação – CPSF3 (LINF_340041200), componente principal do complexo de processamento da extremidade 3', que determina o local de clivagem permitindo a poliadenilação de mRNAs.

Os dados também revelam que proteínas como as MAP quinases, presentes tanto no EIF4G3_{WT} como no mutante EIF4G3_{IR}, deixam de interagir com o EIF4G3_{FSL}. Porém, a enzima mRNA cap guanine-N7 methyltransferase, que deixou de coprecipitar com o EIF4G3_{IR}, é identificada no produto da imunoprecipitação do mutante EIF4G3_{FSL}.

Em relação ao mutante EIF4G3_{LNK} (Figura 15-A), o efeito da mutação no domínio MIF4G aboliu a interação com EIF4A1, como esperado, porém mesmo na ausência da subunidade 4A, o EIF4E4 aparece interagindo fortemente quando comparado ao EIF4G3 selvagem, assim como a PABP1. Os resultados também demonstram a ausência da ligação com fatores como o eIF5, eRF3 e fatores de alongamento 1 e 2, estes últimos presentes no EIF4G3 selvagem e nos demais mutantes. A mutação nos resíduos LNK alteraram de forma importante a interação com o eIF3, onde não foi possível identificar nenhuma das subunidades do complexo na amostra desse mutante. Ganha destaque também a presença de mais um homólogo de eIF4G, o EIF4G1, que se encontra muito mais enriquecido que o EIF4G4, presente em todas as amostras avaliadas (Anexo III). É interessante notar que algumas proteínas identificadas interagindo exclusivamente com este mutante sugerem uma importância destas proteínas em processos celulares como tráfego vesicular de compartimentos endossômicos, como clatrina (cadeia leve

(LINF_190005900) e cadeia pesada (LINF_360022600), complexo adaptador da subunidade gama – AP1 (LINF_340047500), entre outras.

6.2 Proteínas associadas ao homólogo EIF4G4 selvagem de *L. infantum*

Os resultados referentes a espectrometria de massas do EIF4G4 selvagem e seus mutantes foram representados no quadro 6, mostrando de forma resumida as proteínas que interagiram com cada construção e enriquecidas quanto ao controle negativo utilizado na imunoprecipitação.

Quadro 6. Análise comparativa das proteínas identificadas por espectrometria de massa que coprecipitam com o EIF4G4 selvagem e seus mutantes em *Leishmania infantum*

ID e Descrição da proteína	Localização	Proteínas em comum LOG2 >1		
		EIF4G4 _{WT}	EIF4G4 _{FSL}	EIF4G4 _{LNK}
LINF_360070500 - EIF4G4	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_280032200 - EIF4E3	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_350055900 - PABP1	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_010012900 - EIF4A1	Citoplasma (irregular)	1,6	2,3	2,0
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NA TRADUÇÃO				
LINF_150005500 - EIF4G1	Citoplasma (pontos, forte)	+∞	+∞	+∞
LINF_160022100 - EIF4G3	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_080010700 - EIF2-beta	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_030014900 - EIF2- alfa	Citoplasma (75%, irregular)	1,7	0,6	0,8
LINF_360007100 - EF2	Citoplasma (irregular)	1,5	0,8	0,8
LINF_330036700 - EIF5B	Citoplasma	1,1	_____	_____
LINF_350047100 - PABP2	Grânulos de RNA	1,5	1,2	1,1
LINF_250005800 - PABP3	Grânulos de RNA	5,1	4,7	4,4
LINF_070012000 - EIF3H	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_320028100 - EIF3K	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_340033000 - EIF3G	Citoplasma (irregular)	+∞	+∞	+∞
LINF_300036000 - EIF3D	Não há dados	6,2	5,9	_____
LINF_280029900 - EIF3E	Citoplasma (irregular)	6,0	5,6	4,8
LINF_360047700 - EIF3I	Citoplasma (irregular)	5,5	5,2	4,4
LINF_170005000 - EIF3A	Não há dados	5,4	4,9	3,6
LINF_170020200 - EIF3B	Citoplasma	4,6	4,1	2,9
LINF_360007700 - EIF3L	Citoplasma (25%)	4,2	3,8	3,2
LINF_360081900 - EIF3C	Citoplasma (irregular)	3,9	3,6	2,4
PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS				
LINF_070010600 - 60S L7a	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_340044000 - 60S L21	Citoplasma (irregular)	+∞	+∞	+∞
LINF_360046300 - 60S L34	Citoplasma (irregular)	+∞	+∞	+∞

LINF_220005300 - 60S L11 (L5 - L16)	Citoplasma (irregular)	+∞	+∞	+∞
LINF_210027000 - 60S L32	Citoplasma; nucléolo	+∞	+∞	+∞
LINF_350007500 - 60S L30	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_040014500 - 60S L10	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_360046500 - 60S	Citoplasma (irregular)	+∞	+∞	+∞
LINF_300043100 - 60S	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_350038300 - 60S L31	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_260027600 - L38	Não há dados	+∞	_____	+∞
LINF_110017500 - 60S L28	Citoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_280015900 - S20	Não há dados	+∞	+∞	_____
LINF_300037600 - S26	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_330042500 - 60S L44	Não há dados	+∞	_____	_____
LINF_350023900 - 60S L5	Citoplasma (irregular); nucléolo	+∞	5,1	4,9
LINF_130010600 - 40S S12	Citoplasma (irregular); nucléolo	2,8	2,9	3,0
LINF_210024100 - 40S S11	Citoplasma	2,6	2,4	2,3
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA				
LINF_040016900 - DRBD3	Citoplasma (pontos, 50%); nucleoplasma (50%)	+∞	_____	_____
LINF_180007200 - RBP29	Nucleoplasma	+∞	+∞	+∞
LINF_320013000 - NRBD	Citoplasma (irregular, <10%)	4,0	4,2	3,9
LINF_270019700 - ZC3H41	Citoplasma (irregular)	3,0	2,6	2,3
RNA HELICASES				
LINF_280021300 - EIF4AIII	Lúmen nuclear	+∞	_____	_____
LINF_070008800 - DBP2B	Nucléolo (forte)	4,6	4,2	4,3
LINF_320009100 - HEL67	Citoplasma (fraco)	1,8	1,2	1,2
OUTRAS PROTEÍNAS				
LINF_100018900 - RabX1	Não há dados	+∞	+∞	+∞
LINF_110008400 - 14-3-3 2	Bolsa flagelar; citoplasma (pontos)	+∞	+∞	+∞
LINF_110010500	Não há dados	+∞	+∞	_____
LINF_340041200 - CPSF3	Citoplasma (pontos fracos)	+∞	+∞	+∞

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: As proteínas que compõem a tabela são as que interagem com o homólogo EIF4G4 selvagem e estão divididas de acordo com seu tipo. O símbolo +∞ representa o limite da variável tendendo ao infinito e o _____ indica a ausência da proteína naquela construção.

Os resultados obtidos confirmam que o EIF4G4 interage com a proteína EIF4E3, descrito anteriormente como seu parceiro funcional, além do EIF4A1, formando um segundo complexo EIF4F. A PABP1 também foi identificada interagindo com o EIF4G4 selvagem, com um valor de enriquecimento consideravelmente alto quando comparado ao controle negativo. Destaca-se a presença de outros fatores envolvidos na formação do complexo de pré-iniciação da tradução, como as subunidades do complexo trimérico EIF2, o EIF2-alpha

(LINF_030014900) e o EIF2-beta (LINF_080010700), dez subunidades do complexo EIF3, bem como o EIF5B (LINF_330036700). É importante ressaltar a presença de outros homólogos eIF4G, como o EIF4G1 (LINF_150005500) e EIF4G3 (LINF_160022100), e das PABPs 2 (LINF_350047100) e 3 (LINF_250005800). Todas as proteínas que foram imunoprecipitadas com o EIF4G4 sugerem que o mesmo tem função na tradução, entretanto não estão descartadas outras funções para esta proteína na célula.

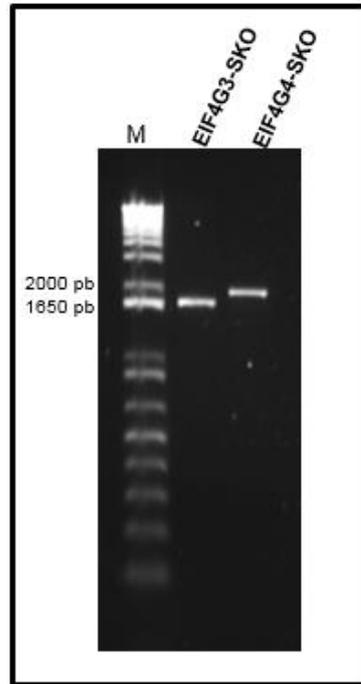
Das proteínas que foram identificadas na imunoprecipitação do EIF4G4 e merecerem destaque, estão diferentes proteínas ribossomais e RNAs helicases. Outras proteínas identificadas na imunoprecipitação são a 14-3-3-2 (LINF_110008400), o mRNA cap guanina-N7 metiltransferase e o fator específico de clivagem e poliadenilação, estas últimas também foram encontradas interagindo com o EIF4G3 e suas versões mutadas com alto valor de enriquecimento.

Os dados de espectrometria de massas dos mutantes de interação do EIF4G4 aos parceiros EIF4E3 (EIF4G4_{FSL}) e EIF4A1 (EIF4G4_{LNK}) demonstraram que as regiões modificadas não foram suficientes para abolir a interação com as subunidades parceiras do EIF4F, uma vez que, as proteínas identificadas no imunoprecipitado foram muito semelhantes ao controle EIF4G4_{WT}.

6.3 Análise fenotípica após deleção gênica dos homólogos EIF4G de *Leishmania infantum*

Para dar início esta etapa, plasmídeos contendo os cassetes para deleção gênica do EIF4G3 e EIF4G4 no pGEMT- *Easy*, disponíveis no laboratório, foram utilizados para obtenção de maiores quantidades através de minipreparações de DNA plasmidial. Em seguida foram realizadas digestões enzimáticas para liberação total do cassete de deleção do vetor de clonagem pGEMT-*Easy* e assim foram gerados fragmentos de 1655 pb (EIF4G3) e 1724pb (EIF4G4) e analisados através de separação eletroforética em gel de agarose 1% (Figura 16).

Figura 16. Gel de agarose 1% mostrando os cassetes de deleção gênica purificado utilizados no *single knockout*



Fonte: imagem produzida pela autora

Nota: após digestão enzimática para liberação dos cassetes gênicos do vetor pGEMT-Easy, os mesmos foram purificados usando o illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits, de acordo com as instruções do fabricante.

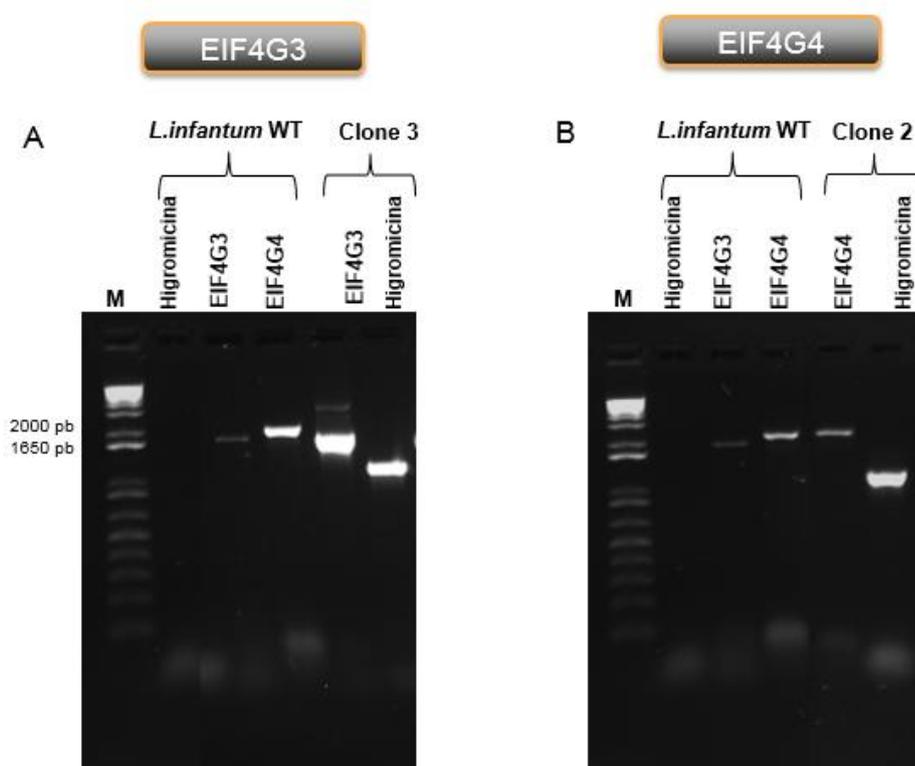
Os fragmentos lineares, referentes aos cassetes de deleção, foram utilizados para transfecção das células promastigotas de *Leishmania infantum*, os clones foram submetidos à confirmação da deleção de uma cópia gênica (*single knockout* – SKO) por meio de PCRs utilizando oligonucleotídeos específicos onde os *primers forward* anelaram na região intergênica dos EIF4Gs, sendo esta uma região externa ao fragmento usado para a integração, e o *primers reverse* anelaram na região 3' que codifica o gene da higromicina (Figura 17).

Figura 17. Esquema representativo de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados para confirmação do *single knockout* - SKO



O resultado demonstra que os clones apresentam o gene de resistência integrado no locus adequado e permaneceram com outro alelo, como representado na figura 18, permitindo assim as próximas etapas do ensaio de deleção. Para o gene da higromicina no EIF4G3 foi gerado um fragmento com 1222pb e para o EIF4G4 com 1164pb. E para os genes endógenos, foram gerados fragmentos de 1908pb para o EIF4G3 e 2277pb para o EIF4G4.

Figura 18. Gel de agarose a 1% confirmando o *single knockout* nos homólogos EIF4G de *Leishmania infantum*

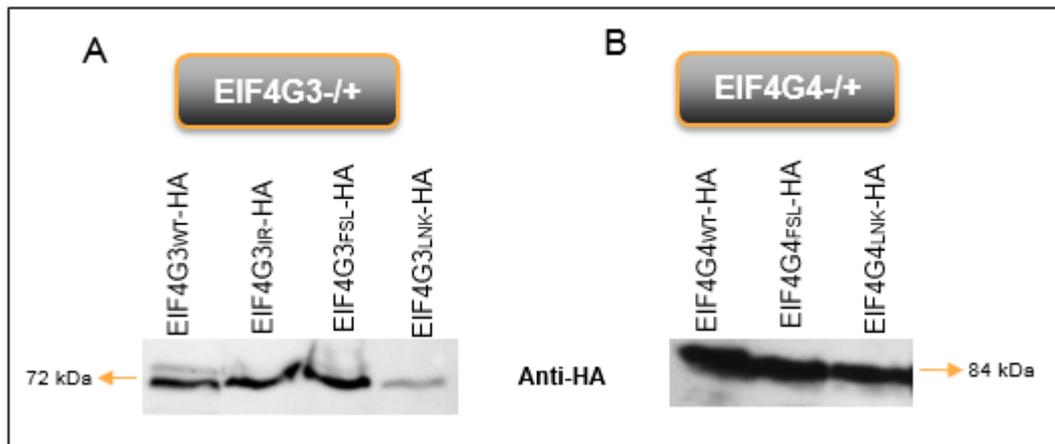


Fonte: elaborada pela autora

Nota: a imagem mostra a confirmação do nocaute gênico (*single knockout* - SKO) nos homólogos EIF4G3 e EIF4G4, utilizando oligonucleotídeos específicos. **A)** apresentando os tamanhos esperados para EIF4G3 **B)** apresentando os tamanhos esperados para EIF4G4 de acordo com o marcador de peso molecular.

Os clones de cada linhagem após confirmação do SKO foram utilizados para o ensaio de complementação utilizando cópias episomais dos genes alvo selvagens e mutantes no plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa, como demonstrado na figura 19.

Figura 19. Ensaio de complementação do EIF4G3 e EIF4G4 possuindo apenas um alelo gênico

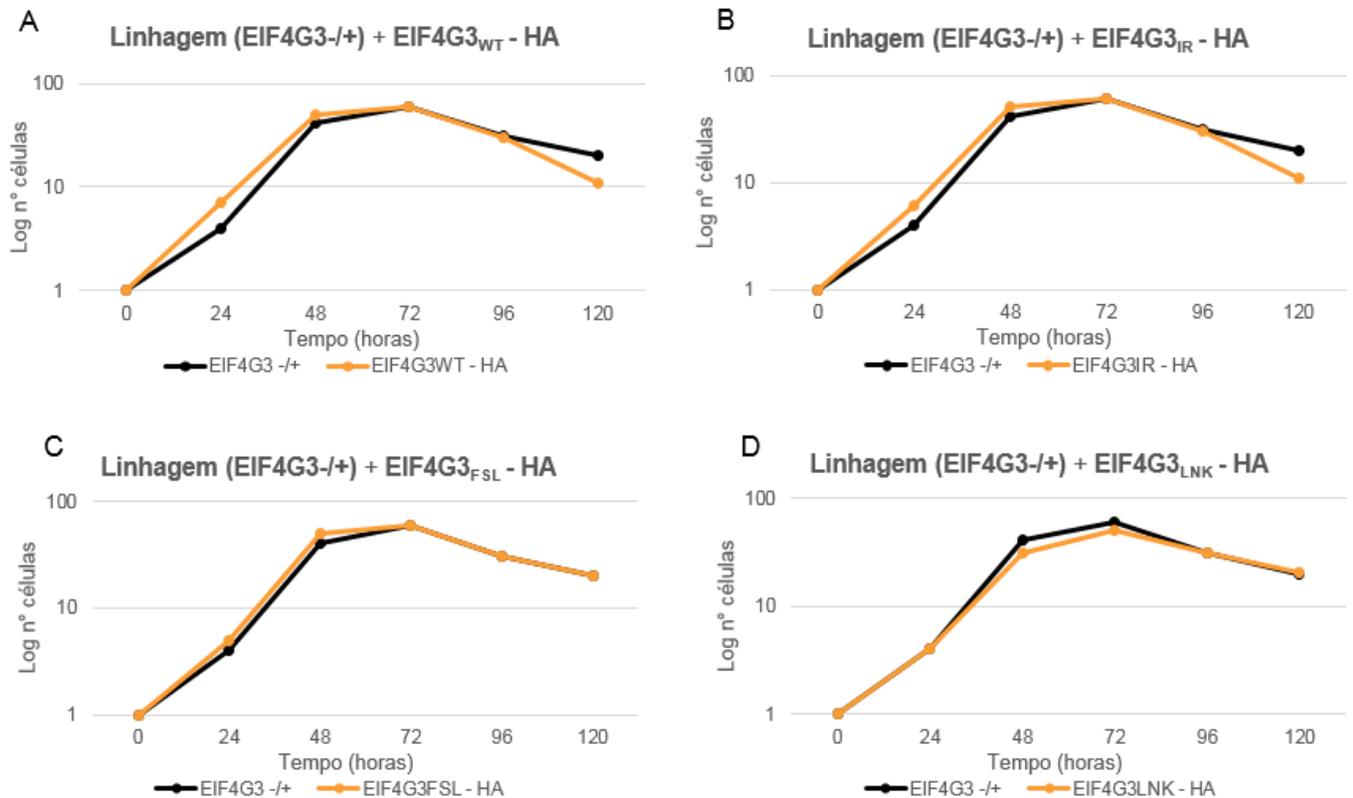


Fonte: elaborada pela autora, 2019.

Nota: Confirmação da expressão das proteínas obtidas após a transfecção em células de *L. infantum*, com uma única cópia endógena do gene EIF4G3 (A) e EIF4G4 (B), ou seja, *Single Knockout* (SKO) com os mesmos construtos gênicos utilizados nas transfecções da linhagem selvagem. As proteínas expressas apresentaram o tamanho de aproximadamente 72kDa e 84kDa

Posteriormente, as linhagens com uma cópia do EIF4G3 deletada e complementada com as construções do gene selvagem e mutantes foram submetidas a curva de crescimento para avaliar o impacto da deleção gênica nos seus níveis de proliferação (Figura 20).

Figura 20. Análise dos níveis de crescimento das linhagens com apenas uma cópia endógena do EIF4G3 complementada com construções contendo o gene selvagem e mutantes com *tag* HA



Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: Os gráficos representam as taxas de proliferação celular das linhagens submetidas ao nocaute simples, complementadas com cópias episomais fusionadas ao epítopo HA. EIF4G3^{WT}-HA (A), EIF4G3^{IR}-HA (B), EIF4G3^{FSL}-HA (C) e EIF4G3^{LNK}-HA (D) comparada a linhagem EIF4G3^{-/+} de *L. infantum*.

As linhagens submetidas ao nocaute simples, expressando o EIF4G3^{WT}-HA e aquelas que foram complementadas com os mutantes de ligação ao EIF4E3 (EIF4G3^{IR}-HA e EIF4G3^{FSL}-HA) não apresentaram diferenças nos seus níveis de crescimento quando comparado com a linhagem sem uma das cópias endógenas do gene e sem complementação (-/+), utilizada como controle. A linhagem complementada com o construto que possui mutação no motivo de interação ao EIF4A1 manteve seus níveis de crescimento similar ao controle, podendo ser identificado uma leve diminuição durante a fase exponencial de crescimento, porém nada significativo.

7. DISCUSSÃO

A síntese de proteínas é um evento crítico para todos os seres vivos, sendo a iniciação da tradução considerada a mais complexa e sujeita a mecanismos de controle, com a atuação fundamental dos chamados fatores de iniciação eucarióticos (eIFs – *Eukariotic Initiation Factors*). Nos eucariotos superiores, para que seja dado início ao processo de tradução, o fator eIF4G, como subunidade do complexo eIF4F (formando ainda pelas subunidades eIF4A e eIF4E), recruta o eIF3, que está associado à subunidade ribossômica 40S e outros fatores que formam o complexo de pré-iniciação (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Em tripanosomatídeos foram descritos dois complexos EIF4F relacionados à tradução, formados pelo EIF4G3 e EIF4G4, cujas interações foram melhor investigadas neste trabalho.

Os resultados descritos em outros trabalhos apontam que diferentes subunidades do complexo eIF4F possam ser reguladas ativamente por modificações pós-traducionais. Neste trabalho o EIF4G3 foi expresso sob a forma de duas bandas ao longo de toda a curva de crescimento, diferentemente de resultados descritos para outras espécies de tripanosomatídeos, como *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma brucei*, onde esta proteína foi expressa numa única isoforma (PEREIRA *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2015; BENZ; URBANIAK, 2019). Já a proteína EIF4G4 apresentou um perfil diferenciado, com uma isoforma de alto peso molecular mais alto sendo expressa apenas na fase tardia da curva de *L. infantum*, resultado contrastante com outras espécies que apresentaram apenas uma isoforma do EIF4G4 durante a curva de crescimento (PEREIRA *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2015). Análises de fosfoproteômica em *T. brucei* identificaram diferentes sítios alvos de fosforilação no EIF4G4 (BENZ; URBANIAK, 2019) que também são encontrados no ortólogo de *L. infantum* e precisam ser melhor investigados.

Estudos anteriores sugerem que o EIF4G3 seria o eIF4G canônico de tripanosomatídeos, mesmo com estes protozoários apresentando cinco diferentes homólogos (MOURA *et al.*, 2015). Esta proteína faz interações com homólogos das demais subunidades do complexo eIF4F, EIF4E4 e EIF4A1, interage com o complexo EIF3 e com várias outras proteínas envolvidas com a iniciação da tradução geral nestes protozoários. Os sítios de interação com as demais subunidades foram devidamente mapeados, sendo dois motivos distintos para

ligação ao eIF4E (resíduos conservados IR e FSL na região N-terminal) e eIF4A (resíduos LNK no domínio MIF4G) (YOFFE *et al.*, 2009; MOURA *et al.*, 2015)

As linhagens que expressavam proteínas contendo mutações em sítios que afetam a ligação com o EIF4E4, (EIF4G3_{IR} e EIF4G3_{FSL}) mostraram um perfil de expressão representado por duas bandas, de forma similar ao EIF4G3 selvagem. Porém, o mutante de ligação ao EIF4A1 (EIF4G3_{LNK}) apresentou apenas uma isoforma e com expressão reduzida frente as demais linhagens. Uma leve redução em relação a taxa de proliferação celular referente a este último mutante foi observada. O resultado do EIF4G3_{LNK} contrasta com um resultado obtido em *T. brucei*, onde a mesma mutação nos resíduos LNK na proteína ortóloga levou a uma maior diminuição da taxa de crescimento celular, compatível com um efeito dominante negativo (MOURA *et al.*, 2015).

A partir dos dados obtidos com a imunoprecipitação do EIF4G3 selvagem de *L. infantum*, foi possível confirmar a interação com as diferentes subunidades do complexo EIF4F já descritas. A presença de diversas proteínas ribossomais, assim como fatores de tradução envolvidos na formação do pré-complexo como o EIF5 e EIF3, reforçam a ação deste homólogo no processo de tradução desses protozoários. O eIF4G humano possui dois locais de ligação distintos para o eIF3, um dos quais interage com as subunidades eIF3c e eIF3d, enquanto o outro se liga ao eIF3e (VILLA; HERSHEY; FRASER, 2013; ASANO *et al.*, 2001). Em mamíferos o complexo eIF3 é formado por 13 subunidades que são nomeadas de a-m, porém as subunidades essenciais (eIF3a, eIF3b, eIF3c, eIF3g e eIF3i) que compõem o complexo em *S. cerevisiae*, definiram o complexo principal presente em todos os eucariotos investigados. Em *T. brucei* e *L. major* foi confirmado experimentalmente que o complexo eIF3 é composto por 11 subunidades (LI *et al.*, 2016) e em *Leishmania spp* foram identificadas por análises de bioinformática e experimentalmente 12 subunidades (REZENDE *et al.* 2014; MELEPPATTU *et al.*, 2015). Das subunidades do eIF3 identificadas nas imunoprecipitações da proteína EIF4G3 obtidas neste trabalho, merecem destaque o eIF3a e o eIF3c que possuem um domínio PCI que interage entre si em eucariotos formando um dímero central na formação do complexo eIF3 ao mediar as interações protéicas PCI-PCI (PICK; HOFMANN; GLICKMAN, 2009).

Em outros eucariotos, por meio de estudos de interação *in vitro*, foi proposto que a ligação eIF5-eIF4G poderia substituir funcionalmente a interação eIF3-eIF4G para promover o recrutamento de mRNA (ASANO *et al.*, 2001). Outro trabalho demonstrou que para uma interação eficiente do eIF4G com o eIF5 é preciso que o domínio HEAT esteja intacto, assim como uma sequência rica em arginina e serina localizado no N-terminal do domínio HEAT (HE *et al.*, 2003).

Neste trabalho, investigando o efeito das mutações selecionadas sobre as interações do EIF4G3, os mutantes EIF4G3_{IR} e o EIF4G3_{FSL} não ligaram a proteína EIF4E4, como era esperado, e foi visto também que estes mutantes também deixaram de interagir com a PABP1. Estudos anteriores identificaram uma interação direta entre PABP1 e EIF4E4, isto poderia justificar a ausência da PABP1 nos mutantes do EIF4G3 para ligação ao EIF4E4. Entretanto, nossas análises identificaram na imunoprecipitação do EIF4G3 a proteína PABP3 que não tinha sido identificada como produto de coprecipitação em trabalhos anteriores (DA COSTA LIMA, 2010). Para os dois mutantes acima citados destaca-se a presença de outras subunidades envolvidas na formação do segundo complexo EIF4F, o EIF4G4 e EIF4E3, cuja associação ao EIF4G3 precisa ser melhor averiguada. O mutante EIF4G3_{FSL} sofre uma redução significativa nas interações com proteínas ribossomais e uma hipótese para isso seria a desestruturação conformacional da proteína, o que pode não ocorrer para o mutante EIF4G3_{IR}.

Em se tratando do EIF4G3_{LNK}, foi visto uma redução significativa na interação com proteínas ribossomais e demais fatores de tradução como o EIF5, ERF3. Além disso, o efeito da mutação no motivo de ligação ao EIF4A1 impede totalmente a interação do EIF4G3 com qualquer subunidade do eIF3. Estudos anteriores, utilizando o eIF4G humano mutado no domínio central, sugerem que eIF4A e eIF3 podem se ligar de forma cooperativa ao eIF4G, uma vez que uma quantidade maior de eIF3 pode ser imunoprecipitada com eIF4G na presença de eIF4A usando componentes purificados. No entanto, esse cooperativismo ocorre através de uma mudança conformacional do eIF4G provocada pelo eIF4A e não pela ligação direta do eIF3 ao EIF4A (KORNEEVA *et al.*, 2000).

Dentre as proteínas com alto valor de enriquecimento encontradas no complexo do EIF4G3 selvagem e suas versões mutadas, destacamos a proteína

contendo o domínio GRIP. Em diferentes eucariotos, o domínio GRIP foi caracterizado como uma sequência conservada de 42 aminoácidos localizado na região C-terminal, com estrutura estendida de bobina espiralada que atuam como fixadores moleculares no acoplamento de vesículas transportadoras (BROWN *et al.*, 2001; MCCONVILLE *et al.*, 2002). O transporte entre os diversos compartimentos celulares é mediado por famílias de proteínas de membrana, em sua maioria periféricas, que regulam de modo temporal e espacial a seleção da carga e o brotamento da vesícula e por sua vez a fusão destas com a membrana alvo (MCCONVILLE *et al.*, 2002). Além da proteína contendo o domínio GRIP, foi possível identificar de forma exclusiva no mutante EIF4G3_{LNK} um grupo de proteínas como a proteína Rab4 e Rab14 relacionadas à Ras, a Gim5A, clatrina (cadeia leve e pesada) e dentre elas, o complexo adaptador AP-1, que está envolvido na formação de vesículas revestidas com clatrina. Estudos indicam que o AP-1 desempenha papéis importantes no tráfego endossômico em tripanosomatídeos e sua essencialidade foi comprovada pelo seu silenciamento em *T. brucei* e, além disso, o AP-1 é necessário para infectividade em *Leishmania* (ALLEN *et al.*, 2007; TAZEY *et al.*, 2009).

Os dados referentes a imunoprecipitação do EIF4G4 selvagem de *L. infantum* mostram claramente sua interação com o parceiro EIF4E3, como já havia sido descrito através de estudos *in vitro* e *in vivo* em diferentes espécies de tripanosomatídeos (FREIRE *et al.*, 2011; ZINOVIEVI; SHAPIRA, 2012). A mutação do motivo FSL do EIF4G4 não aboliu a interação com a proteína EIF4E3 em *T. brucei* e *L. major*, entretanto, a mutação dos resíduos IL presentes na região N-terminal foi capaz de interromper essa interação (MOURA *et al.*, 2015). Os resultados *in vivo* do mutante EIF4G4_{FSL} estudado neste trabalho corrobora com o descrito acima, no qual demonstramos a presença do EIF4E3 dentre as proteínas com alto valor de enriquecimento, e já foi iniciado ainda neste trabalho a obtenção da construção contendo mutação dos resíduos IL de *L. infantum* visando complementarmos as análises do EIF4G4.

Além do EIF4E3, foi demonstrada a ligação do homólogo EIF4G4 com o EIF4A1. Em estudos anteriores essa interação foi avaliada por meio de ensaios *in vitro* de interação protéica do tipo *pull-down* utilizando a proteína completa que

contém os domínios MIF4G e MA3, no qual houve uma ligação específica do EIF4G4 ao EIF4A1, porém quando testada uma proteína truncada contendo apenas o domínio MIF4G, foi visto uma redução nesta interação (MOURA *et al.*, 2015). Os dados de espectrometria de massas obtidos neste trabalho sobre o mutante EIF4G4_{LNK}, que avalia a interação do EIF4G4 com o EIF4A, demonstra que a modificação nesses resíduos não interfere no padrão de ligação destas subunidades, uma vez que, o EIF4A1 aparece com alto valor de enriquecimento quando comparado ao controle e até mesmo ao EIF4G4_{WT}. Sendo assim, levanta-se a hipótese de que o domínio de ligação ao EIF4A está presente nos domínios MIF4G e no C-terminal do EIF4G4 e dessa forma uma mutação apenas no motivo MIF4G não seria suficiente para bloquear a interação entre EIF4G4/EIF4A1 em *Leishmania spp.*

Foi observado também, que o EIF4G4 se liga a fatores envolvidos na formação do pré-complexo de iniciação da tradução como o EIF5B, as subunidades dos complexos EIF2 e EIF3, além de diferentes proteínas ribossomais, confirmando, portanto, um papel potencial na tradução. Estudos de espectrometria de massas, utilizando células de *L. amazonensis* expressando o EIF4E3 e EIF4G4, mostraram que a subunidade EIF2-alfa e sete subunidades do EIF3 (a, c, d, e, i, k e l) foram identificadas interagindo de forma específica com a proteína EIF4E3 (ZINOVIIIEVI; SHAPIRA, 2012), o que contrasta com os resultados obtidos neste trabalho. Além disso, no mesmo estudo referenciado acima, foi vista a interação apenas da PABP2 com EIF4G4, o que contrasta com nossos resultados, uma vez que, mesmo que a PABP2 e 3 tenham sido identificadas interagindo com o EIF4G, a PABP1 apresentou um alto valor de enriquecimento comparando as demais PABPs e ao controle negativo.

A proteína 14-3-3 II foi identificada entre uma variedade de proteínas que coprecipitaram com o EIF4G4 selvagem de *L. infantum*. As proteínas 14-3-3 se ligam especificamente à fosfoserinas e fosfotreoninas, interagindo com uma variedade de fatores de sinalização funcionalmente diferentes regulando as interações protéicas (OBSILOVA *et al.*, 2014; FU; SUBRAMANIAN; MASTERS., 2000). Em *T. brucei*, foi relatada a presença da 14-3-3-II interagindo com o EIF4G1, EIF4E5 e EIF4G1-IP2, formando um subcomplexo que parece não estar envolvido diretamente no processo de tradução (FREIRE *et al.*, 2017). Porém os fatores EIF4E5 e EIF4G1-IP2 não foram

identificados interagindo com o EIF4G4, demonstrando que a presença desta proteína se dá devido a sua interação com o EIF4G1, ambas aparecendo com alto valor de enriquecimento dentre as proteínas identificadas no imunoprecipitado.

Os dados referentes aos ensaios de *single knockout* mostram que as células de *L. infantum* com apenas uma cópia dos genes EIF4G3 e EIF4G4 não apresentam alterações morfológicas ou no seu padrão de expressão. Este padrão também não foi alterado após complementação com cópias epissomais dos genes selvagens e mutantes fusionados ao *tag* HA. Porém, em estudo anterior, o efeito do silenciamento do EIF4G3 e EIF4G4 por interferência de RNA foi analisado em células procíclicas de *T. brucei* e foi observado que logo após a indução do RNAi a proliferação celular do EIF4G3 cessou, apresentando morte celular e diminuição drástica nos níveis de expressão da proteína em 24 horas. Para o EIF4G4 o crescimento tornou-se lento após 48 horas e a morte celular só foi identificada após 120 horas da indução, entretanto alterações morfológicas importantes foram descritas como células arredondadas e múltiplos flagelos. Estes resultados comprovam a essencialidade dos genes em estudos para esses parasitas (MOURA *et al.*, 2015). Diante disto, temos como perspectivas, submeter todas as linhagens restantes ao duplo nocaute (*double knockout*) com o intuito de avaliar a essencialidade dos genes e sua viabilidade celular.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o EIF4G3 e EIF4G4 promovem interações protéicas relevantes que ajudam a definir de forma mais clara a formação de um complexo de iniciação, além de outras funções metabólicas essenciais para o parasita em estudo. De forma inédita, foram avaliadas a superexpressão das proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens e mutantes em *Leishmania infantum* e os diferentes complexos formados. O conhecimento dessas interações protéicas pode viabilizar a identificação de alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos e moléculas inibidoras capazes de inibir especificamente a síntese protéica destes protozoários.

8. CONCLUSÕES

1. As proteínas EIF4G3 e EIF4G4 selvagens e mutantes não apresentam mudanças em seu perfil de crescimento celular em comparação com o controle.
2. As linhagens transgênicas, expressando o EIF4G3 e EIF4G4 selvagens e mutantes apresentam isoformas compatíveis com fosforilação, sugerindo que estes fatores possam ser regulados durante a curva de crescimento por modificações pós-traducionais.
3. O mutante EIF4G3_{LNK} é expresso em menor quantidade comparado aos demais mutantes, sugerindo sua instabilidade e possível processamento proteolítico.
4. Os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 selvagens têm capacidade de realizar interações com seus parceiros funcionais do EIF4F, assim como com outros fatores de tradução e proteínas ribossomais, evidenciando o papel destas proteínas no processo de síntese proteica.
5. Através de ensaios *in vivo* foi possível confirmar que os mutantes do EIF4G3 IR/FSL e LNK não se ligam a seus respectivos parceiros funcionais o EIF4E4 e EIF4A1.
6. Os ensaios de interação *in vivo*, confirmam que os mutantes do EIF4G4 FSL e LNK interagem com os parceiros EIF4E3 e EIF4A1.
7. As linhagens de *L. infantum* submetidas ao *single knockout* dos genes EIF4G3 e EIF4G4 complementados com os genes selvagens e mutantes não apresentam alterações no perfil de crescimento e morfologia celular.

REFERÊNCIAS

- ACKER, M.G; LORSCH, J.R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 36, n. 4, p. 653–657, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BST0360653>.
- AKHOUNDI, M., *et al.* A historical overview of the classification, evolution and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349> e0004349.
- ALI, M.U., *et al.* Eukaryotic translation initiation factors and cancer. **Tumor Biology**, Tokyo, v. 39, n. 6, p. 1-19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1010428317709805>.
- ALLEN, C. L. *et al.* Dileucine signal-dependent and AP-1-independent targeting of a lysosomal glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.156, n. 2, p. 175-190, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.020>.
- ASANO, K. *et al.* Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 2326–2337, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2326>.
- BANGS, J.D. *et al.* Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, p. 9805-15, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)50165-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)50165-X).
- 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**, London, v. 28, n. 5, p. 1211-20, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.5.1211>.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomines sand flies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>.
- BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. **Current Molecular Medicine**, Hilversum, v. 4, n. 6. P. 601-9. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1566524043360285>.
- BELLSOLELL, L. *et al.* Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. **Structure**, London, v. 14, n. 5, p. 913– 23, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.03.012>.
- BENGS, F., *et al.* LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in Leishmania mexicana. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 5, p. 1606-15, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04498.x>.

BENZ, C.; URBANIAK, M. D. Organising the cell cycle in the absence of transcriptional control: Dynamic phosphorylation co-ordinates the *Trypanosoma brucei* cell cycle post-transcriptionally. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 15, n. 12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008129>.

BROWN, D. L. *et al.* The GRIP domain is a specific targeting sequence for a population of trans-Golgi network derived tubulo-vesicular carriers. **Traffic**, Copenhagen, v. 2, n. 5, p. 336-344, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.002005336.x>.

BROWNING, K. S.; BAILEY-SERRES, J. Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. **The Arabidopsis book**, Rockville, v. 13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1199/tab.0176>.

CLAYTON, C. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 32, p. 46–51, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.018>.

CLAYTON, C.E (2014) Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.195, p. 96–106. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.005>.

CNUUDE, F. *et al.* Diffuse cutaneous leishmaniasis with visceral dissemination in an AIDS patient in Guadeloupe, West Indies. **AIDS**, London, v. 8, p. 559–60, 1994.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVEZ, C.R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. ISBN: 978-85-7541-439-2.

COSTAL, D.N.C.C. *et al.* Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 52, n. 92, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/S1518-8787.2018052000381>.

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, v. 9, p.1484 – 1494, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00148-10>.

DE AQUINO, I.R.P.U.C. **Caracterização preliminar de homólogos de fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 e de possíveis parceiros da proteína de ligação ao poli-A (PABP) em *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife (BR), 2018.

DE CASTRO, J. M. *et al.* Conhecimento, Percepções de Indivíduos em Relação à Leishmaniose Visceral Humana Como Novas Ferramentas de Controle. **Ciências Biológicas e Agrárias em Saúde**, v. 20, n. 2, p. 93-103, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2016v20n2p93-103>.

DE MELO NASCIMENTO, Larissa. **Complexo eIF2 em *Leishmania* sp.: expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de novo fator**

de iniciação da tradução. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife (BR), 2016.

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**, Georgetown, v. 12, p. 1209–1221, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1086865>.

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, p. 435-475, 2016.

DE MELO NETO, O.P. *et al.* Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. **RNA Biology**, Georgetown, v. 15, n. 6, p. 739-755, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1445958>.

DEAN, S. *et al.* A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. **Open Biology**, London, v. 5, p. 140 -197, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsob.140197>.

DHALIA, R. *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Research**, London, v. 34, n. 9, p. 2495–2507, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl290>.

DHALIA, R. *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: characterization of multiple eIF4F subunit homologues. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 23-41, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.12.001>.

DNDi - *Drugs for Neglected Diseases initiative*. **Responding to Neglected Patients' Needs Through Innovation**. Annual Report, 2017.

EL-SAYED, N. M. *et al.* Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science**. New York, v. 309, n. 5733. p. 404-409, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1112181>.

FAHRION, A. *et al.* Surveillance of leishmaniasis in the WHO European Region. **Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique**, Paris, v. 66, n. 5, p. S394, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.respe.2018.05.429>.

FISCHER, P. M. Cap in hand: targeting eIF4E. **Cell cycle**, Georgetown, v. 8, n. 16, p. 2535-2541, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9301>.

FREIRE, E. *et al.* The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. **Pathogens**, Basel, v. 6, n. 4, p. 55, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens6040055>.

FREIRE, E. R *et al.* eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, New York, v. 20, n. 8, p.1272-86, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1261/rna.045534.114>.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.011>.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annual review of pharmacology and toxicology**, Palo Alto, v. 40, n. 1, p. 617-647, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617>.

GARG, R. *et al.* Leishmania infantum amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 5, p. e441. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000441>.

GHEDIN, E. *et al.* Gene Synteny and Evolution of Genome Architecture in Trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 134, n. 2, p. 183-190, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.11.012>.

GROSS, J. D. *et al.* Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. **Cell**, Cambridge, v. 115, n. 6, p. 739-50, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00975-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00975-9).

GRUNER, S. *et al.* The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. **Molecular cell**, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 467-479, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.020>.

GÜNZL, A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00113-10>.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current opinion in microbiology**, London, v. 10, n. 6, p. 569-577, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.10.001>.

HE, H. *et al.* The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 23, n. 15, p. 5431-45, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.23.15.5431-5445.2003>.

HERNANDEZ, G. *et al.* On the diversification of the translation apparatus across eukariotes. **Comparative and functional genomics**, Mexico, 2012: 256848, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/256848>.

HERNANDEZ, G.; VAZQUEZ-PIANZOLA, P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. **Mechanisms of development**, Shannon, v. 122, n. 7-8, p. 865-76, jul. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.04.002>.

HERSHEY, P.E. *et al.* The Cap-binding protein eIF4E promotes folding of a functional domain of yeast translation initiation factor eIF4G1. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 30, p. 21297–21304, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.30.21297>.

HINNEBUSCH, A.G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. **The Annual Review of Biochemistry**. Palo Alto, v. 83, p. 779-812, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035802>.

ISMAIL, A., *et al.* The pathogenesis of post kala-azar dermal leishmaniasis from the field to the molecule: does ultraviolet light (UVB) radiation play a role? **Medical Hypotheses**, New York, vol. 66, n. 5, p. 993–999, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.03.035>.

JACKSON, A.P. Genome evolution in trypanosomatid parasites. **Parasitology**, London, v. 1, p. S40-56, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182014000894>.

JÄGER, A.V.; MUIÁ, R.P.; CAMPETELLA, O. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. **FEMS Microbiol Lett.** Argentina, v. 283, n. 2, p. 182-8. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01170.x>

JENSEN, O.N. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current opinion in chemical biology**, London, v. 8, n. 1, p. 33-41, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.12.009>.

JIVOTOVSKAYA, A. V. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) and eIF2 can promote mRNA binding to 40S subunits independently of eIF4G in yeast. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 26, n. 4, p. 1355-1372, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1355-1372.2006>.

KHALIL, E.A.G. Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: A Paradigm of Paradoxical Immune Reconstitution Syndrome in Non-HIV/AIDS Patients. **Journal of Tropical Medicine**. Cairo, 2013, ID 275253, 7 p. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/275253>.

KOLEV, N. G.; ULLU, E.; TSCHUDI, C. The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 482-489, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cmi.12268>.

KORNEEVA, N. L. *et al.* Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 52, p. 41369-41376, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M007525200>.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2, p. 61-72, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.002>.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends Parasitol Rev**, Cambridge, v. 27 n. 1, p. 23-30, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.011>.

LI, K. *et al.* The eIF3 complex of *Trypanosoma brucei*: composition conservation does not imply the conservation of structural assembly and subunits function. **RNA**, New York, v. 23, n. 3, p. 333-345, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1261/rna.058651.116>.

LIBERMAN, N.; MARASH, L.; KIMCHI, A. The translation initiation factor DAP5 is a regulator of cell survival during mitosis. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 8, p. 204-9, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/cc.8.2.7384>.

LOPES, A. H. *et al.* Trypanosomatids: Odd organisms, devastating diseases. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 30-59, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1874421401004010030>.

LUKEŠ, J. *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.05.007>.

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

MANN, M.; JENSEN O. N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature biotechnology**, Amsterdam, v. 21, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.037>.

MARINTCHEV, A. *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. **Cell**, Cambridge, v. 136, p. 447-460, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.014>.

MARQUES, N. *et al.* Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana na era da terapêutica anti-retrovírica de alta eficácia. **Acta Médica Portuguesa**, Lisboa, v. 20, n. 4, p.291-298, 2007.

MASLOV, D. A. *et al.* Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, London, v. 146, n. 1, p. 1-27, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S00311820180009519>.

McCALL, L.I.; McKERROW, J.H. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 30, p. 342-349, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.001>.

MCCONVILLE, M. J. *et al.* Targeting of the GRIP domain to the trans-Golgi network is conserved from protists to animals. **European journal of cell biology**, Germany, v. 81, n. 9, p. 485-495, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00268>.

MELEPPATTU, S. *et al.* The eIF3 complex of Leishmania—subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. **Nucleic acids research**, London, v. 43, n. 13, p. 6222-6235, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv564>.

MOURA, D.M. *et al.* Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA biology**, Philadelphia, v. 12, n. 3, p. 305-19, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017233>.

NAULA, C., *et al.* Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1754, n. 1-2, p. 151-9, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.018>.

OBSILOVA, V. *et al.* Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. **Physiological research**, Praha, v. 63, n. 1, p. S155-S164, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.33549/physiolres.932659>

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, India, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>.

PAREDES, R. *et al.* Leishmaniasis in HIV infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, India, v. 49, n. 1, p. 39-49, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0022-3859.929>.

PARSYAN, A. *et al.* mRNA helicases: the tacticians of translational control. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v. 12, n. 4, p. 235-45, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm3083>.

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 & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 190 p. 82–86, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2013.06.008>.

PICK, E., HOFMANN, K., GLICKMAN, M.H. PCI complexes: Beyond the proteasome, CSN, and eIF3 Troika. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 35, p. 260–264, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.009>.

POVELONES, M. L. *et al.* Beyond replication: Division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 196, n.1, p. 53-60, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.07.009>.

PRÉVÔT, D.; DARLIX, J.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biology of the Cell**, Cambridge, v. 95, p. 141-156, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0248-4900\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0248-4900(03)00031-5).

REIS, C. R. S. **Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator EIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major***. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

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. **BMC genomics**, London, v. 15, n. 1, p. 1175, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1175>.

ROSENZWEIG, D. *et al.* Post-translational modification of cellular proteins during *Leishmania donovani* differentiation. **Proteomics**, Auckland, v. 8, n. 9, p. 1843-1850, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pmic.200701043>.

SACHDEVA, H. Life Cycle of *Leishmania Donovanii*; causative agent of visceral leishmaniasis: A Review. **JSRSET**, Chandigarh, v. 2, n. 1, 2016. Print ISSN: 2395-1990 | Online ISSN: 2394-4099.

SAHA, S. *et al.* immune responses in kala-azar **The Indian Journal of Medical Research**, New Delh, v. 123, n. 3, p. 245-266, 2006. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1431/>.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, Cambridge, 136:731-45; 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>.

TAZEH, N. N. *et al.* Role of AP-1 in developmentally regulated lysosomal trafficking in *Trypanosoma brucei*. **American Society in Microbiology**, Washington, v. 8. n. 9., 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00156-09>.

TEIXEIRA, M. *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.11.010>.

TORRES-GUERRERO, E., *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000 research**, London, v. 6, p. 750, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>.

TRIPATHI, P., SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to *Leishmania*, paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00311>.

VALÁSEK, L. S. 'Ribozoomin' Translational initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). **Curr. Protein Pept. Sci.**, Hilversum, v. 13, n. 4, p. 305-330, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138920312801619385>.

VILLA, N. *et al.* Human eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) protein binds to eIF3c, -d, and -e to promote mRNA recruitment to the ribosome. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 288, p. 32932–32940, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.517011>.

YOFFE, Y. *et al.* Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 5: p. 1969-1979, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/EC.00230-06>.

YOFFE, Y. *et al.* Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **Nucleic Acids Research**, New York, v. 37, p. 3243-3253, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1261/rna.7520404>.

YOFFE, Y. *et al.* Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E–eIF4G interactions. **Nucleic acids research**, New York, v. 37, n. 10, p. 3243-3253, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp190>.

ZINOVIEV, A. *et al.* A novel 4E interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic acids research**, New York, v. 39, n. 19, p. 8404-8415, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr555>.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comp. Funct. Genomics**, Chichester, v. 2012, p. 813718, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/813718>.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Nutritional stress affects an atypical cap-binding protein in *Leishmania*. **RNA biology**, Georgetown, v. 9, n. 12, p. 1450-1460, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/rna.22709>.

ANEXO I

Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que interagem com o mutante do EIF4G3_{IR}.

EIF4G3_{IR}			
ID	Descrição da proteína	Localização pelo <i>TrypTag</i>	LOG2 >1
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
LINF_160022100	EIF4G3- fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	+∞
LINF_010012900	EIF4A1 - fator de iniciação eucariótico 4a	Citoplasma (irregular)	1,1
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE TRADUÇÃO			
LINF_360081900	EIF3C - Subunidade 8 do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica	Citoplasma (irregular)	+∞
LINF_360007700	EIF3L - Subunidade L do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica	Citoplasma (25%)	+∞
LINF_170005000	EIF3A – Proteína hipotética conservada	Não há dados	3,7
LINF_280029900	EIF3E - fator de iniciação da tradução eucariótica	Citoplasma (irregular)	3,4
LINF_360047700	EIF3I - fator 3 de iniciação da tradução eucariótica subunidade 2	Citoplasma (irregular)	2,7
LINF_170020200	EIF3B - fator de iniciação da tradução	Citoplasma	2,5
LINF_090016000	EF1-gama - Fator de alongamento-1 gama	Citoplasma (<10%)	3,3
LINF_340014200	EF1-beta_ fator de alongamento 1-beta	Citoplasma (forte, <10%)	1,6
LINF_250005800	PABP3_ proteína 3 de ligação a poli (A)	Grânulos de RNA	2,3
LINF_360070500	EIF4G4_ fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	1,9
LINF_280032200	EIF4E3_ fator de iniciação da tradução eucariótica 4E	Citoplasma	1,1
PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS			
LINF_360046400	40S proteína ribossomal S27-1	Citoplasma	+∞
LINF_220005300	60S proteína ribossomal L11 (L5 - L16)	Citoplasma (irregular); nucléolo	3,3
LINF_350010700	60S proteína ribossomal L18a	Citoplasma (irregular); nucléolo	2,7
LINF_330016500	40S proteína ribossomal S3	Citoplasma (pontos)	2,0
LINF_260013800	40S proteína ribossomal S16	Não há dados	1,5
LINF_360060700	40S proteína ribossomal SA	Citoplasma; citoplasma flagelar (fraco)	1,5
LINF_070010600	60S proteína ribossomal L7a	Não há dados	1,5
LINF_320009600	40S proteína ribossomal S2	Citoplasma (irregular)	1,4
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA			
LINF_320013000	NRBD_ Proteína de ligação ao RNA	Citoplasma (irregular, <10%)	2,1
PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS			
LINF_320017200	Proteína hipotética - conservada	Citoplasma; lúmen nuclear	+∞
LINF_230006700	Proteína hipotética - conservada	Citoplasma (pontos, fracos)	+∞
LINF_260012300	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	+∞

LINF_160015300	Proteína hipotética - conservada	Endocítico; citoplasma (pontos)	$+\infty$
LINF_230005800	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	$+\infty$
RNA HELICASES			
LINF_070008800	DBP2B_ DEAD/H RNA helicase dependente de ATP	Nucléolo (forte)	$+\infty$
LINF_350036300	RNA helicase dependente de ATP	Não há dados	2,1
LINF_080005700	DEAD/H RNA helicase dependente de ATP	Não há dados	1,8
OUTRAS PROTEÍNAS			
LINF_150007600	Lisil-tRNA sintetase	Endocítico	$+\infty$
LINF_110005600	Proteína contendo o domínio GRIP	Não há dados	$+\infty$
LINF_360014300	MKK5_ proteína quinase quinase ativada por mitogênio	Não há dados	1,7
LINF_100007100	MPK10_ Proteína quinase ativada por mitogênio 10	Não há dados	1,5

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: As proteínas que compõem a tabela estão divididas de acordo com seu tipo e as destacadas em **negrito** são as que interagiram de forma exclusiva com o EIF4G3_{IR}, a proteína destacada em roxo, trata-se de uma subunidade do complexo eIF3 presente apenas nos mutantes de interação com o EIF4E4. O símbolo $+\infty$ representa o limite da variável tendendo ao infinito.

ANEXO II

Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que interagem com o mutante do EIF4G3_{FSL}.

EIF4G3_{FSL}			
ID	Descrição da proteína	Localização pelo TrypTag	LOG2 >1
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
LINF_160022100	EIF4G3- fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	+∞
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE TRADUÇÃO			
LINF_360081900	EIF3C - Subunidade 8 do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica	Citoplasma (irregular)	+∞
LINF_360007700	EIF3L - fator 3 de iniciação da tradução eucariótica, subunidade L	Citoplasma (25%)	+∞
LINF_280029900	EIF3E - fator de iniciação da tradução eucariótica	Citoplasma (irregular)	2,7
LINF_170020200	EIF3B - fator de iniciação da tradução	Citoplasma	1,4
LINF_340008600	EIF5_ fator de iniciação da tradução eucariótica 5	Citoplasma (irregular)	1,8
LINF_090016000	EF1 gamma - Fator de alongamento-1 gama	Citoplasma (<10%)	2,9
LINF_340014200	EF1-beta_ fator de alongamento 1-beta	Citoplasma (forte, <10%)	1,2
LINF_360007100	EF2-2_ fator de alongamento 2	Citoplasma (irregular)	1,2
LINF_250005800	PABP3_ proteína 3 de ligação a poli (A)	Grânulos de RNA	2,6
LINF_360070500	EIF4G4_ fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	1,5
LINF_280032200	EIF4E3_ fator de iniciação da tradução eucariótica 4E	Citoplasma	1,3
PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS			
40S proteína ribossomal S6			
LINF_350025100		Nucléolo (forte); citoplasma (irregular)	1,9
Proteína ribossomal S7			
LINF_010009300		Citoplasma (irregular); nucléolo (fraco)	1,8
PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO RNA			
LINF_030010000	Motivo de reconhecimento de RNA. (também conhecido como domínio RRM - RBD - ou RNP)	Citoplasma (pontos, fraco, 75%)	+∞
LINF_350037400	RBP35_ Proteína de ligação ao RNA	Citoplasma (50%, pontos); citoplasma flagelar (50%)	2,1
LINF_240017400	RBP38_ Proteína de ligação ao RNA 38	Citoplasma	2,0
LINF_250010200	UPB1_ Proteína de ligação ao RNA	Acidocalcisome	1,5
LINF_250008000	RBP43_ Proteína de ligação ao RNA	Citoplasma; Citoplasma (pontos); nucléolo (50%)	1,5
LINF_350027200	Proteína de ligação ao RNA	Citoplasma (pontos)	1,3
PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS			
LINF_330033600	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	+∞
LINF_340020600	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	+∞
LINF_260012300	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	+∞

LINF_160020100	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	$+\infty$
LINF_190011100	Proteína hipotética - conservada	Não há dados	$+\infty$
LINF_230006700	Proteína hipotética - conservada	Citoplasma (pontos, fraco)	$+\infty$
RNA HELICASES			
LINF_070008800	DBP2B_ DEAD / H RNA helicase dependente de ATP	Nucléolo (forte)	$+\infty$
LINF_080005700	DEAD / H RNA helicase dependente de ATP	Não há dados	1,8
OUTRAS PROTEÍNAS			
LINF_150007600	Lisil-tRNA sintetase	Endocítico	$+\infty$
LINF_110005600	Proteína contendo o domínio GRIP	Não há dados	$+\infty$
LINF_110010500	mRNA cap guanina-N7 metiltransferase	Não há dados	$+\infty$
LINF_340041200	CPSF3_ Fator específico de clivagem e poliadenilação	Citoplasma (pontos, fraco)	1,9

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: As proteínas que compõem a tabela estão divididas de acordo com seu tipo e as destacadas em **negrito** são as que interagiram de forma exclusiva com o EIF4G3_{FSL}, a proteína destacada em roxo, trata-se de uma subunidade do complexo eIF3 presente apenas nos mutante de interação com o EIF4E4. O símbolo $+\infty$ representa o limite da variável tendendo ao infinito.

ANEXO III

Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que interagem com o mutante do EIF4G3_{L_{NK}}

EIF4G3 _{L_{NK}}			
ID	Descrição da proteína	Localização pelo TrypTag	LOG2 >1
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
LINF_160022100	EIF4G3- fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	+∞
LINF_300009600	EIF4E4 - fator de iniciação da tradução eucariótica 4E	Citoplasma	+∞
LINF_350055900	PABP1 - proteína 1 de ligação a poli (A)	Citoplasma	2,3
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE TRADUÇÃO			
LINF_150005500	EIF4G1_ Fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama tipo 1	Citoplasma (pontos, forte)	+∞
LINF_250005800	PABP3_ proteína 3 de ligação a poli (A)	Grânulos de RNA	2,1
LINF_360070500	EIF4G4_ fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama	Citoplasma	1,9
PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS			
LINF_130017300	40S Proteína ribossomal S4	Não há dados	2,2
PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS			
LINF_130018800	Proteína hipotética - conservada	Nucléolo	+∞
LINF_210012500	Proteína hipotética - conservada	Glicossomo	+∞
LINF_320017200	Proteína hipotética - conservada	Citoplasma; citoplasma flagelar; lúmen nuclear	+∞
LINF_230006700	Proteína hipotética - conservada	Citoplasma (pontos, forte); axonema	+∞
LINF_190011100	Proteína hipotética - conservada	Nucleoplasma	+∞
LINF_300013000	Proteína hipotética - conservada	Citoplasma	+∞
LINF_090018300	Proteína hipotética - conservada	Endocítico; citoplasma	+∞
RNA HELICASES			
LINF_070008800	DBP2B_ DEAD/H RNA helicase dependente de ATP	Nucléolo (forte)	+∞
LINF_080005700	DEAD/H RNA helicase dependente de ATP	Não há dados	1,5
OUTRAS PROTEÍNAS			
LINF_320010200	Proteína Rab4 relacionada à Ras	Endocítico	+∞
LINF_110005600	Proteína contendo o domínio GRIP	Não há dados	+∞
LINF_350042400	Proteína Gim5A	Glicossomo	+∞
LINF_360022600	Cadeia pesada da clatrina	Endocítico	4,6
LINF_070011100	Proteína rab-14 relacionada com Ras	Não há dados	2,7
LINF_340041200	CPSF3_ Fator específico de clivagem e poliadenilação	Citoplasma (pontos, fraco)	2,4
LINF_340047500	Complexo adaptador da subunidade gama – AP1	Endocítico (forte 50%)	2,2
LINF_190005900	Cadeia leve da clatrina	Citoplasma (fraco, 75%); endocítico (forte, 25%)	2,0
LINF_360014300	MKK5_ proteína quinase quinase ativada por mitogênio	Não há dados	1,8

Fonte: elaborado pela autora, 2020.

Nota: As proteínas que compõem a tabela estão divididas de acordo com seu tipo e as destacadas em **negrito** são as que interagiram de forma exclusiva com o EIF4G3_{L_{NK}}. O símbolo +∞ representa o limite da variável tendendo ao infinito