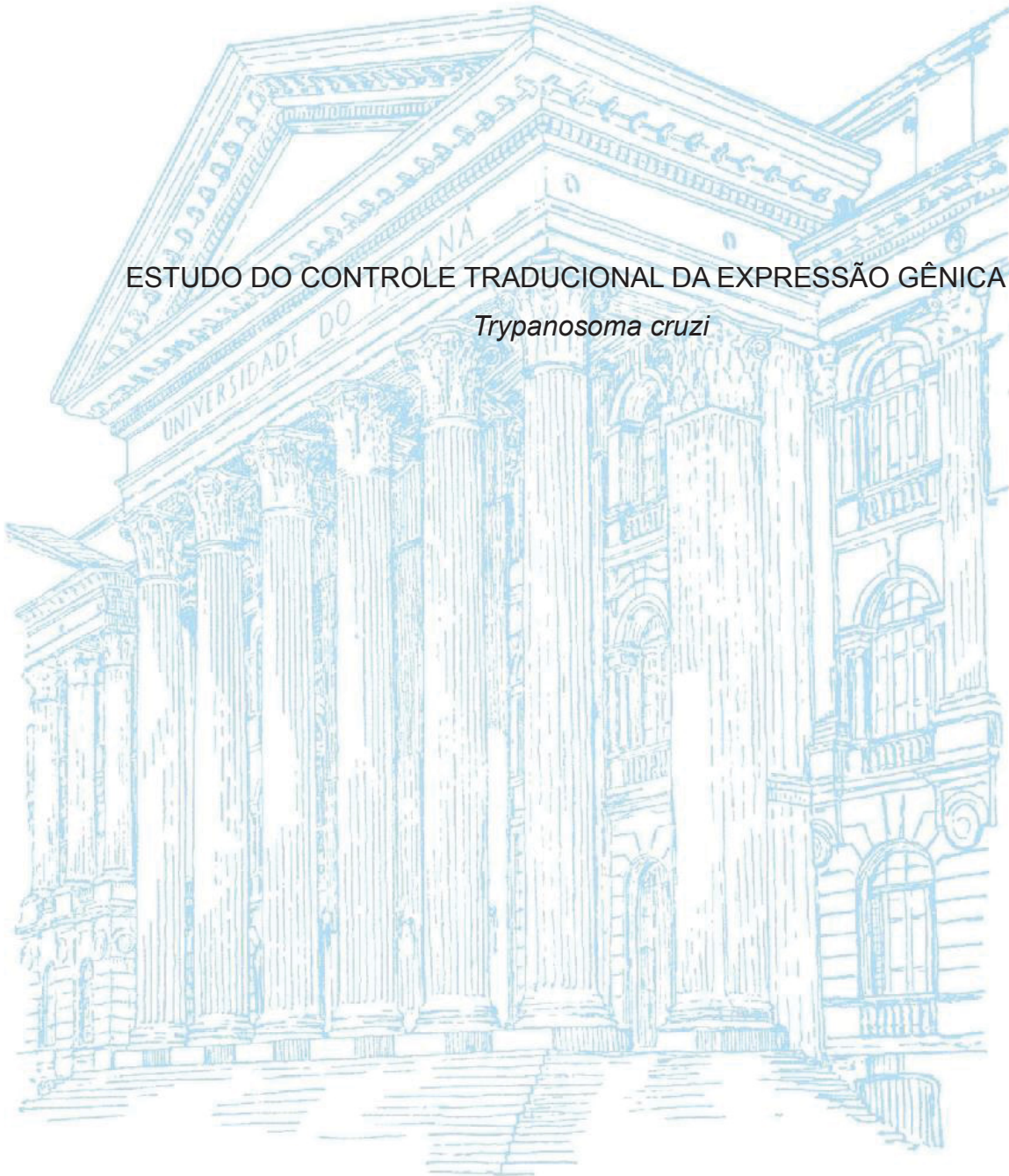


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JIMENA FERREIRA DA COSTA

ESTUDO DO CONTROLE TRADUCIONAL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM
Trypanosoma cruzi



CURITIBA

2019

JIMENA FERREIRA DA COSTA

ESTUDO DO CONTROLE TRADUCIONAL DA EXPRESSÃO GÊNICA EM
Trypanosoma cruzi

Tese apresentada como requisito para a obtenção de grau de Doutor, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Bruno Dallagiovanna
Co-Orientadora: Dra. Fabíola Barbieri Holetz

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Costa, Jimena Ferreira.

Estudo do controle traducional da expressão gênica em *Trypanosoma cruzi*. / Jimena Ferreira da Costa. – Curitiba, 2019.

131 f. : il.

Orientador: Bruno Dallagiovanna.

Coorientadora: Fabíola Barbieri Holetz.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Expressão gênica. 3. Tradução. 4. Chagas, Doença de. I. Título. II. Dallagiovanna, Bruno. III. Holetz, Fabíola Barbieri. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 616.9363



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JIMENA FERREIRA DA COSTA** intitulada: **Estudo do Controle Traducional da expressão Gênica em Trypanosoma cruzi**, sob orientação do Prof. Dr. BRUNO DALLAGIOVANNA MUNIZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Dezembro de 2019.





BRUNO DALLAGIOVANNA MUNIZ
Presidente da Banca Examinadora


MARIANA SERPELONI

Avaliador Externo (INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO
PARANÁ)


ALEJANDRO CORREA DOMINGUEZ

Avaliador Interno


EDEN RIBEIRO FREIRE
Avaliador Externo (ICC-FIOCRUZ)


DANIEŁA FIORI GRADIA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Ao meu marido Reginaldo pela paciência e apoio, e à minha filha Helena pelos sorrisos e descontrações nos momentos mais difíceis.

Às minhas grandes amigas-irmãs: Amanda Klinke, Ana Paula Chappo, Ize Bittencourt e Helisa Helena Wippel. conversas enriquecedoras e energias positivas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Bruno Dallagiovanna e Dra. Fabíola Barbieri Holetz. Por terem a mim confiado este lindo trabalho.

Aos meus avaliadores Dr. Alejandro Correa Dominguez, Dra. Andrea Rodrigues Ávila e Dr. Wanderson Duarte da Rocha pelas sugestões e ideias enriquecedoras.

Ao Dr. Henrique Preti pela ajuda com o ensaio de duplo-híbrido.

Ao Dr. Nilson Tonin Zanquin, Dra. Beatriz Guimarães e Dr. Eden Ribeiro Freire pela colaboração no artigo das interações dos fatores de início de tradução.

A Dra. Salôê Bispo Poubel pelas análises de RNA-Seq.

Ao Dr. Alexandre Haruo Inoue pela valiosa orientação a respeito de imunoprecipitações. Com a sua ajuda e conhecimento estes ensaios foram executados com êxito e qualidade.

A Ms. Camila Sayuri Tominaga da Cunha pela parceria e ajuda com os experimentos.

A todos do Laboratório de Expressão Gênica. Em especial a minha grande amiga Ize Bittencourt pela amizade sincera e verdadeira desde o mestrado.

A Tania e Sibebe pela organização dos materiais necessários aos experimentos, facilitando assim a realização deste trabalho.

Ao pessoal da microscopia Tabata D'Maiella Freitas Klimeck, Beatriz Santana Borges, Bruna Hilzendeger Marcon pelos milagres realizados com as imunofluorescências de *T. cruzi*.

Ao pessoal da plataforma de citometria de fluxo em especial a Dra. Priscila Mazzocchi Hiraiwa pelas análises de parasitas fluorescentes.

A minha família sempre interessada em saber se eu já descobri a cura para a Doença de Chagas. Lhes digo que estamos no caminho.

Ao Reginaldo pelo amor e companheirismos. Sempre me ensinando que devemos olhar para o lado positivo das situações difíceis para aprender com elas.

A minha filha Helena. Minha pequena válvula de escape. Meu porto seguro.

As minhas amigas galácticas Amanda Klinke, Ana Paula Chappo, Ize Bittencourt e Helisa Helena Wippel por enfrentarem junto comigo um intenso processo de amadurecimento e evolução pessoal. Juntas para sempre, nessa e em outras vidas.

'Quem olha para fora, sonha. Quem olha para dentro... desperta!'

Carl Jung

RESUMO

Nas células eucarióticas, os mRNAs podem estar compartimentalizados em ribonucleoproteínas mensageiras (mRNPs) que são classificadas em função da presença de proteínas específicas e do destino dos mRNAs nas células. Dentre essas estruturas estão os complexos de iniciação da tradução e os grânulos de mRNPs. Os complexos de iniciação da tradução são formados pelas proteínas eIFs (*eukaryotic initiation factors*) dos quais destaca-se o complexo eIF4F, formado por eIF4A, eIF4E e eIF4G. eIF4E interage diretamente com o *cap* do mRNA e presume-se que a formação de eIF4F é, em grande parte, regulada pela disponibilidade de eIF4E. Dentre os grânulos de mRNPs mais estudados estão os *Processing bodies (P-bodies)* e os grânulos de estresse (GE). De forma geral, os GE são definidos pela presença de alguns fatores de iniciação da tradução enquanto os *P-bodies* são definidos pela presença de componentes da maquinaria de degradação. Estudos em eucariotos têm revelado que os complexos de início de tradução podem interagir com os grânulos e trocar diferentes ribonucleoproteínas mensageiras. Esta interação sugere um ciclo citoplasmático dinâmico com o intercâmbio de mRNAs entre tradução, GE e *P-bodies*. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo estudar a regulação da expressão gênica do *Trypanosoma cruzi* em nível pós-transcricional, iniciado o estudo dos seis homólogos do fator de iniciação da tradução EIF4E (EIF4E1-EIF4E6) de *T. cruzi*, buscando identificar os parceiros funcionais de cada fator. Paralelamente, caracterizamos os mRNAs totais no citoplasma, os mRNAs associados aos complexos ribonucleoproteicos que contém as proteínas TcXRNA e TcDHH1 e os mRNAs associados aos polissomos nas formas epimastigotas em crescimento exponencial e nas formas epimastigotas submetidas a estresse nutricional. Através deste trabalho foi possível verificar que o *T. cruzi*, assim como os demais tripanossomatídeos, apresenta uma grande multiplicidade de homólogos para os fatores de início de tradução que compõe o complexo eIF4F. A fim de identificar as interações que ocorrem entre estes fatores, realizamos ensaios de duplo-híbrido, imunoprecipitação e co-imunolocalização e identificamos três novas interações que ainda não foram relatadas em nenhum outro tripanossomatídeo, EIF4E3:PABP1, EIF4E3:PABP2 e EIF4E5:EIF4G5. Os fatores TcEIF4E5 e TcEIF4G5 co-localizam em parasitas epimastigotas, principalmente na periferia do núcleo. Além disso, reforçamos a ideia de que o controle da expressão gênica em tripanossomatídeos ocorre predominantemente em nível pós-transcricional, pois ao comparar o transcriptoma de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional não foram identificadas diferenças significativas na expressão de genes em nível de mRNA. Verificamos também que ocorre a redução da tradução quando o parasita é submetido ao estresse nutricional, indicando que o parasita pode modular a expressão de seus genes em nível traducional. O sequenciamento dos mRNAs associados a complexos contendo as proteínas TcXRNA e TcDHH1 mostrou que essas proteínas interagem com diferentes mRNAs, e que ambas as proteínas associam-se tanto à mRNAs que também estão presentes em complexos polissomais, quanto mRNAs que podem estar traducionalmente reprimidos. Dessa maneira, esses dados sugerem que essas proteínas possam participar de complexos ribonucleoproteicos distintos os quais são importantes para regulação da expressão gênica de *T. cruzi*. Os resultados obtidos neste trabalho, abrem novas perspectivas para o entendimento da função de cada complexo de início de tradução eIF4F-like no ciclo do mRNA em *T. cruzi*. Além disso, todos esses dados, reforçam a importância da regulação da expressão gênica em nível de tradução, e fornece novas evidências a respeito da dinâmica dos mRNAs e da disponibilidade dos EIF4Es neste organismo.

Palavras-chaves: ciclo de mRNA; tradução; eIF4E; *P-bodies*; grânulos de estresse.

ABSTRACT

In eukaryotic cells, mRNAs can be compartmentalized into messenger ribonucleoproteins (mRNPs) that are classified according to the presence of specific proteins and the fate of mRNAs in cells. Among these structures are translation initiation complexes and mRNP granules. The translation initiation complexes are formed by the eIFs proteins (eukaryotic initiation factors) of which the eIF4F complex, formed by eIF4A, eIF4E and eIF4G stands out. eIF4E interacts directly with the mRNA cap and it is assumed that the formation of eIF4F is largely regulated by the availability of eIF4E. Among the most studied mRNP granules are Processing bodies (P-bodies) and stress granules (GE). In general, GE are defined by the presence of some translation initiation factors while P-bodies are defined by the presence of components of the degradation machinery. Studies in eukaryotes have revealed that translation initiation complexes can interact with granules and exchange different messenger ribonucleoproteins. This interaction suggests a dynamic cytoplasmic cycle with the exchange of mRNAs between translation, GE and P-bodies. Thus, the present study aimed to study the regulation of the gene expression of *Trypanosoma cruzi* at the post-transcriptional level, beginning the study of the six homologues of the translation initiation factor EIF4E (EIF4E1-EIF4E6) of *T. cruzi*, seeking to identify the functional partners of each factor. In parallel, we characterize the total mRNAs in the cytoplasm, the mRNAs associated with the ribonucleoprotein complexes that contain the TcXRNA and TcDHH1 proteins and the mRNAs associated with the polysomes in exponentially growing epimastigotes and epimastigote forms subjected to nutritional stress. Through this work it was possible to verify that *T. cruzi*, like the other trypanosomatids, has a large multiplicity of homologues for the translation initiation factors that make up the eIF4F complex. In order to identify the interactions that occur between these factors, we performed two-hybrid, immunoprecipitation and co-immunolocalization assays and identified three new interactions that have not yet been reported in any other trypanosomatids, EIF4E3: PABP1, EIF4E3: PABP2 and EIF4E5: EIF4G5. The factors TcEIF4E5 and TcEIF4G5 co-localize in epimastigote parasites, mainly in the periphery of the nucleus. In addition, we reinforce the idea that the control of gene expression in trypanosomatids occurs predominantly at the post-transcriptional level, since when comparing the transcriptome of epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress, no significant differences were found in the expression of genes at the mRNA level. We also found that there is a reduction in translation when the parasite is subjected to nutritional stress, indicating that the parasite can modulate the expression of its genes at the translational level. The sequencing of mRNAs associated with complexes containing the TcXRNA and TcDHH1 proteins showed that these proteins interact with different mRNAs, and that both proteins are associated with both mRNAs that are also present in polysomal complexes, and mRNAs that may be translationally repressed. Thus, these data suggest that these proteins may participate in different ribonucleoprotein complexes, which are important for the regulation of *T. cruzi* gene expression. The results obtained in this work open new perspectives for the understanding of the function of each complex of eIF4F-like translation initiation in the mRNA cycle in *T. cruzi*. In addition, all of these data reinforce the importance of regulating gene expression at the translation level, and provide new evidence regarding the dynamics of mRNAs and the availability of EIF4Es in this organism.

Keywords: mRNA cycle; Translation; eIF4E; P-bodies; stress granules.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 2. Mecanismos de cis-splicing e trans-splicing.....	23
Figura 3. Esquema do processo de início da tradução <i>cap</i> dependente em eucariotos.....	27
Figura 4. Complexo EIF4F formado por EIF4E, EIF4G e PABP.....	31
Figura 5. Representação esquemática dos complexos eIF4F-like formados por EIF4E5.....	33
Figura 6. Modelo do ciclo dinâmico de mRNAs entre a tradução, estocagem em GE e degradação em <i>P-bodies</i>	41

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Fatores de iniciação eucarióticos.....	24
Quadro 2. Componentes de <i>P-bodies</i> e grânulos de estresse	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD: domínio de ativação

attP e *attB*: sítio de recombinação

ATP: adenosina tri fosfato

BD: domínio de ligação ao DNA

CaCl₂: cloreto de cálcio

ccdB: gene de morte celular

Chaps: detergente 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA: ácido desoxirribonucleico

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

eIFs: fatores de iniciação eucarióticos

Epi: epimastigota

g: gramas

G418: Geneticina

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Gal:galactose

GDP: Guanosina difosfato

GE: grânulo de estresse

GFP: proteína verde fluorescênte

GNPs: grânulos perinucleares

GTP: Guanosina trifosfato

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineethanesulfonico

His3p: enzima imidazolglicerol-fosfato desidratase

ID: número de identificação

IgG: imunoglobulina G

IMPDGFP: tampão de imunoprecipitação da Dhh1GFP

IMPXGFP: tampão de imunoprecipitação da XRNAGFP

kb: kilobase

KCl: cloreto de potássio

kDa: kiloDaltons

KH₂PO₄: fosfato de potássio monobásico

LacZ: gene da β-galactosidase

LB: Luria-Bertani

LiAc: acetate de lítio

LiCl: cloreto de lítio

LIT: *Liver Infusion Tryptose*

M: molar

mA: miliampere

MgCl₂: cloreto de magnésio

MgSO₄: sulfato de magnésio

m⁷GTP: 7-Metilguanosina 5'-trifofate

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

Na₃C₆H₅O₇: citrato de sódio

NaCl: cloreto de sódio

Na₂HPO₄: fosfato de sódio dibásico

NaH₂PO₄: fosfato monossódico

NaOH: hidróxido de sódio

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: nanograma

nm: nanometros

NP40: Nonidet P-40 (octyl phenoxy polyethoxy ethanol)

P-bodies e PBs: corpos de processamento

PBS: tampão fosfato-salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PEG: polietileno glicol

Pfam: banco de dados de famílias de proteínas

pH: potencial hidrogeniônico

Pi: fosfato inorgânico

pmol: picomol

poliA: cauda de poli adeninas

RFP: *ribosome foot printing*

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: ácido ribonucleico de interferência

RNPs: ribonucleoproteínas

SC: meio sintético completo

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: gel de eletroforese em poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

St: epimastigota sob estresse nutricional

TA 4x: tampão de amostra de proteínas 4x

TAU: Urina artificial de triatomíneo

Taq: enzima da *Thermus aquaticus*

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano-hidroclorídrico

TritypDB: banco de dados genômicos de tripanossomatídeos

tRNA: ácido ribonucleico transportados

3AT: 3-Amino-1,2,4-triazole

LISTA DE SÍMBOLOS

mg: miligrama

mL: mililitro

mM: milimolar

U: unidades

V: volts

x g: força de rotação

YEPD: extrato para meio de cultura de levedura com peptona e dextrose

YFP: proteína amarela fluorescente

YNB: base nitrogenada para meio de cultura de levedura

µg: micrograma

µF: microfarad

µl: microlitros

µm: micrometros

°C: graus celsius

%: porcentagem

LISTA DE AMINOÁCIDOS E NUCLEOTÍDEOS

Grupos R	Aminoácido	Código de três letras	Código de uma letra
Alifáticos não polares	Glicina	Gly	G
	Alanina	Ala	A
	Prolina	Pro	P
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	Metionina	Met	M
Aromáticos	Fenilalanina	Phe	F
	Tirosina	Tyr	Y
	Triptofano	Trp	W
Não carregados, mas polares	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Cisteína	Cys	C
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gln	Q
Carregados positivamente	Lisina	Lys	K
	Histidina	His	H
	Arginina	Arg	R
Carregados negativamente	Aspartato	Asp	D
	Glutamato	Glu	E
Base nitrogenada	Nucleotídeo	Nome Abreviado	
Purina	Adenina	A (Ade)	
	Guanina	G	
Pirimidina	Citosina	C	
	Timina	T	
	Uracila	U (Ura)	

Códons

1ª Base

		1ª Base				
		U	C	A	G	
2ª Base	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
		UUA Leu	UCA Ser	UAA Stop	UGA Stop	A
		UUG Leu	UCG Ser	UAG Stop	UGG Trp	G
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
		CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
	A	AUU Iso	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
		AUC Iso	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
		AUA Iso	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
		AUG Met (<i>Start</i>)	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U	
	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C	
	GUA Val	GCA Ala	GAA Asp	GGA Gly	A	
	GUG Val	GCG Ala	GAG Asp	GGG Gly	G	

3ª Base

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Trypanosoma cruzi: o protozoário causador da doença de chagas	19
1.2 Peculiaridades na biologia molecular e regulação da expressão gênica do T. cruzi	21
1.3 Tradução em eucariotos: Iniciação da tradução cap dependente e sua regulação ..	24
1.4 Complexo eIF4F em tripanossomatídeos	28
1.4.1 Múltiplos homólogos do fator eIF4A	28
1.4.2 Múltiplos homólogos do fator eIF4G.....	29
1.4.3 Múltiplos homólogos do fator eIF4E	30
1.5 Homólogos do fator auxiliar PABP	34
1.6 Estocagem e degradação de mRNAs em eucariotos: grânulos de RNA	35
1.7 Grânulos de mRNA em tripanossomatídeos	38
1.8 Controle da expressão gênica: Ciclo dinâmico do mRNA - tradução, estocagem e degradação.....	39
2. OBJETIVO.....	43
3. CAPITULO 1.....	45
4. CAPITULO 2.....	84
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	119
6. REFERÊNCIAS	122

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Trypanosoma cruzi*: o protozoário causador da doença de chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da Doença de Chagas. O parasita, juntamente com seu inseto vetor, foi descoberto em 1907 pelo médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, ao investigar uma moléstia que estava acometendo pessoas que viviam na região da construção da Estrada de Ferro Central do Brasil (Chagas, 1909, 1911). Atualmente, sabe-se que além da transmissão através da picada do inseto vetor, pode ocorrer contaminação por transfusão sanguínea, por via oral, por via congênita, acidentes de laboratório e transplantes de órgãos (Beltrao *et al.*, 2014; Steindel *et al.*, 2008; Tanowitz *et al.*, 1992).

Caracterizando-se por uma doença grave, a Doença de Chagas afeta aproximadamente 8 milhões de pessoas ao redor do mundo, principalmente na América Latina onde permanece como um dos maiores problemas de saúde pública. É estimado que aproximadamente 10.000 pessoas morram todos os anos devido as manifestações clínicas da doença, e mais de 25 milhões de pessoas estejam em área de risco (WHO, 2019). A doença pode se manifestar em duas fases. As manifestações da fase aguda ocorrem em 1 a 2 semanas após a infecção, nesta fase a maioria dos acometidos são assintomáticos, porém quando os sintomas estão presentes podem ocorrer severas miocardites e/ou meningoencefalites. É durante a fase aguda que o tratamento é realizado, através da administração das drogas nifurtimox e benzonidazol. Contudo, se a doença progredir para a fase crônica, pode ocorrer manifestações cardíacas e/ou digestivas onde o tratamento não é mais bem tolerado, devido aos efeitos colaterais e baixos índices de cura levando ao abandono da terapia pelo paciente (Jannin & Villa, 2007; Rassi & Marin-Neto, 2010).

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* apresenta quatro estágios principais, alternando-se entre um hospedeiro intermediário, o barbeiro, um inseto hematófago, e um hospedeiro definitivo mamífero (Figura 1) (De Souza, 1984). Os vetores do *T. cruzi* são insetos hematófagos da subfamília Triatominae, como por exemplo, *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* e *Rhodnius prolixus* (Rassi & Marin-Neto, 2010). No inseto vetor, o *T. cruzi* hospeda-se em todo o trato digestivo, e as formas infectantes tripomastigotas metacíclicas abrigam-se na porção final do intestino, sendo permitida sua liberação durante o repasto sanguíneo, juntamente com as fezes e urina do inseto vetor. Os parasitas liberados podem ser carreados para o local da picada, atingindo a corrente sanguínea do mamífero e infectam as células (De Souza, 1984; Rassi & Marin-Neto, 2010). Quase todos os tipos celulares dos tecidos e órgãos de mamíferos podem

ser parasitados com diferentes intensidades dependendo do tropismo de cada cepa de *T. cruzi* (Lenzi *et al.*, 1996). Os tripomastigotas metacíclicos interiorizados pelas células são envoltos pelo vacúolo parasitóforo, onde permanecem por algumas horas e se diferenciam na forma amastigota. No citoplasma da célula, ocorre o processo de replicação dos amastigotas que, na sequência, se diferenciam em novas formas, as tripomastigotas, as quais através de movimentos frenéticos rompem a membrana da célula libertando-se na forma de tripomastigotas sanguíneos, podendo infectar outras células ou serem ingeridos por outro inseto. (De Souza, 1984; Rassi & Marin-Neto, 2010). Se forem ingeridos novamente, os parasitas se abrigam ao longo do trato digestivo do vetor sofrendo modificações biológicas e morfológicas. No estômago, porção anterior do trato digestivo, o parasita toma a forma epimastigota, que se divide exponencialmente por um processo de fissão binária. Os epimastigotas migram para o intestino do inseto, porção distal do trato digestivo, e podem aderir às porções posteriores do intestino, encontrando neste momento uma região pobre em nutrientes (Kollien & Schaub, 2000). A falta de nutrientes leva o parasita a um estresse nutricional, sinalizando o desencadeamento da diferenciação celular conhecida como metaciclogênese, onde ocorre novamente a mudança da forma epimastigota para a forma infectiva tripomastigota metacíclica (De Souza, 1984; Rassi & Marin-Neto, 2010).

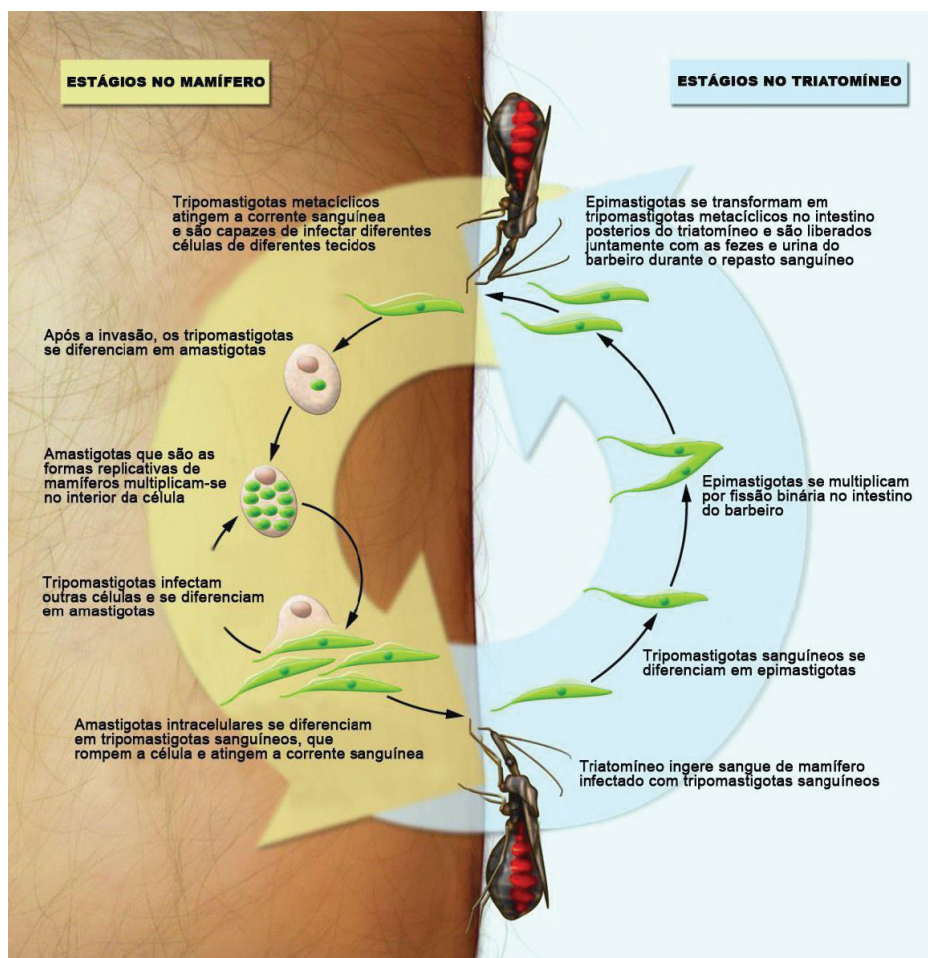


Figura 1. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O parasita é transmitido aos seres humanos durante o repasto sanguíneo por insetos *Triatominae* infectados, que depositam tripomastigotas em suas fezes durante a alimentação. As formas tripomastigotas entram na ferida e invadem as células próximas, no interior das células eles diferenciam em amastigotas que se multiplicam por fissão binária. Os amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas, que são liberados na corrente sanguínea e infectam células de múltiplos órgãos e tecidos, incluindo o coração, intestino, sistema nervoso central, músculo liso e tecido adiposo, onde mais uma vez se tornam amastigotas. Os tripomastigotas metacíclicos circulantes na corrente sanguínea, podem ser ingeridos novamente durante um novo repasto sanguíneo. Os tripomastigotas ingeridos diferenciam-se nas formas replicativas epimastigotas, que sofrem transformações morfológicas e fisiológicas no intestino médio do vetor e diferencie-se novamente em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior, onde são liberados podendo infectar outros mamíferos. Figura adaptada de: (Stuart *et al.*, 2008).

O processo de metaciclogênese, assim como as demais diferenciações, é de grande importância para que o ciclo biológico do parasita ocorra e permita a manutenção da sua espécie. Sendo assim, o processo de metaciclogênese foi eficientemente mimetizado *in vitro*, podendo ser obtidos parasitas desde a sua forma epimastigota, passando pelo estresse nutricional e chegando aos tripomastigotas metacíclicos (Camargo, 1964; Contreras *et al.*, 1985). Durante a metaciclogênese, além do estresse nutricional, ocorrem muitas mudanças metabólicas que afetam o controle da expressão gênica do parasita, tornando neste contexto, a metaciclogênese *in vitro*, um excelente modelo para o estudo da regulação da expressão gênica do *T. cruzi* (Goldenberg *et al.*, 1987).

1.2 Peculiaridades na biologia molecular e regulação da expressão gênica do *T. cruzi*

Além da relevância médica e econômica, o estudo do *T. cruzi* é igualmente importante para o conhecimento de sua biologia básica, bem como a maneira como esse parasita regula seus genes, pois apresenta diversas características biológicas peculiares que o torna importante modelo de estudo. A transcrição em tripanossomatídeos ocorre, assim como em outros eucariotos, pela ação das RNAs polimerases I, II e III. Contudo, não foram identificadas sequências promotoras canônicas para a transcrição por RNA polimerase II (Laufer & Günzl, 2001; Laufer *et al.*,

1999; Palenchar & Bellofatto, 2006). Outra peculiaridade diz respeito ao genoma, o qual é disposto em *clusters* separados por espaçadores intergênicos curtos. Na ausência de íntrons na maioria dos casos, os RNAs são transcritos em uma única molécula policistrônica, com exceção para os genes que codificam a enzima poli-A polimerase. Além disso, a informação contida nos RNAs policistrônicos não apresentam funções relacionadas (Clayton & Shapira, 2007; Vanhamme & Pays, 1995).

Os mRNAs policistrônicos são processados em mRNAs monocistrônicos maduros por um outro evento peculiar chamado de *trans-splicing*. O *trans-splicing* ocorre por duas reações de transesterificação, assim como no *cis-splicing* em mamíferos, porém gera uma estrutura em Y ao invés de um laço intermediário. Além disso, para que o *trans-splicing* seja realizado eficientemente é necessária a presença do dinucleotídeo AG na região 3' do SL e uma região rica em pirimidina no mRNA (Figura 2). (Clayton, 2019; Liang *et al.*, 2003; Martínez-Calvillo *et al.*, 1997). Durante o evento de *trans-splicing*, ocorrerem dois fenômenos em paralelo para formar os RNA mensageiros maduros, a poliadenilação e a inserção da sequência *spliced leader* RNA (SL RNA).

Quando se fala em diferenças entre tripanossomatídeos e outros eucariotos, o SL é uma das estruturas que mais se sobressai, pois se trata de um pequeno RNA contendo 39 nucleotídeos, o qual é inserido na região 5' do mRNA fornecendo uma estrutura diferenciada chamada *cap4*. Diferente de mamíferos e leveduras, por exemplo, que apresentam o *cap2*, com apenas duas metilações (Jankowska-Anyszka *et al.*, 1998; Michaeli, 2011; Reddy, Singh, & Shimba, 1992), o *cap* dos tripanossomatídeos exhibe múltiplas modificações químicas que o torna único, como a 2'-O-metilção nas primeiras quatro riboses e metilações no primeiro nucleotídeo (adenina) e quarto nucleotídeo (uracila). (Bangs *et al.*, 1992; Reolon *et al.*, 2019).

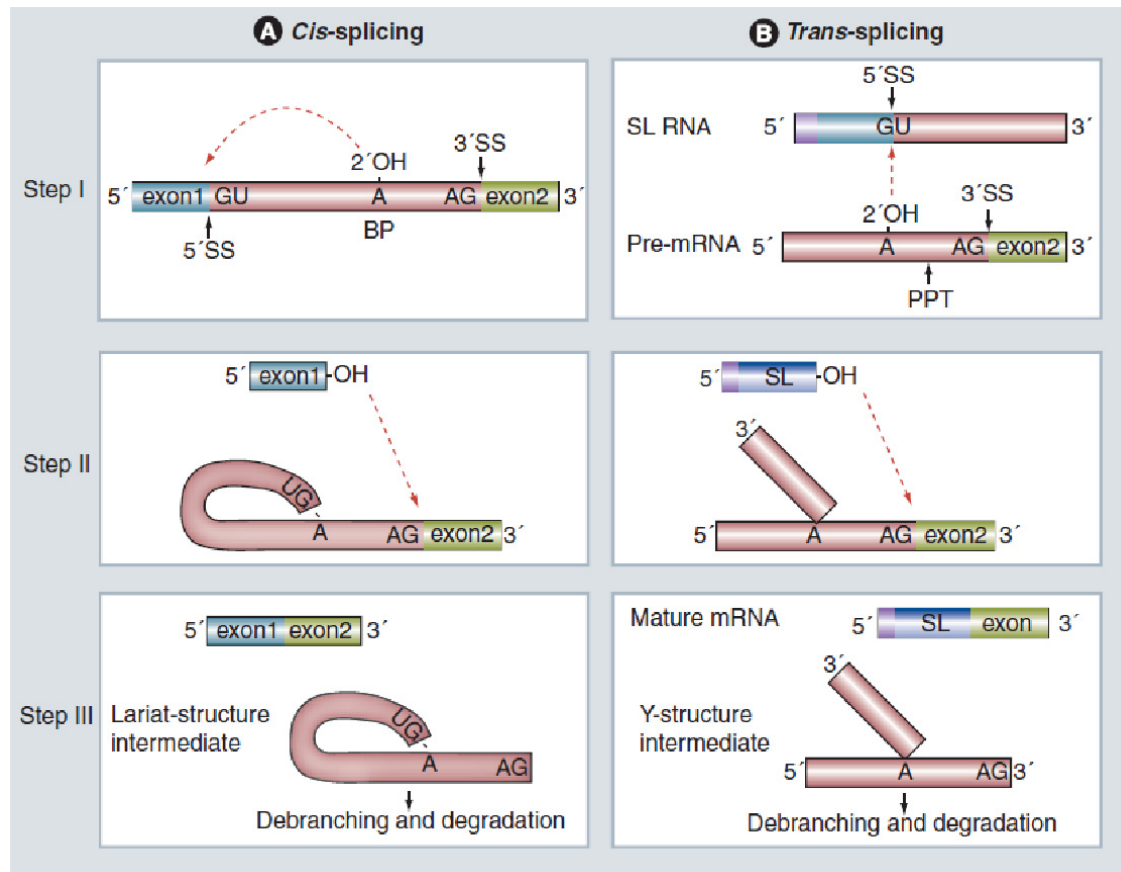


Figura 2. Mecanismos de cis-splicing e trans-splicing. A) Representa o mecanismo de cis-splicing e B) o trans-splicing. Os dois passos de transesterificação estão apresentados. Os sítios de splice 5' (GU) e 3'(AG) e a sequência BP estão indicados. Sítios requeridos para o splicing: BP (*Branch point*) e PPT (*Polypyrimidine tract*). SL: *Spliced leader*, SS: *Splice site*. Fonte: (Michaeli, 2011).

Nas células eucarióticas, a regulação da expressão gênica desempenha um papel crucial no desenvolvimento e diferenciação celular. Ocorrendo em diferentes níveis, a regulação, vai desde a transcrição, passando pelo processamento, exportação, tradução e degradação de mRNAs. A biogênese e a funcionalidade de uma determinada molécula de mRNA depende da ação de um conjunto de proteínas ligadoras de RNA (*RNA binding proteins*) que participam de todas as etapas de processamento do transcrito. Em cada etapa, o mRNA é submetido à um intenso controle de qualidade até que esteja perfeitamente pronto para ser traduzido. Além disso, a combinação única de fatores que acompanham um mRNA específico, bem como suas posições relativas neste transcrito, determinam o destino deste mRNA no citoplasma, ou seja, tradução e/ou estocagem para posterior tradução ou degradação (Moore, 2005).

Assim, em tripanossomatídeos, devido a riqueza de características moleculares incomuns na estrutura de genes como a ausência de íntrons, ausência de promotores canônicos para a RNA polimerase II, a transcrição policistrônica de mRNAs bem como o evento de *trans-splicing*, acredita-se que grande parte da regulação da expressão gênica ocorra por eventos pós-transcricionais por mecanismos que envolvem o processamento e exportação, mudanças na estabilidade e no acesso dos mRNAs aos polissomos; e, principalmente, no controle da síntese proteica (Clayton, 2019; Clayton & Shapira, 2007; Holetz *et al.*, 2010; Kramer, 2012).

1.3 Tradução em eucariotos: Iniciação da tradução *cap* dependente e sua regulação

A tradução em eucariotos compreende quatro estágios principais: iniciação, alongação, terminação e reciclagem de ribossomos (Sonenberg & Hinnebusch, 2009).

Durante a tradução, a etapa de iniciação é a mais complexa e abrange todos os processos que precedem a formação da primeira ligação peptídica, sendo, portanto a etapa mais sujeita a mecanismos de regulação, além de ser aquela que mais varia entre diferentes grupos taxonômicos (Jackson *et al.*, 2010) e, portanto, é a etapa que vamos focar neste trabalho. Além dos fatores auxiliares, existem pelo menos 12 proteínas envolvidas, denominadas fatores de iniciação eucariótica (eIFs), que desempenham papéis críticos no processo, e vários desses fatores são compostos por proteínas de múltiplas subunidades (Quadro 1) (Jackson *et al.*, 2010; Merrick & Pavitt, 2018).

Quadro 1. Fatores de iniciação eucarióticos em vertebrados

Nome	Número de subunidades e massa molecular (kDa)	Função
Fatores de Iniciação		
eIF1	1 (12.7)	Garante a fidelidade na seleção do códon de iniciação; promove a varredura ribossomal; estimula a ligação do eIF2-GTP-Met-tRNA ^{Met_i} à subunidade 40S; previne a indução prematura por eIF5 na hidrólise de eIF2 ligada a GTP e liberação de P _i .
eIF1A	1 (16.5)	Coopera com eIF1 na estimulação da ligação do eIF2-GTP-Met-tRNA ^{Met_i} à subunidade 40S; no escaneamento ribossomal e seleção do códon de iniciação.
eIF2	3 (36.1, 38.4, 51.1)	Forma um complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA ^{Met_i} que se liga a subunidade 40S.
eIF2B	5 (33.7, 39.0, 50.2,	É um fator que promove a troca de GDP por GTP no fator eIF2.

	59.7, 80.3)	
eIF3	13 (800 total)	Liga-se a subunidade 40S, eIF1, eIF4G e eIF5; estimula a ligação do eIF2-GTP-Met-tRNA ^{Met} _i à subunidade 40S; promove a ligação do complexo 43S ao mRNA e subsequente escaneamento; dissocia ribossomos e impede a sua reassociação.
eIF4A*	1 (46.1)	DEAD-box ATPase e ATP-dependente RNA helicase.
eIF4B	1 (69.3)	Proteína de ligação a RNA que melhora a atividade de eIF4A.
eIF4E**	3 (24.5, 28.3, 27.0)	Liga-se à estrutura <i>cap</i> do mRNA.
eIF4F	3 (246.1 total)	Um complexo de ligação ao <i>cap</i> , compreende eIF4E, eIF4A e eIF4G; desenrola a região 5' do mRNA e medeia a ligação do complexo 43S; auxilia o complexo ribossomal durante o escaneamento.
eIF4G***	2 (175.5, 102.3)	Proteína estrutural que se liga à eIF4E, eIF4A, eIF3, PABP e mRNA; melhora a atividade helicase de eIF4A.
eIF4H	1 (27.4)	Proteína de ligação ao RNA que melhora a atividade de eIF4A e é homóloga a um fragmento de eIF4B.
eIF5	1 (49.2)	Proteína GTPase-ativadora, específica para eIF2-GTP, que induz hidrólise de eIF2 no reconhecimento do códon de iniciação.
eIF5B	1 (138.9)	GTPase dependente de ribossomo que medeia a junção das subunidades ribossomais.

Fatores auxiliares

eIF6	1 (26.6)	Fator anti-associação que se liga a subunidade 60S e a previne de ligar a 40S.
PABP****	1 (70.6)	Liga-se a cauda poliA do mRNA e ao eIF4G; melhora a ligação do eIF4F ao <i>cap</i> ; e pode facilitar o recrutamento da subunidade 40S para a região 5' do mRNA.
DHX29	1 (155.3)	Proteína DExH box que se liga a subunidade 40S e promove o escaneamento ribossomal ao longo do mRNA.

*Duas eIF4As são descritas como parálogas (eIF4AI e eIF4AII), são expressas por genes diferentes, mas funcionalmente indistinguíveis. eIF4AIII não tem atividade como eIF.

**Dados atualizados. Atualmente já são descritos 3 eIF4Es em mamíferos que parecem ser funcionais em determinadas situações em que a célula é submetida, como por exemplo hipóxia. (Ho & Lee, 2016).

***Duas eIF4Gs são descritas como parálogas (eIF4G1 e eIF4G2), são expressas por genes diferentes, apresentam função similar, mas são seletivas para determinados mRNAs. eIF4G1 é geralmente a mais abundante.

****Duas PABPs são descritas (PABP1 e PABP2), mas PABP2 parece ter função no processamento do pré-mRNA, transporte para o citoplasma e proteção do mRNA. (Calado & Carmo-Fonseca, 2000).

Adaptado de: (Jackson *et al.*, 2010)

Durante a iniciação da tradução *cap* dependente (Figura 3), acredita-se que três eventos ocorram paralelamente: formação do complexo eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}_i, liberação das subunidades ribossomais e reconhecimento do mRNA com subsequente formação do complexo eIF4F (Hinnebusch, 2014).

Basicamente, o início da síntese de proteínas é o processo que resulta em reunir um ribossomo 80S com um mRNA e com o Met-tRNA_i. Estes três componentes combinam-se de tal forma que o Met-tRNA_i faz interações de pares de bases códon-anticódon com o códon de iniciação correto no início de um quadro de leitura aberta (ORF) no mRNA (Merrick & Pavitt, 2018). AUG é o códon típico de iniciação, embora códons quase cognatos sejam usados para a iniciação em alguns mRNAs (Kearse & Wilusz, 2017; Starck *et al.*, 2016). A interação códon-anticódon ocorre no sítio P de um ribossomo 80S. Esta topologia permite que a fase de alongamento da síntese proteica comece ligando um aminoacil-tRNA ao sítio A do 80S, favorecendo a leitura do códon adjacente (Merrick & Pavitt, 2018).

O complexo eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}_i é conhecido como complexo ternário (TC), e sua formação é considerada o primeiro passo da iniciação da tradução (Merrick & Pavitt, 2018). O TC é formado a partir da reciclagem de eIF2-GDP para eIF2-GTP pelo fator de troca de nucleotídeo eIF2B. Essa reação pode ser inibida durante condições de estresse pela fosforilação de eIF2 na Ser-51 de sua subunidade alfa (Hinnebusch, 2014). A liberação dos ribossomos é mediada por eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5, os quais ficam ligados à subunidade 40S impedindo que ela se ligue novamente com a subunidade 60S, com isso o complexo eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}_i liga-se aos fatores eIF1, eIF1A e eIF3 acoplados a 40S formando o complexo de pré-iniciação 43S (PIC) (Jackson *et al.*, 2010). Alternativamente, eIF3 e eIF1 podem formar um complexo multifator (MFC) independente com TC e eIF5 antes de se ligar a subunidade 40S. Paralelamente ocorre o reconhecimento do mRNA através de sua estrutura *cap* pelo complexo eIF4F e ligação da proteína PABP à cauda poliA na porção 3' do mRNA. PABP interage com o mRNA e com eIF4F, ligado a porção 5' do mRNA, formando uma estrutura circular altamente estável (*closed-loop structure*). Essa interação ativa o mRNA, proporcionando a ligação do complexo 43S na região 5' do mRNA formando o complexo 48S, e permitindo o escaneamento do mRNA pelo complexo 43S até o encontro do códon de iniciação da tradução AUG, com posterior junção da subunidade 60S e alongação (Hinnebusch, 2014).

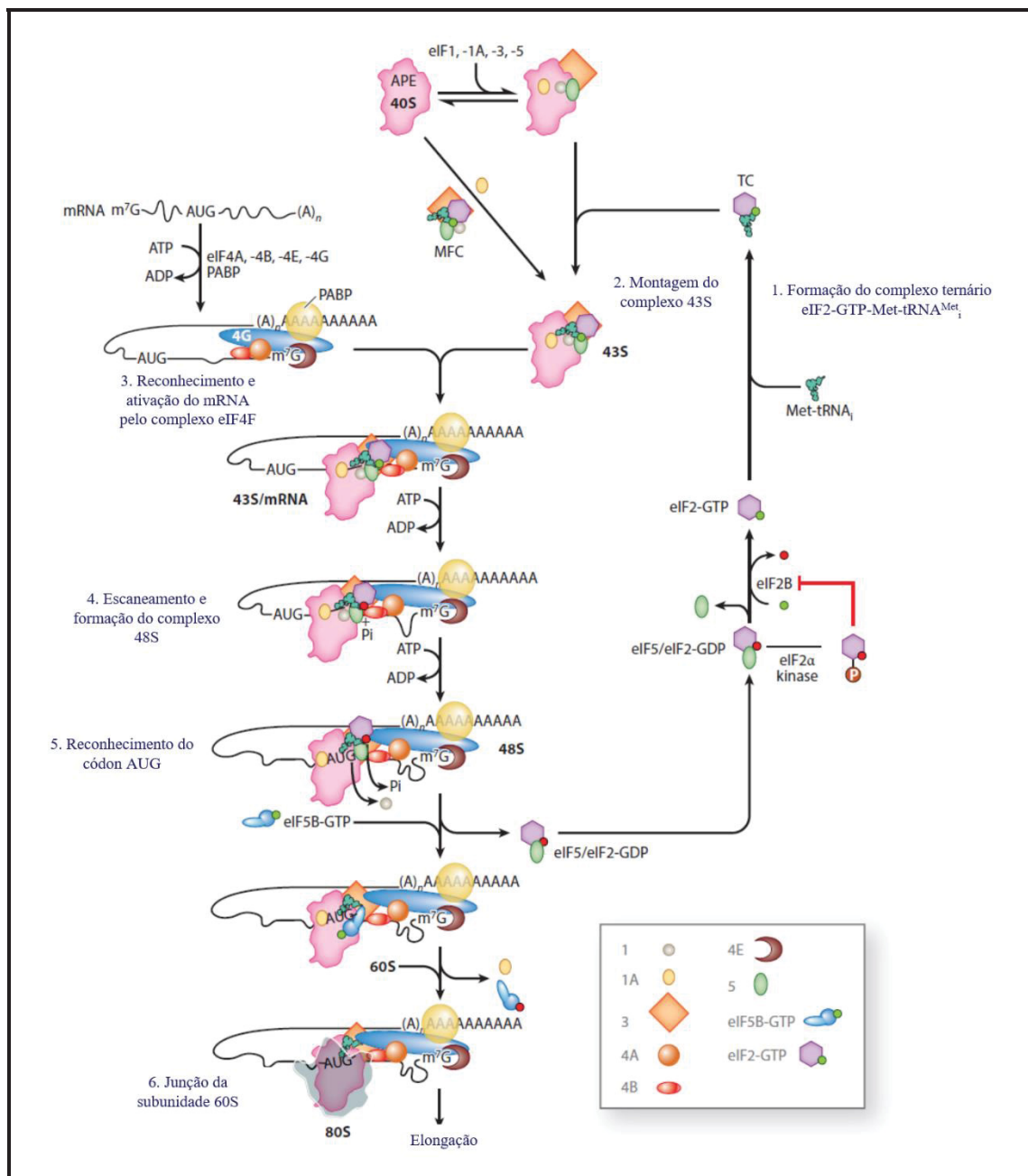


Figura 3. Esquema do processo de início da tradução *cap* dependente em eucariotos.

1) Ocorre a formação do complexo ternário (GTP-tRNA_i-eIF2), que se associa com a subunidade ribossomal 40S. 2) Formação do complexo 43S após a junção do 40 S com o complexo ternário. Ao mesmo tempo há a formação do complexo eIF4F. 3) O complexo eIF4F reconhece o mRNA e juntamente com as proteínas de ligação à cauda poliA promove a circularização do mRNA. 4) Escaneamento ribossomal e formação do complexo 48S. 5) Reconhecimento do códon de iniciação AUG. 6) Montagem do ribossomo pela junção da subunidade ribossomal 60S e início da fase de elongação. Figura adaptada de: (Hinnebusch, 2014).

O complexo eIF4F é formado pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G. Este complexo é um dos principais responsáveis pelo reconhecimento do mRNA pelo ribossomo, principalmente pela interação direta do eIF4E com a estrutura *cap* presente nos mRNA (Gingras *et al.*, 1999). De maneira geral em eucariotos, o fator de início de tradução eIF4E liga-se ao *cap* do mRNA e recruta a proteína estrutural eIF4G, a qual possui domínio de ligação ao mRNA e às proteínas eIF4E, eIF4A, eIF3 e PABP (Hinnebusch, 2014). Em mamíferos, eIF4G recruta eIF4A, uma helicase que quando ativada desenrola as estruturas secundárias do mRNA para facilitar o recrutamento do complexo de iniciação 43S próximo ao *cap* do mRNA, ou seja, o posicionamento do complexo 43S em mRNAs eucarióticos é ativado através de uma cadeia de interações *cap*-eIF4E-eIF4G-eIF3-40S (Kumar *et al.*, 2016).

Um dos exemplos de regulação no início da tradução é através da fosforilação de fatores do complexo eIF4F mais especificamente do fator eIF4E e de proteínas que se ligam ao eIF4E (Hinnebusch, 2014; Jackson *et al.*, 2010; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). Neste caso, a fosforilação do eIF4E correlaciona-se com níveis de tradução e crescimento celular, além de aumentar a afinidade deste pela estrutura *cap*. O grau de fosforilação de proteínas que se ligam ao eIF4E pode resultar no sequestro de eIF4E inibindo ou liberando-o para a maquinaria de tradução (Revisado por Freire *et al.*, 2011).

1.4 Complexo eIF4F em tripanossomatídeos

O complexo eIF4F que compreende as subunidades eIF4A, eIF4G e eIF4E, tem sido foco de maiores estudos. Tanto em parasitas do gênero *Leishmania* como *Trypanosoma*, têm sido identificados múltiplos homólogos para as três subunidades, para os quais ainda não se sabe a real função, mas se associam formando um novo padrão de complexos eIF4F-like (visado por Freire *et al.*, 2017B).

1.4.1 Múltiplos homólogos do fator eIF4A

O fator eIF4A foi o primeiro a ser identificado em tripanossomatídeos (Skeiky *et al.*, 1995). Posteriormente, foi definido que tripanossomatídeos contém dois homólogos do fator eIF4A, porém pouco se conhece a seu respeito. Em *Leishmania*, O fator LmEIF4A1 é cerca de 100 vezes mais abundante que LmEIF4A2 e também é o único que se liga ao fator eIF4G (Dhalia *et al.*, 2005). Em *T. brucei*, eIF4A foi caracterizado com mais detalhes. O fator TbEIF4Ai é uma proteína localizada abundantemente no citoplasma e, após RNAi sua redução para menos de 10% dos níveis normais reduziu drasticamente a síntese de proteínas e interrompeu a proliferação celular, sugerindo sua

participação na tradução. TbEIF4AIII é moderadamente expressa no núcleo e sua depleção interrompe a proliferação celular após aproximadamente quatro ciclos celulares. Além disso, analisando individualmente resíduos de aminoácidos, verificou-se que na verdade, o TbEIF4AIII seria ortólogo de eIF4AIII, um componente do complexo de junção de exons em células de mamíferos (Dhalia *et al.*, 2006).

1.4.2 Múltiplos homólogos do fator eIF4G

Em mamíferos eIF4G apresenta em sua região N-terminal uma hélice canônica com sequência aminoacídica YXXXXLΦ, na qual Φ representa aminoácidos hidrofóbicos, como motivo de ligação conservado para a eIF4E (Safaei *et al.*, 2012). Na região N-terminal também se encontra o sítio de ligação à PABP. Além disso, essa proteína apresenta três domínios: o primeiro localizado na região central, MIF4G, onde está presente o sítio de interação ao eIF4A, eIF3 e uma região de ligação a RNA (RRM); o segundo MA3, que funciona como um segundo sítio de ligação ao eIF4A; e o terceiro, W2, para ligação à proteína MnK1 (quinase de eIF4E1) (Marintchev & Wagner, 2005; Shatsky *et al.*, 2014).

Em tripanossomatídeos foram identificados 5 homólogos para o fator eIF4G que compartilham um domínio central conservado HEAT1-MIF4G (Dhalia *et al.*, 2005). Em tripanossomatídeos, pouco foi estudado a respeito dos homólogos de eIF4G, contudo sabe-se que EIF4G3 e EIF4G4, apesar de apresentarem a região N-terminal muito mais curta que a de mamíferos e leveduras, contém os motivos conservados de interação com EIF4E (Moura *et al.*, 2015). Em *T. brucei* todos os cinco fatores interagem com algum fator EIF4E. Sendo EIF4G1 e EIF4G2 com EIF4E5, EIF4G3 com EIF4E4, EIF4G4 com EIF4E3 e EIF4G5 com EIF4E6 (Freire *et al.*, 2011, 2014A; 2014B). Em *T. brucei* EIF4G2, EIF4G3, EIF4G4 e EIF4G5 foram identificados como fatores que promovem a regulação positiva da tradução (Klein *et al.*, 2015), e tanto em *T. brucei* quanto em *Leishmania*, EIF4G3 e EIF4G4 aparecem interagindo com EIF4E4 e EIF4E3 respectivamente, indicando a formação de complexos distintos eIF4F-like, onde ambos atuam na síntese de proteínas e têm sido subsequentemente estudados em maiores detalhes (Freire *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2015).

Os fatores EIF4G3 e EIF4G4 são citoplasmáticos, podem ser fosforilados, são moderadamente expressos e EIF4G3 é de três a quatro vezes mais abundante que EIF4G4, sendo EIF4G3 encontrado em níveis similares ao seu parceiro EIF4E4. Por outro lado, a abundância de EIF4G4 é cerca de dez vezes menor em quantidade que EIF4E3, motivos estes ainda não compreendidos (de Melo Neto *et al.*, 2016).

Tanto EIF4E3 quanto EIF4E4 são considerados importantes para a viabilidade dos parasitas, porém acredita-se que EIF4G3 seja o maior participante na iniciação da tradução, uma vez que, além atuar na tradução propriamente dita, EIF4G3 co-migra com EIF4E4 e EIF4A1 em polissomos em gradientes de sacarose, interage com o complexo eIF3 e em ensaio de *knockdown* em *T. brucei* reduzem o crescimento celular e a tradução global (de Melo Neto *et al.*, 2016).

Em muitos eucariotos o fator eIF4G pode circularizar o mRNA por interagir com proteínas de ligação à cauda poliA (PABP), promovendo a formação de um loop fechado que facilita a tradução e a reciclagem de ribossomos. Porém, estudos em leveduras mostraram que nem todos os mRNAs estão em loop fechado por interação eIF4G-PABP (Archer *et al.*, 2015). Trabalhos sugerem que em *Leishmania*, EIF4G3 interage com PABP1 por ensaio de *pull-down*, entretanto, esta interação não foi observada em ensaios de duplo-híbrido em leveduras. Por outro lado, em *Leishmania*, a interação de PABP1 com EIF4E4 foi observada. (Klein *et al.*, 2015; Moura *et al.*, 2015; Zoltner *et al.*, 2018).

1.4.3 Múltiplos homólogos do fator eIF4E

Em mamíferos, eIF4E1 ou apenas eIF4E, interage com o fator eIF4G e com o *cap* do mRNA. A interação com eIF4G ocorre através do motivo conservado VEDFW presente em eIF4E, e a interação com o *cap* do mRNA através dos resíduos W56, W102 e W166 presentes no *Cap-binding pocket* de eIF4E (Freire *et al.*, 2017B).

Trypanossomatídeos apresentam seis homólogos para eIF4E (Freire *et al.*, 2011; 2014A; 2014B), que exibem resíduos equivalentes responsáveis pela interação tanto com eIF4G quanto com o *cap* (Freire *et al.*, 2017B). Além disso, múltiplas isoformas foram identificadas para os vários homólogos deste fator em *Leishmania* e *Trypanosoma*, indicativas de modificações pós-traducionais mediadas por fosforilação, e estas modificações parecem estar associadas a fases específicas de crescimento dos parasitas (Pereira *et al.*, 2013). Ademais, acredita-se que cada complexo eIF4F-like, em que os eIF4Es estão inseridos, esteja relacionado à regulação do destino dos mRNAs em diferentes aspectos na iniciação da tradução (Freire *et al.*, 2017B).

Em *Leishmania*, os fatores EIF4E1-4 são citoplasmáticos, e a localização dos fatores EIF4E5 e EIF4E6 ainda não foram estudadas. Dentre os fatores estudados, EIF4E1 e EIF4E4 ligam-se fortemente ao *cap* ao contrário de EIF4E2 e EIF4E3. Em gradiente de sacarose EIF4E1 migra com a fração livre, enquanto que EIF4E2, EIF4E3 e EIF4E4 estão associados ao complexo 80S e polissomos (Yoffe *et al.*, 2006). Em ensaios de interação por *pull down* tanto EIF4E1 quanto EIF4E4 interagem com EIF4G3

e EIF4A1 (Yoffe *et al.*, 2009), mas por ensaio de duplo-híbrido apenas EIF4E4 interagiu com EIF4G3 (Zinoviev *et al.*, 2011). Neste mesmo trabalho a interação direta entre LmEIF4G3 com LmPABP1 não foi confirmada por duplo-híbrido, contudo, foi descoberta uma nova interação, a qual não é vista em nenhum outro eucarioto, LmEIF4E4-LmPABP1, envolvendo a extensão N-terminal de LmEIF4E4 (Zinoviev *et al.*, 2011). Posteriormente, em *L. infantum*, foi definido que esta interação é dependente de três motivos conservados, L/MN/DXXAXXY/FXP, localizados na região N-terminal de EIF4E4 (de Melo Neto *et al.*, 2015), sendo que esta região N-terminal estendida atua como um *core* molecular para que o complexo se ligue ao *cap* do mRNA (dos Santos Rodrigues *et al.*, 2019). A figura 4 explica esse processo de interação. As três sequências consenso conservadas são chamadas B1, B2 e B3. Este consenso delibera que o complexo baseado em EIF4E4 e EIF4G3 é fortemente associado com PABP1 e estas proteínas tem papel comum na tradução (Freire *et al.*, 2017B).

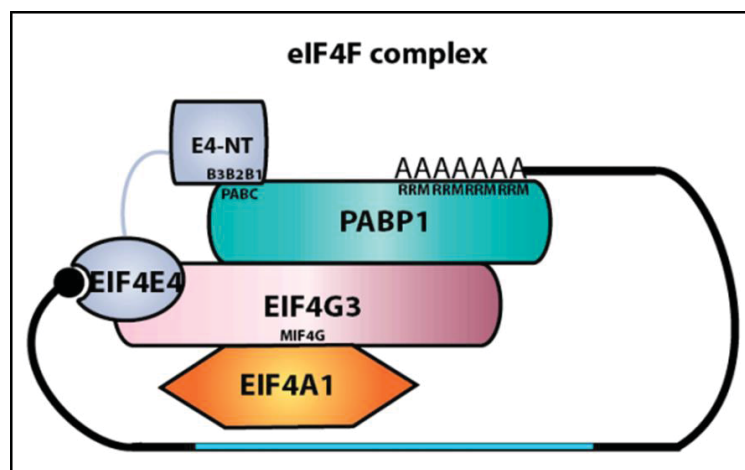


Figura 4. Complexo EIF4F formado por EIF4E, EIF4G e PABP. Em tripanossomatídeos, EIF4E4 forma o principal complexo envolvido na tradução, por interagir com EIF4G3 (o qual também se liga a EIF4A1) e com PABP1 através das três regiões consenso (B1, B2 e B3) contidas na região N-terminal de EIF4E4, a qual se liga ao domínio PABPC de PABP1. Figura adaptada de Freire *et al.*, 2017B.

Em *T. brucei*, dentre os seis homólogos estudados (eIF4E1-6), constatou-se que apenas EIF4E1 e EIF4E2 localizam-se no núcleo. Ambas as proteínas não interagem com nenhum dos eIF4Gs, e após RNAi em células procíclicas EIF4E1 e EIF4E2 apresentaram fenótipo celular similar, sem impacto significativo na sobrevivência celular. No entanto, o knockdown simultâneo de EIF4E1 e EIF4E2 levou as células a cessar a proliferação e morrer. Em células sanguíneas, o knockdown de EIF4E1 causou a parada no crescimento celular, ao contrário de EIF4E2 que não apresentou nenhum

efeito (Freire *et al.*, 2011). Recentemente, dois trabalhos apontam um possível papel para estes fatores, no primeiro o fator EIF4E1 foi apontado como supressor da tradução de mRNAs aos quais ele se liga (Klein *et al.*, 2015), e o segundo mostrou a associação de EIF4E2 com mRNAs maduros e a interação direta com uma proteína SLBP (*Stem-loop binding protein*), tornando EIF4E2 com potencial papel na seleção diferencial de mRNAs contendo estruturas *stem-loop* (Freire *et al.*, 2017A).

Dos homólogos de eIF4E, apenas EIF4E3 apresenta pouca afinidade pelo m⁷G cap. No entanto, tanto EIF4E3 como EIF4E4 são implicados como fatores que promovem a tradução (Freire *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2015) e demonstram indícios de atuarem ativamente na tradução pertencendo a dois complexos de iniciação distintos, de acordo com suas interações com os fatores EIF4G4 e EIF4G3, onde EIF4E4 se associa ao EIF4G3 e EIF4E3 interage com EIF4G4. Ambas são citoplasmáticas e o RNAi de EIF4E3 levou a parada da proliferação celular tanto em células procíclicas como em sanguíneas. Já EIF4E4, após knockdown em células sanguíneas houve parada na proliferação celular, contudo em células procíclicas não houve fenótipo. No entanto, ao realizar knockdown simultâneo de EIF4E4 e EIF4E1 em procíclicos um distinto fenótipo foi observado, parada na proliferação celular. Além disso, em ambas as formas do parasita o knockdown de EIF4E4 parece provocar um ligeiro aumento nos níveis de EIF4E3 (Freire *et al.*, 2011).

Com relação aos fatores EIF4E5 e EIF4E6 de *T. brucei*, ambos apresentam interação com EIF4G, onde EIF4E5 interage com EIF4G1 e EIF4G2 (Freire *et al.*, 2014B) e EIF4E6 interage com EIF4G5 (Freire *et al.*, 2014A). Estes fatores são caracterizados por formar complexos eIF4F-like incomuns, os quais interagem com proteínas que apresentam domínios encontrados em enzimas responsáveis pela adição e metilação do cap de mRNAs (Freire *et al.*, 2017B).

O complexo EIF4E5-EIF4G1 foi visto interagir com três principais proteínas, uma homóloga conhecida como 14-3-3 e duas hipotéticas nomeadas TbG1-IP e (TbEIF4G1 *Interacting Protein*) e RBP43 (Tb

G1-IP2). O complexo TbEIF4E5-TbEIF4G2 interage com três principais proteínas, duas homólogas de 14-3-3 e uma hipotética nomeada TbG2-IP (Figura 4). As proteínas 14-3-3 são proteínas que se ligam à fosfoserinas/fosfotreoninas envolvidas com fatores de sinalização e regulação de interação proteína-proteína. TbG1-IP apresenta os domínios *guanylyltransferase* e *methyltransferase*, que são encontradas em proteínas envolvidas na adição e modificação do cap de mRNAs durante a maturação. TbG2-IP é uma *RNA binding protein* putativa contendo dois domínios distintos associados com a interação com o RNA, contudo, sua função ainda é desconhecida. Sabe-se que TbG1-IP interage diretamente com TbEIF4G1, e em complexo, TbG1-IP

pode ou não interagir com a proteína 14-3-3. Acredita-se que a ausência de 14-3-3 do complexo TbEIF4E5–TbEIF4G1–TbG1-IP–TbG1-IP2, implique em uma troca dinâmica entre dois complexos baseados na interação TbEIF4E5–TbEIF4G1. O primeiro complexo pode incluir TbG1-IP na ausência de 14-3-3, enquanto que no segundo complexo pode ocorrer uma troca entre TbG1-IP e 14-3-3 (Figura 5) (Freire *et al.*, 2017B; 2014B).

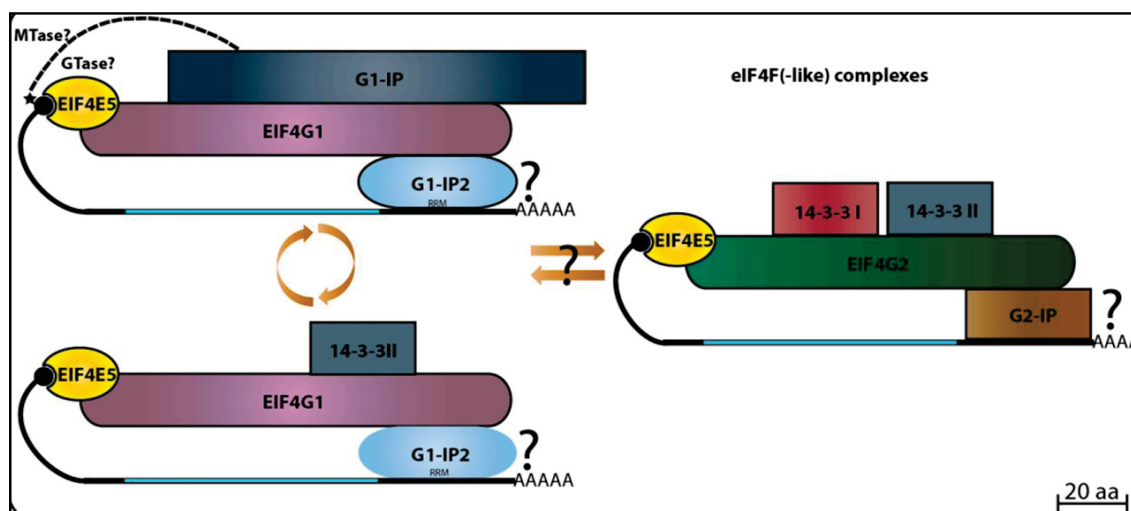


Figura 5. Representação esquemática dos complexos eIF4F-like formados por EIF4E5. Um complexo eIF4F-like formado por suas interações com EIF4G1, que se liga à proteína G1-IP2 e G1-IP (a qual parece ser regulada pela proteína homóloga 14-3-3). O segundo complexo de EIF4E5 é composto por sua interação com EIF4G2, a qual também se liga à proteína G2-IP. Fonte: Freire *et al.*, 2017B.

O fator EIF4E6 interage diretamente com o fator EIF4G5 e acredita-se que em *T. brucei* essa interação seja específica, uma vez que, nenhum outro EIF4E interage com EIF4G5 neste organismo. *In vivo*, o complexo TbEIF4E6-TbEIF4G5 interage com uma proteína hipotética nomeada TbG5-IP, a qual se liga diretamente à TbEIF4G5. Curiosamente, a proteína TbG5-IP apresenta domínios encontrados em enzimas envolvidas na formação do *cap* de mRNAs, como os domínios *nucleoside triphosphate (NTP) hydrolase* e *guanylyltransferase*. A interação entre proteínas com estes domínios e fatores de início de tradução era inédita até o momento, e levanta questões sobre possíveis funções atribuídas ao complexo EIF4E5 e EIF4E6. Embora nem o EIF4E5 nem o EIF4E6 possam desempenhar papéis na tradução geral, principalmente devido à sua baixa abundância e ao fato de que seu *knockdown* não afeta as taxas de tradução, eles podem ser requeridos para regular a tradução de mRNAs específicos, tornando

estes complexos como parte de novas vias que regulam a tradução de mRNA através de *decapping* e recapeamento seletivo dentro do citoplasma (Freire *et al.*, 2014A; 2017B; 2014B).

1.5 Homólogos do fator auxiliar PABP

Em eucariotos em geral, as PABPs são proteínas altamente conservadas que se ligam à cauda poliA de mRNAs (Kahvejian *et al.*, 2005). Duas PABPs foram descritas em eucariotos, PABP1 ou PABPC (citoplasmática) e PABP2 ou PABPN (nuclear) e são proteínas que apresentam múltiplas funções. PABP1 contém quatro motivos de reconhecimento de RNA (RRM) e um domínio C-terminal rico em prolina responsável por muitas interações proteína-proteína. Sua função vai desde a biogênese do mRNA até a estabilização do mRNA e tradução. Uma das principais funções de PABP1 é, ao interagir diretamente com o fator eIF4G, provocar a circularização do mRNA e estimular a tradução (Kahvejian *et al.*, 2005). PABP2 localiza-se em grânulos de intercromatina (*speckles*) sempre associada à cauda poliA de um mRNA e apresenta alta afinidade por cauda poliA nascente, estimulando sua extensão e controlando seu comprimento (Calado & Carmo-Fonseca, 2000).

Em tripanossomatídeos, proteínas homólogas à PABP foram identificadas, sendo duas em *T. cruzi* e *T. brucei* e três em *Leishmania* (Bates, 2000; da Costa Lima *et al.*, 2010; Batista *et al.*, 1994; Pitula *et al.*, 1998).

Em *Leishmania*, as três PABPs são citoplasmáticas, contudo, após inibição da transcrição com Actinomicina D, apenas PABP2 e PABP3 migram para o núcleo. PABP3 co-precipita com PABP2 independente de mRNA, indicando que ambas se ligam a mesma população de mRNAs e possam apresentar funções redundantes (da Costa Lima *et al.*, 2010; de Melo Neto *et al.*, 2016). PABP1 foi vista interagir em complexo com EIF4G3 através de ensaio de *pulldown* e curiosamente interage diretamente com EIF4E4 por duplo-híbrido (Zinoviev *et al.*, 2011). Recentemente, foi demonstrado que este diferente padrão de interação, entre a PABP1 e o EIF4E4 de *Leishmania*, funciona como uma ponte para aproximar as extremidades 5' e 3' do mRNA (Dos Santos Rodrigues *et al.*, 2018) (Figura 4). Em *T. brucei* as duas PABPs estimularam a tradução de um mRNA repórter por *tethered*, indicando papel relevante na tradução (Erben *et al.*, 2014). Além disso, tanto em *T. brucei* quanto em *T. cruzi*, ambas foram vistas migrar para grânulos em resposta a diferentes condições de estresse (Cassola *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2013; Kramer *et al.*, 2012).

1.6 Estocagem e degradação de mRNAs em eucariotos: grânulos de RNA

Em células de mamíferos e leveduras, os mRNAs podem se associar à diversas proteínas formando complexos ribonucleoproteicos (RNPs) chamados de “Grânulos de RNPs”. Os grânulos de RNPs são uma característica onipresente nas células eucarióticas, e são formados pela combinação somatória de interações entre proteína-proteína e RNA-RNA. Dentre os grânulos de RNPs citoplasmáticos já conhecidos, os mais bem estudados são chamados *Processing bodies (P-bodies)* e grânulos de estresse (GE) (Mittag and Parker, 2018), sendo que esses grânulos são determinados em função da presença de proteínas específicas (Quadro 2). A função exata dos grânulos de RNA ainda não é totalmente compreendida, mas estas estruturas apresentam papel importante na regulação da expressão gênica em eucariotos com funções na degradação, estocagem, distribuição e transporte de mRNAs nas células (Buchan, 2014).

Quadro 2. Componentes de *P-bodies* e grânulos de estresse

Nome	Função
Componentes encontrados predominantemente em <i>P-bodies</i>	
Complexo Ccr4/Pop2/Not	Deadenilase
Dcp1	Subunidade da enzima de retirada do <i>cap</i>
Dcp2	Enzima de retirada do <i>cap</i>
Edc1, Edc2 e Edc3	Ativadores de retirada do <i>cap</i>
eIF4E-T	Repressor da tradução
eRF1 e eRF3	Terminador da tradução
GW182	Função de miRNA
Hedls/Ge-1 e complexo Lsm1-7	Ativadores de retirada do <i>cap</i>
Pat1/PatL1	Repressor da tradução / ativadores de retirada do <i>cap</i>
Upf1-3	<i>Nonsense-mediated decay</i>
Componentes encontrados predominantemente em grânulos de estresse	
40S subunidade ribossomal	Tradução
Ataxin-2/Pbp1	Tradução / processamento de mRNA
DDX3/Ded1	RNA helicase
eIF2a, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G	Iniciação da tradução
FMRP	Tradução, repressão / função de miRNA
G3BP	Proteína estrutural, endorribonuclease

Pabp	Proteína de ligação à poliA
RACK1	Proteína estrutural, de sinalização
TIA-1/TIAR/Pub1/Ngr1	Repressão da tradução / estabilidade de mRNA
Componentes encontrados em ambos grânulos de estresse e <i>P-bodies</i>	
Proteínas Agonautas	Função de miRNA
Dhh1/Rck/p54	Repressor da tradução / ativador de retirada do <i>cap</i>
eIF4E	Iniciação da tradução
FAST	Fosfoproteína <i>Fas activated serine/threonine</i>
Rap55/Scd6	Repressor da tradução
Xrn1	Exonuclease 5' – 3'

Adaptado de: (Decker & Parker, 2012).

Os GE e *P-bodies* (PB) são estruturas citoplasmáticas dinâmicas ausentes de membrana (Guzikowski *et al.*, 2019), que se caracterizam por complexos ribonucleoproteicos formados na presença de mRNAs e que participam ativamente no metabolismo de RNA determinando o destino de mRNAs que não estão sendo traduzidos, seja mantendo-os estabilizados ou levando-os às vias de degradação (Kramer, 2014). No entanto, vários estudos revelam novas proteínas e RNAs que são componentes dessas estruturas e que também executam outras funções celulares. As proteínas que medeiam *splicing*, transcrição, adesão, sinalização e desenvolvimento estão integradas com a formação de GE e *P-bodies* (Anderson & Kedersha, 2007). Recentemente, novas proteínas foram identificadas em *P-bodies* incluindo enzimas modificadoras de mRNA (TUT4, APOBEC3F), *RNA binding proteins* (PUM1/2, STAU2, HNRNPU) e miosinas (MYO6), potencialmente sugerindo um link entre *P-bodies* e citoesqueleto (Hubstenberger *et al.*, 2017). Curiosamente, proteínas que reconhecem tanto estruturas secundárias de RNA como G-quadruplexes (FXR1, FMR1) quanto a *epitranscricional RNA modification* N⁶-metiladenosina (m⁶A) (YTHDF1 / 2/3) são enriquecidos em GEs. De forma semelhante, o YTHDF2, um leitor de m⁶A, é um componente de PB recentemente identificado. Portanto, as estruturas de RNA e modificações reconhecidas por essas proteínas podem fornecer meios para determinar a especificidade no direcionamento de certos mRNAs para grânulos de mRNP, embora a validação experimental deste potencial mecanismo ainda não tenha sido realizado (Grams *et al.*, 2002; Guzikowski *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2018). Assim, a função destes grânulos vai muito além de controladores do destino de mRNA entre tradução e degradação. Cada um pode existir de forma independente, abrigando componentes específicos e desempenhando funções autônomas. Contudo, quando são

coordenadamente induzidos podem manter-se unidos em uma “dança citosólica”, tornando-se potencialmente acoplados e trocando seus componentes, podendo compartilhar substratos de mRNA, propriedades dinâmicas e muitas proteínas tornando-se espacialmente e funcionalmente ligados (Anderson & Kedersha, 2007; Guzikowski *et al.*, 2019).

De forma geral, os GE são os primeiros grânulos observados sob condições de estresse (Anderson & Kedersha, 2007). Sua composição sugere que são formados por agregados de mRNAs estagnados no processo de início de tradução, quando a tradução está inibida. Acredita-se que RNAs não traduzidos sofrem um processo de compactação que leva a aproximação das extremidades 3' e 5' (Khong & Parker, 2018), estimulando a interação entre RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína, favorecendo a formação de grânulos de estresse (Khong & Parker, 2018; Treeck *et al.*, 2018). Os GEs também são definidos pela presença de um grupo diverso de proteínas, alguns até mesmo sem ligações conhecidas para o metabolismo do RNA (Anderson & Kedersha, 2007). Apresentam proteínas envolvidas com a repressão da tradução como CIRP, DDX3 (Ded1 em leveduras), FXR1/2, Staufen1 (Guzikowski *et al.*, 2019). Porém, uma das principais classes a ser definida consiste em complexos de iniciação da tradução ainda ligados ao mRNA após a desmontagem de polissomos. Esta categoria inclui mRNA, eIF2A, eIF3, eIF4F (compreendendo eIF4E, eIF4A e eIF4G), eIF4B, subunidade ribossomal 40S e PABP-1 (Guzikowski *et al.*, 2019; Kedersha *et al.*, 2002).

Os *P-bodies*, que são geralmente vistos em todos os tipos celulares (Buchan, 2014) são agregados de mRNPs relacionados à degradação de mRNAs e a fatores que inibem o processo de tradução. Com isso, inicialmente foi hipotetizado que PBs eram sítios de degradação de mRNAs. Contudo, posteriormente foi demonstrado que mRNAs podem sair de *P-bodies* e serem traduzidos em polissomos (Luo *et al.*, 2018). PBs estão presentes nas células não estressadas, mas sua formação é ainda mais induzida em resposta ao estresse ou outras condições que levem à inibição da tradução. A composição total dos PBs ainda não está determinada. No entanto, podem-se citar alguns componentes já identificados nesses grânulos: proteínas da maquinaria de degradação, as quais incluem as enzimas de *deccapping* Dcp1p/Dcp2p, os ativadores de *deccapping* Dhh1p/RCK/p54, Pat1p, Scd6p/RAP55, Edc3p, o complexo Lsm1-7, e a exonuclease 5'→3' Xrn1 (Parker & Sheth, 2007; Teixeira *et al.*, 2005). Recentemente, estudos com espectrometria de massas têm identificado outros componentes de *P-bodies*, como Dcp1a/b, Edc3, Edc4, Lsm14a, Pat11, e 4E-T/eIF4ENIF1 (Ayache *et al.*, 2015; Bish *et al.*, 2015).

1.7 Grânulos de mRNA em tripanossomatídeos

Diferentes tipos de grânulos de RNA já foram identificados em tripanossomatídeos: Grânulos contendo LeishIF4E3 (Shrivastava *et al.*, 2019); grânulos de pequenos RNAs transportadores (tRNA halves); Grânulos perinucleares (GPNs); grânulos de estresse por choque térmico; grânulo de pólo posterior; grânulos de estresse nutricional; grânulos semelhantes a *P-bodies* (Kramer, 2014).

Os grânulos contendo LeishIF4E3, foram descritos recentemente durante o estresse nutricional com privação de purinas, onde sob tais condições, em que o processo de tradução desacelera, LeishIF4E3 é fosforilada e migra para grânulos. Estes grânulos apresentam uma variedade de proteínas ribossômicas, junto com *RNA binding proteins*, e mRNAs. Acredita-se que estes grânulos armazenem transitoriamente partículas ribossômicas bloqueadas e mRNAs inativos. Diferentes de outros grânulos descritos em tripanossomas, os grânulos contendo LeishIF4E3 não contém enzimas de degradação de RNA, sugerindo que sua função seja principalmente para estocagem até que as condições de estresse se normalizem (Shrivastava *et al.*, 2019).

Os grânulos de pequenos RNAs transportadores (tRNA halves) foram identificados no citoplasma de *T. cruzi* sob condições de estresse nutricional e, acredita-se que esses grânulos, sob a ação de pequenos tRNAs halves guias, participem no processo da repressão da tradução (Garcia-Silva *et al.*, 2010).

Os grânulos perinucleares (GPNs) possuem propriedades semelhantes aos grânulos germinativos encontrados em *C. elegans*, como por exemplo, localização na periferia do núcleo e formação a partir do acúmulo de pré-mRNA quando o *trans-splicing* é inibido. Em tripanossomatídeos, acredita-se que os GPNs atuem na triagem e no controle de qualidade de mRNAs, pois foram encontradas nestes grânulos, proteínas de ligação à RNAs, de iniciação da tradução e de degradação de mRNA (Costa *et al.*, 2018; Kramer, 2014; Kramer *et al.*, 2012; Sheth *et al.*, 2010).

Os grânulos de estresse por choque térmico não apresentam função conhecida, foram identificados em culturas procíclicas de *T. brucei*, podendo abrigar proteínas que podem estar presentes em *P-bodies* como a XRNA (homóloga de Xrn1 de mamíferos), bem como proteínas não pertencentes à *P-bodies* como a PABP1. (Kramer *et al.*, 2008).

Os grânulos de estresse nutricional foram primeiramente identificados em *T. cruzi* e *T. brucei* através da privação extrema de nutrientes em cultura *in vitro*. Os GSs são maiores que os *P-bodies* e são capazes de armazenar e estabilizar os mRNAs durante o momento de estresse nutricional. Esses grânulos podem conter as proteínas Dhh1, XRNA, SCD6, eIF4E1-3, PABP1 e PABP2, proteínas que se ligam a uridina UBP1-2, proteínas que se ligam a RNA RBP3,4,5a,6b, DRBD3 e ALBA1-4 (Cassola *et*

al., 2007; Holetz *et al.*, 2007; Kramer, 2014). Além disso, esses grânulos podem conter homólogos dos fatores de início de tradução eIF2 α e eIF3B, proteínas ribossomais e ortólogos do eIF4G (Kramer *et al.*, 2008).

Em *T. brucei*, o grânulo de pólo posterior compartilha a exonuclease 5'-3' XRNA e proteína ALPH1, a recém identificada *deccaping* de tripanossomatídeos. Esse grânulo aumenta seu tamanho significativamente com o choque térmico neste parasita (Kramer, 2017; Kramer *et al.*, 2008).

Nos grânulos semelhantes a *P-bodies* tem sido relatada a presença de algumas proteínas homólogas de outros eucariotos como Dhh1, XRNA, PUF6, SCD6 e RP55 (também conhecida por LSM14) (Cassola, 2011). Também foi relatada a presença da *deccaping* ALPH1. Essa proteína é uma fosfatase que co-localiza com XRNA em *T. brucei*, sua depleção é letal para a célula e causa um aumento massivo nos mRNAs totais que estão desadenilados (Kramer, 2017). Em *T. cruzi*, os *P-bodies* foram inicialmente descritos em 2007 por Holetz e colaboradores ao identificarem uma proteína homóloga à proteína marcadora de grânulos de RNA de levedura, Dhh1. TcDHH1, está presente em grânulos citoplasmáticos e em complexos independentes de polissomos. O número de grânulos que contém TcDHH1 depende da disponibilidade dos mRNAs. Em análises do complexo proteico que contém TcDHH1, foi visto que estão presentes também proteínas componentes de grânulos de estresse, como proteínas de choque térmico e subunidade ribossomal (Holetz *et al.*, 2007; 2010). Assim como DHH1, a exonuclease XRNA, sabidamente presente em *P-bodies* em outros eucariotos e envolvidas no processo de degradação dos mRNAs, foi inicialmente caracterizada em *T. cruzi*, mostrando-se presente em *foci* citoplasmáticos que lembram estruturas *P-body-like* (Cassola *et al.*, 2007). XRNA em *T. brucei* mostrou-se essencial e sua depleção levou ao acúmulo de mRNAs (Li *et al.*, 2006). Recentemente, nosso grupo, mostrou que TcXRNA apresenta localização celular citoplasmática granular, é constitutivamente expressa ao longo da metaciclogênese, acumula-se ao redor do núcleo e co-localiza parcialmente com TcDHH1, sendo que a interação entre ambas as proteínas parece ocorrer principalmente ao redor do núcleo. Essa co-localização parcial sugere a existência de grânulos distintos em *T. cruzi*. (Costa *et al.*, 2018).

1.8 Controle da expressão gênica: Ciclo dinâmico do mRNA - tradução, estocagem e degradação

A expressão gênica é regulada em múltiplos níveis e de diversas maneiras, e a célula necessita integrar e coordenar suas diferentes etapas de controle para expressar a informação do genoma. Dentre os níveis de regulação da expressão de genes

destaca-se a regulação pós-transcricional, que envolve a reciclagem dos transcritos e o controle na tradução (Mata *et al.*, 2005).

Como descrito anteriormente, mRNAs que não estão engajados na tradução podem ser agregados em grânulos citoplasmáticos de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNPs) como os grânulos de estresse e os *P-bodies*, os quais atuam ativamente no controle da tradução. Esta dança dos mRNAs entre os diferentes compartimentos celulares recebe o nome de “Ciclo do mRNA” (Figura 6) pelo fato de que os mRNAs podem mover-se entre polissomos, *P-bodies* e grânulos de estresse (Decker & Parker, 2012).

A tradução dos mRNAs é altamente regulada, com muitos mecanismos que afetam a montagem dos complexos de iniciação e a habilidade do ribossomo em se ligar ao mRNA. Amplos mecanismos de controle traducional que agem em muitos mRNAs incluem a fosforilação do fator eIF2 α por quinases responsivas à vários mecanismos de estresse, os quais limitam o nível de complexo ternário e as taxas de iniciação da tradução, facilitando a montagem dos grânulos de estresse. Outro mecanismo regulatório é através do sequestro do fator de ligação ao *cap* eIF4E por proteínas 4E-BPs, um processo altamente regulado por vias de sinalização do complexo mTOR, a qual integra muitos fatores de crescimento e sinais nutricionais para regular a taxa geral de síntese de proteínas, favorecendo a formação de grânulos de estresse e de *P-bodies*, onde as próprias proteínas 4E-BP e TORC1 podem ser encontradas (Buchan, 2014).

A tradução e a maquinaria de degradação competem pelo acesso ao mRNA. A competição entre os dois processos foi primeiramente sugerida pela observação de que a remoção da cauda poliA e da estrutura *cap*, sejam passos chave na degradação do mRNA. Ademais, a inibição da tradução por estruturas secundárias na 5' UTR, inibidores da iniciação da tradução e mutações em fatores de início de tradução aumentam as taxas de desadenilação e *decapping*. Contudo, este processo pode ser inibido e/ou dificultado pelo fator eIF4E e pela proteína PABP, uma vez que eIF4E se liga ao *cap* do mRNA estimulando a tradução e PABP se liga à cauda poliA do mRNA protegendo-o de degradação via desadenilação. No contexto geral, acredita-se que durante a etapa de competição, uma estrutura dinâmica semelhante à mRNP possa se formar no *cap* do mRNA, onde fatores de início de tradução e fatores de degradação se misturam até que ocorra a troca completa da maquinaria de iniciação da tradução pela maquinaria de degradação (Decker & Parker, 2012).

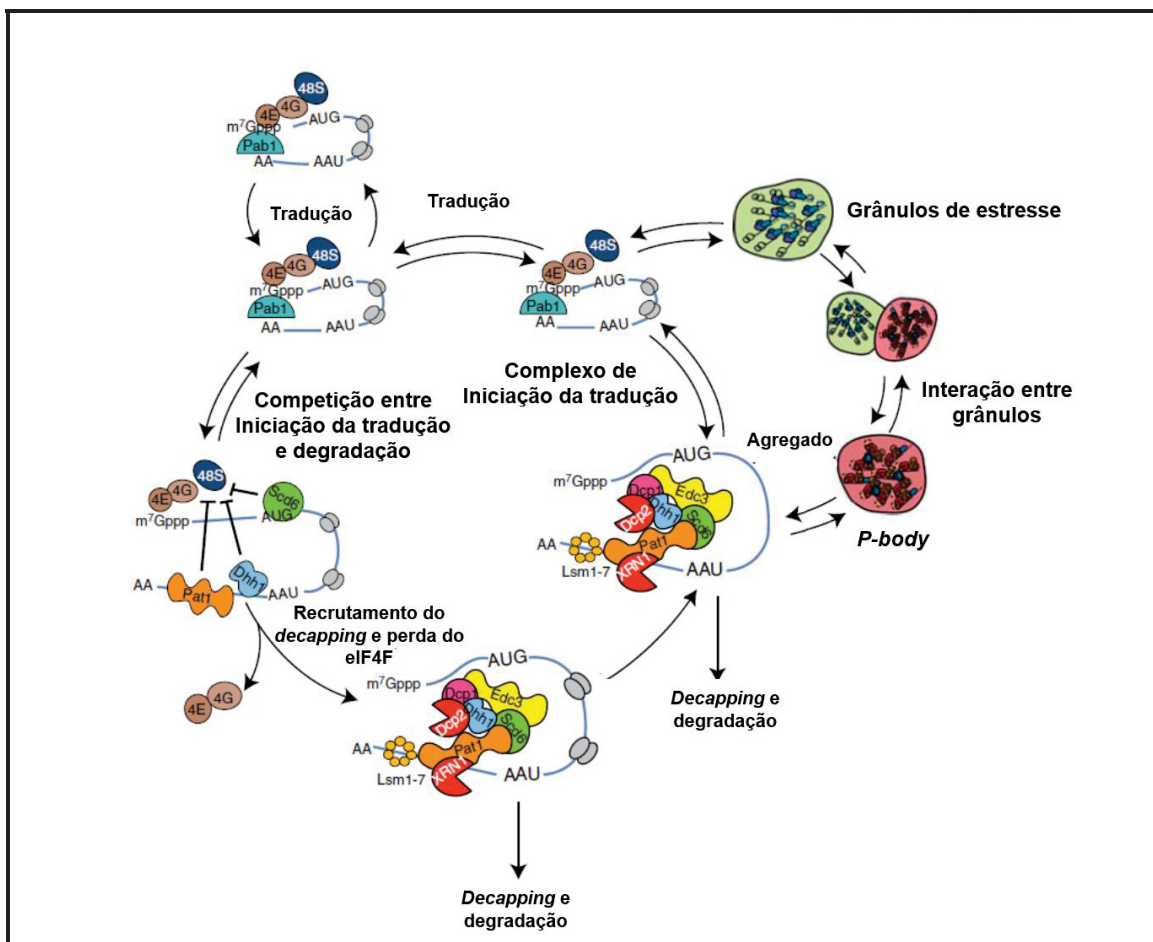


Figura 6. Modelo do ciclo dinâmico de mRNAs entre a tradução, estocagem em GE e degradação em P-bodies. Fonte: (Decker & Parker, 2012).

As diferenças apresentadas até o momento entre eucariotos em geral e tripanossomatídeos possivelmente reflete características específicas no metabolismo de RNA de cada organismo. A ideia de que fatores de início de tradução e componentes da maquinaria de estocagem/degradação estejam totalmente implicados neste metabolismo torna relevante entender como está disposto o ciclo dinâmico do mRNA em *T. cruzi*. Além disso, a multiplicidade dos fatores de início de tradução, bem como sua possível atuação tanto na tradução como na regulação da tradução e a suposição da coexistência de grânulos de mRNA em tripanossomatídeos, aliados ao fato de que os grânulos aumentam em número em condições de estresse celular, semelhante a grânulos de estresse e *P-bodies*, sugerem uma significativa mobilização dos mRNAs entre esses grânulos e a maquinaria de tradução.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi entender a dinâmica dos mRNAs no citoplasma com o intuito de compreender a regulação da tradução e sua ligação com o controle da expressão gênica em *T. cruzi*, buscando conhecer como este parasita regula seus genes, focando na regulação da tradução e os mecanismos que a cercam.

Acreditamos que a realização desta proposta científica permitirá um avanço importante na compreensão dos mecanismos de regulação da expressão gênica neste parasita. Os resultados podem ser também utilizados para entender processos regulatórios fundamentais em outros parasitas patogênicos como *Leishmania* e *T. brucei* devido às semelhanças em nível evolutivo e dos mecanismos de regulação. Esperamos que com esta abordagem seja possível identificar moléculas chaves que permitirá no futuro, dispor de alvos para o desenho racional de novas drogas tripanocidas.

Neste trabalho nós identificamos em *T. cruzi* diferentes complexos eIF4F-like, alguns já descritos em *T. brucei* e *Leishmania*, como por exemplo a interação entre TcEIF4E3 com TcEIF4G4 e TcEIF4E4 com TcEIF4G3, os quais são complexos engajados na tradução. Verificamos também a existência de três novas interações entre fatores de início de tradução, EIF4E3:PABP1, EIF4E3:PABP2 e EIF4E5:EIF4G5, interações que ainda não foram descritas em nenhum outro organismo. Vimos também que TcEIF4E5 e TcEIF4G5 co-localizam principalmente na periferia do núcleo, local onde ocorre intenso processo traducional e regulatório de mRNAs. Estes dados são fortemente relevantes, pois contribuem para o entendimento funcional da multiplicidade dos complexos eIF4F-like de *T. cruzi*.

Nosso trabalho também constatou que *T. cruzi* não apresenta diferença significativa na expressão de genes em nível de mRNA entre as formas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional. Verificamos que ao ser submetido ao estresse nutricional o parasita diminui consideravelmente a tradução de proteínas. As análises do RNA-seq dos imunocomplexos de TcXRNA e TcDHH1 mostraram que estas proteínas interagem com mais mRNAs em parasitas epimastigota do que quando o parasita está sob estresse nutricional. Ao classificar os processos biológicos em que os mRNAs estão envolvidos em cada condição de cultivo dos parasitas, vimos que em epimastigota TcXRNA interage com mRNAs codificantes de proteínas envolvidas principalmente com processos metabólicos e biossintéticos. Ademais, em parasitas sob estresse nutricional a interação ocorre principalmente com mRNAs codificantes de proteínas envolvidas com processos metabólicos, resposta ao estresse e reparo de DNA. Os resultados obtidos para TcDHH1 mostraram que esta proteína interage principalmente com mRNAs codificantes de proteínas envolvidas com processos metabólicos, catabólicos e transporte em parasitas epimastigota. Já em parasitas sob estresse, além da interação com mRNAs codificantes de proteínas envolvidas com processos metabólicos, identificamos principalmente a interação com mRNAs de processos biossintéticos e organização de complexos proteína-DNA. Esses dados juntos fortalecem a ideia de que o controle da expressão de genes neste organismo ocorra predominantemente em nível

pós-transcricional, e que o controle da tradução é uma etapa importante para a regulação da expressão de genes em *T. cruzi*.

2. OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo estudar a regulação da expressão gênica do *Trypanosoma cruzi* em nível pós-transcricional, caracterizando o ciclo dinâmico dos mRNAs neste organismo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS/METAS

1. Identificar a interação entre os diferentes homólogos dos fatores de início da tradução em *T. cruzi*

Meta 1 – Verificar a interação dos fatores TcEIF4E1-6 com TcEIF4G1-5 e TcPABP1-2 por ensaio de Duplo-híbrido em leveduras.

Meta 2 – Confirmar interações inéditas do duplo-híbrido por ensaio de co-precipitação e imunofluorescência.

2. Identificar RNAs poliA total em parasitas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional

Meta 1 - A partir de pelo menos três réplicas biológicas dos parasitas epimastigotas e dos parasitas submetidos a estresse nutricional, extrair mRNAs totais por reagente TRIzol e obter frações enriquecidas para mRNA poliA.

Meta 2 – Sequenciar os mRNAs poliA através da plataforma Illumina disponível no Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ.

Meta 3 – Analisar os dados obtidos do sequenciamento utilizando ferramentas de bioinformática. Mapear as sequências gênicas obtidas utilizando genoma de referência. Determinar a expressão diferencial entre ambas as condições de crescimento do parasito.

3. Identificar mRNAs associados à maquinaria de tradução em parasitas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional

Meta 1 - A partir de pelo menos três réplicas biológicas dos parasitas epimastigotas e dos parasitas submetidos a estresse nutricional, isolar os complexos Ribossomo-mRNA e purificar os fragmentos de mRNAs protegidos pela técnica de *Ribosome Footprinting*.

Meta 2 – Sequenciar os fragmentos de mRNAs obtidos pelo *footprinting* através da plataforma Illumina disponível no Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ.

Meta 3 – Analisar os dados obtidos do sequenciamento utilizando ferramentas de bioinformática. Mapear as sequências gênicas obtidas utilizando genoma de referência. Determinar a expressão diferencial entre ambas as condições de crescimento do parasito. Calcular a eficiência traducional para cada mRNA em ambas as condições.

4. Identificar mRNAs presentes nos complexos ribonucleoproteicos que contêm as proteínas TcDHH1 e TcXRNA em parasitas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional

Meta 1 - A partir de pelo menos três réplicas biológicas dos parasitas epimastigotas e dos parasitas submetidos a estresse nutricional, isolar os mRNAs associados às proteínas marcadoras de grânulos de RNA (TcDHH1 e TcXRNA) por ensaio de imunoprecipitação através da etiqueta GFP.

Meta 2 – Sequenciar os mRNAs através da plataforma Illumina disponível no Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ.

Meta 3 – Analisar os dados obtidos do sequenciamento utilizando ferramentas de bioinformática. Mapear as sequências gênicas obtidas utilizando genoma de referência.

3. CAPITULO 1

**Novel protein interactions for the translation initiation factor EIF4E homologs in
*Trypanosoma cruzi***

Autores: Jimena Ferreira da Costa, Henrique Preti, Bruno Moisés de Matos, Eden Ribeiro Freire, Camila Sayuri Tominaga da Cunha, Beatriz Gomes Guimarães, Nilson Zanchin, Bruno Dallagiovanna, Fabiola Barbieri Holetz.

Artigo científico em preparação para ser enviado para a revista PlosOne.

Muitos estudos têm demonstrado a importância dos fatores de início de tradução na regulação da tradução, bem como na expressão de genes em células eucarióticas. Em tripanossomatídeos os fatores de início de tradução, principalmente os homólogos que compreendem o complexo eIF4F e o fator auxiliar PABP, tem sido extensivamente estudados em *Leishmania* e *T. brucei* devido a grande multiplicidade destes fatores, contudo, até o momento, nada se conhecia a respeito destes fatores em *T. cruzi*. Por esse motivo, este trabalho idealizou como um dos principais objetivos, primeiramente identificar a formação de possíveis complexos eIF4F-like em *T. cruzi*, a fim de iniciar o processo de entendimento da disposição destes fatores para a maquinaria de início de tradução neste organismo.

Para a execução desta etapa, foi necessária uma busca extensiva nos bancos de dados para identificar as sequências dos genes que codificam as proteínas homólogas de eIF4E, eIF4G e PABP. Para esse fim, foram utilizados como base IDs de *Leishmania* e *T. brucei* já identificados e disponibilizados na literatura (da Costa Lima *et al.*, 2010; Freire *et al.*, 2011; 2014A; 2014B; Reis, 2009).

Tendo em mãos as sequências dos genes de *T. cruzi*, a primeira meta foi identificar a interação direta entre os todos os seis fatores TcEIF4Es, os cinco TcEIF4Gs e as duas TcPABPs. Para isso, realizamos ensaios de duplo-híbrido em levedura, utilizando duas cepas (MAV e Y), onde identificamos interações já descritas em outros tripanossomatídeos, bem como três novas interações TcEIF4E3-TcPABP1; TcEIF4E3-TcPABP2 e TcEIF4E5-TcEIF4G5, as quais, até o momento, foram identificadas apenas em *T. cruzi* e reportadas neste trabalho. As novas interações descobertas nos impulsionaram a confirmá-las *in vivo*. Assim, a segunda meta, foi produzir parasitas transfectantes expressando as proteínas TcEIF4E3 e TcEIF4E5 fusionadas à etiqueta GFP, que permitiram a realização de ensaios de imunoprecipitação seguidos de espectrometria de massas, confirmando as novas interações relatadas por duplo-híbrido. Com a imunoprecipitação de TcEIF4E3GFP foram identificados também os fatores TcEIF4G4 e TcEIF4A1. E através de imunoprecipitação de TcEIF4E5GFP, foram identificadas as proteínas RBP43 (também nomeada G1IP2), PABP2, G1IP1, 14-3-3, G2IP e G5IP, os quais são relatados como importantes parceiros para a formação e função dos complexos eIF4F-like de tripanossomatídeos no que diz respeito a regulação de genes nestes organismos (Clayton, 2019; Freire *et al.*, 2017B).

Em parceria com a Dra. Beatriz Guimarães do laboratório de Biologia Estrutural e Engenharia de Proteínas do Instituto Carlos Chagas, foram produzidos anticorpos anti-TcEIF4G5 e, através de ensaio de imunofluorescência indireta, o qual se tornou meta desta tese, foi possível visualizar a co-localização entre TcEIF4E5GFP e TcEIF4G5. Este ensaio mostrou que assim como TcEIF4E5, TcEIF4G5 apresenta localização distribuída pelo citoplasma da célula e com maior concentração na periferia do núcleo. Ainda em colaboração com a Dra. Beatriz Guimarães e com o Dr. Nilson Zanchin, um importante experimento de termoforese em microescala foi realizado em seu laboratório. Neste ensaio foi comprovada, mais uma vez, que TcEIF4E5 e TcEIF4G5 interagem *in vitro*, e que esta interação é mediada pela região N-terminal de TcEIF4G5. Este resultado reforçou os achados apresentados nesta tese e contribuiu para realização do primeiro artigo.

Outra parceria importante que gerou resultados de relevância e que contribuíram para a elaboração do primeiro artigo foi com o Dr. Eden Ribeiro Freire do laboratório de Regulação Gênica do Instituto Carlos Chagas. O Dr. Eden comparou as sequências dos homólogos dos fatores eIF4E, eIF4G e PABP de *T. cruzi* com *Homo sapiens*, *T. brucei* e *L. major*. Esta análise mostrou que os homólogos de EIF4E de *T. cruzi* apresentam maior nível de identidade com os homólogos de *T. brucei*. Além disso, TcEIF4E2 apresenta maior identidade de aminoácidos com eIF4E1 de humanos. Por outro lado, TcEIF4E6 é o fator mais divergente. Com relação aos homólogos de eIF4G, o nível de identidade também foi maior com *T. brucei*, e TcEIF4G3 é o mais similar ao eIF4G1 de humanos. Dentre as PABPs, TcPABP1 é a mais similar com a PABP de *Homo sapiens*, e TcPABP2 apresenta maior identidade com as homólogas dos outros tripanossomatídeos.

Outros resultados obtidos pelo Dr. Eden foram através do alinhamento das sequências proteicas dos homólogos de eIF4E3 e eIF4E4 de *T. cruzi* com os homólogos de *T. brucei* e *L. major*. Estas análises identificaram que, assim como nos outros tripanossomatídeos, TcEIF4E3 e TcEIF4E4 também apresentam o motivo PAM2 na região N-terminal, o qual é responsável pela interação com o domínio MLLE contido na região C-terminal das proteínas PABPs. Análise semelhante foi realizada também para os fatores TcEIF4G1 e TcEIF4G5. As sequências proteicas destes fatores foram alinhadas com sequência de *H. sapiens*, e foi possível identificar que TcEIF4G5 contém um motivo putativo de ligação à eIF4E, e além disso, tanto TcEIF4G5 quanto TcEIF4G1, o qual também interagiu diretamente com TcEIF4E5, apresentam uma sequência YXXXXΩΦ relacionada ao domínio MIF4G, que poderia estar envolvida na interação específica entre os homólogos de eIF4G com TcEIF4E5.

Os resultados obtidos neste capítulo reforçam a ideia de que os fatores de início de tradução podem apresentar um papel importante na tradução propriamente dita ou na regulação da tradução, abrindo espaço para novos estudos sobre a disposição e papel destes fatores para a realização efetiva do controle da expressão de genes em tripanossomatídeos. Sabe-se que em eucariotos, os fatores de início de tradução e as proteínas que compreendem os grânulos de estocagem/degradação competem pelo acesso ao mRNA, interconectando os processos de estocagem/degradação e tradução, promovendo o “Ciclo dos mRNAs” (Decker & Parker, 2012). A maneira como os fatores de início de tradução estão envolvidos com esta regulação, no que diz respeito à mobilização dos mRNAs tanto para serem efetivamente traduzidos, como estocados ou entregues para degradação, ainda precisa ser elucidada. Contudo, nesta tese, foi possível iniciar o estudo do Ciclo dos mRNAs entre a tradução, estocagem e degradação em *T. cruzi*, o qual está descrito no capítulo 2.

Novel protein interactions for the translation initiation factor EIF4E homologs in

Trypanosoma cruzi

Jimena Ferreira da Costa^{1,2}, Henrique Preti¹, Bruno Moisés de Matos¹, Eden Ribeiro Freire¹, Camila Sayuri Tominaga da Cunha¹, Beatriz Gomes Guimarães¹, Nilson Zanchin¹, Bruno Dallagiovanna^{1,2}, Fabiola Barbieri Holetz^{1*}.

¹ Carlos Chagas Institute, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ-PR, Curitiba, Paraná, 81350-010, Brazil.

² Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, 81530-000, Brazil.

*To whom correspondence should be addressed at: Laboratório de Regulação da Expressão Gênica. Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ-PR, Curitiba, Paraná, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775, CIC, 81830-010, Brazil.

Tel: +55 41 21043231

Email: fabiola.holetz@fiocruz.br

ABSTRACT

Trypanosomatids show predominantly post-transcriptional regulation of gene expression. An important part of this regulation takes place during mRNA translation, especially at the initiation phase, which is the step when translation factors recruit mRNAs to the ribosomes to start synthesis of new proteins. Trypanosomatids presents multiple homologs of the translation initiation factors eIF4E and eIF4G and 2-3 homologs of the poly-adenylate binding protein (PABP), which form different eIF4F-like complexes. Depending on the composition of the eIF4F-like complexes, they can either promote or inhibit translation. In this work, we initially tested the interactions between the six *T. cruzi* eIF4E homologs with all five eIF4G and the two PABP homologs by using the two-hybrid system in two different yeast strains. We have identified eight interactions already described for other trypanosomatids and three new interactions involving TcEIF4E3 and TcPABP1, TcEIF4E3 and TcPABP2 and TcEIF4E5 and TcEIF4G5. The new interactions were confirmed by immunoprecipitation followed by protein identification by mass spectrometry. This analysis revealed four additional interactions. The direct interaction

between TcEIF4E5 and TcEIF4G5 was further confirmed *in vitro* by microscale thermophoresis using recombinant proteins. Our results showed that this interaction is mediated by the N-terminal region of TcEIF4G5. In addition, we demonstrated that TcEIF4E5 and TcEIF4G5 colocalize in the periphery of the nucleus, where several proteins involved with the translation and regulation of translation are concentrated. The interaction between TcEIF4E5 and TcEIF4G5 as well as its perinuclear localization suggests that these proteins may be involved in a specific translation complex in *T. cruzi*.

Keywords: TcEIF4E5; TcEIF4G5; yeast two-hybrid screen; translation complex; *T. cruzi*.

Funding details This work was supported by the Fundação Araucária [05/2016]; Fundação Oswaldo Cruz; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [CAPES: JFC fellowship].

Disclosure statement: The authors report no conflict of interest.

1. INTRODUCTION

The translation process in eukaryotes comprises four main stages: initiation, elongation, termination and recycling of ribosomes¹. The initiation stage involves all the steps that precede formation of the first peptide bond and is the one most subjected to regulatory mechanisms². Eukaryotes have a complex translation initiation pathway, depending on the action of proteins called eukaryotic initiation factors (eIFs) and their auxiliary factors. There are at least 12 known eIFs, most them multiprotein complexes, organized in six groups (eIF1, eIF2, eIF3, eIF4, eIF5 and eIF6) taking into account the step in which they act according to the current models for translation initiation. The eIFs mediate the recruitment by ribosomal subunits, of the starter methionyl-tRNA and assembly of the complete ribosome on the AUG start codon of the mRNA to initiate translation^{2,3,4}.

In cap-dependent translation, the eIF4F complex formed by the subunits EIF4E, EIF4A and EIF4G is responsible for recognition of the mRNA by the ribosomes⁵. EIF4E specifically binds to the 5' cap structure of the mRNA and recruits the scaffolding protein EIF4G, which has domains for interaction with EIF4A, EIF3, the poly-adenylate-binding protein (PABP) and additional regulatory proteins³.

Trypanosomatid protozoans, which include parasitic species that cause diseases such as Chagas Disease (*Trypanosoma cruzi*), African Trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei*) and Leishmaniasis (*Leishmania*) belong to a group of organisms that have particular genome organization. They lack canonical RNA polymerase II promoters and transcription factors and contain protein-coding genes of unrelated functions and temporal expression organized into long polycistronic units. These units are constitutively transcribed and processed by trans-splicing and polyadenylation to generate monocistronic mRNAs^{6,7}. During trans-splicing a common miniexon sequence is added to the 5' end of all transcripts. Constitutive transcription renders trypanosomatids dependent on post-transcriptional processes to regulate their gene expression, which include mRNA turnover and translational efficiency^{8,9,10}.

In trypanosomatids, multiple homologs of the eIF4F subunits have been identified. They have been best characterized in *T. brucei* and *Leishmania* species, revealing the existence and conservation of six EIF4E five EIF4G and two EIF4A homologs in all trypanosomatid species studied to date¹¹. In addition, two homologs of the translation auxiliary factor PABP have been identified in trypanosomes and three in leishmania^{12,13}. Consistent with the higher number of initiation factor homologs, trypanosomatids have the ability to form a high number of alternative eIF4F complexes and different interaction patterns with auxiliary factors.

Trypanosomatid EIF4E homologs have been clustered in 3 groups according to their functional and molecular characteristics with EIF4E1 and EIF4E2 forming group1, EIF4E3 and EIF4E4 forming group 2 and EIF4E5 and EIF4E6 forming group 3. However, only homologs of groups 2 and 3 were shown to interact with EIF4G subunits. Group 1

members are unlikely to form eIF4F-like complexes¹¹. EIF4E1 factor appears to act in translational repression of specific mRNAs^{14,15}. Another critical difference regarding trypanosomatid EIF4E homologs involves the long N-terminal extensions found in EIF4E3 and EIF4E4. These extensions contain “PAM2” motifs allowing them to directly interact with the C-terminal MLLE domain of the PABP proteins^{16,17,18,19}.

In this work we describe, for the first time, the interactions between the translation initiation factors eIF4E, eIF4G and PABP of *T. cruzi*. Besides the identification of interactions already described in *T. brucei* and *Leishmania*, the yeast two-hybrid assay performed in this work revealed novel interactions involving TcEIF4E3 with TcPABP1 and TcPABP2 and TcEIF4E5 with TcEIF4G5. These interactions were confirmed by immunoprecipitation assays. We have also produced recombinant TcEIF4E5 and TcEIF4G5 and demonstrated that their interaction is mediated by the TcEIF4G5 N-terminal region using microscale thermophoresis. Moreover, we observed that TcEIF4E5 and TcEIF4G5 colocalize mainly in the nucleus periphery suggesting that these proteins form a specific translational complex in *T. cruzi*.

2. RESULTS

2.1 Identification (IDs) of the translation factors homologs in *T. cruzi*

The genes encoding for the *T. cruzi* homologs TcEIF4E1-6, TcEIF4G1-5 and TcPABP1-2 were identified through a search on the databases using the sequences of *T. brucei* and *L. major* homologs (Table 1). Sequence comparison with trypanosomatid and *Homo sapiens* homologs are presented in Supplementary tables 2, 3 and 4. Globally, *T. cruzi* EIF4E homologs present higher identity level with the *T. brucei* counterparts. The homologs TcEIF4E2 presents the highest amino acid identity with human eIF4E1. In contrast TcEIF4E6 is the most divergent. Concerning the TcEIF4G homologs, the proteins vary greatly in size. The level of identity is also higher with *T. brucei* counterparts and TcEIF4G3 is the most similar to the human eIF4G1. TcPABP1 is more similar with *Homo sapiens*, yet TcPABP2 has greater identity with their homologs in other

trypanosomatids. With this analyzes, we have confirmed that the *T. cruzi* genes are not copies of each other and that they present a high level of identity with *T. brucei* and *L. major* homologs.

Table 1. <i>Trypanosoma cruzi</i> eIF4F proteins				
Protein name	TriTryp GeneID #	Pfam domain value*	<i>T. brucei</i> similarity (%)	<i>L. major</i> similarity (%)
TcEIF4E1	BCY84_14627	3.6e ⁻⁵¹	67.17	50.75
TcEIF4E2	BCY84_03744	3.4e ⁻³⁷	71.43	44.97
TcEIF4E3	BCY84_15940	1.7e ⁻²⁸	62.89	40.76
TcEIF4E4	BCY84_00845	3.4e ⁻²⁵	68.91	52.79
TcEIF4E5	BCY84_16159	1.4e ⁻⁰⁹	79.50	58.45
TcEIF4E6	BCY84_13349	ND	74.33	57.73
TcEIF4G1	BCY84_21750	7.4e ⁻²⁰	57.28	55.97
TcEIF4G2	BCY84_02076	1.4e ⁻¹²	59.00	38.03
TcEIF4G3	BCY84_16025	5.3e ⁻³¹	71.63	58.45
TcEIF4G4	BCY84_11683	1.4e ⁻²⁶	67.09	47.93
TcEIF4G5	BCY84_05377	3.0e ⁻¹²	71.37	51.89
TcEIF4A1	BCY84_11965	1.4e ⁻⁴⁰	97.77	94.31
TcPABP1	BCY84_14494	2.0e ⁻¹⁹	83.25	79.44
TcPABP2	BCY84_14189	1.4e ⁻²⁴	89.73	74.00

* eIF4E superfamily domain; MIF4G domain; DEAD/DEAH box helicase domain; PABP C-terminus domain

2.2 *T. cruzi* EIF4E are involved in new eIF4F-like complexes

We have applied the yeast two-hybrid assay to identify interactions between the initiation factors EIF4E1-6, EIF4G1-5 and PABP1-2 of *T. cruzi*. The assay was performed in the *S. cerevisiae* strains Y and MaV aiming to achieve independent reproduction of the interactions. All homologs were cloned into the plasmids pDEST22 and pDEST23 in fusion with the activation domain (AD) and DNA-binding domain (DBD), respectively, of the split GAL4 transcription factor used in two-hybrid protein interactions. pDEST22 derivative plasmids, expressing the AD fusions, were transformed into the haploid strains Mav103 (*MAT α*) and Y8800 (*MAT α*) while pDEST23 derivatives expressing the DBD fusions were transformed into the haploid strains Mav203 (*MAT α*) and Y8930. Mating between Mav103 (*MAT α*) and Mav203 (*MAT α*) and, between Y8800 (*MAT α*) and Y8930 regenerated the diploid MaV and Y strains bearing both plasmids for the interaction

assays. In this way, we were able to test all interactions using both configurations of AD and DBD fusion. We identified eight interactions already described for translation factors in others trypanosomatids and three new interactions (TcEIF4E3-TcPABP1, TcEIF4E3-TcPABP2 and TcEIF4E5-TcEIF4G5), which have not been previously described in other organisms. A yeast two-hybrid assay showing the positive interactions identified along with the controls is presented in figure 1. The interactions in the Y strain were tested for the *ADE2* and *HIS3* gene reporters for hybrid protein interactions as well as for the *HIS3* reporter in the presence of increasing concentrations of the inhibitor 3-amino-triazole (3-AT). In the Y strain (Figure 1A), the cells expressing DBD-TcEIF4E3 and AD-TcEIF4G4 showed slow growth in selective medium lacking histidine and did not grow in selective medium lacking adenine. However, the cells expressing the reverse configuration of fusions (DBD-TcEIF4G4/AD-TcEIF4E3) grow fairly well in selective medium lacking histidine, indicating a positive interaction. The fastest growing cells were the ones expressing the DBD-TcEIF4G3/AD-TcEIF4E4 and DBD-TcEIF4E6/AD-TcEIF4G5 combinations. Although cells expressing DBD-TcEIF4G5/AD-TcEIF4E5 grew fast in medium containing high 3-AT concentration when compared with cells expressing the other pairs, we did not consider this as strong interaction, since DBD-TcEIF4G5 shows auto-activation of the reporter genes in the Y strain. The same criterium was adopted for the cells expressing DBD-TcEIF4G5/AD-TcEIF4E6. However, TcEIF4G5 fused to the AD domain did not auto-activate the reporter genes in the Y strain. Neither the DBD-TcEIF4G5 nor the AD-TcEIF4G5 fusion showed autoactivation of the reporter genes in the MaV strain (data not shown). The assay in the Y strain revealed new interactions between DBD-TcEIF4E3 with AD-TcPABP1 and AD-TcPABP2. Cells expressing the DBD-TcEIF4E3 with AD-TcPABP1 pair grew well in all experimental conditions tested, including, absence of adenine and histidine and presence of high concentrations added of 3AT. There was no growth for cells expressing DBD-TcEIF4E3/AD-TcPABP2 in selective medium lacking adenine, but there was growth in selective medium lacking and containing 3-AT. A third new interaction involves TcEIF4E5-TcEIF4G5 in cells expressing

both AD and DBD fusion configurations. However, growth was observed only for the *HIS3* reporter gene including at concentrations of the 3-AT inhibitor. No growth was observed in selective medium lacking adenine. We assumed that growth in selective medium for at least one reporter gene indicates positive hybrid protein interaction and proceeded to confirm these interactions by co-immunoprecipitation.

In the MaV strain, the interactions were tested for the *URA3* and *HIS3* gene reporters and for *HIS3* also in the presence of 3-AT. Except for the positive control, no growth was observed for all cells test for complementation of the *URA3* reporter gene (data not shown). Fewer interactions were detected in the MaV strain as compared to the Y strain (Figure 1B). The cells expressing TcEIF4G4/TcEIF4E3 showed the fastest growth in the MaV strain for both DBD and AD fusion configurations. No interactions between TcEIF4E3 and the TcPABP homologs were observed in this strain. However, some growth of cells expressing DBD-TcEIF4G5/AD-TcEIF4E5 was detected for complementation of the *HIS3* marker in medium containing 25 mM of 3-AT. Even though growth was limited, it was similar to the control cells (Figure 1B) and we considered this as a positive interaction since it was observed in bot strains.

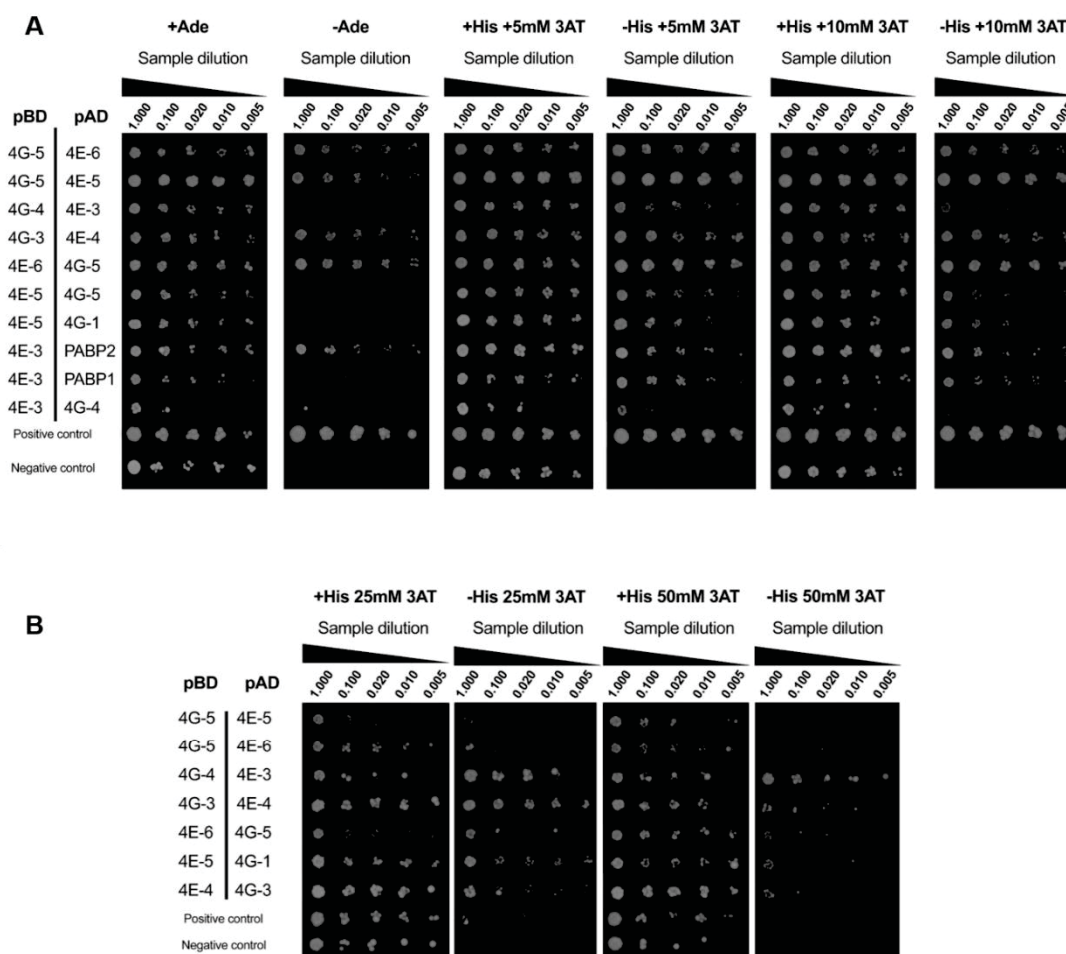


Figure 1. Yeast two-hybrid assays were performed using the Y (A) and MAV (B) strains. Interactions between the six TcEIF4E homologs with the five TcEIF4G and the two TcPABP homologs were evaluated. All translation initiation factors were cloned in fusion with both the activation domain (pAD) and the DNA-binding (pBD) of plasmids pDEST22 and pDEST23, respectively. Only the positive interactions and the control strains are shown. Cells were cultured under restrictive (-His; -Ade) and non-restrictive (+His; +Ade) growth conditions. When indicated, the medium was supplemented with increasing amounts of 3-AT, increasing the stringency of the assay. Dilutions (0.1, 0.02, 0.01, and 0.005) of saturated yeast cultures containing the indicated plasmids were spotted on the plates, and photographs were taken after 3 days of incubation at 30 °C. Positive and negative control plasmids were supplied by the gateway's manufacturer.

2.3 The new interactions of *T. cruzi* occur *in vivo*

To verify if the new interactions detected by two-hybrid occurred *in vivo*, TcEIF4E3 and TcEIF4E5 genes were fused to a GFP tag using the plasmid pTcGFP (supplementary material Figure 1), and the resulting constructions transfected into the *T. cruzi* strain Dm28c. Expression of the fusion proteins was confirmed by Western blotting (Figure 2). Magnetic beads coupled to anti-GFP nanobodies were used to capture the protein-complexes. To avoid potential interactions mediated by RNA, RNaseA was added to the lysis and immunoprecipitation buffers. The complexes immunoprecipitated with TcEIF4E3-GFP and TcEIF4E5-GFP were analysed by silver nitrate stained SDS-PAGE and Western blot assays using anti-GFP antibody (Figure 2). In each experiment, we observe a band corresponding to the expected size of the protein bait, which is not present in the control. Additional bands associated to the TcEIF4E3-GFP samples are observed, which are most likely associated to degradation products.

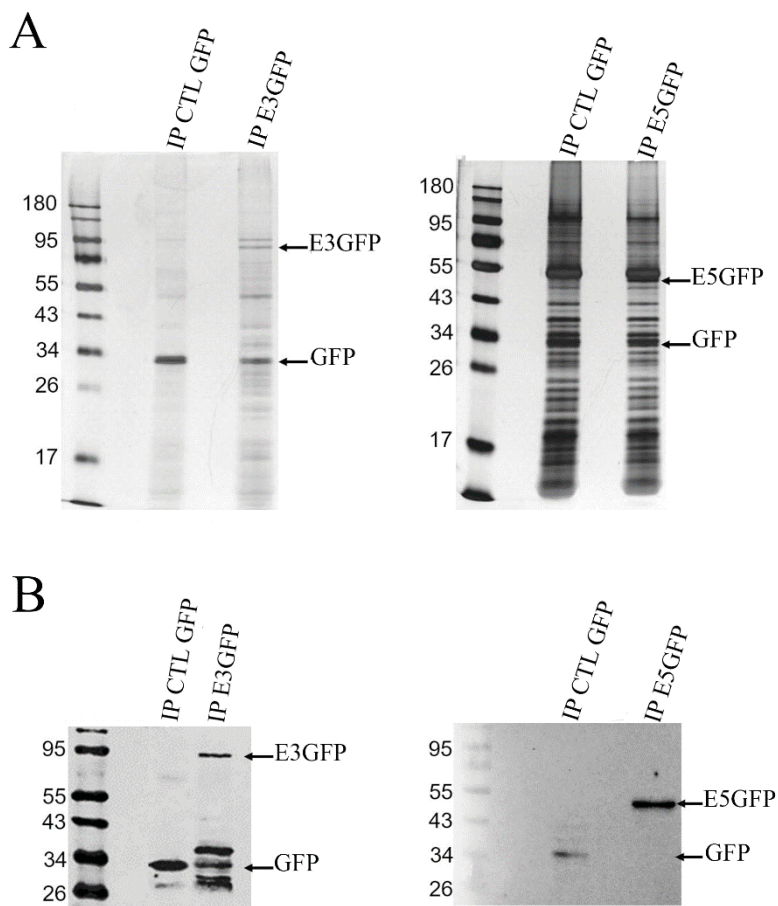


Figure 2. Immunoprecipitation assay of TcEIF4E3-GFP and TcEIF4E5-GFP. A) SDS-PAGE gel stained with silver nitrate. B) Western blot using anti-GFP antibody. IF-GFP/Ctl-GFP indicate the control immunoprecipitations performed with extracts of *T. cruzi* epimastigotes cells in exponential growth phase expressing GFP alone. IP-E3GFP and IP-E5GFP indicate the immunoprecipitations performed with extracts of cells expressing the TcEIF4E3-GFP and TcEIF4E5-GFP fusion proteins.

Identification of the co-immunoprecipitated proteins by mass spectrometry identified TcEIF4E3, TcPABP1 and TcPABP2 in the TcEIF4E3-GFP immunoprecipitation assay showing that both TcPABP homologs can form complexes with TcEIF4E3 in exponentially growing *T. cruzi* epimastigotes (Table 2). Similarly, TcEIF4E5 and TcEIF4G5 in the TcEIF4E5-GFP immunoprecipitation assay (Table 3). In addition, TcEIF4E5 mass spectrometry analysis revealed also the presence of the TcEIF4G1 and TcEIF4G2 homologs, as well as other associated proteins, including G1IP1, a cytoplasmatic protein that possesses both guanylyltransferase and methyltransferase domains; RBP43 (previously known as G1IP2, Freire *et al.*, 2017), a RNA binding protein; G2IP, a protein of unknown function conserved only in *Trypanosoma* genera; the regulatory protein 14-3-3 II and PABP2. These results not only confirm the participation of TcEIF4E5 in two independent eIF4F(-like) complexes as partner of EIF4G1 or EIF4G2 and associated proteins, as previously demonstrated in *T. brucei*²⁰, but also identify the TcEIF4E5 participation in an apparently *T. cruzi*-exclusive complex with the TcEIF4G5 homologue and its putative cap-generating partner G5IP²⁰.

Table 2. Proteins enriched with EIF4E3-GFP

Protein name	TriTryp GeneID #	Unique peptides	Intensity	Int/Intctrl*
EIF4G4	BCY84_11683	10	196190000	Absent in control
EIF4E3	BCY84_15940	3	20661000	21.72
PABP1	BCY84_14494	8	12883000	88.05
PABP2	BCY84_14189	5	16095000	2.57
EIF4A1	BCY84_11965	2	4009200	Absent in control

*Ratio of test intensity to control intensity

Table 3. Proteins enriched with EIF4E5-GFP

Protein name	TriTryp GeneID #	Unique peptides	Intensity	Int/Intctrl*
EIF4E5	BCY84_16159	6	196190000	Absent in control
EIF4G2	BCY84_02076	11	20661000	21.72
EIF4G1	BCY84_21750	7	12883000	88.05
EIF4G5	BCY84_05377	7	16095000	2.57
RBP43	BCY84_03238	2	4009200	Absent in control
PABP2	BCY84_14189	1	2770600	Absent in control
G1IP	BCY84_12978	3	2630900	Absent in control
14-3-3	BCY84_12962	2	2358500	2.18
G2IP	BCY84_00706	1	1967700	Absent in control
G5IP	BCY84_18374	2	1670300	3.44

*Ratio of test intensity to control intensity

2.4 TcEIF4E5 interacts directly with TcEIF4G5 *in vitro*

Sequence analysis of TcEIF4G5 allowed identification of a sequence which partially conserves an EIF4E-binding motif (82-YDIAEFV-89) at the N-terminal region of the protein, also predicted to be intrinsically disordered. In order to test the direct interaction between TcEIF4E5 and TcEIF4G5, we have produced and purified recombinant full length TcEIF4E5 and truncated forms of TcEIF4G5 (supplementary material Figure 2). TcEIF4G5 Δ C (residues 1-371) contains the full N-terminal in addition to the conserved MIF4G domain, whereas TcEIF4G5MIF (residues 142-371) comprises the MIF4G domain. Microscale thermophoresis (MST) assays showed that TcEIF4E5

interacts with TcEIF4G5 Δ C ($K_d = 23 \pm 3 \mu\text{M}$) while no binding was detected with the TcEIF4G5MIF construction (Figure 3), indicating that the TcEIF4G5 N-terminal region is responsible for TcEIF4E5 binding.

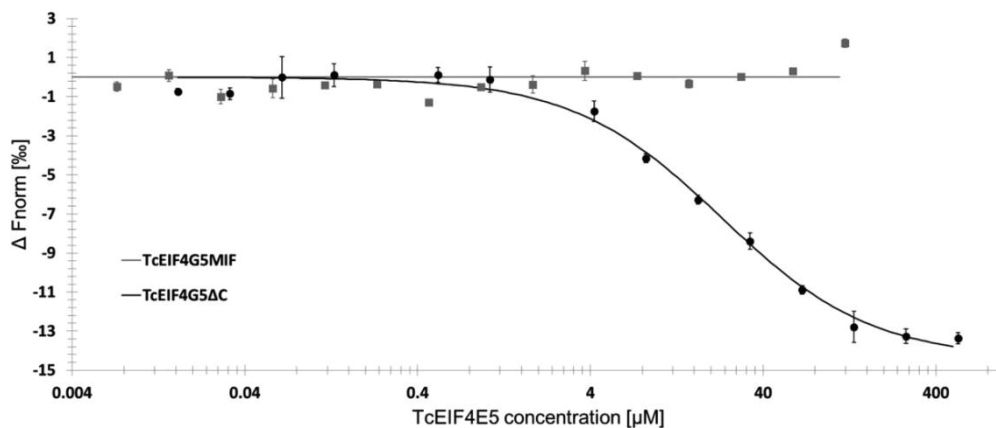


Figure 3. Microscale thermophoresis analysis of TcEIF4E5 binding to TcEIF4G5. The specific interaction of TcEIF4E5 to TcEIF4G5 Δ C (black spheres) was quantified ($K_d = 23 \pm 3 \mu\text{M}$), whereas no binding to TcEIF4G5MIF was detected (gray squares).

2.5 TcEIF4E5 and TcEIF4G5 colocalize mainly on periphery of the nucleus

To verify the cellular distribution of TcEIF4E5 and TcEIF4G5, we performed immunofluorescence assays on *T. cruzi* epimastigotes. TcEIF4G5 was detected using a polyclonal serum and the co-localization experiment was performed with transfectant cells expressing TcEIF4E5-GFP using an antibody against GFP (Figure 4). We observed a diffuse distribution for EIF4E5 with a higher concentration of the protein at the periphery of the nucleus. The same distribution pattern was seen for TcEIF4G5, evidencing the colocalization of the proteins (Figure 4A). Comparison of the fluorescence intensity profiles of confocal graphic shows similar distribution pattern and correlated peaks (Figure 4B).

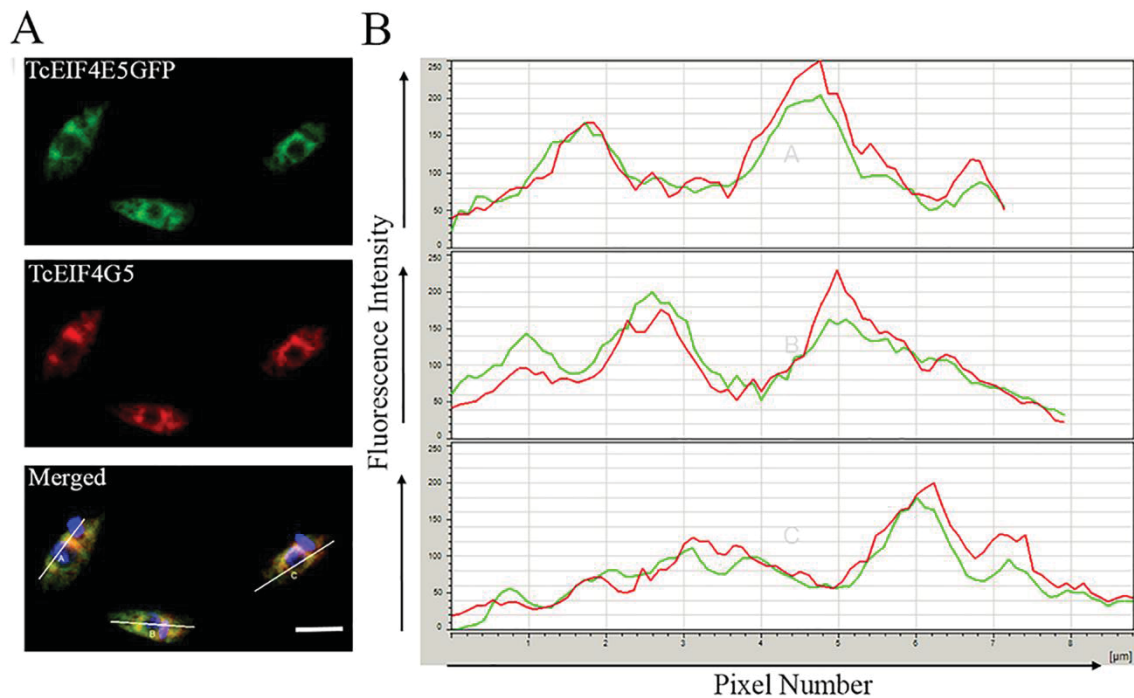


Figure 4. Colocalization between EIF4E5 and EIF4G5 in *T. cruzi*. A) Immunolocalization of TcEIF4E5 (green) and TcEIF4G5 (red) by confocal microscopy. B) Analysis of colocalization of TcEIF4E5 (green curve) and TcEIF4G5 (red curve). Dilution of antibodies: anti-GFP (Invitrogen) 1:500, anti-TcEIF4G5 1:100, Alexa 488 1:600 and Alexa 546 1:300. Nuclei and kinetoplasts are marked with DAPI. The fluorescence intensity profiles of TcEIF4E5 and TcEIF4G5 show the distribution of fluorescence across the x-axis. The fluorescence intensities are plotted along the y-axis. Bars = 5 μ m.

3. DISCUSSION

One of the main steps for the *post-transcriptional control of gene expression* takes place at the initiation stage of the translation process. Most of this regulation is mediated by modulation of the activity of the EIF4F complex subunits by different interacting partners and post-translational modifications²¹. The distinct eIF4F-like complexes formed by combinatorial association of the initiation factor homologs not always play a role in promoting translation^{22,23}. They can also regulate translation, depending on the regulatory proteins that bind to the eIF4E and eIF4G^{24,25,26}.

Trypanosomatids possess six EIF4E and five eIF4G homologs and some of their interactions have already been described^{27,28,20,29,30}. However, the specific function of each factor as well as the composition of the alternative complexes that they can form remains poorly characterized especially for *T. cruzi*. An important feature for the formation of the eIF4F complex is the interaction between EIF4E and EIF4G, being EIF4G a scaffold protein for anchoring other proteins as seen in humans and yeasts^{31,2}. A summary of the interactions identified in trypanosomatids is shown in table 4. Interestingly, no interactions of the EIF4E1 and EIF4E2 homologs with the EIF4G or the PABP homologs were detected for the three trypanosomatid species tested so far. EIF4E1 was shown to interact with 4E-IP in *T. brucei* and *L. major*^{32,15}. This interaction has been proposed to inhibit translation¹⁴. The only interaction described for EIF4E2 was with the *T. brucei* homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein³³. Both *T. brucei* and *L. major* EIF4E3 and EIF4E4 homologs were previously shown to interact respectively with the EIF4G4 and EIF4G3 homologs^{32,28}. Equivalent interactions were also detected in this work for the respective *T. cruzi* homologs of these factors. Similarly interactions of EIF4G3 described for *T. brucei* and *L. major*^{32,34,35}, were also detected for *T. cruzi*. These results are consistent with the model generally accepted for eukaryotic translation initiation where the PABPs interact with EIF4G³⁶ favoring circularization of the mRNA, facilitating its translation^{37,38} and enhancing the binding affinity of EIF4E to the mRNA cap^{39,40}.

Table 4. eIF4F(-like) complexes interactions from Trypanosomatids				
Species Interactions	<i>Leishmania</i>	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	Reference (<i>Leishmania</i> *, <i>T. brucei</i> #)
EIF4E1/4E-IP	●	●	○	Zinoviev, <i>et al.</i> , 2011*; Terraio <i>et al.</i> , 2018#.
EIF4E2/SLBP2	○	●	○	Freire, <i>et al.</i> , 2018#.
EIF4E3/EIF4G4	●	●	●	Zinoviev, <i>et al.</i> , 2012*; Freire, <i>et al.</i> , 2011#; This work.
EIF4E3/PABP1	○	○	●	This work; New interaction.
EIF4E3/PABP2	○	○	●	This work; New interaction.
EIF4E4/EIF4G3	●	●	●	Yoffe, <i>et al.</i> , 2009*; Freire, <i>et al.</i> , 2011#; This work.
EIF4E4/PABP1	●	●	●	Zinoviev, <i>et al.</i> , 2011*; Zoltner, <i>et al.</i> , 2018#. This work.
EIF4E4/PABP2	○	●	●	Zoltner, <i>et al.</i> , 2018#. This work.
EIF4G3/PABP1	●	●	●	Moura, <i>et al.</i> , 2015*; Zoltner, <i>et al.</i> , 2018#. This work.
EIF4E5/EIF4G1	○	●	●	Freire, <i>et al.</i> , 2014b#; This work.
EIF4E5/EIF4G2	○	●	●	Freire, <i>et al.</i> , 2014b#; This work.
EIF4E5/EIF4G5	○	●	●	Freire, <i>et al.</i> , 2014b#; This work; New interaction.
EIF4G1/PABP2	○	●	○	Zoltner, <i>et al.</i> , 2018#.
EIF4E6/EIF4G5	○	●	●	Freire, <i>et al.</i> , 2014a#; This work.

● Y2H/Pull-down. ● Non detected / Absent. ○ Not tested

The most intriguing trypanosomatid-specific finding involves the direct interaction of EIF4E4 with PABP1³². This association was also found by immunoprecipitation for *T. brucei* homologs³⁵. However such interaction was not detected for TcEIF4E4 with TcPABP1. On the other hand, we detected new interactions between TcEIF4E3 with both TcPABP1 and TcPABP2. Recent studies in *L. major* showed that the interaction EIF4E4-PABP1 occurs via three PAM2 motifs found in the N-terminal region of EIF4E4 and the MLLE domain in the C-terminal domain of PABP1^{18,19}. The resulting interaction configuration 5'cap4-eIF4E4-PABP1-poly(A) creates a bridge between the mRNA 5' and 3' ends. Sequence analysis indicated that TcEIF4E3 also contains three PAM2 motifs in the N-terminal region as well as both TcPABP1 and TcPABP2 contain C-terminal MLLE domains (Figure 5). The presence of these domains explains the interactions detected in this work.

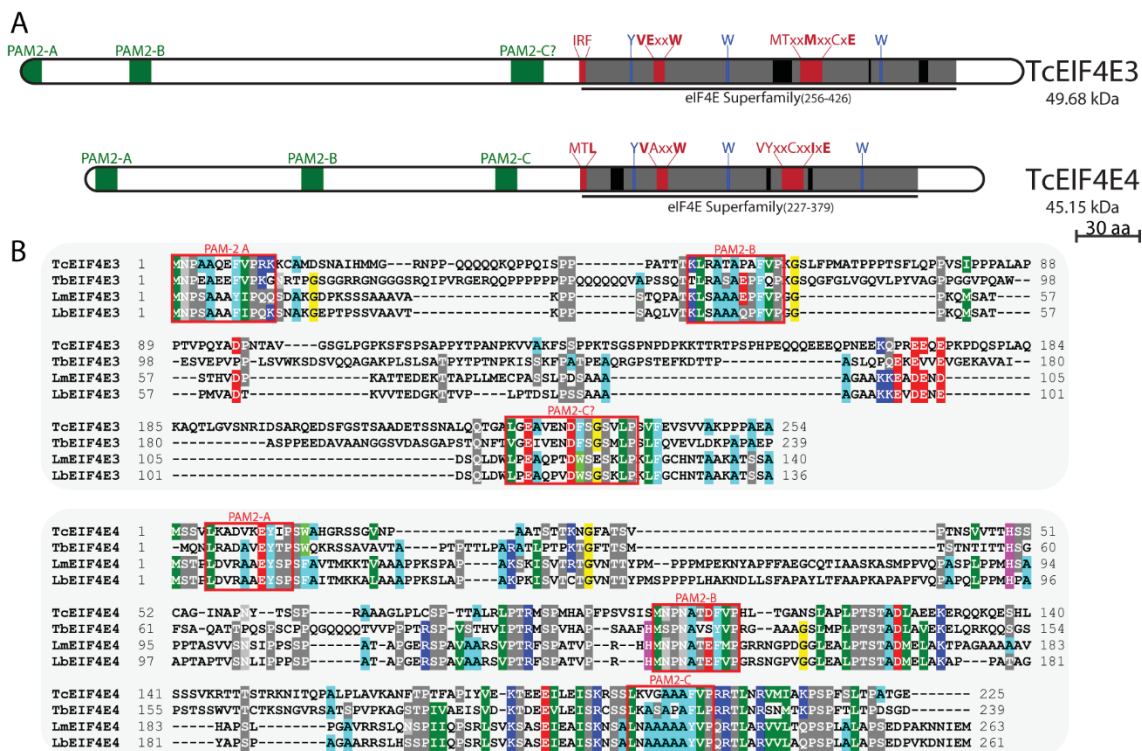


Figure 5. eIF4E homologs EIF4E3 and EIF4E4 from *T. cruzi*. (A) Graphical representations of TcEIF4E3 and TcEIF4E4. The eIF4E core regions are represented in grey; black boxes represent insertions within these core regions, based on eIF4E Superfamily consensus comparison using the Pfam Database on line tool⁴¹. Aromatic residues involved in cap binding (or equivalent based on mammal eIF4E) are highlighted in blue; residues involved in eIF4G-binding (or equivalent based on mammal eIF4E) are highlighted in red; green boxes represent conserved PAM2 motifs from EIF4E4 involved in PABP1 interaction^{18, 19} and putative PAM-2 motifs also found on EIF4E3. B- MAFFT sequence alignment⁴² of TcEIF4E3 and TcEIF4E4 N-terminal extensions showing the positions of PAM-2 motifs. Residues coloring were done in BioEdit tool.

The EIF4E5 and EIF4E6 homologs belonging to group 3 are the most divergent EIF4E homologs and are closer to each other than to their homologs in other trypanosomatid species. They have been studied in more detail only in *T. brucei*^{20,29}. In *T. cruzi*, we found EIF4E6 interacting with eIF4G5 as described for *T. brucei*. TbEIF4E5 was shown to interact with TbEIF4G1 and TbEIF4G2 forming two separate eIF4F-like

complexes which are implicated in the post-transcriptional gene expression regulation^{20,29}. The first TbEIF4E5 complex contains TbEIF4G1, a 47.5-kDa protein with two RNA-binding domains, also known as RBP43, and a predicted 117.5-kDa bifunctional capping enzyme, later renamed TbG1IP¹¹. The later is a cytoplasmic protein that contains guanylyltransferase and methyltransferase domains consistent with a role in mRNA cap formation. In addition, TbEIF4G1-TbG1IP interaction seems to be regulated by influence of the regulatory protein Tb14-3-3 II, which is a phosphoserine/phosphothreonine-binding protein that may promote a complex formation block. The second TbEIF4E5 complex, formed by TbEIF4E5-TbEIF4G2 interaction has in association a small protein of unknown function of 17,9 kDa, later named TbG2IP¹¹, and also includes the Tb14-3-3 I and Tb14-3-3 II proteins that function likely as homo- or heterodimeric regulators of activity of this complex. The results obtained in this work by TcEIF4E5-GFP immunoprecipitation and mass spectrometry confirmed that both complexes featuring EIF4E5 are also present in *T. cruzi*.

Surprisingly, we have also identified a new interaction between TcEIF4E5 and TcEIF4G5, which was confirmed by four distinct experiments, both *in vivo* and *in vitro*. It was previously reported in *T. brucei* that TbEIF4G5 formed an independent eIF4F-like complex with TbEIF4E6, in association with another protein that contains nucleoside triphosphate hydrolase and guanylyltransferase domains, called TbG5IP²⁰. However, the present results have shown that TcEIF4E5-GFP was immunoprecipitated with both EIF4G5 and G5IP homologs from *T. cruzi*, which adds even more complexity to EIF4E5 function as a cytoplasmic cap binding protein participating in three different eIF4F-like complexes (Figure 6).

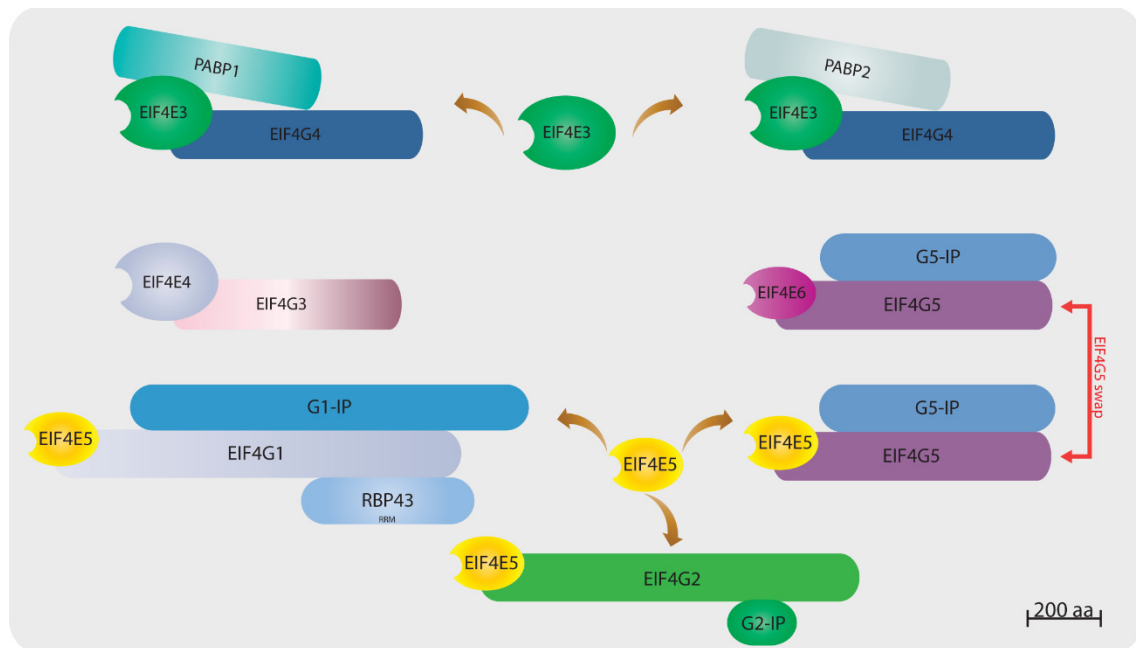


Figure 6. Summary of the eIF4F complexes from *T. cruzi*. Available data obtained in present work indicates that in *T. cruzi* EIF4E3 is involved in formation of two different eIF4F complexes with EIF4G4 and both PABP1 and PABP2 homologs. Furthermore, EIF4E5 have a role in three different eIF4F-like complexes, interacting with EIF4G1, EIF4G2 and EIF4G5. Finally, EIF4E4 forms complex with EIF4G3 and PABP1, while EIF4E6 forms complex with EIF4G5, both complexes corroborate with *T. brucei* findings^{34,29}.

The direct interaction between TcEIF4E5 and TcEIF4G5 was confirmed by microscale thermophoresis assay using recombinant proteins. Eukaryotic initiation factor 4G (EIF4G) and other groups of EIF4E-binding proteins contain the so-called canonical EIF4E-binding motif YXXXXLΦ, where X denote any amino acid, and Φ any hydrophobic residue^{44,45}. In EIF4G this consensus motif is found in a disordered region situated upstream to the conserved MIF4G domain, which becomes structured upon EIF4E binding⁴⁶. TcEIF4G5 contains a putative YXXXXLΦ EIF4E-binding motif. We speculate that the putative TcEIF4G5 motif YXXXXFΦ could function as the EIF4E-binding motif, since the substitution of the leucine from the consensus motif by a phenylalanine does not change the hydrophobic pattern in the sequence. Interestingly, TcEIF4G1, which was

also shown to interact with TcEIF4E5 by yeast two hybrid assays, presents a YPPMF sequence at approximately the same position, related to the MIF4G domain, of TcEIF4G5 YDIAEFV. This finding suggests that a consensus motif, defined by YXXXXΦΦ or, more specifically, YXXXXΩΦ (where Ω denotes aromatic), could be involved in the specific interaction of *T. cruzi* EIF4G homologs and their partner TcEIF4E5 (Figure 7).

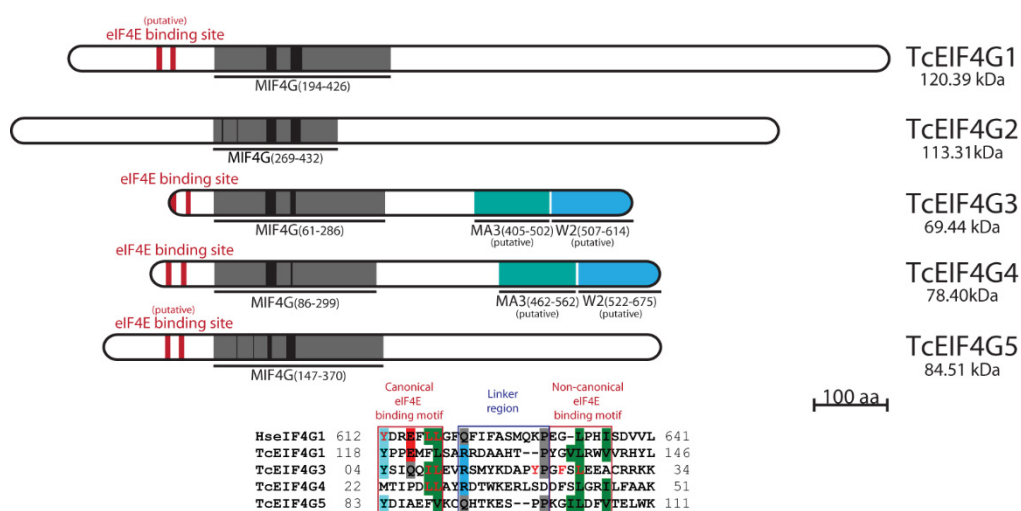


Figure 7. Schematic representation of eIF4G homologs from *T. cruzi* (TcEIF4G1, G3 to G5). The MIF4G domains are represented in grey; black boxes represent insertions based on MIF4G consensus comparison using the Pfam Database on line tool⁴¹. Red segments represent eIF4E interaction residues, green box represents putative MA3 domain and blue box represents putative W2 domain (equivalent to LmeIF4G3 and LmeIF4G4 according to Moura, *et al.*, 2015). Sequences equivalent to canonical and non-canonical eIF4E-interacting residues are shown in alignment below (according to Gruner, *et al.*, 2016). Important residues involved in eIF4E interaction are highlighted in red for human HseIF4G1⁴⁴ and equivalent residues from *Leishmania* EIF4G3 and EIF4G4 from previous works^{47,30,34}.

The characterization of the EIF4E affinity to peptides derived from a variety of EIF4E-binding proteins has shown dissociation constant values in the nano-submicromolar range^{45,48,49,50}. Our results show a significantly lower affinity between TcEIF4E5 and TcEIF4G5 and we speculate whether differences in the interaction strengths between initiation factor homologs in *T. cruzi* could be related to a stage specific regulatory mechanism. We should also notice that the binding of TcEIF4E5 to the cap4 may increase its affinity to TcEIF4G5.

We also show that in epimastigotes TcEIF4E5 and TcEIF4G5 have a diffuse cytoplasmic distribution and co-localize in foci mainly at the nucleus periphery. In trypanosomatids, the perinuclear region is believed to concentrate different proteins, present in mRNA granules, that may be involved in several aspects of mRNA metabolism^{51,10,52}. mRNA granules are important players in the control of gene expression regulation competing with the translation machinery for mRNA access in eukaryotes^{53,54,55,56,57,58}. In fact, the presence of many translation initiation factors and ribosomal proteins have already been registered in mRNA granules acting in non-canonical function^{59,10,60}.

The combined data available indicates that EIF4E5 does not have a primary role in translation in trypanosomatids¹¹. However, its knockdown of TbEIF4E5 resulted in loss of productive cell movement in which one of the complexes formed by TbEIF4E5 can directly or indirectly affect the cellular motility. The *T. brucei* EIF4E5 protein can bind to cap 4 *in vitro* and it was found in distinct complexes with different eIF4Gs and other interacting proteins. The formation of two different complexes involving TbEIF4E5 indicates that these complexes may act in different regulatory functions²⁰. As in *T. brucei*, EIF4E5 can also bind to cap 4 in *T. cruzi*⁶¹ and, in this scenario, the interaction of TcEIF4E5 with three EIF4G homologs may suggest the performance of this factor in unique complexes that may be involved with different regulatory functions which can be dependent of the translational status of the cell, indicating a high complex function for an

eIF4E homologue in unicellular organisms. Further studies should be carried out in order to understand the actual role of EIF4E5 as well as its partner EIF4G5 in *T. cruzi*.

1. MATERIAL AND METHODS

1.1 Parasite cultures

Epimastigotes of the *T. cruzi* Dm28c strain were cultured in liver infusion tryptose (LIT) medium at 28 °C as previously described⁶².

1.2 Gene cloning

All *T. cruzi* EIF4E, EIF4G and PABP open reading frames (ORF) were amplified by PCR using specific oligonucleotide primers (Supplementary material Table 1). The PCR products were cloned into the pDONRTM221 vector from the Gateway cloning system (Invitrogen). From pDONRTM221, all coding sequences were subcloned into pDESTTM22 and pDESTTM32 for the yeast two-hybrid assays. The cloning steps using the Gateway system (Invitrogen) were performed according to the manufacturer's protocol. For expression of recombinant proteins to produce polyclonal antibodies, the coding sequence of TcEIF4G5 was recombined into the pDESTTM15 vector. The resulting GST-tagged TcEIF4G5 was produced recombinantly in *E. coli* and purified. Plasmid for expression of the TcEIF4E3-GFP and TcEIF4E5-GFP fusion proteins in *T. cruzi* were obtained by recombination of pDONRTM221 with plasmid pTcGFP according to Batista *et al.*, 2010.

1.3 Yeast two-hybrid assays

The haploid yeast host strains MaV103 (*MATa*) and MaV203 (*MATα*) [*leu2-3,112 trp1-901 his3Δ200 ade2-101 ura3-52 gal4Δ gal80Δ SPAL10::URA3@ura3 GAL1::lacZ GAL1::HIS3@LYS2 can1^R cyh2^R*] used in the two-hybrid analyses contains yeast *HIS3*, *LacZ* and *URA3* genes as reporters for two-hybrid interaction integrated into the genome. The haploid yeast host strains Y8800 (*MATa*) and Y8930 (*MATα*) [*leu2-3,112 trp1-901 his3Δ200 ade2-101 ura3-52 gal4Δ gal80Δ GAL2::ADE2 GAL1::HIS3@LYS2*

GAL7::LacZ@met2 cyh2^R] used in the two-hybrid analyses contains yeast *HIS3*, *LacZ* and *ADE2* genes as reporters for two-hybrid interaction integrated into the genome. The MaV103 and Y8800 strains were transformed with the plasmid pDESTTM22, encoding the activation domain (AD) fusions. The MaV203 and Y8930 strains were transformed with plasmid pDESTTM32, encoding the DNA-binding domain (DBD) fusions. Yeast strains were transformed using a TE/PEG/lithium acetate method containing salmon carrier DNA according as previously described⁶⁴. Diploid yeast strains were generated by mating on YEPD plates and selected on synthetic complete (SC) medium in absence of leucin and tryptophan. For the phenotypic assay, the diploid strains were transferred to plates containing selective SC medium selective for each strain (Strain Y: -Leu-Tryp-Ade and -Leu-Tryp-His + 5mM3AT and 10mM3AT) Strain MaV: -Leu-Tryp-Ura and -Leu-Tryp-His+25mM3AT and 50mM3AT). Gateway® control vectors were used as control of the test (pEXPTM32/Krev (BD) + pEXPTM22/RalGDS-*wt* (AD) – positive control and pEXPTM32/Krev (BD) + pEXPTM22/RalGDS-m2 (AD) – negative control. The plating process was performed by using an automated Tecan Freedom 200 system.

1.4 Protein Expression and Purification

The genes encoding TcEIF4E5 and the truncated forms of TcEIF4G5, TcEIF4G5ΔC (residues 1-371) and TcEIF4G5MIF (residues 142-371) were synthesized by GeneCust and subcloned into the pET28a vector (Novagen) to express the constructs in fusion with a C-terminal His-tag. The same general protocol was used for expression and purification of all proteins studied in this work. Specific differences are described when appropriated. *Escherichia coli* cells BL21-STAR (DE3) were transformed with the pET expression vectors. The cultures were grown at 37°C in LB medium containing kanamycin 50 µg/mL. When the culture reached the OD₆₀₀ ~0.6, the temperature was reduced to 18°C and protein expression was induced with 0.2 mM of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), overnight. Cells were harvested by centrifugation at 4000 g for 20 minutes and the pellet was stored at -80°C until protein purification.

The frozen cells from 1 L culture (expression of TcEIF4E5 and TcEIF4G5MIF) or 2 L culture (expression of TcEIF4G5 Δ C) were suspended and lysed in buffer A (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazole for TcEIF4E5 or the same buffer with pH 8.8 for the TcEIF4G5 constructs) containing protease inhibitor cocktail (SigmaFAST). Cells were disrupted using a microfluidizer processor (Microfluidics™) and the soluble fraction was isolated by centrifugation at 40000 g for 30 minutes at 4°C.

The extracts were loaded onto a His-Trap HP column (GE Healthcare Life Sciences) equilibrated in buffer A. TcEIF4E5 was eluted with a two steps gradient, a 10 column volumes (CV) linear gradient from 0 to 50 mM of imidazole followed by a 6 CV linear gradient from 50 to 500 mM of imidazole in the same buffer. TcEIF4G5 Δ C was also eluted with a two steps gradient, a 30 CV linear gradient from 0 to 75 mM of imidazole followed by a 25 CV linear gradient from 75 to 500 mM of imidazole in the same buffer. TcEIF4G5MIF was eluted with a three-steps gradient including a 30 CV linear gradient from 0 to 75 mM of imidazole followed by a 7 CV linear gradient from 75 to 150 mM of imidazole and a 10 CV linear gradient from 150 to 500 mM in the same buffer.

Fractions containing the target proteins were pooled, concentrated and loaded onto a Superdex 75 16/60 column (GE Healthcare Life Sciences) or a Superdex 75 10/30 (TcEIF4G5 Δ C), equilibrated with 20 mM Sodium Phosphate pH 7.5; 200 mM NaCl; 2 mM DTT and 0.05% Tween. The fractions corresponding to the centre of the elution peaks were used in microscale thermophoresis experiments. Purified TcEIF4G5MIF was also used to produce immunized mouse serum which was used in *in vivo* experiments

The production of anti-TcEIF4G5 antibodies was performed with ethics committee code LW-15/13. Four Swiss mice were immunized for a total of four doses administered within 14 days. Doses were 25-50 μ g protein in a total volume of 100 μ l (protein + adjuvant).

1.5 Immunoprecipitation assays

T. cruzi epimastigotes were transfected with plasmids pTcGFP amino-terminal fusions bearing TcEIF4E3 or TcEIF4E5, as described by Lu *et al.*, 1991. TcEIF4E3-GFP and TcEIF4E5-GFP immunoprecipitation assays were performed with the cytoplasmic extracts from epimastigotes in the exponential growing phase. Recombinant anti-GFP nanobodies were coupled to 20 mg of Dynabeads® M-270 Epoxy (Invitrogen) and stored in 150 µl of PBS according to Fridy *et al.*, 2014. $5,0 \times 10^8$ epimastigote cells expressing TcEIF4E3-GFP and epimastigotes expressing only the GFP-tag (control) were lysed by adding 1 ml of solubilization buffer contained [Hepes pH 7,5 20 mM; MgCl₂ 1 mM; CaCl₂ 10 mM; Sodium Citrate (Na₃C₆H₅O₇) 50 mM; Triton 0,5%; protease inhibitor (Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, 1:100), PMSF 1 mM; E-64 10 µM; Glycerol 10%; RNase A 10 µg/ml]. The lysis was controlled microscopically. Epimastigotes expressing TcEIF4E5-GFP and GFP were lysed by cryo-milled using the Mixer Mill MM 400 (Retsch), resulting in 1 g of cell powder. Approximately $5,0 \times 10^8$ cells were suspended in 1 ml of solubilization buffer [Hepes pH 7,5 20 mM; MgCl₂ 5 mM; Sodium Citrate (Na₃C₆H₅O₇) 10 mM; CHAPS 0,1%; protease inhibitor (Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, 1:100); PMSF 1 mM; E-64 10 µM; Glycerol 10%; RNase A 10 µg/ml]. The cytoplasmic extracts from cells expressing TcEIF4E3-GFP, TcEIF4E5-GFP and of the GFP controls were submitted to centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatants were incubated with 2 µl of anti-GFP-coupled magnetic beads under constant stirring at 4 °C for 2 h. The magnetic beads were washed 3 times with solubilization buffer and the proteins were eluted with 15 µl of sample buffer (Tris-HCl 40 mM pH 6,8; SDS 1%, 2-Mercaptoethanol 2,5%, Glycerol 6%; bromophenol blue 0,005%). The eluted fractions were visualized in 13% SDS-PAGE by silver nitrate staining and the proteins of interest were detected by immunoblotting.

1.6 Silver nitrate staining and immunoblotting

For silver nitrate staining, the gel was incubated in SDS-PAGE fixing solution (50% ethanol; 12% acetic acid, 0.02% formaldehyde) for 30 min at room temperature and then washed 3 times with 50% ethanol solution. The gel was subsequently incubated with staining solution for sensitization of silver (sodium thiosulfate 0.02%) for 1 min, washed with water for 3 times and incubated with silver staining solution (0.2% silver nitrate, 0.03% formaldehyde) for 30 min. After washing with water, visualization was performed using silver developing solution (sodium carbonate 3%; formaldehyde 0.02%; 1 ml sensitizing solution). Immunoblotting was performed by transferring the proteins from the gel to nitrocellulose blotting membranes (Amersham Life Sciences) and incubated with a rabbit monoclonal anti-GFP antibody, 1:2000 dilution (Invitrogen) followed by incubation with Goat anti-Rabbit IgG IRDye®800CW secondary antibody, 1:15:000 dilution (LI-COR Biosciences). To reveal the immunoblotting we used Scanner Odyssey LI-COR Biosciences.

1.7 Proteomic data acquisition and analysis

The immunoprecipitated proteins were separated by SDS-PAGE and the samples processed and analyzed by the technicians of the mass spectrometry platform of Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ-Paraná, Brazil. First, gel fragments containing the proteins were with incubated with destaining solution (100 mmol L⁻¹ sodium thiosulphate and 30 mmol L⁻¹ potassium ferricyanide) and with 25 mM ammonium bicarbonate. Next, the gel fragments were dehydrated in 100% ethanol for 10 min at 25 °C and dried in a speedvac for 7 min. After this, the proteins were reduced (10 mmol L⁻¹ DTT in 50 mmol L⁻¹ ABC) for 60 min at 56° and alkylated (55 mmol L⁻¹ iodoacetamide in 50 mmol L⁻¹ ABC) for 45 min at 25° protected from light. Digestion buffer (ammonium bicarbonate, 50 mmol L⁻¹) was added to the gel fragments for 20 min at 25 °C, followed by dehydration in 100% ethanol for 10 min at 25 °C. The dehydration step was performed twice with subsequent drying in speed-vac for 7 min. In sequence, gel fragments were rehydrated in trypsin solution (trypsin 12,5 ng µl⁻¹ in ammonium bicarbonate 50 mmol L⁻¹) for 20 min

at 4° followed by removal of the supernatant and incubation at 37 by 16-18 h in digestion buffer. After trypsinization, peptides were extracted from gel through incubation using the extraction buffer twice [3% trifluoroacetic acid (TFA) and 30% acetonitrile (MeCN)] and MeCN twice for 10 min at 25 °C each incubation. Samples were dried in speed-vac to 10-20% of the original volume and the peptides were purified using Stage-Tips-C18. The peptides were eluted in 40 µl formic acid 0,1%, ACN 40%, dried in speed-vac for 30 min, diluted in formic acid 0,1%, DMSO 5%, ACN 5% and analyzed by LC-MS/MS injected into the mass spectrometer LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Fisher Scientific). The collected spectra were analyzed by PSM with the Andromeda algorithm⁶⁷ embedded into MaxQuant platform⁶⁸. The parameters were set as default, where carbamidomethylation on cysteine was set as a fixed modification, oxidation on methionine and acetylation on protein N-terminus were set as variable modification. In the search, a minimum peptide length of 7 amino acids was required and 1% FDR was applied both at the peptide and protein levels. During the first search in the identification of peptides, tolerance of 20 ppm was used. Trypsin digestion sites were used with up to 2 missed cleavages (sites before proline were not digested). Mass spectrometry analyses were performed using two technical replicates with the MaxQuant program by comparing the data with the TriTrypDB database for *T. cruzi* strain Dm28c generating a spreadsheet in Excel. The classification was made by ratio between intensities excluding number of peptides less than two.

1.8 Microscale Thermophoresis

TcEIF4G5ΔC and TcEIF4GMIF were labeled using the Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper Technologies) according to the supplied protocol. The concentration of labeled proteins was kept constant at 2 nM. The unlabeled binding

partner (TcEIF4E5) was titrated in 1:1 dilutions, with the highest final concentration (538 μ M) chosen from previous tests. The assays were performed in triplicate in buffer containing 20 mM Sodium Phosphate pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT and 0.05% Tween-20. Measurements were performed in premium treated capillaries (NanoTemper Technologies) on a Monolith NT.115Pico system (Nano Temper Technologies) using 20% LED and Medium IR-laser power. Data analysis were performed using MO.affinity analysis v.2.2.7 software (NanoTemper Technologies).

1.9 Fluorescent microscopy analysis

Confocal images and analysis were acquired on a Confocal Leica TCS SP5 microscope. Cells were centrifuged to remove the culture medium at 3000 x g and washed twice with PBS following the same centrifugation method. Subsequently, the parasites were fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde on a slide pre-treated with poly-L-lysine. After fixation, cells were washed twice with PBS 1X and permeabilized with 0.1% Triton X-100 followed by three washes in PBS 1X and block for 1 h in 0.5% PBS/BSA. After this, the cells were incubated with the primary antibody for 1 h followed by three washes with PBS and incubation with secondary anti-IgG fluorescent-conjugated antibody for 1 h. Nuclei and kinetoplasts were marked with DAPI together with the secondary antibody. The dilution of primary antibodies was: rabbit anti-GFP (Invitrogen 1:500) and anti-TcEIF4G5 (1:50). Dilution of secondary antibodies: Alexa 546-conjugated goat anti-mouse antibody 1:400 (Sigma); Alexa 488-conjugated goat anti-rabbit antibody diluted 1:600 (Sigma). DAPI dilution 1:2000.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Alexandre Haruo Inoue (Molecular Biology Institute of Paraná) for the help with the preparation of *T. cruzi* extracts as well as the immunoprecipitations, Michel Batista and Kelly Cavalcanti Machado (Carlos Chagas

Institute) for the preparation and analysis of samples for mass spectrometry, Tabata D'Maiella Freitas Klimeck, Beatriz Santana Borges, Bruna Hilzendeger Marcon (Carlos Chagas Institute) for help with microscopy images. The authors also thank the Laboratory Animal Facility at the Carlos Chagas Institute/Fiocruz-PR, Brazil. Protein purifications, mass spectrometry and microscopy analyses were performed respectively at the Protein Purification and Characterization, Mass Spectrometry and Microscopy platforms of the of the FIOCRUZ Technological Platform program.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JFC: performed most of the experiments and prepared the manuscript; HP: performed experiments; BMM: performed experiments; ERF: performed *in silico* analysis, analyzed the data and discussed the results; CSTC: performed experiments; BGG: performed experiments, analyzed the data, critically discussed the results and prepared the manuscript; BD: critically discussed the results and prepared the manuscript; NZ: critically discussed the results and prepared the manuscript, FBH: prepared the manuscript and critically discussed the results.

REFERENCES

1. Sonenberg N, Hinnebusch A. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*. 2009;136(4):731–745.
2. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2010;11(2):113–27.
3. Hinnebusch AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*. 2014;83:779–812.
4. Merrick WC, Pavitt GD. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(12): pii:a033092.
5. Gingras A, Raught B & Sonenberg N. eIF4 initiation factors : effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators. *Annu. Rev. Biochem*. 1999;68:913–963.
6. Günzl A. The pre-mRNA splicing machinery of trypanosomes: complex or simplified? *Eukaryot. Cell*. 2010;9:1159–1170.

7. Preußner C, JN, Günzl A, Bindereif A. Pre-mRNA splicing in *Trypanosoma brucei*: factors, Mechanisms, and Regulation. In: Bindereif A, editor. RNA Metabolism in Trypanosomes. Springer Press; 2012. pp. 49–76.
8. De Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* 2011;51:31-46.
9. Clayton C. The Regulation of Trypanosome Gene Expression by RNA-Binding Proteins. *PLoS Pathog.* 2013;9(11):e1003680.
10. Kramer S. RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA.* 2014;5(2):263–84.
11. Freire ER, Sturm NR, Campbell DA, de Melo Neto OP. The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. *Pathogens.* 2017;6(4):pii:E55.
12. da Costa Lima TD, Moura DMN, Reis CRS, Vasconcelos, JRC, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RC de Melo Neto OP. Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryotic Cell.* 2010;9(10):1484–94.
13. Kramer S, Bannerman-Chukualim B, Ellis L, Boulden EA, Kelly S, Field MC, Carrington M. Differential Localization of the Two *T. brucei* Poly(A) Binding Proteins to the Nucleus and RNP Granules Suggests Binding to Distinct mRNA Pools. *PLoS One.* 2013;8(1):e54004.
14. Lueong S, Merce C, Fischer B, Hoheisel JD, Erben ED. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. *Mol Microbiol.* 2016;100(3):457-71.
15. Terrao M, Marucha KK, Mugo E, Droll D, Minia I, Egler F, Braun J, Clayton C. The suppressive cap-binding complex factor 4EIP is required for normal differentiation. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(17):8993-9010.
16. Khaleghpour K, Kahvejian A, De CG Roy G, *et al.* Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol Cell Biol.* 2001;21:5200–13.
17. Jiménez-López D, Bravo J, Guzmán P. Evolutionary history exposes radical diversification among classes of interaction partners of the MLLE domain of plant poly(A)-binding proteins. *BMC Evol Biol.* 2015;15:195.
18. de Melo Neto OP, da Costa Lima TDC, Merlo KC, Romão TP, Rocha PO, Assis LA, Nascimento LM, Xavier CC, Rezende AM, Reis CRS, Papadopoulou B. Phosphorylation and interactions associated with the control of the Leishmania Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. *RNA Biol.* 2018;15(6):739-755.
19. Dos Santos Rodrigues FH, Firczuk H, Breeze AL, Cameron AD, Walko M, Wilson AJ, Zanchin NIT, McCarthy JEG. The *Leishmania* PABP1-eIF4E4 interface: a novel 5'-3' interaction architecture for trans-spliced mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(3):1493-1504.

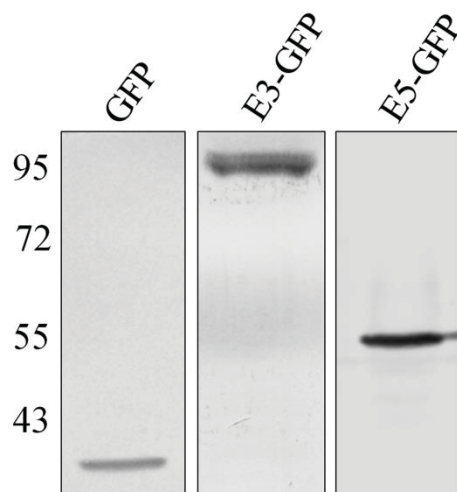
20. Freire E, Vashisht A, Malvezzi A. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. *RNA*. 2014;20:1–15.
21. Topisirovic I, Svitkin YV, Sonenberg N, Shatkin AJ. Cap and cap binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*. 2011;2: 277–298.
22. Rhoads RE. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:16711–16715.
23. Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B, Place AR. Diversity of Eukaryotic Translational Initiation Factor eIF4E in Protists. *Comparative and Functional Genomics*. 2012;2012: 134839-21.
24. Groppo R, Richter JD. Translational control from head to tail. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21:444–451.
25. Blewett NH, Goldstrohm AC. A eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein promotes mRNA decapping and is required for PUF repression. *Molecular and Cell Biology*. 2012;32:4181–4194.
26. Gosselin P, Martineau Y, Morales J, Czjzek M, Glippa V, Gauffeny I, Morin E, Le Corquille G, Pyronnet S, Cormier P, Cosson B. Tracking a refined eIF4E-binding motif reveals Angel1 as a new partner of eIF4E. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:7783–7792.
27. Dhalia R, Reis CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, Standart N, de Melo Neto OP. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2005;140(1):23–41.
28. Freire ER, Dhalia R, Moura DMN, da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CRS, Hughes K, Figueiredo RC, Standart N, Carrington M, de Melo Neto OP. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2011;176(1):25–36.
29. Freire ER, Malvezzi AM, Vashisht AA., Zuberek J, Saada EA, Langousis G, Nascimento JD, Moura D, Darzynkiewicz E, Hill K, de Melo Neto OP, Wohlschlegel JA, Sturm NR, Campbell, DA. *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. *Eukaryotic Cell*. 2014;13(7):896–908.
30. Zinoviev A, Shapira M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. *Comparative and Functional Genomics*. 2012;2012:813718.
31. Pestova TV, Hellen CU. Coupled folding during translation initiation. *Cell*. 2003;115(6):650-2.

32. Zinoviev A, Léger M, Wagner G, Shapira M. A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(19), 8404–8415.
33. Freire ER, Moura DMN, Bezerra MJR, Xavier CC, Morais-Sobral MC, Vashisht AA, Rezende AM, Wohlschlegel JA, Sturm NR, de Melo Neto OP, Campbell DA. *Trypanosoma brucei* EIF4E2 cap-binding protein binds a homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein. *Curr Genet*. 2018;64(4):821-839.
34. Moura DM, Reis CR, Xavier CC, da Costa Lima TD, Lima RP, Carrington M, de Melo Neto OP. Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol*. 2015;12(3):305-19.
35. Zoltner M, Krienitz N, Field MC, Kramer S. Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(7):e0006679.
36. Imataka H, Gradi A, Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J*. 1998;17(24):7480-9.
37. Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Mol Cell*. 1998;2(1):135-40.
38. Rajkowitsch L, Vilela C, Berthelot K, Ramirez CV, McCarthy JEG. Reinitiation and Recycling are Distinct Processes Occurring Downstream of Translation Termination in Yeast. *JMB*. 2004;335:71–85.
39. Haghighat A, Sonenberg N. eIF4G Dramatically Enhances the Binding of eIF4E to the mRNA 5*-Cap Structure. *J Biol Chem*. 1997;272(35):21677-80.
40. Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev*. 2005;19(1):104-13.
41. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D222-30.
42. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 2017.
43. de Melo Neto OP, da Costa Lima TD, Xavier CC, Nascimento LM, Romão TP, Assis LA, Pereira MM, Reis CR, Papadopoulou B. The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA Biol*. 2015;12(11):1209-21.
44. Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol*. 1995;15(9):4990-7.

45. Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell*. 1999;3(6):707-16.
46. Hershey PE, McWhirter SM, Gross JD, Wagner G, Alber T, Sachs AB. The Cap-binding protein eIF4E promotes folding of a functional domain of yeast translation initiation factor eIF4G1. *J Biol Chem*. 1999;274(30):21297-304.
47. Yoffe Y, Léger M, Zinoviev A, Zuberek J, Darzynkiewicz E, Wagner G, Shapira M. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E–eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(10):3243-53.
48. Umenaga Y, Paku KS, In Y, Ishida T, Tomoo K. Identification and function of the second eIF4E-binding region in N-terminal domain of eIF4G: comparison with eIF4E-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;414(3):462-7.
49. Igreja C, Peter D, Weiler C, Izaurralde E. 4E-BPs require non-canonical 4E-binding motifs and a lateral surface of eIF4E to repress translation. *Nat Commun*. 2014;5:4790.
50. Grüner S, Peter D, Weber R, Wohlbold L, Chung MY, Weichenrieder O, Valkov E, Igreja C, Izaurralde E. The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. *Mol Cell*. 2016;64(3):467-479.
51. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;181(2):61-72.
52. Costa JFD, Ferrarini MG, Nardelli SC, Goldenberg S, Ávila AR, Holetz FB. *Trypanosoma cruzi* XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(6):e170531.
53. Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Krieger MA, Goldenberg S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356(4):1062-7.
54. Dallagiovanna B, Correa A, Probst CM, Holetz F, Smircich P, de Aguiar AM, Mansur F, da Silva CV, Mortara RA, Garat B, Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA. Functional Genomic Characterization of mRNAs Associated with TcPUF6, a Pumilio-like Protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2008;283(13):8266-73.
55. Decker CJ, Parker R. P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(9):a012286.
56. Protter DSW, Parker R. Principles and Properties of Stress Granules. *Trends Cell Biol*. 2016;26(9):668-679.
57. Oliveira C, Carvalho PC, Alves LR, Goldenberg S. The Role of the *Trypanosoma cruzi* TcNRBD1 Protein in Translation. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164650.

58. Zeidan Q, He F, Zhang F, Zhang H, Jacobson A, Hinnebusch AG. Conserved mRNA-granule component Scd6 targets Dhh1 to repress translation initiation and activates Dcp2-mediated mRNA decay in vivo. *PLoS Genet.* 2018;14(12):e1007806.
59. Holetz FB, Alves LR, Probst CM, Dallagiovanna B, Marchini FK, Manque P, Buck G, Krieger MA, Correa A, Goldenberg S. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J.* 2010;277(16):3415-26.
60. Fritz M, Vanselow J, Sauer N, Lamer S, Goos C, Siegel TN, Subota I, Schlosser A, Carrington M, Kramer S. Novel insights into RNP granules by employing the trypanosome's microtubule skeleton as a molecular sieve. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(16):8013-32.
61. Reolon LW, Vichier-Guerre S, de Matos BM, Dugué L, Assunção TRDS, Zanchin NIT, Pochet S, Guimarães BG. Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* EIF4E5 translation factor homologue in complex with mRNA cap-4. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(11):5973-5987.
62. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CN, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 1985;16:315–327.
63. Batista M, Marchini FK, Celedon PA, Fragoso SP, Probst CM, Preti H, Ozaki LS, Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol.* 2010;10:259.
64. Dreze M, Monachello D, Lurin C, Cusick ME, Hill DE, Vidal M, Braun P. High-quality binary interactome mapping. *Methods in Enzymology.* (2nd ed., Vol. 470). Elsevier Inc. 2010.
65. Lu HY, Buck GA. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;44(1):109-14.
66. Fridy PC, Li Y, Keegan S, Thompson MK, Nudelman I, Scheid JF, Rout MP. (2014). A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nature Methods.* 11(12):1253–1260.
67. Cox J, Neuhauser N, Michalski A, Scheltema RA, Olsen JV, Mann M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J Proteome Res.* 2011;10(4):1794-805.
68. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol.* 2008;26(12):1367-72.

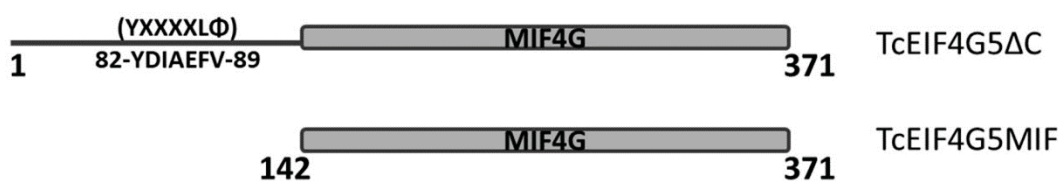
SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS



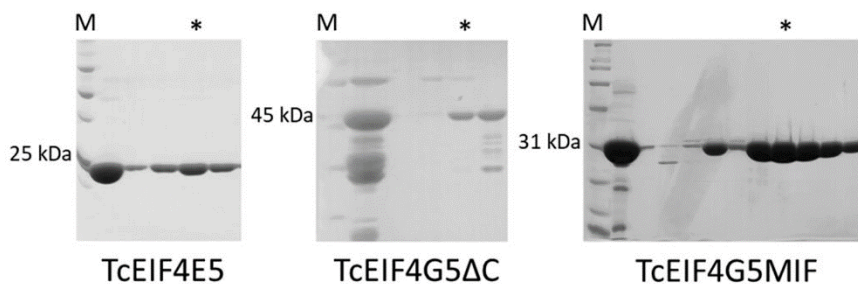
Supplementary figure 1. TcEIF4E3 and TcEIF4E5 expression fused to the GFP tag.

T. cruzi epimastigote protein extract. GFP: parasites expressing GFP; E3-GFP: parasites expressing TcEIF4E3-GFP; E5-GFP: parasites expressing TcEIF4E5-GFP. Western blot performed with rabbit monoclonal anti-GFP, 1:2000 dilution (Invitrogen) as primary antibody, followed by incubation with Goat anti-Rabbit IgG IRDye[®]800CW secondary antibody, 1:15:000 dilution (LI-COR Biosciences). To reveal the immunoblotting we used Scanner Odyssey LI-COR Biosciences.

A



B



S

supplementary figure 2. A) Schematic representation of the TcEIF4G5 constructions used for recombinant expression. TcEIF4G5ΔC, in addition to the conserved MIF4G

domain, contains the full N-terminal, which in eukaryotic eIF4G, comprises the canonical eIF4E binding motif (YXXXXLΦ). The partially conserved motif identified in TcEIF4G5 is highlighted. B) SDS-PAGE analysis of the purified TcEIF4E5, TcEIF4G5ΔC and TcEIF4G5MIF. M: molecular marker. The lanes corresponding to the samples used in micro scale thermoforesis experiments are identified with an asterisk.

SUPPLEMENTARY TABLE LEGEND

Supplementary table 1. Specific oligonucleotide primers. Sequence of oligonucleotide primers used for amplification of TcEIF4E1-6, TcEIF4G1-5 and TcPABP1-2 genes.

Gene	ID	Primer
TcEIF4E1	TcCLB.503593.10	F – ATGTCGGACGTGAAGTCGAAGGAGG R - CTA CTTCCCGGTGCTGTGGGGG
TcEIF4E2	TcCLB.511353.40	F – ATGCAGACGCGGCTGAAGTCG R - CTATAACTCGTATTTGGGTGGTACCTTCCAG
TcEIF4E3	TcCLB.508827.30	F – ATGAACCCGGCGGCGCAAGA R - TTACAGTGTGAAGTCCGGCGTTATTCGC
TcEIF4E4	TcCLB.509037.40	F – ATGAGCTCCGTTCTGAAGGCGGAC R - TTACCAGCGGCGTCCGGTTGTTTC
TcEIF4E5	TcCLB.508661.10	F – ATGAAGGAAACGGCTCACGCC R - TCAGCTTTTTGCACCGGACACC
TcEIF4E6	TcCLB.507519.30	F – ATGAGCGCGCAGACGTCTTCG R - TCAATCGGCGGTGACTTCACTGC
TcEIF4G1	TcCLB.506739.10	F – ATGTTTACCGTTACACCGGGTCC R - TCAATACCCGCGTAGTTCACG
TcEIF4G2	TcCLB.506445.20	F – ATGGAGCCACTGAGAGCG R - TCACCGGCGCTGAATCG
TcEIF4G3	TcCLB.508837.130	F – ATGCACGTCTATTCCATT CAGCAGA R - TCACTTGTTCCGCTTCTTAAACG
TcEIF4G4	TcCLB.504827.130	F – ATGCTCTTCAAGCCACGAGG R - TCAAGGATACA ACTGGGCAAGCT

TcEIF4G5	TcCLB.508989.90	F – ATGGACCACCAAACCATGTCTAATG R - C TACTTGAGCTTGTCAAGCATGGCT
TcPABP1	TcCLB.506885.70	F – ATGCTGGCAGTAAATAAACCAATGGC R - TTACGCGCTGGATTTCGTGCG
TcPABP2	TcCLB.508461.140	F – ATGTCGAACTTTCCTGCTGCG R - CTAAACGTTTCATGTGGCGATTCA

Forward (F) e Reverse (R)

4. CAPÍTULO 2

The mRNA cycle in *Trypanosoma cruzi*

Autores: Saloê Bispo Poubel, Jimena Ferreira da Costa, Mariana Galvão Ferrarini, Bruno Dallagiovanna, Fabiola Barbieri Holetz.

Artigo científico submetido no periódico RNA.

Como citado no capítulo anterior, em eucariotos, os fatores de início de tradução e as proteínas que compreendem os grânulos de estocagem/degradação estão sempre atuando em um processo competitivo pelo acesso aos mRNAs, promovendo entre estes compartimentos o “Ciclo dos mRNAs” (Decker & Parker, 2012). Esse processo de intercâmbio de mRNAs entre diferentes complexos proteicos é de extrema importância para a realização correta do controle da expressão gênica em células eucarióticas, tanto em condições ambientais normais quanto em momentos desafiadores para a célula, como por exemplo durante o estresse nutricional.

Sabe-se que os tripanossomatídeos apresentam sua biologia celular e molecular muito peculiar o que exige um controle de expressão gênica diferenciado. Uma das

características que torna os tripanossomatídeos excelentes modelos de estudo da regulação de genes é que o controle dessa regulação ocorre predominantemente em nível pós-transcricional. Muitas pesquisas engajadas em estudar a regulação nestes organismos têm sido realizadas (Revisado por Clayton, 2019), contudo, até o momento nada se conhecia a respeito da dinâmica dos mRNAs entre a tradução, a estocagem e a degradação em tripanossomatídeos.

Sendo assim, o capítulo 2 deste trabalho teve por objetivo caracterizar o ciclo dos mRNAs no *T. cruzi*, identificando os mRNAs que estão sendo traduzidos ou complexados à grânulos de estocagem/degradação, a fim de entender a dinâmica dos mRNAs quando os parasitas estão em condições normais de crescimento e quando são submetidos ao estresse nutricional.

Neste trabalho foram extraídos e sequenciados RNAs poliA totais e associados à tradução (*Ribosome Profiling*). Através desses dados foi possível observar que de fato, o controle da expressão de genes em *T. cruzi* ocorre majoritariamente em nível pós-transcricional com importante papel do controle traducional. Quando o transcrito das formas epimastigotas e epimastigotas submetidas a estresse nutricional foi comparado, constatamos que 98% dos genes são comuns em ambas as condições. Entretanto, quando comparamos o tradutoma, (*Ribosome profiling*), demonstramos que 55% dos transcritos traduzidos são diferencialmente expressos entre epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional. Através de ensaios de imunoprecipitação das proteínas marcadoras de grânulos, TcDHH1 e TcXRNA, verificou-se que além dessas proteínas interagirem com diferentes mRNAs, ambas compartilham mRNA com a tradução, indicando que além de TcDHH1 e TcXRNA provavelmente atuarem em complexos ribonucleoproteicos distintos, essas proteínas apresentam importante envolvimento com a regulação de genes no *T. cruzi*.

The mRNA cycle in *Trypanosoma cruzi*

Bispo SP^{1,☒}, Costa JF^{1,2,☒}, Ferrarini MG¹, Dallagiovanna B^{1,2,*}, Holetz FB^{1,*}.

¹ Laboratório de Regulação de Expressão Gênica, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ/PR, Curitiba, Paraná, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, Paraná, Brazil.

☒ These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: * fabiola.holetz@fiocruz.br; * bruno.dallagiovanna@fiocruz.br

Running Title: The mRNA cycle in *T. cruzi*.

Keywords: *T. cruzi*, TcXRNA, TcDHH1, Translation regulation, mRNA cycle.

Abstract

Trypanosomes present particularities at the molecular level, such as the absence of canonical promoters for RNA polymerase II and polycistronic transcription. Hence, regulation of the gene expression occurs by post-transcriptional events. Among them, the control of mRNA degradation and mRNAs access to the translation machinery are directly related to host adaptation during their life cycle. In eukaryotes, mRNAs that are not being translated, or those directed for degradation, are compartmentalized into distinct cytoplasmic structures termed mRNP granules. These granules are classified in P-bodies and Stress Granules (GE) and play a key role in the post-transcriptional regulation of gene expression. These structures can interact in a dynamic cycle exchanging mRNAs between translation, storage and degradation, pointing to a decisive role in the control of gene expression. Here, we investigated the movement of mRNAs in the storage / degradation and translation machineries in *T. cruzi*. RNA sequencing analysis of Poly(A) RNA population showed that less than 2% of genes are differentially expressed comparing epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress. However, ribosome footprints mapping showed that although almost all of the transcripts are present in both conditions, only 45% of the translated transcripts are common between them. In addition, TcXRNA and TcDHH1 granules do not share mRNAs, suggesting that these granules have distinct functions.

Introduction

Since its transcription the life of a eukaryotic messenger RNA is an odyssey that involves several regulatory steps, including processing, nucleocytoplasmic transport, degradation/storage, and finally protein translation. These mechanisms ensure the correct fate of mRNA contributing to the development and adaptation of the cell to different environmental conditions (Copping *et al.*, 2018).

In cytoplasm, mRNAs that are not being translated associate with RNA-binding proteins (RBP) and, according to cell state, are assembled into membraneless ribonucleoprotein structures called RNA granules, including P-bodies and Stress Granules (GE) (Anderson & Kedersha, 2006; Kedersha *et al.*, 2005). These structures play a crucial role in post-transcriptional regulation and translation control. P-bodies are constitutively present in the cell but increase in number and size in response to conditions that affect the translation process (Teixeira & Sheth, 2005). Several studies indicate the role of P-bodies in mRNA decapping-dependent decay as they are composed of proteins that act on 5' - 3' degradation of mRNA (deadenylases, decapping enzymes DCP1 / DCP2, 5'-3' exoribonuclease 1 XRN1, translational repressor / decapping activator (Rck / p54 / dhh1) and some specific mRNA regulatory factors, such as Non Sense Mediated Decay (NMD) proteins and miRNA-associated factors (Kulkarni

et al., 2010; Parker & Sheth, 2007; Sheth & Parker, 2006; Franks & Lykke-Andersen, 2008). P bodies are devoid of eukaryotic initiation factors (eIFs) with the exception of the 5'-m⁷GTP mRNA cap binding protein eIF4E (Melemedjian & Mejia, 2013). In contrast, GE contain non-translating mRNAs associated with various translation initiation factors, the 40S ribosomal subunit and the Poly(A) tail-binding protein (PABP) (Anderson & Kedersha, 2008; Buchan & Parker, 2009). GE are induced by cell stress (e.g., starvation, arsenite, heat shock) in a wide variety of organisms and cell types and appear to play an important role in mRNA storage when the integrity of the translation process is compromised (Ivanov *et al.*, 2019). In addition, eukaryotic studies demonstrate that P-bodies and GE can interact and exchange their components in a dynamic cycle with the exchange of mRNAs between translation, storage and degradation, indicating the crucial role of these structures in the control of gene expression at the post-transcriptional level (Ivanov *et al.*, 2019; Brengues *et al.*, 2005; Decker & Parker, 2012).

Trypanosomatids are eukaryotic parasites that cause a number of highly debilitating zoonoses affecting millions of people worldwide. In order to adapt to the different microenvironments of their hosts, trypanosomatids undergo biological transformations, which cause changes in their structure and metabolism to make the infection viable. These organisms have biological peculiarities that make it unique in nature (De Souza, 2004; Rodrigues *et al.*, 2014). Trypanosomatids appear to have lost their ability to regulate their transcription and the regulation of gene expression occurs predominantly by post-transcriptional mechanisms at the level of mRNA and protein metabolism (Clayton & Shapira, 2007; Martínez-Calvillo *et al.*, 2009; De Gaudenzi *et al.*, 2011). In these parasites, mRNAs are transcribed by RNA polymerase II (RNA Pol II) into polycistronic units that are further processed to yield mature mRNAs. To date, no canonical promoters have been identified for RNA Pol II and mRNA processing occurs by trans-splicing and polyadenylation (Michaeli, 2011; Clayton & Michaeli, 2011). In addition, genes of the same polycistronic unit are unrelated in function and may show significant differences in their level of expression through the life cycle of the cells [reviewed in Clayton, 2019]. The control of the degradation and access of the mRNAs to the translation machinery are directly related to the adaptation of these parasites during the life cycle (Zinoviev & Shapira, 2012). The mechanism of translation and stability of the mRNAs are regulated by trans factors that bind to specific cis elements in a set of target mRNAs (Clayton, 2014). In addition, an overall reduction of the translation process at non-proliferative stages of these parasites or in response to stress is observed (Smircich *et al.*, 2015). These characteristics, added to the fact that trypanosomatids are easily cultured and genetically modified, make these organisms excellent models for the study of post-transcriptional regulation.

Several studies have described the presence of different granules of mRNP in *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. There are at least six types of granules of mRNPs in trypanosomatids, such as: P-body-like RNA granules, nutritional stress induced RNA granules, heat shock induced RNA granules, nuclear peripheral granules, posterior pole granule, and granules formed by tRNAs (Kramer, 2014). This vast repertoire of mRNP granules can be justified as an adaptation to the loss of transcriptional control. However, although the importance of translational control and control of mRNA stability in the regulation of gene expression is evident, the connection between mRNP granules and the regulation during the life cycle remains unknown in these parasites.

P-body-like granules were initially described in *Trypanosoma cruzi* (Holetz *et al.*, 2007; Cassola *et al.*, 2007) and contain similar components to yeast or mammalian P-bodies, p.e., TcDHH1 and TcXRNA proteins. These proteins are constantly present through the parasite life cycle and are localized in cytoplasmic foci that vary in number according to nutritional stress conditions and cycloheximide/puromycin treatment (Holetz *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2018). Additionally, TcDHH1 and TcXRNA colocalize only at the nuclear periphery mainly under cellular stress conditions and when the mRNA processing is inhibited (Costa *et al.*, 2018).

Here we assess the dynamic movement of cytoplasmic mRNAs between polysomes and mRNPs containing TcDHH1 and TcXRNA in exponentially growing parasites and parasites subjected to nutritional stress using Ribo-Seq and immunoprecipitation assays. RNA-seq of the total Poly(A) RNA population showed that only 2% of the genes are differentially expressed comparing epimastigote and stressed epimastigotes. In contrast, although almost all transcripts are present under both conditions, only 45% of translated transcripts are common between them. Furthermore, TcXRNA and TcDHH1 do not share mRNAs, suggesting that these proteins are in granules with distinct functions. Taking together our results show that translation plays a major role in gene expression regulation and that TcDHH1 and TcXRNA proteins acting decisively on the dynamics of mRNA in *T. cruzi*.

Results

To study the regulation of gene expression in response to stress conditions, we determined the gene expression profiles of epimastigote forms and nutritional stressed epimastigotes both at the total mRNA and at the translome level. We used the RNA-

Seq approach to identify transcribed mRNAs and ribosome profiling for polysome associated transcripts (Figure 1A).

Epimastigotes of the Dm28c strain were subjected to nutritional stress for 2 hours. Independent biological triplicates of each condition were obtained and used for RNA-Seq and ribosome profiling assays. All samples were sequenced on an Illumina platform and the total number of readings generated from all libraries as well as percentages of readings mapped to the *T. cruzi* Dm28c reference genome are shown in Table S1. Sample data derived from all libraries was analyzed using a variety of methods, including hierarchical clustering and principal component analysis (PCA), to inspect sample relationships and to identify possible outliers (Figure 1B and C). PCA analysis showed that at the total mRNA level samples do not segregate suggesting no significant differential gene expression after nutritional stress. On the other hand, footprinting samples clearly grouped according to treatment pointing to a predominant control of translation.

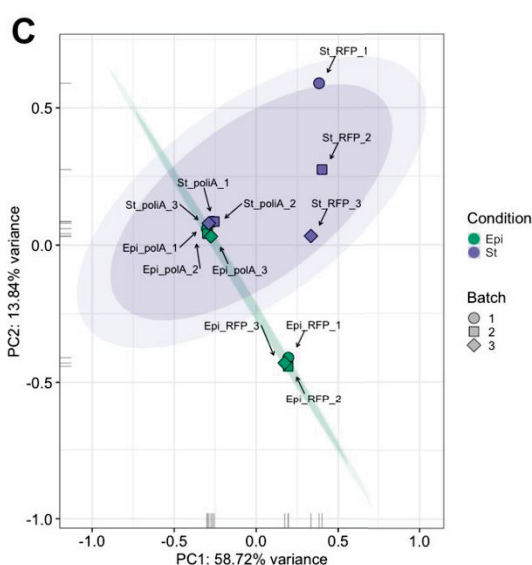
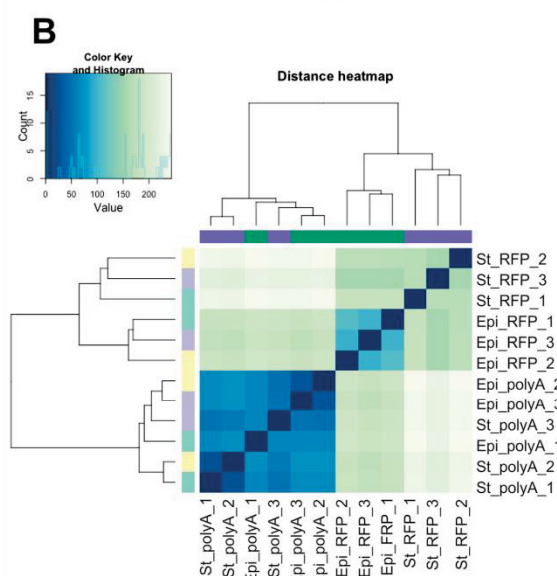
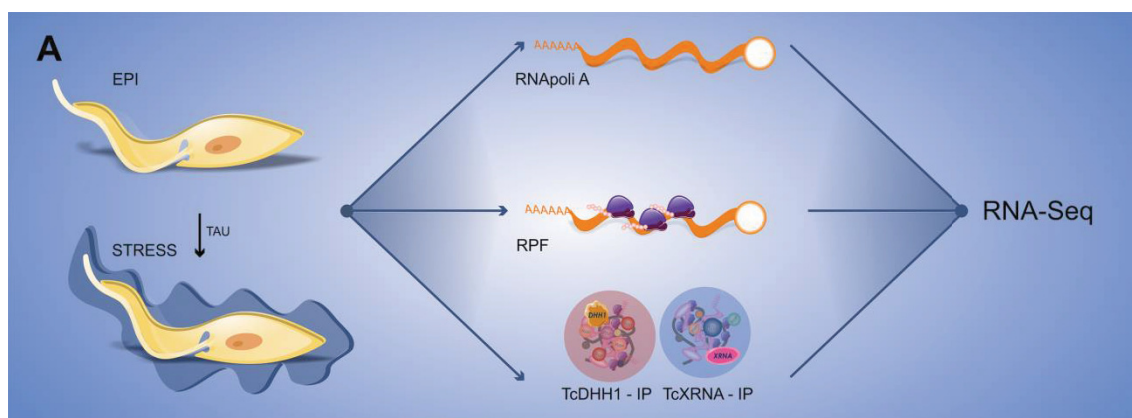


Figure 1: Global statistical assessment of the work. (A) Schematic representation of the study of gene expression regulation at the post-transcriptional level in *T. cruzi*. **(B)** RNA-Seq Heatmap analysis of PolyA and RFP mRNA replicas. Epi_polyA1-3: PolyA mRNAs of epimastigote; St_polyA1-3: PolyA mRNAs of epimastigotes under nutritional stress; Epi_RFP1-3: Ribosome Footprinting Profile of mRNAs of epimastigote; St_RFP1-3: Ribosome Footprinting Profile of mRNAs of epimastigote under nutritional stress. **(C)** RNA-Seq PCA analysis of PolyA and RFP mRNA replicas. Epi_RFP and St_RFP: Grouping mRNA replicas of the Ribosome Footprinting Profile of epimastigote and epimastigote under nutritional stress; Epi_polyA and St_polyA: Grouping PolyA mRNAs replicas of epimastigote and epimastigote under nutritional stress.

Epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress present small differences in the expression of genes at total mRNA level

In order to assess the mechanisms underlying gene expression control in response to stress conditions we first analyzed the total mRNA profile in epimastigotes in exponential growth phase and under nutritional stress. Thus, total mRNA was extracted and sequenced from three independent assays. We were able to identify more than 17 thousand genes being transcribed. Moreover, these transcripts were detected in both conditions with a nearly total overlap (Figure 2A). Most of these genes showed no significant changes in their expression levels after nutritional stress. Less than two per cent of the transcripts showed at least a two-fold change in their total levels (Figure 2B and Table S2).

These data show that there are no large differences in the total mRNA profile between the epimastigote and epimastigote samples under nutritional stress. We can say that almost all genes identified in both conditions are constitutively transcribed with no statistically significant changes in their transcript accumulation. When transcripts that showed changes in their accumulation after stress were analyzed, we observed that certain gene families were over-represented. DGF-1, MASPs, trans-sialidases and GP63 families were among the upregulated mRNAs (Table S2). Gene ontology (GO) analysis also showed the upregulation of different membrane transporters suggesting an intense remodeling of the parasite membrane in response to stress, as well as protein-coding genes involved with adhesion (Figure 2C and 2D). On the other hand, GO showed that protein-coding genes involved in various metabolic processes, mainly RNA metabolism,

as well as genes associated with molecular function of helicase activity were down-regulated in stress (Figure 2E and 2F).

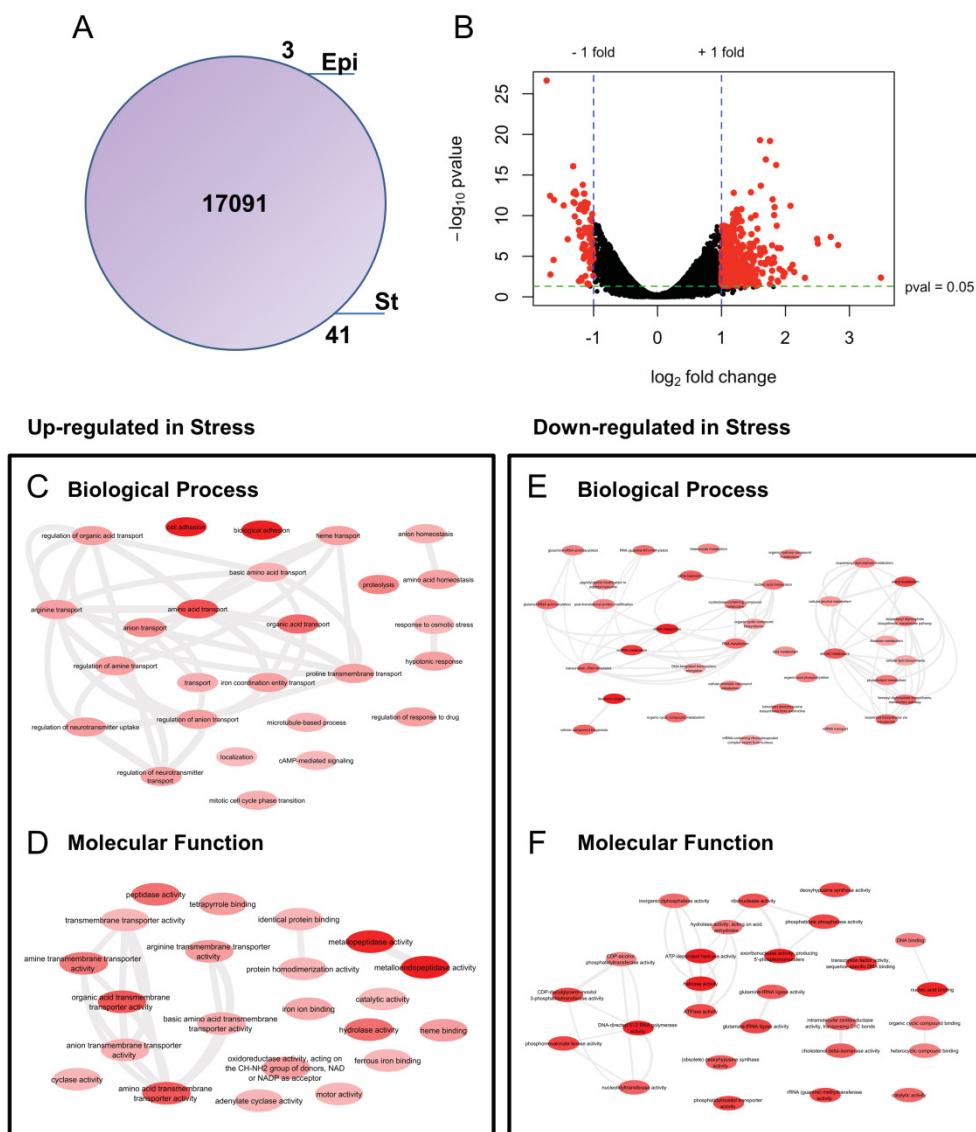


Figure 2. Sequencing of total mRNAs of epimastigotes (epi) and epimastigotes under nutritional stress (Stress). (A) Venn diagram indicating, the number of genes detected in both conditions. (B) Volcano plot depicting the log₂ fold change (log₂FC) of genes against the average expression level across both conditions. Each dot represents one gene. Red dots represent differentially expressed genes (FC > 1, P-Value < 0.05). (C and D) Gene ontology and String network of genes up-regulated in epimastigotes under nutritional stress: (C) genes involved in biological process, (D) genes involved in molecular function. (E and F) Gene ontology and String network of genes down-regulated in epimastigotes under nutritional stress: (E) genes involved in biological process, (F) genes involved in molecular function. The darker the color of the bubble, the

greater the number of protein-coding genes involved in the same pathway belonging to a metabolic process or molecular function.

Translational control is the major mechanism regulating gene expression in response to nutritional stress.

As a next step to investigate the role of translational control of *T. cruzi* gene expression, mRNAs associated with polysomes in epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress were analyzed by Ribosome Footprinting.

After analysis and normalization of counts of reads, it was possible to observe that about 10 thousand genes were associated with ribosomes in both conditions, being 15% of the identified mRNAs associated with the translation machinery only in the epimastigote form of the parasites, and 5.3% only in the stressed epimastigotes (Figure 3A). When analyzing the differential expression data, it is possible to note a change in the mRNA profiles associated with the polysomes, as shown in Figure 3B. Shift in protein synthesis strongly suggests that translational control is the predominant mechanism of gene regulation in *T. cruzi*.

In addition, there is an enrichment of protein-coding genes from the multigene trans-sialidases and MASP families (Table S2). When classifying the biological processes of genes up-regulated in stress, we observed an enrichment of several genes of biological processes involving several metabolic processes, biosynthesis and translation. Similarly, genes involved with the molecular function of transmembrane transport are up-regulated. (Figure 3C, 3D and Table 1). Among the down-regulated genes, a greater presence of genes involved in several transport processes was seen (Figure 3E and 3F).

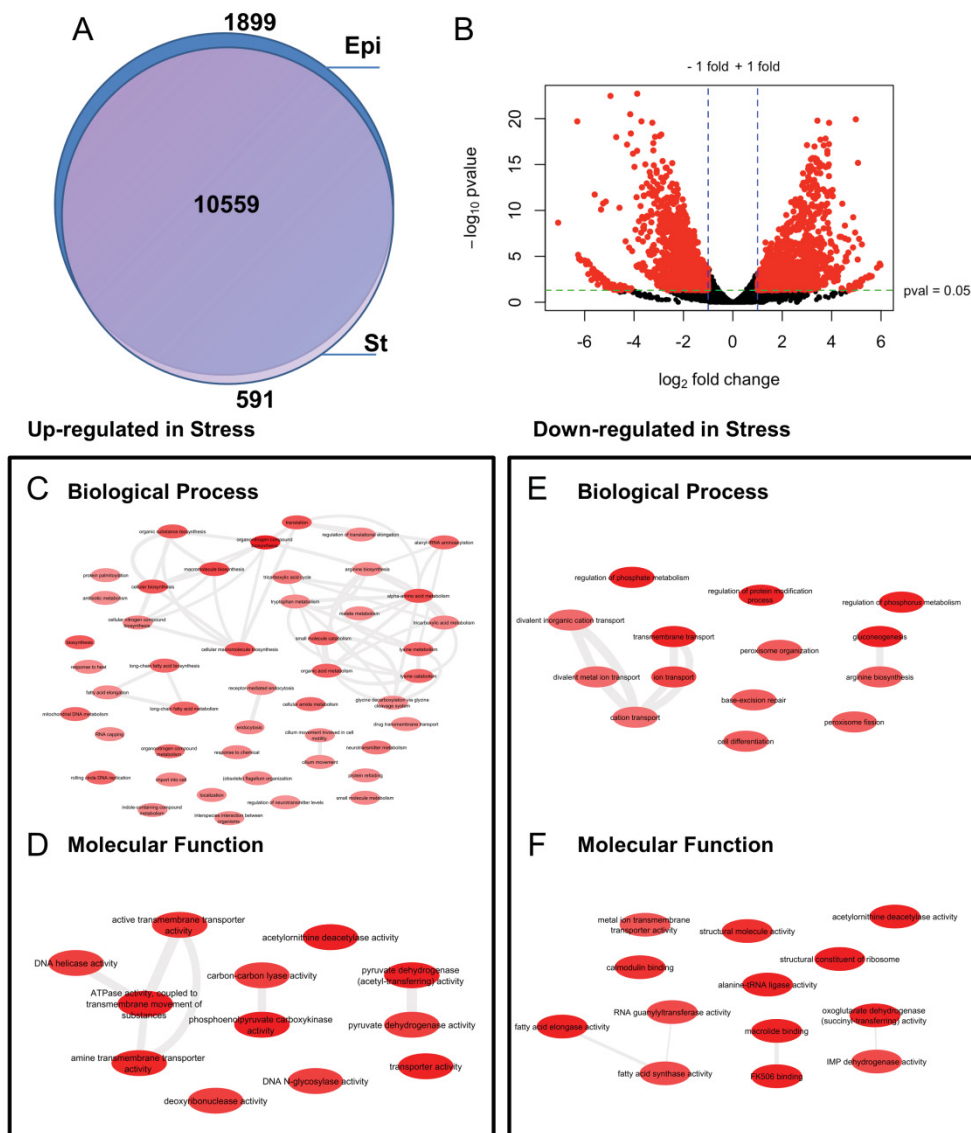


Figure 3. Sequencing of Ribosome Footprint of epimastigotes (epi) and epimastigotes under nutritional stress (St). (A) Venn diagram indicating, the number of genes detected in both conditions. (B) Volcano plot depicting the log₂ fold change (log₂FC) of genes against the average expression level across both conditions. Each dot represents one gene. Red dots represent differentially expressed genes (FC > 1, P-Value < 0.05). (C and D) Gene ontology and String network of genes up-regulated in epimastigotes under nutritional stress: (C) genes involved in biological process, (D) genes involved in molecular function. (E and F) Gene ontology and String network of genes down-regulated in epimastigotes under nutritional stress: (E) genes involved in biological process, (F) genes involved in molecular function. The darker the color of the bubble, the greater the number of protein-coding genes involved in the same pathway belonging to a metabolic process or molecular function.

Table 1. Gene ontology (GO) categories (Biological Process and Molecular Function) enriched across the epimastigotes under nutritional stress and epimastigotes form of *T. cruzi*.

	GO Term	P value	Num. DE	Total Num.	Ontology
Epimastigotes under nutritional stress to Epimastigote, up-regulated					
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	0.000543215147146	22	88	BP
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	0.000830084811272	73	426	BP
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	0.00564203057863	68	421	BP
GO:0006518	peptide metabolic process	0.0058295785465	46	265	BP
GO:1901605	alpha-amino acid metabolic process	0.00670867050141	12	46	BP
GO:0044249	cellular biosynthetic process	0.00805086917428	94	620	BP
GO:0006412	translation	0.00826940134731	44	256	BP
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	0.00939199272287	95	631	BP
GO:0043043	peptide biosynthetic process	0.00948970584213	44	258	BP
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	0.00953402942057	66	416	BP
GO:0009058	biosynthetic process	0.00977785342318	97	647	BP
GO:0006082	organic acid metabolic process	0.0118073681705	31	171	BP
GO:0044282	small molecule catabolic process	0.0133401548497	9	33	BP
GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	0.0136794944281	30	166	BP
GO:0042759	long-chain fatty acid biosynthetic process	0.0143484581763	3	5	BP
GO:0001676	long-chain fatty acid metabolic process	0.0143484581763	3	5	BP
GO:0006554	lysine catabolic process	0.0144333333284	2	2	BP
GO:0006419	alanyl-tRNA aminoacylation	0.0144333333284	2	2	BP
GO:0070581	rolling circle DNA replication	0.0144333333284	2	2	BP
GO:0006553	lysine metabolic process	0.0144333333284	2	2	BP
GO:0032042	mitochondrial DNA metabolic process	0.0158714353798	4	9	BP
GO:0006264	mitochondrial DNA replication	0.0158714353798	4	9	BP
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	0.015895681261	157	1123	BP
GO:0043436	oxoacid metabolic process	0.0173678109966	30	169	BP
GO:0043603	cellular amide metabolic process	0.0176729543999	46	282	BP
GO:0043604	amide biosynthetic process	0.0215843263019	44	271	BP
GO:0006101	citrate metabolic process	0.0239770643534	4	10	BP
GO:0006099	tricarboxylic acid cycle	0.0239770643534	4	10	BP
GO:0042133	neurotransmitter metabolic process	0.026012068538	6	20	BP
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	0.0323303198268	65	434	BP
GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	0.0328259876541	6	21	BP
GO:0072350	tricarboxylic acid metabolic process	0.0341697057116	4	11	BP
GO:0042221	response to chemical	0.0348585177551	5	16	BP
GO:0098657	import into cell	0.0362349962517	7	27	BP
GO:0006897	endocytosis	0.0362349962517	7	27	BP
GO:0044281	small molecule metabolic process	0.0366592484408	48	310	BP

GO:0051179	localization	0.0381031575848	67	453	BP
GO:0019464	glycine decarboxylation via glycine cleavage system	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0006568	tryptophan metabolic process	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0006586	indolalkylamine metabolic process	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0006898	receptor-mediated endocytosis	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0043064	obsolete flagellum organization	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0009266	response to temperature stimulus	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0009408	response to heat	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0042430	indole-containing compound metabolic process	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0006448	regulation of translational elongation	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0042026	protein refolding	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0006108	malate metabolic process	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0003341	cilium movement	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0034605	cellular response to heat	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0060294	cilium movement involved in cell motility	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0006526	arginine biosynthetic process	0.0398380042994	2	3	BP
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	0.0406991217605	6	22	BP
GO:0006855	drug transmembrane transport	0.0417361548055	3	7	BP
GO:0030497	fatty acid elongation	0.0417361548055	3	7	BP
GO:0036260	RNA capping	0.0417361548055	3	7	BP
GO:0044419	interspecies interaction between organisms	0.0419003505453	11	52	BP
GO:0016999	antibiotic metabolic process	0.0465058138035	4	12	BP
GO:0018345	protein palmitoylation	0.0465058138035	4	12	BP
GO:0001505	regulation of neurotransmitter levels	0.0496685224715	6	23	BP
GO:0003735	structural constituent of ribosome	0.0117536445084	27	144	MF
GO:0009922	fatty acid elongase activity	0.0143484581763	3	5	MF
GO:0004591	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring) activity	0.0144333333284	2	2	MF
GO:0004813	alanine-tRNA ligase activity	0.0144333333284	2	2	MF
GO:0005527	macrolide binding	0.0144333333284	2	2	MF
GO:0005528	FK506 binding	0.0144333333284	2	2	MF
GO:0008777	acetylornithine deacetylase activity	0.0144333333284	2	2	MF
GO:0005198	structural molecule activity	0.0218091415261	30	172	MF
GO:0005516	calmodulin binding	0.0239770643534	4	10	MF
GO:0003938	IMP dehydrogenase activity	0.0398380042994	2	3	MF
GO:0004484	mRNA guanylyltransferase activity	0.0398380042994	2	3	MF
GO:0008192	RNA guanylyltransferase activity	0.0398380042994	2	3	MF
GO:0004312	fatty acid synthase activity	0.0417361548055	3	7	MF
GO:0046873	metal ion transmembrane transporter activity	0.0496685224715	6	23	MF

(P-value cutoff of <0.05; Number of DE genes and total number of genes in each GO term are shown)

TcXRNA containing complexes are associated to different mRNAs in epimastigotes when compared with epimastigotes under nutritional stress

To identify mRNAs associated with the TcXRNA exonuclease in *T. cruzi* we immunoprecipitated the RNP particles both in logarithmic growth phase parasites and nutritionally stressed epimastigotes. In previous work, we described the generation of transfected strains expressing a GFP-tagged TcXRNA protein (Costa *et al.*, 2018). Here, we used an anti-GFP nanobody to immunoprecipitated TcXRNA RNPs. Immunoprecipitation assays were performed in independent triplicates for each condition, using GFP transfected parasites as a control. After immunoprecipitation, western blot assays of the eluted fractions showed the presence of a band of approximately 180 kDa, the expected size of TcXRNA-GFP fusion protein (Figure 4A). mRNAs present in the eluates were isolated and identified by RNA-Seq. An enrichment of two-fold when compared to the control assays was considered as positive for the presence of an mRNA in the TcXRNA containing complexes (see Table S2). Near three thousand mRNAs were identified as associated with TcXRNA complexes in epimastigotes (Figure 4B). We observed that in epimastigotes, associated mRNAs encode proteins mainly involved in different metabolic and biosynthesis processes (Figure 4C and 4D). On the other hand, a significant lower number of mRNAs were identified as associated with TcXRNA complexes in epimastigotes under nutritional stress. Moreover, this mRNAs represent a different subpopulation than the one identified in unstressed epimastigotes (Figure 4B). In addition, in parasites under stress, the interaction occurs mainly with mRNAs encoding proteins involved in metabolic processes like DNA metabolism, as well as response to stress and DNA repair (Figure 4E and 4F and Table 2).

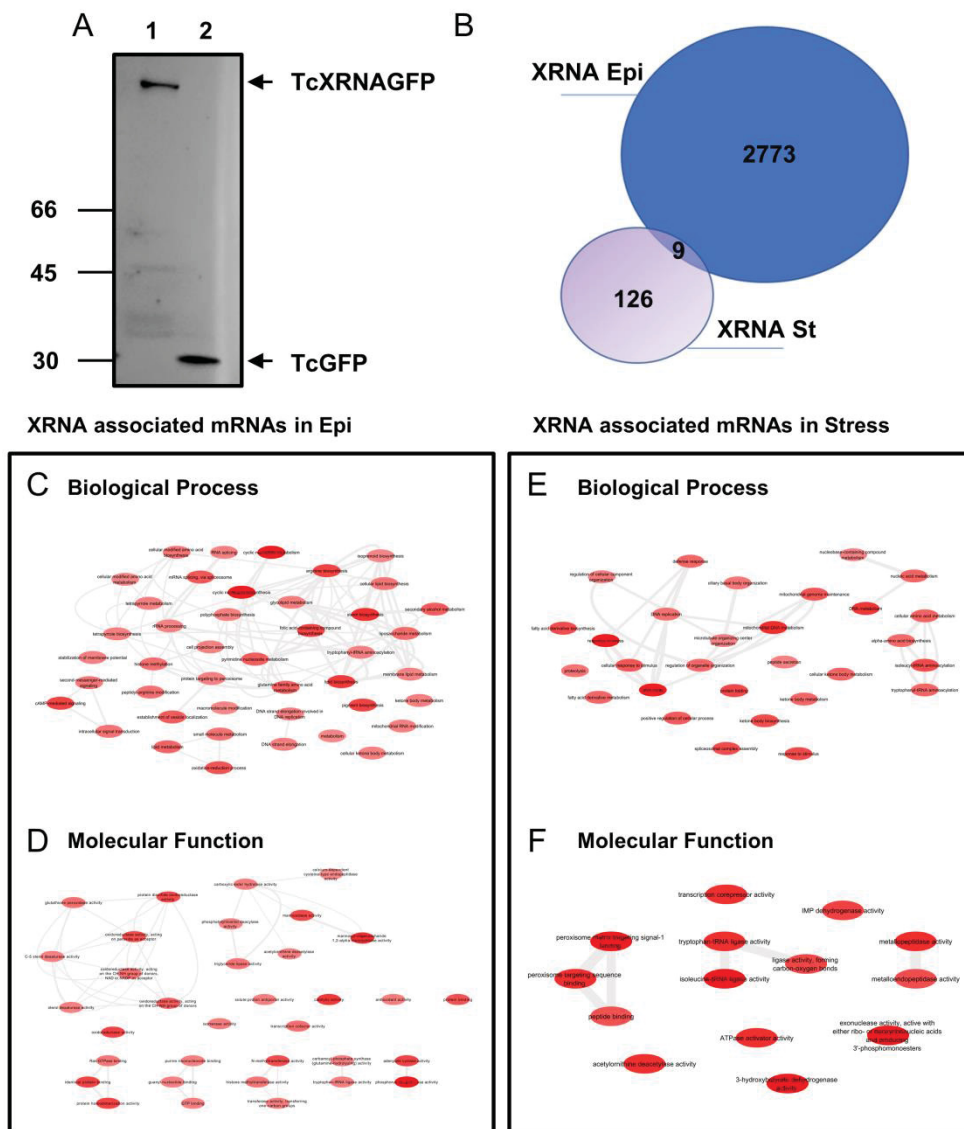


Figure 4. Sequencing of TcXRNA immunoprecipitated mRNAs of epimastigotes (Epi) and epimastigotes under nutritional stress (St). (A) Western blot of TcXRNAGFP immunoprecipitation (1) and TcGFP immunoprecipitation as a control (2). (B) Venn diagram indicating the number of genes detected in each condition. (C and D) Gene ontology and String network of TcXRNAGFP genes associated in epimastigote: (C) genes involved in biological process, (D) genes involved in molecular function. (E and F) Gene ontology and String network of TcXRNAGFP genes associated in epimastigotes under nutritional stress: (E) genes involved in biological process, (F) genes involved in molecular function. The darker the color of the bubble, the greater the number of protein-coding genes involved in the same pathway belonging to a metabolic process or molecular function.

Table 2. Gene ontology (GO) categories (Biological Process and Molecular Function) enriched in TcXRNA associated mRNAs in epimastigotes under nutritional stress form of *T. cruzi*.

	GO Term	P value	Num. DE	Total Num.	Ontology
XRNA epimastigotes under nutritional stress					
GO:0006950	response to stress	0.00198356984594	6	109	BP
GO:0006281	DNA repair	0.00231882009327	5	77	BP
GO:0006974	cellular response to DNA damage stimulus	0.00245444991581	5	78	BP
GO:0033554	cellular response to stress	0.00394757875863	5	87	BP
GO:0006264	mitochondrial DNA replication	0.00496153330047	2	9	BP
GO:0032042	mitochondrial DNA metabolic process	0.00496153330047	2	9	BP
GO:0006289	nucleotide-excision repair	0.00615328474842	2	10	BP
GO:0006259	DNA metabolic process	0.00660508373485	6	139	BP
GO:0006457	protein folding	0.0105420361821	5	110	BP
GO:0050896	response to stimulus	0.0112524911312	7	203	BP
GO:0000245	spliceosomal complex assembly	0.0121470263448	1	1	BP
GO:1901570	fatty acid derivative biosynthetic process	0.0121470263448	1	1	BP
GO:0046951	ketone body biosynthetic process	0.0121470263448	1	1	BP
GO:0006428	isoleucyl-tRNA aminoacylation	0.0121470263448	1	1	BP
GO:0000002	mitochondrial genome maintenance	0.0156540653744	2	16	BP
GO:0051716	cellular response to stimulus	0.0163590824098	6	169	BP
GO:0048522	positive regulation of cellular process	0.0176030361953	2	17	BP
GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	0.0217662036111	4	88	BP
GO:0090304	nucleic acid metabolic process	0.0228550385996	12	523	BP
GO:1902224	ketone body metabolic process	0.0241483956994	1	2	BP
GO:0046950	cellular ketone body metabolic process	0.0241483956994	1	2	BP
GO:1901568	fatty acid derivative metabolic process	0.0241483956994	1	2	BP
GO:0006436	tryptophanyl-tRNA aminoacylation	0.0241483956994	1	2	BP
GO:0008284	positive regulation of cell proliferation	0.0241483956994	1	2	BP
GO:0006952	defense response	0.0241483956994	1	2	BP
GO:1901607	alpha-amino acid biosynthetic process	0.0263457405173	2	21	BP
GO:0033043	regulation of organelle organization	0.0263457405173	2	21	BP
GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	0.0287555431248	2	22	BP
GO:0006260	DNA replication	0.0315601719277	3	57	BP
GO:0006508	proteolysis	0.0335253442749	8	310	BP
GO:0032053	ciliary basal body organization	0.0360058319519	1	3	BP
GO:0042127	regulation of cell proliferation	0.0360058319519	1	3	BP
GO:0006526	arginine biosynthetic process	0.0360058319519	1	3	BP
GO:0051128	regulation of cellular component organization	0.0420297370918	2	27	BP
GO:0006418	tRNA aminoacylation for protein translation	0.0449137079387	2	28	BP
GO:0031023	microtubule organizing center	0.0477210388545	1	4	BP

	organization				
GO:0009306	protein secretion	0.0477210388545	1	4	BP
GO:0002790	peptide secretion	0.0477210388545	1	4	BP
GO:0006525	arginine metabolic process	0.0477210388545	1	4	BP
GO:0006139	nucleobase-containing compound metabolic process	0.0489350867727	13	652	BP
GO:0016797	exonuclease activity, active with either ribo- or deoxyribonucleic acids and producing 3'-phosphomonoesters	0.0121470263448	1	1	MF
GO:0003858	3-hydroxybutyrate dehydrogenase activity	0.0121470263448	1	1	MF
GO:0005052	peroxisome matrix targeting signal-1 binding	0.0121470263448	1	1	MF
GO:0004822	isoleucine-tRNA ligase activity	0.0121470263448	1	1	MF
GO:0140110	transcription regulator activity	0.0196492513189	2	18	MF
GO:0008237	metallopeptidase activity	0.0221683579628	6	181	MF
GO:0008777	acetylmethionine deacetylase activity	0.0241483956994	1	2	MF
GO:0000268	peroxisome targeting sequence binding	0.0241483956994	1	2	MF
GO:0003714	transcription corepressor activity	0.0241483956994	1	2	MF
GO:0001671	ATPase activator activity	0.0241483956994	1	2	MF
GO:0004830	tryptophan-tRNA ligase activity	0.0241483956994	1	2	MF
GO:0140097	catalytic activity, acting on DNA	0.030156226591	3	56	MF
GO:0003938	IMP dehydrogenase activity	0.0360058319519	1	3	MF
GO:0060590	ATPase regulator activity	0.0360058319519	1	3	MF
GO:0016875	ligase activity, forming carbon-oxygen bonds	0.0392191846331	2	26	MF
GO:0004812	aminoacyl-tRNA ligase activity	0.0392191846331	2	26	MF
GO:0004222	metalloendopeptidase activity	0.044416047063	5	160	MF
GO:0005048	signal sequence binding	0.0477210388545	1	4	MF
GO:0003712	transcription coregulator activity	0.0477210388545	1	4	MF
GO:0042277	peptide binding	0.0477210388545	1	4	MF

(P-value cutoff of <0.05; Number of DE genes and total number of genes in each GO term are shown)

TcDHH1 is associated with different mRNA subpopulations and defines distinct RNP complexes when compared to TcXRNA.

In order to know which mRNAs interact with TcDHH1, a decapping activator in eukaryotes, we produced transfectant parasites expressing a GFP-tagged TcDHH1 protein. Transfected parasites showed the expression of the TcDHH1-GFP fusion protein in their cytoplasm (Figure S1). Transfected epimastigote forms were subjected to nutritional stress and both logarithmic growth phase parasites and stressed parasites were used for immunoprecipitation assays. For each condition, three independent

assays were performed where TcDHH1-GFP complexes were immunoprecipitated using GFP nanobodies. Immunoprecipitation of the TcDHH1-GFP protein complexes was confirmed by western blot of the eluted fractions, where a band corresponding to the size of the fusion protein was detected. Additional band associated to the TcDHH1-GFP samples are observed, which are most likely associated to degradation products. (Figure 5A). RNA in the immunoprecipitated fractions was purified and mRNAs were identified by RNA-seq analysis. We were able to identify 164 mRNAs in unstressed epimastigotes and 38 in stressed parasites, which almost no overlap between the mRNA subpopulations isolated in each condition (Figure 5B and Table S2). TcDHH1 interacts mainly with mRNAs involved in metabolic, catabolic processes, homeostasis and membrane transport in epimastigote (Figure 5 C and 5 D). In stressed parasites, we also observed mainly the presence of mRNAs involved in metabolic processes but also of transcripts involved with biosynthetic processes and translation, as well as DNA and RNA-binding (Figure 5E and 5F and Table 3).

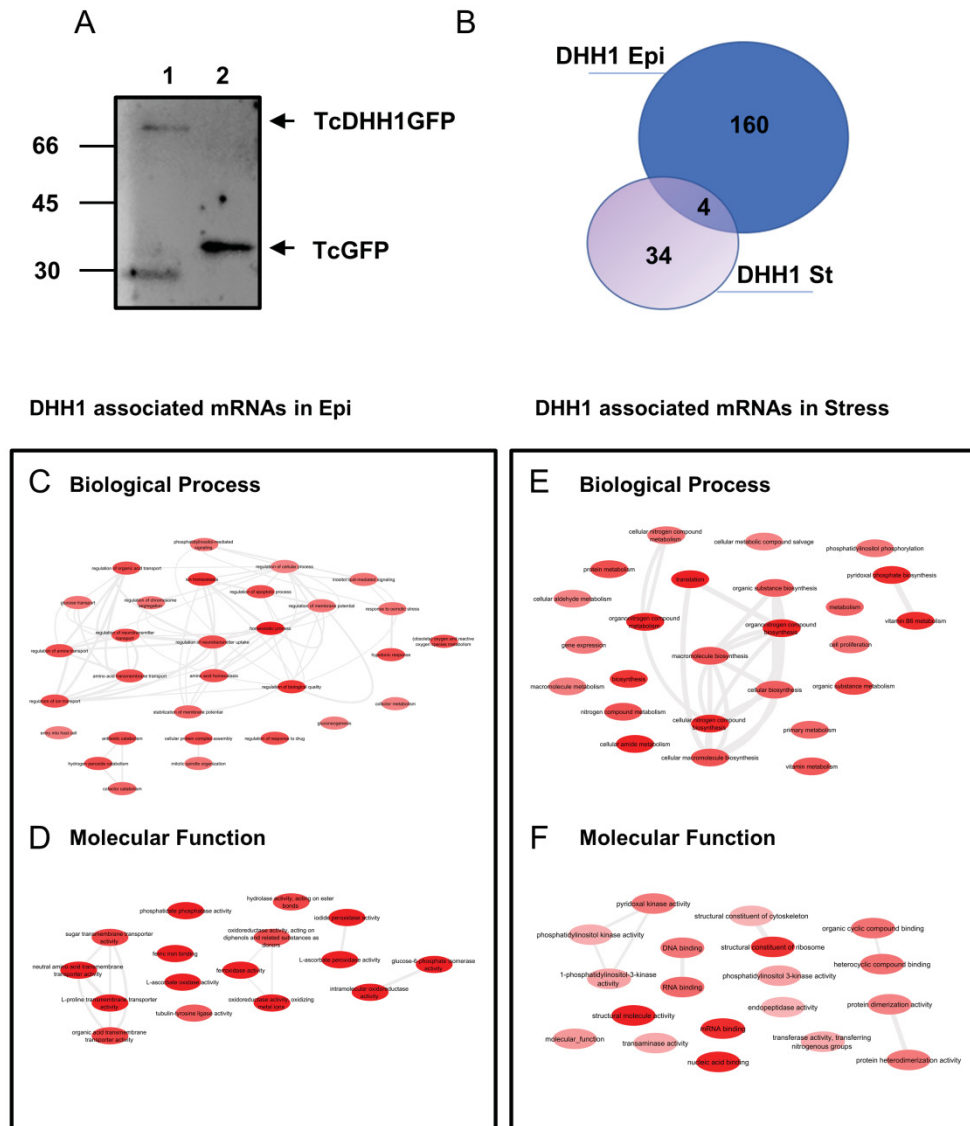


Figure 5. Sequencing of TcDHH1 immunoprecipitated mRNAs of epimastigotes (Epi) and epimastigotes under nutritional stress (St). (A) Western blot of TcDHH1GFP immunoprecipitation (1) and TcGFP immunoprecipitation as a control (2). (B) Venn diagram indicating the number of genes detected in each condition. (C and D) Gene ontology and String network of TcDHH1GFP genes associated in epimastigote: (C) genes involved in biological process, (D) genes involved in molecular function. (E and F) Gene ontology and String network of TcDHH1GFP genes associated in epimastigotes under nutritional stress: (E) genes involved in biological process, (F) genes involved in molecular function. The darker the color of the bubble, the greater the number of protein-coding genes involved in the same pathway belonging to a metabolic process or molecular function.

Table 3. Gene ontology (GO) categories (Biological Process and Molecular Function) enriched in TcDHH1 associated mRNAs in epimastigotes under nutritional stress form of *T. cruzi*.

	GO Term	P value	Num. DE	Total Num.	Ontology
TcDHH1 epimastigotes under nutritional stress					
GO:0006412	translation	0.00154554107176	5	256	BP
GO:0043043	peptide biosynthetic process	0.00160005597653	5	258	BP
GO:0006518	peptide metabolic process	0.00180216274565	5	265	BP
GO:0043604	amide biosynthetic process	0.0019899529277	5	271	BP
GO:0043603	cellular amide metabolic process	0.00237130393785	5	282	BP
GO:1901564	organonitrogen compound metabolic process	0.00240287913063	10	1123	BP
GO:1901566	organonitrogen compound biosynthetic process	0.00262955708822	6	426	BP
GO:0044271	cellular nitrogen compound biosynthetic process	0.00288956108116	6	434	BP
GO:0042816	vitamin B6 metabolic process	0.00347057895567	1	1	BP
GO:0042819	vitamin B6 biosynthetic process	0.00347057895567	1	1	BP
GO:0042822	pyridoxal phosphate metabolic process	0.00347057895567	1	1	BP
GO:0042823	pyridoxal phosphate biosynthetic process	0.00347057895567	1	1	BP
GO:0046184	aldehyde biosynthetic process	0.00347057895567	1	1	BP
GO:0009443	pyridoxal 5'-phosphate salvage	0.00347057895567	1	1	BP
GO:0009058	biosynthetic process	0.00483978120018	7	647	BP
GO:0071704	organic substance metabolic process	0.00914997236138	12	1810	BP
GO:0019538	protein metabolic process	0.0103734241849	8	938	BP
GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	0.0116520671977	11	1619	BP
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	0.0123329128808	5	416	BP
GO:0009059	macromolecule biosynthetic process	0.0129463785723	5	421	BP
GO:0006767	water-soluble vitamin metabolic process	0.0138134654668	1	4	BP
GO:0042364	water-soluble vitamin biosynthetic process	0.0138134654668	1	4	BP
GO:0009110	vitamin biosynthetic process	0.0138134654668	1	4	BP
GO:0006766	vitamin metabolic process	0.0138134654668	1	4	BP
GO:0044249	cellular biosynthetic process	0.0162811742994	6	620	BP
GO:1901576	organic substance biosynthetic process	0.0176517652658	6	631	BP
GO:0008152	metabolic process	0.0200056543749	12	1988	BP
GO:0044238	primary metabolic process	0.0215223481869	11	1755	BP
GO:0008283	cell proliferation	0.0274446778075	1	8	BP
GO:0034641	cellular nitrogen compound metabolic process	0.0290051632777	7	907	BP
GO:0046834	lipid phosphorylation	0.0341926562413	1	10	BP
GO:0046854	phosphatidylinositol phosphorylation	0.0341926562413	1	10	BP
GO:0010467	gene expression	0.0355683715938	5	545	BP
GO:0043170	macromolecule metabolic process	0.0408001281071	9	1426	BP

GO:0043094	cellular metabolic compound salvage	0.0442308882102	1	13	BP
GO:0006081	cellular aldehyde metabolic process	0.0442308882102	1	13	BP
GO:0005198	structural molecule activity	1.90163089236e-05	6	172	MF
GO:0003676	nucleic acid binding	3.96559698526e-05	10	686	MF
GO:0003729	mRNA binding	7.18861555498e-05	5	132	MF
GO:0003735	structural constituent of ribosome	0.000108796668185	5	144	MF
GO:0003723	RNA binding	0.00178663236481	6	395	MF
GO:1901363	heterocyclic compound binding	0.00245542485685	11	1337	MF
GO:0097159	organic cyclic compound binding	0.00245542485685	11	1337	MF
GO:0003677	DNA binding	0.00308057151335	4	180	MF
GO:0008478	pyridoxal kinase activity	0.00347057895567	1	1	MF
GO:0046982	protein heterodimerization activity	0.00355333207974	2	26	MF
GO:0046983	protein dimerization activity	0.00535509616398	2	32	MF
GO:0003674	molecular function	0.0136220426998	19	3959	MF
GO:0035004	phosphatidylinositol 3-kinase activity	0.0206517094098	1	6	MF
GO:0016303	1-phosphatidylinositol-3-kinase activity	0.0206517094098	1	6	MF
GO:0008483	transaminase activity	0.0274446778075	1	8	MF
GO:0016769	transferase activity, transferring nitrogenous groups	0.0274446778075	1	8	MF
GO:0052742	phosphatidylinositol kinase activity	0.0341926562413	1	10	MF
GO:0005200	structural constituent of cytoskeleton	0.0408959285816	1	12	MF
GO:0004175	endopeptidase activity	0.0436582397965	3	230	MF

(P-value cutoff of <0.05; Number of DE genes and total number of genes in each GO term are shown)

Our results show that TcXRNA and TcDHH1 RNP complexes harbored mRNAs involved in different biological pathways. Moreover, comparison of the associated mRNA populations for both proteins in epimastigotes and stressed epimastigotes showed few or no mRNAs shared between the RNP complexes. We were able to identify a much larger number of mRNAs that interact with TcXRNA than with TcDHH1 in epimastigotes with only 32 shared mRNAs (Figure 6A). Furthermore, no mRNAs were identified as being shared by the two proteins in parasites under nutritional stress (Figure 6B). This result strongly suggests that these proteins are part of distinct ribonucleoprotein complexes. For both proteins in each of the studied culture conditions we were able to find mRNAs that were also present in polysomal complexes and mRNAs that appear to be translationally repressed (Figure 6C and D).

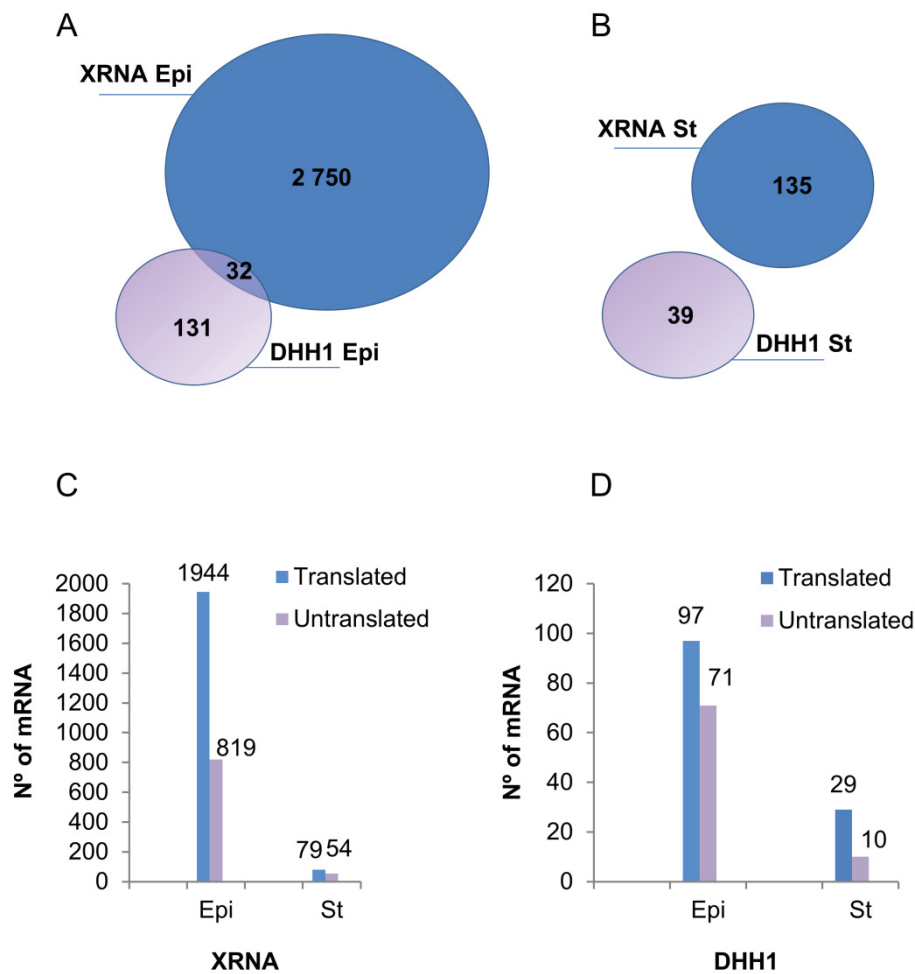


Figure 6. RNA-Seq of TcXRNA and TcDHH1 immunoprecipitated complexes in epimastigotes (Epi) and epimastigotes under nutritional stress (St). (A) and (B) Venn diagrams indicating the number of detected genes shared between TcXRNA and TcDHH1 granules in epimastigotes (A) and epimastigotes under nutritional stress (B). (C) and (D) mRNAs translated and untranslated in complex with TcXRNA (C) and TcDHH1 (D) in epimastigote and epimastigote under nutritional stress

Discussion

The processes of translational control and mRNA storage and degradation play a key role in controlling gene expression in eukaryotic cells. These processes interconnect in different ways promoting an important cellular quality control mechanism. Untranslated mRNAs can aggregate into mRNP granules such as p-bodies and stress granules in a

dynamic cyclic process referred to as the mRNA Cycle, wherein mRNPs can move between polysomes, P-bodies and stress granules, and translation inhibition is one of the main factors for this to occur (Decker and Parker, 2012). Thus, this study aimed to characterize the dynamic cycle of mRNA in *Trypanosoma cruzi*, the important protozoan that causes Chagas Disease, which currently became a neglected worldwide disease with a high morbimortality rate and substantial social impact (Lidani *et al.*, 2019).

The results from this study, have confirmed that there is no significant difference in the control of gene expression at the transcriptional level in *Trypanosoma cruzi* when compared epimastigotes and epimastigotes after nutritional stress, because less than 2% of the genes were differentially expressed at total mRNA level. Our results corroborate several studies that suggest little evidence of transcriptional regulation for trypanosomal protein-encoding genes (Clayton, 2002, 2019; Clayton & Shapira, 2007; Smircich *et al.*, 2015) reinforcing the hypothesis that control of gene expression in these organisms occur predominantly at the post-transcriptional level (Kramer, 2012). By analyzing differentially expressed transcripts after stress, we observed that some gene families were up-regulated, such as DGF-1, MASPs, trans-sialidases and GP63, which play an important role in the invasion and evasion mechanisms of the immune system, according to the literature (Buscaglia *et al.*, 2004; Frasch, 2000; Wincker *et al.*, 1990; 1992). There is a strong relationship between nutritional stress and *T. cruzi* epimastigote differentiation into trypomastigote (Figueiredo *et al.*, 2000). Data from Berná *et al.* (2017) have shown, at the transcriptome level, the expression of genes in trypomastigote parasites, which present an abundance of genes that encode surface proteins and signaling involved in invasion and evasion of the immune system. Thus, it can be concluded that even though differentially expressed genes are part of less than 2% of the identified genes, and therefore not a drastic difference in gene expression, we believe that *T. cruzi* can maintain a tendency to regulate its genes according to their environment, activating during stress the production of proteins important for the trypomastigote phase.

We then decided to investigate whether translational control would impact gene regulation in *T. cruzi*. Thus, after ribosome footprinting, we sequenced mRNAs associated with polysomes in epimastigote and epimastigote under nutritional stress. Differential expression showed a remarkable change in the profile of polysome-associated mRNAs after nutritional stress, revealing many genes involved in metabolic process, biosynthesis, translation and transmembrane transport. In addition, an enrichment of protein coding genes from the trans-sialidase and MASP families was identified. Many studies point to the importance of trans-sialidases and MASPs as a virulence factor of *T. cruzi*. These proteins are involved with host cell invasion and

parasite survival (Buschiazzo *et al.*, 2012; Nardy *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2019). Given that protein mRNAs belonging to multigene families, which are involved in important mechanisms performed by trypomastigotes, were present in the translation into epimastigote parasites under nutritional stress, leads us to believe that at this moment the parasite initiates a process of adaptation and preparation for the next stage of its life cycle, which is totally dependent on the processes of infection and evasion of the immune system. We noticed that there was reduction in protein synthesis after stress, strongly suggesting that translational control is the predominant gene regulation mechanism in *T. cruzi*. These data lead us to hypothesize that untranslated mRNAs may be being mobilized into mRNA granules. Similar data were obtained for *T. brucei* by Minia *et al.* (2016), where a decrease in translation between parasites growing at 27 °C and heat shock at 39 °C was also seen, implying an association between translation and mRNA degradation.

Following, we searched for mRNAs associated with two protein homologues, Dhh1 and XRN1 (XRNA in Trypanosomatids), known to be markers of two major studied mRNP granules, stress granules and p-bodies. Thus, knowing that stress granules and p-bodies can interact with translation machinery, promoting the dynamic mRNAs Cycle (Decker & Parker, 2012), *T. cruzi* DHH1 and XRNA were immunoprecipitated and the associated mRNAs were eluted and sequenced. With this study, it can be verified that, for both proteins, the number of associated mRNAs decreases under the stress condition. This result was interesting since XRNA and DHH1 in trypanosomatids have their granule assembly modified depending on the availability of untranslated mRNAs, ie the number of granules containing XRNA and DHH1 increases when inhibition of translation by polysome dissociation occurs (Holetz *et al.*, 2007, 2010; Kramer *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2018). However, it has recently been shown in yeast and mammals that only about 10% of total cell mRNAs accumulate in stress granules (Khong *et al.*, 2017). Thus, we raise the question that if XRNA and DHH1 are in fact part of stress granules in *T. cruzi*, could these granules also harbor only a small portion of mRNAs?

Both TcXRNA and TcDHH1 were shown to harbor different mRNA profiles when compared to epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress. Associated with TcXRNA in epimastigote are transcripts involved with various metabolic and biosynthetic processes, and after stress there is the association of mRNAs involved with RNA metabolism, stress response and DNA repair. In epimastigote, TcDHH1 is mainly associated with mRNAs involved with metabolic and catabolic processes, as well as homeostasis and membrane transport. Interestingly, when crossing TcXRNA-associated mRNA profiles and TcDHH1-associated profiles, it was seen that these proteins share a small portion of mRNAs in epimastigote parasites and in stress parasites there is no

mRNA sharing. Recently, our group has shown that XRNA and DHH1 do not colocalize in the *T. cruzi* cytoplasm, however, there is a small colocalization in the periphery of the nucleus (Costa *et al.*, 2018). Moreover, in other eukaryotes, it is believed that two dynamic complexes are formed in the presence of degradation-directed mRNAs. One complex consists of the protein Pat1, the complex Lsm1-7 and Xrn1. A second set of interacting proteins consists of Dcp1, Dcp2, Edc3 or Scd6 and Dhh1. However, it is not yet known if all these factors can be associated at the same time (Decker and Parker, 2012). Our analyzes also showed that, TcXRNA and TcDHH1 associate with mRNAs that are also present in polysomal complexes and with mRNAs that may be translationally repressed. These results strongly suggest that TcXRNA and TcDHH1 are part of distinct mRNPs complexes that, in turn, may act on the dynamics of mRNAs between translation and storage / degradation. Thus, this study has demonstrated the *T. cruzi* mRNA Cycle (Figure 7), where there is different mobilization of mRNAs between epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress. The mRNA Cycle in *T. cruzi* also shows that a large portion of mRNAs are directly sent for translation, and that the TcXRNA and TcDHH1 mRNP complexes harbor few mRNAs that are not shared between both proteins, but for both proteins in each of the studied culture conditions we were able to find mRNAs that were also present in polysomal complexes and mRNAs that appear to be translationally repressed. These data indicate that many mRNAs can migrate from the translation machine to the TcXRNA and TcDHH1 complexes, however whether these mRNAs can return to translation or whether their final destination is granules has yet to be determined.

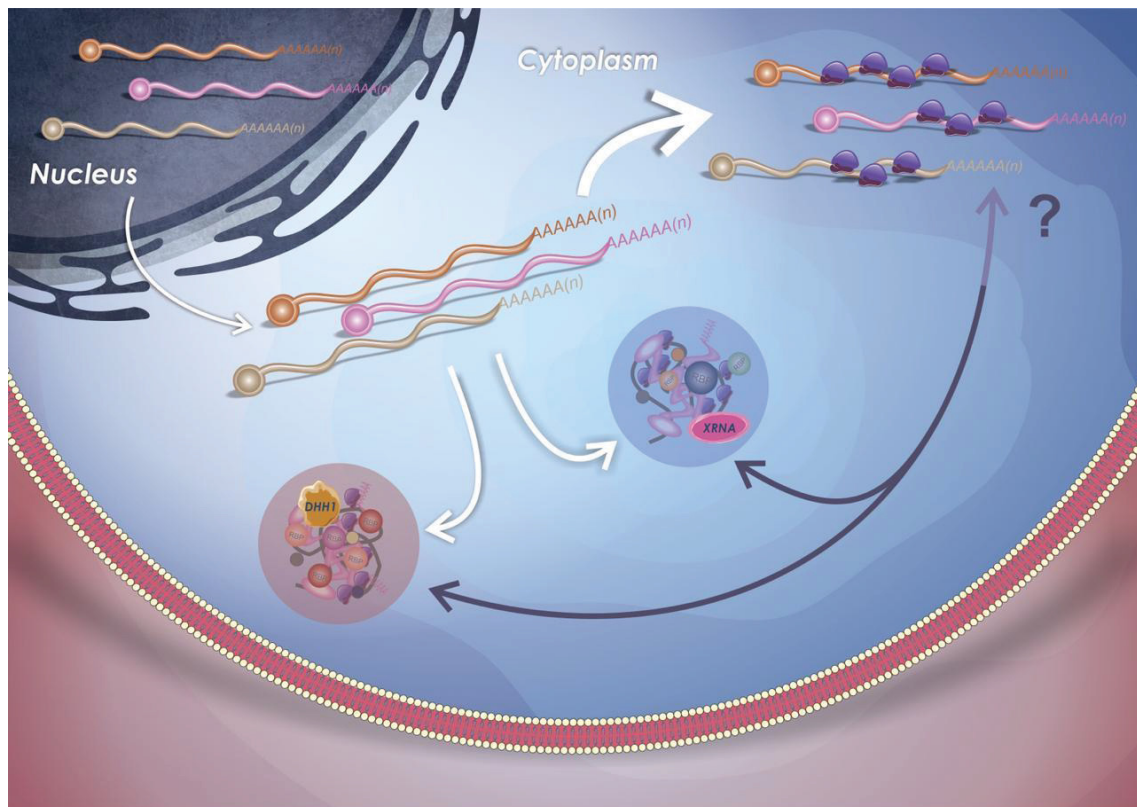


Figure 7. Model of the *T. cruzi* “mRNA cycle.” Showing the dynamic movement of mRNA between polysomes and TcXRNA and TcDHH1 granule-associated proteins.

Materials and methods

Parasites culture

Epimastigotes of *T. cruzi* Dm28c strain (Contreras *et al.*, 1985) were cultured at 28°C in liver infusion tryptose (LIT) medium supplemented with 10% bovine fetal serum. The culture was initiated by adding 1×10^6 cells ml^{-1} and the exponentially growing epimastigotes were obtained from three-day culture (density of 3×10^7 epimastigotes ml^{-1}). Three biological replicates with 1×10^9 epimastigotes each were used. Nutritionally stressed cells were obtained as previously described (Contreras *et al.*, 1985). Briefly, epimastigotes in exponential growth phase from three-day culture were harvested by centrifugation at $5000 \times g$ for 5 min at 25°C and subjected to nutritional stress for 2 h at 28°C in TAU medium (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 8 mM phosphate buffer pH 6.0).

PCR and Cloning

Amplification of the TcDHH1 gene was performed from specific primers (Forward 5'CACCATGTCTTTGGAAGACGACTG3' and Reverse 5'TGCGGCGTAGAGTTCAG3') and under standard conditions using the enzyme Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). For the reaction, 150 ng of *T. cruzi* strain Dm28c genomic DNA was used in a reaction with a final volume of 50 µl. The cycling consisted of an initial step of 3 minutes at 96 ° C, followed by 35 cycles of 30 seconds at 96 ° C, 30 seconds at 55 ° C and 2 minutes at 68 ° C. PCR products were recombined into pDONR™ 221 vector to generate pDONR_TcDHH1 vector by Gateway technology (Invitrogen) as directed by the manufacturer. Mutants parasites expressing TcDHH1-GFP N-terminal fusion proteins were obtained by transfection after the recombination of the pDONR_TcDHH1 vector gene with the pTcGFP vector, according to Batista *et al.* (2010).

Immunoprecipitation assays

Parasites epimastigotes and epimastigotes under nutritional stress with the TcDHH1GFP (produced for this work – FigS1) and TcXRNAGFP (Costa *et al.*, 2018), as well as control parasites harboring only the GFP tag (Costa *et al.*, 2018), were subjected to the lysis process. For TcDHH1GFP lysis was performed by cry-milled using the Mixer Mill MM 400 (Retsch), resulting in 1 g of cell powder. Approximately $5,0 \times 10^8$ parasites were suspended in 1 ml of solubilization buffer (HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 10 mM, Citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) 25 mM, Chaps 0,1%; Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, 1:100). For TcXRNA, $5,0 \times 10^8$ parasites were lysed by the addition of 1 ml of solubilization buffer contained (HEPES 20 mM pH 7,4, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 10 mM, Citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) 50 mM, Chaps 0,5%; Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche, 1:100). The cytoplasmic extracts followed to centrifugation at 10,000 x g for 10 min at 4 °C. The supernatant was incubated under constant stirring at 4 °C for 2 h, with 2 µl of the magnetic beads coupled to Nanobodies anti-GFP according to (Fridy *et al.*, 2014). Immunoprecipitation of both proteins was confirmed on silver nitrate stained SDS-PAGE and immunoblotting. RNAs were obtained using the TRIzol® LS Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Immunoblotting

For immunoblotting, the proteins were transferring from the gel to Nitrocellulose Blotting Membranes (Amersham Life Sciences). For the detection of GFP, a 1:4000 dilution of rabbit anti-GFP antiserum (Invitrogen) was used. For the detection of TcDHH1, antiserum against TcDHH1 (Holetz *et al.*, 2007) was diluted 1:100. For the detection of TcGAPDH, antiserum against TcGAPDH (1:100 dilution), kindly provided by Dr Stênio Perdigão Fragoso (ICC/ FIOCRUZ/Brazil), was used and served as a loading control. The membranes were then washed in PBS/Tween 20 and incubated with IRDye® 680LT goat anti-mouse and IRDye® 800CW goat anti-rabbit antibodies (Bioscience), both diluted 1:15,000. A Li-Cor Biosciences Odyssey scanner was used for fluorescence detection.

Immunofluorescence and imaging

Deconvolution images and analysis were acquired on a Leica DMI6000 B microscope, and using LAS AF software - Leica (Leica-microsystems). Cells were centrifuged to remove the culture medium at 3000 x g and washed twice with PBS following the same centrifugation method. Subsequently, the parasites were fixed for 10 minutes with 4% paraformaldehyde on a slide pre-treated with poly-L-lysine. After fixation, cells were washed twice with PBS 1X and permeabilized with 0.1% Triton X-100 followed by three washes in PBS 1X and block for 1 h in 0.5% PBS/BSA. After this, cells were incubated with the primary antibody anti-GFP (1:500 dilution – Invitrogen) for 1 h followed by three washes with PBS and incubation with secondary anti-IgG fluorescent-conjugated antibody Alexa 488 goat anti-rabbit antibody diluted 1:600 (Sigma) for 1 h. Nuclei and kinetoplasts were marked with DAPI (1:2000 dilution) together with the secondary antibody.

Total RNA Poly(A) isolation

Total RNA extraction was fulfilled using TRIzol® reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Thus, 1×10^9 cells were centrifuged at 5,000 x g at 4 °C and washed three times with 1X PBS buffer. Subsequently the parasite pellet was suspended with 500 µl of TRIzol® and incubated for 5 minutes at room temperature. Subsequently, 100 µl of chloroform was added and incubation for 2 minutes at room temperature. The mixture was then centrifuged at 12,000 x g for 15 minutes at room temperature. The aqueous phase was collected and the RNAs precipitated for 24 hours with 2 volumes of absolute ethanol and 10% of sodium acetate. The precipitate was centrifuged for one

hour at 22,000 x g at 4 °C, followed by two washes with 70% ethanol, room temperature drying and suspension in 10 µl water. To obtain the mRNAs, the PolyATtract® mRNA Isolation System IV Kit (Promega) was used following the manufacturer's instructions.

Ribosome Profiling

The extraction of polysomal mRNA was performed as described by Goldenberg *et al.*, 1985, with modifications. Initially, 5×10^9 cells were maintained in the culture medium and supplemented with cycloheximide (10 mg / 5×10^9 cells). Cells were centrifuged for 5 min at 7,000 x g. The parasite pellet was washed twice with NKM buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂), supplemented with cycloheximide (100 µg / ml) and 5 mM 2-mercaptoethanol, followed by lysis with hypotonic buffer and 1% NP-40. Lysis of the parasites was observed under an optical microscope. After addition of 2 M sucrose, the nucleus and mitochondria were pelleted by centrifugation at 10,000 x g at 4 °C. The supernatant was deposited on a 2 M sucrose cushion and the polysomnal fraction was obtained after ultracentrifugation of the supernatant at 192,000 x g at 4 °C for two hours. The supernatant was discarded and the pellet, containing the RNA molecules associated with the polysomes, was immediately digested by nuclease and processed as described by Smircich *et al.*, 2015.

Sequence read processing, alignment, normalization and comparative analysis

FASTQ files were analyzed with Fastqc (Version 0.11.7) (Andrews, 2010) and Ribosome Profiling files were trimmed using Cutadapter (2.7) (Martin, 2019), reads were aligned onto the TriTrypDB-46_TcruziDm28c2018 genome version ("<http://tritrypdb.org/>") using Bowtie (v.1.2.3) (Langmead, 2010). Samtools software was used to convert, merge, sort and index every SAM file and were used to visualize and inspect read mapping in the IGV software (v. 2.3.82) (<https://igv.org>). We used htseq (v. 0.5.4p3) (Anders *et al.*, 2015) to read counts using the following parameters: “-m intersection- strict -i ID -s no”. R and Bioconductor packages were used to perform statistical analysis in edgeR (v. 3.20.9) (Robinson *et al.*, 2010). We considered as differentially expressed all genes presenting p-Valuer lower than 0.05 and the logarithm of fold change (logFC) greater than 1 or lower than -1.

Functional annotation of gene lists

To categorize gene lists into overrepresented functional related groups, TritrypDB, functional annotation clustering tool was used. Groups with an “enrichment score” (ES) < 0.05, (defined as the minus logarithm of p values) were considered significant, for visualization we use Cytoscape (<https://cytoscape.org/>).

Author Contributions

Saloê Bispo: performed analyze the data, discussed the results, performed experiments and prepared the manuscript. Jimena Ferreira da Costa: performed most of the experiments, discussed the results and prepared the manuscript. Mariana Galvão Ferrarini: performed experiments. Bruno Dallagiovanna: discussed the results, prepared the manuscript and supervision, Fabíola Barbieri Holetz: performed experiments, prepared the manuscript, discussed the results and supervision.

Acknowledgments

We are grateful for the financial support provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – PROBRAL/CAPES/DAAD [88881.144088/2017-01] and Fundação Araucária [005/2016 and 025-2017]. The authors also thank Alexandre Haruo Inoue for his assistance in the immunoprecipitation assays, and Wagner Nagib for his valuable contribution in the development of graphic images.

References

- Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 15;31(2):166-9.
- Anderson P & Kedersha N. 2006. RNA granules. *J Cell Biol* 172: 803–808.
- Anderson P & Kedersha N. 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci* 3, 141–150.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>. Accessed: 09 dec. 2019.
- Batista M, Marchini FK, Celedon PA, Fragoso SP, Probst CM, Preti H, Ozaki LS, Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA. 2010. A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiol* 10:259.

- Berná L, Chiribao ML, Greif G, Rodriguez M, Alvarez-Valin F, & Robello C. 2017. Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi*. *PeerJ* 5: e3017.
- Bregues M, Teixeira D, Parker R. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 310: 486–489.
- Buscaglia CA, Campo VA, Di Noia JM, Torrecilhas ACT, De Marchi CR, Ferguson, MAJ, Frash ACC, & Almeida IC. 2004. The Surface Coat of the Mammal-dwelling Infective Trypomastigote Stage of *Trypanosoma cruzi* is Formed by Highly Diverse Immunogenic Mucins. *The journal of biological chemistry* 279(16): 15860-15869.
- Buchan JR, & Parker R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* 36, 932–941.
- Buschiazzo A, Muiá R, Larrieux N, Pitcovsky T, Mucci J, Campetella O. 2012. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase in complex with a neutralizing antibody: structure/function studies towards the rational design of inhibitors. *PLoS Pathog* 8(1):e1002474.
- Cassola A, De Gaudenzi JG, Frasch AC. 2007. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Mol Microbiol* 65, 655–670.
- Clayton CE. 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO J* 21(8):1881-8.
- Clayton, C. 2014. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 195 (2014) 96–106.
- Clayton, C. 2019. Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. *Open Biology* 9(6).
- Clayton C, Michaeli S. 2011. 3' processing in protists. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 247– 255.
- Clayton C, Shapira M. 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology* 156(2), 93–101.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CN, Goldenberg S. 1985. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology* 16:315–327.
- Coppin L, Leclerc J, Vincent A, Porchet N, Pigny P. 2018. Messenger RNA Life-Cycle in Cancer Cells: Emerging Role of Conventional and Non-Conventional RNA-Binding Proteins? *Int. J. Mol. Sci* 19, 650.
- Costa JFD, Ferrarini MG, Nardelli SC, Goldenberg S, Ávila AR, Holetz FB. 2018. *Trypanosoma cruzi* XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 113(6), 1–8.

- De Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A. 2011. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem* 51:31-46.
- De Souza W. 1984. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology* 86, 197–283.
- Decker CJ & Parker R. 2012. P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(9):a012286.
- Figueiredo RCBQ, Rosa DS, & Soares, MJ. 2000. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol* 86(6):1213-8.
- Fonseca LM, Costa KM, Chaves VS, Freire-de-Lima CG, Morrot A, Mendonça-Previato I, Previato JO, Freire-de-Lima L. 2019. Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma Cruzi* Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. *Front Immunol* 10: 164.
- Franks T. & Lykke-Andersen J. 2008. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* 32, 605–615.
- Frasch, ACC. 2000. Functional Diversity in the Trans-sialidase and Mucin Families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today* 16(7): 282-286.
- Fridy PC, Li Y, Keegan S, Thompson MK, Nudelman I, Scheid JF, Oeffinger M, Nussenzweig MC, Fenyö D, Chait BT, Rout MP. 2014. A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat Methods* 11(12):1253-60.
- Holetz FB, Alves LR, Probst CM, Dallagiovanna B, Marchini FK, Manque P, Goldenberg S. 2010. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *The FEBS Journal*, 277(16), 3415–26.
- Holetz FB, Correa A, Avila AR, Nakamura CV, Kriege, MA, Goldenberg S. 2007. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356(4), 1062–7.
- Ivanov P, Kedersha N, Anderson P. 2019. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol* 11, a032813.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 20;169(6):871-84.
- Khong A, Matheny T, Jain S, Mitchell SF, Wheeler JR, Parker R. 2017. The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Mol Cell* 16;68(4):808-820.e5.
- Kramer S. 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology* 181(2), 61–72.

Kulkarni M, Ozgur S, Stoecklin G. 2010. On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans* 38: 242–251.

Kramer S. 2014. RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA* 5(2), 263–84.
Langmead B. 2010. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2010 Dec;Chapter 11:Unit 11.7.

Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason LJ, and Sandri TL. 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health* 7: 166.

Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, [S.l.], v. 17, n. 1, p. pp. 10-12, may 2011. ISSN 2226-6089. Available at:

<<http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200/458>>.

Accessed: 09 dec. 2019.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. 2010. Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2010:525241.

Melemedjian OK, Mejia GL. 2013. Bidirectional regulation of P body formation mediated by eIF4F complex formation in sensory neurons, *Neuroscience Letters* 20;563:169-74.

Michaeli S. 2011. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol* 6, 459– 474.

Minia I, Merce C, Terrao M, Clayton C. 2016. Translation Regulation and RNA Granule Formation after Heat Shock of Procyclic Form *Trypanosoma brucei*: Many Heat-Induced mRNAs Are also Increased during Differentiation to Mammalian-Infective Forms. *PLoS Negl Trop Dis* 10(9):e0004982.

Nardy AF, Freire-de-Lima CG, Pérez AR, Morrot A. 2016. Role of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase on the Escape from Host Immune Surveillance. *Front Microbiol* 23;7:348.

Parker R, Sheth U. 2007. P-bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25: 635–646.

Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.” *Bioinformatics* 26(1), 139-140.

Rodrigues JCF, Godinho JLP, de Souza W. 2014. Biology of human pathogenic trypanosomatids: Epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell. Biochem* 74:1-42.

Sheth U, Parker R. 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125: 1095–1109.

Smircich P, Eastman G, Bispo S, Duhagon MA, Guerra-Slompo EP, Garat B, Goldenberg S, Munroe DJ, Dallagiovanna B, Holetz F, Sotelo-Silveira J. R. 2015. Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 16:443.

Teixeira D & Sheth U. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382.

Wincker P, Roizes G, Goldenberg S. 1990. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* specific nuclear repeated Sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41 (1990): 147-152.

Wincker P, Murto-Dovales AC, Goldenberg S. 1992. Nucleotide sequence of a representative member of a *Trypanosoma cruzi* dispersed gene Family. *Molecular and Biochemical Parasitology* 55 (1992): 217 220.

Zinoviev A, & Shapira M. 2012. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. *Comparative and Functional Genomics* 813718.

Supplementary figure and legend

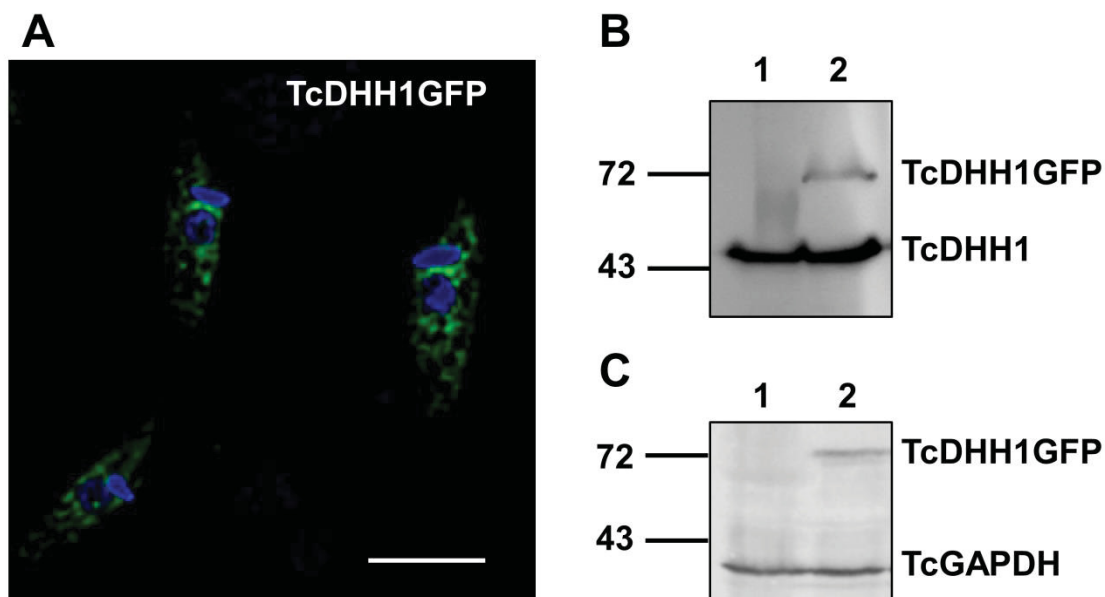


Figure S1. Analysis of parasites expressing TcDHH1 tagged with GFP (TcDHH1GFP). (A) Tri-dimensional deconvolution image of epimastigote-transfected parasites expressing DHH1GFP. Parasites were incubated with rabbit primary antibody anti-GFP followed by incubation with Alexa Flour 488 conjugated secondary antibody. DAPI was used to stain the DNA of the nucleus and kinetoplast. Bar = 5 μ m. (B) and (C) Western blot of protein extracts using anti-DHH1 polyclonal antibody 1:100 dilution (B) (Holetz *et al.*, 2007) and using anti-GFP monoclonal antibody 1:500 dilution (Invitrogen) (C): 1) wild type and 2) transfected epimastigotes. The antibodies detected the GFP-tagged TcDHH1 protein (73 kDa), corresponding to TcDHH1 (47 kDa) fused to GFP (26 kDa). TcGAPDH antibody was used as loading control.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A regulação da tradução exerce importante papel para o controle da expressão gênica em eucariotos e muitos mecanismos trabalham em conjunto para que a expressão de genes ocorra com qualidade.

Assim, este trabalho visou contribuir para o entendimento da regulação da expressão gênica do *T. cruzi* em nível de tradução, iniciando a caracterização do ciclo dinâmico do mRNAs neste parasita, sendo o foco de estudo os mecanismos que atuam diretamente neste processo, iniciação da tradução e estocagem e degradação de mRNAs.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para a produção de dois artigos científicos. O primeiro artigo aborda a identificação de novas interações entre fatores de início de tradução, tornando esses resultados interessantes para a comunidade científica que busca por moléculas e mecanismos que podem ser alvos para desenho de drogas tripanocidas. O trabalho iniciou com a comparação das sequências das proteínas de interesse com homólogos de tripanossomatídeos e *Homo sapiens*, os homólogos de TcEIF4E apresentam maior nível de identidade com os homólogos de *T. brucei*. Os homólogos TcEIF4E2 apresentam a maior identidade de aminoácidos com o eIF4E1 humano. Em contraste, o TcEIF4E6 é o mais divergente. No que diz respeito aos homólogos de TcEIF4G. O nível de identidade também é mais alto com os homólogos de *T. brucei* e o TcEIF4G3 é o mais semelhante ao eIF4G1 humano. O homólogo do fator auxiliar TcPABP1 é mais semelhante ao *Homo sapiens*, mas o TcPABP2 tem maior identidade com seus homólogos em outros tripanossomatídeos. Através de análises *in vitro* e *in vivo*, foi possível identificar, em *T. cruzi*, interações entre os seis EIF4Es, os cinco EIF4Gs e as duas PABPs. Por ensaio de duplo-híbrido foram identificadas oito interações já descritas para fatores de tradução em outros tripanossomatídeos e três novas interações ainda não descritas em nenhum outro organismo (TcEIF4E3-TcPABP1; TcEIF4E3-TcPABP2 e TcEIF4E5-TcEIF4G5). Ensaio de imunoprecipitação revelaram que TcPABP1 e TcPAB2 podem formar complexo com TcEIF4E3 em parasitas epimastigota em crescimento exponencial. Similarmente, TcEIF4G5 aparece na imunoprecipitação de TcEIF4E5. Além disso, a análise por espectrometria de massa de TcEIF4E5 revelou também a presença dos homólogos TcEIF4G1 e TcEIF4G2, bem como outras proteínas associadas, incluindo G1IP1, uma proteína citoplasmática que possui os domínios guanililtransferase e metiltransferase; RBP43 (anteriormente conhecido como G1IP2, Freire et al., 2017), uma proteína de ligação ao RNA; G2IP, uma proteína de função desconhecida conservada apenas nos gêneros *Trypanosoma*; a proteína reguladora 14-3-3 II e PABP2. Esses resultados não

apenas confirmam a participação de TcEIF4E5 em dois complexos eIF4F independentes, como parceiros de EIF4G1 ou EIF4G2 e proteínas associadas, como demonstrado anteriormente em *T. brucei* (Freire *et al.*, 2014B), mas também identificam a participação de TcEIF4E5 em um complexo que pode ser exclusivo de *T. cruzi* com o homólogo TcEIF4G5 e seu parceiro putativo *cap-generating* G5IP (Freire *et al.*, 2014B). Em *T. cruzi*, TcEIF4E5 e TcEIF4G5 apresentam uma distribuição difusa com concentração mais alta das proteínas na periferia do núcleo, evidenciando a colocalização entre as proteínas. Uma análise de sequência de TcEIF4G5 permitiu a identificação de uma sequência que conserva parcialmente um motivo de ligação a EIF4E (82-YDIAEFV-89) na região N-terminal da proteína. Assim, por ensaio de microtermoforese, foi identificado que a região N-terminal de TcEIF4G5 é responsável pela ligação com TcEIF4E5.

O segundo artigo trata da dinâmica dos mRNAs entre a tradução e proteínas marcadores de grânulos de estocagem e degradação, acompanhando esse evento em parasitas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional. Os dados do segundo artigo fornecem maiores entendimentos sobre quais mRNAs são importantes em cada condição em que o parasita pode ser submetido, seja na fase proliferativa (epimastigota), ou quando está sob escassez de nutrientes, visto que o estresse nutricional pode funcionar como um estímulo para a diferenciação em formas infectivas (tripomastigotas). Com este trabalho foi possível verificar, através de sequenciamento de mRNA totais, que não existe diferença significativa na expressão de genes em nível de mRNA quando comparados epimastigota e epimastigota sob estresse nutricional, pois menos de 2% dos genes eram diferencialmente expressos, indicando que quase todos os genes identificados em ambas as condições são constitutivamente transcritos. Contudo ao analisar o translato, através da técnica de *Ribosome Footprinting*, pode-se perceber a mudança no perfil de mRNAs associados à tradução entre as duas condições de crescimento em que o parasita foi submetido, sugerindo que o controle traducional é um mecanismo predominante para a regulação dos genes de *T. cruzi*. Além disso, o *footprinting* de parasitas sob estresse nutricional revelou a presença aumentada de transcritos envolvidos principalmente com diferentes processos metabólicos e biossintéticos, além de tradução e transporte transmembrana. Tendo em vista a importante participação dos grânulos de RNPs no controle traducional bem como na expressão de genes eucarióticos (Clayton, 2019; Decker & Parker, 2012; Kramer, 2012), para este trabalho foram eleitas duas proteínas, TcDHH1 e TcXRNA, sabidamente marcadoras de dois principais grânulos de mRNPs estudados, grânulos de estresse e *p-bodies* (Decker & Parker, 2012). Assim, sabendo que grânulos estresse e *p-bodies* podem interagir com a maquinaria de tradução, promovendo o chamado “Ciclo

dinâmico de mRNAs” (Decker & Parker, 2012), neste trabalho, os complexos de TcDHH1 e TcXRNA foram imunoprecipitados a fim de verificar quais mRNAs estavam associados à estas proteínas tanto em parasitas epimastigota quando em epimastigota sob estresse nutricional. Com este estudo, pode-se verificar que, para ambas as proteínas, o número de mRNAs associados diminui sob a condição de estresse e, além disso, é notável a diferença no perfil de mRNAs em epimastigota quando comparado ao perfil de parasitas sob estresse. Associados à TcXRNA em epimastigota, encontram-se transcritos envolvidos com diversos processos metabólicos e biossintéticos, e após o estresse tem-se a associação de mRNAs envolvidos com metabolismo de RNA, resposta ao estresse e reparo de DNA. Em epimastigota, TcDHH1 associa-se principalmente com mRNAs envolvidos com processos metabólicos e catabólicos, além de homeostase e transporte de membrana. Após o estresse, além da presença de transcritos envolvidos com processos metabólicos, TcDHH1 associa-se também à mRNAs envolvidos com processos biossintéticos, tradução, organização de complexos proteína-DNA e proteínas de união ao DNA/RNA. Interessantemente, ao cruzar os perfis de mRNAs associados à TcXRNA e os perfis associados à TcDHH1, foi visto que estas proteínas compartilham uma pequena parcela de mRNAs em parasitas epimastigota e, em parasitas sob estresse não há compartilhamento de mRNAs. Ademais, ambas as proteínas se associam tanto à mRNAs que também estão presentes em complexos polissomais, quanto mRNAs que podem estar traducionalmente reprimidos. Dessa maneira, estes resultados sugerem fortemente que TcXRNA e TcDHH1 são parte de distintos complexos mRNPs que, por sua vez, podem atuar na dinâmica de mRNAs entre a tradução e a estocagem/degradação.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que as peculiaridades apresentadas pelo *T. cruzi* vão muito além da disposição do genoma e do tipo de transcrição. Foi mostrado que este parasita pode formar diferentes complexos de início de tradução eIF4F-like, distinguindo até mesmo de outros tripanossomatídeos. Além disso, a tradução parece ser um evento impactante para a regulação de genes quando o parasita é submetido ao estresse nutricional. Contudo, não se sabe ainda a função desempenhada por cada complexo de início de tradução durante o momento de estresse, mas é evidenciado pela literatura que muitos fatores de início de tradução interagem com proteínas de grânulos, contribuindo para a dinâmica dos mRNAs em eucariotos (Decker & Parker, 2012; Protter & Parker, 2016). Os resultados desta tese também mostraram que as proteínas marcadoras de grânulos, TcDHH1 e TcXRNA, parecem fazer parte de diferentes complexos ribonucleoproteicos, pois interagem com diferentes mRNAs e podem estar exercendo importante papel para a regulação da tradução bem como do controle da expressão genica neste organismo.

Sendo assim, este trabalho conseguiu iniciar a caracterização do ciclo do mRNA em *T. cruzi*, mostrando quais mRNAs estão presentes na tradução e quais estão associados à proteínas de grânulos, contudo ainda será necessário determinar quais mRNAs estão integrados com cada complexo de início de tradução, verificando o intercâmbio de mRNAs entre os diferentes fatores de início de tradução EIF4E e a tradução global, bem como os mRNAs que podem ser compartilhados entre esses fatores e as proteínas de grânulos TcXRNA e TcDHH1. Dessa maneira será possível contribuir para elucidar a função dos fatores EIF4Es e compreender como os mRNAs estão sendo dispostos quando o parasita se encontra em condição normal de crescimento e quando estão sob estresse nutricional.

6. REFERÊNCIAS

- Anderson, P., & Kedersha, N. (2007). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends in Biochemical Sciences*, 33, 141–150.
- Anderson P. & Kedersha N. (2007). Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci*, 33, 141–150.
- Archer, S. K., Shirokikh, N. E., Hallwirth, C. V, Beilharz, T. H., & Preiss, T. (2015). Probing the closed-loop model of mRNA translation in living cells. *RNA Biology*, 12(3), 248–254.
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., & Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 26(14), 2579–2595.
- Bangs, J. D., Crainll, P. F., Hashizumell, T., Mccloskeyllii, J. A., & Boothroyd, J. C. (1992). Spectrometry of mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9805–9815.
- Batista, J. A. N., Teixeira, S. M. R., Donelson, J. E., Kirchhoff L. V., K. de Sá, C. M. (1994). Characterization of a Trypanosoma cruzi poly(A)-binding protein and its genes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 67, 301–312.
- Bates, E. J. (2000). Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. *Nucleic Acids Research*, 28(5), 1211–1220.
- Beltrao, H. B. M., Cerroni, M. P., Freitas, D. R. C., Pinto, A. Y. N., Valente, V. C., Valente, S. A., Costa Ede G, Sobel, J. (2014). Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. *Tropical Doctor*. 39(October 2009), 232–239.
- Bish, R., Cuevas-Polo, N., Cheng, Z., Hambardzumyan, D., Munschauer, M., Landthaler, M., & Vogel, C. (2015). Comprehensive protein interactome analysis of a key RNA helicase: Detection of novel stress granule proteins. *Biomolecules*, 5(3), 1441–1466.
- Buchan, J. R. (2014). mRNP granules. *RNA Biology*, 11(8), 1019–1030.
- Calado, a, & Carmo-Fonseca, M. (2000). Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 12):2309–2318.
- Camargo, E. P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trupanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 6, 93–100.
- Cassola, A. (2011). RNA Granules Living a Post-transcriptional Life: the Trypanosomes' Case. *Current Chemical Biology*, 5(2), 108–117.
- Cassola, Alejandro, De Gaudenzi, J. G., & Frasch, A. C. (2007). Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. *Molecular Microbiology*, 65(3), 655–670.

Chagas, C. (1909). Nova Tripanozomíaze Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, 159–218.

Chagas, C. (1911). Nova entidade morbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 3, 219–275.

Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. *Open Biology*, 9(6):190072.

Clayton, C., & Shapira, M. (2007). Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 156(2), 93–101.

Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Thomas, N.; Morel, C. M.; Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 16, 315–327.

Costa, J. F. da, Ferrarini, M. G., Nardelli, S. C., Goldenberg, S., Ávila, A. R., & Holetz, F. B. (2018). *Trypanosoma cruzi* XRNA granules colocalise with distinct mRNP granules at the nuclear periphery. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(6), 1–8.

da Costa Lima, T. D., Moura, D. M. N., Reis, C. R. S., Vasconcelos, J. R. C., Ellis, L., Carrington, M., Figueiredo RC, de Melo Neto, O. P. (2010a). Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryotic Cell*, 9(10), 1484–1494.

de Melo Neto, O. P., da Costa Lima, T. D. C., Xavier, C. C., Nascimento, L. M., Romão, T. P., Assis, L. A., Pereira MM, Reis CR, Papadopoulou, B. (2015). The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA Biology*, 12(11), 1209–1221.

De Souza, W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int Rev Cytol*, 86, 197–283.

de Melo Neto, O. P., Reis, C. R. S., Moura, D. M. N., Freire, E. R., Carrington, M. Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) Species. In: Hernández G. & Jagus, R. (2016). *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*. Switzerland: Springer, 2016.p.435-451.

Decker, C. J. & Parker, R. (2012). P-Bodies and Stress Granules : Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4 (9):a012286.

Dhalia, R., Marinsek, N., Reis, C. R. S., Katz, R., Muniz, J. R. C., Standart, N., Carrington M, de Melo Neto, O. P. (2006). The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Research*, 34(9), 2495–2507.

Dhalia, R., Reis, C. R. S., Freire, E. R., Rocha, P. O., Katz, R., Muniz, J. R. C., Standart N, de Melo Neto, O. P. (2005). Translation initiation in *Leishmania major*:

characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 140(1), 23–41.

Dos Santos Rodrigues, F. H., Firczuk, H., Breeze, A. L., Cameron, A. D., Walko, M., Wilson, A. J., Zanchin NIT McCarthy, J. E. G. (2018). The Leishmania PABP1-eIF4E4 interface: A novel 5'-3' interaction architecture for trans-spliced mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 47(3), 1493–1504.

Erben, E. D., Fadda, A., Lueong, S., Hoheisel, J. D., & Clayton, C. (2014). A Genome-Wide Tethering Screen Reveals Novel Potential Post-Transcriptional Regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathogens*, 10(6):e1004178.

Freire, E. R., Dhalia, R., Moura, D. M. N., da Costa Lima, T. D., Lima, R. P., Reis, C. R. S., Hughes K, Figueiredo RC, Standart N, Carrington M, de Melo Neto, O. P. (2011). The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 176(1), 25–36.

Freire, E. R., Malvezzi, A. M., Vashisht, A. A., Zuberek, J., Saada, E. A., Langousis, G., Nascimento J. D., Moura D., Darzynkiewicz E., Hill K., Campbell, D. A. (2014A). *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. *Eukaryotic Cell*, 13(7), 896–908.

Freire, E. R., Moura, D. M. N., Bezerra, M. J. R., Xavier, C. C., Morais-Sobral, M. C., Vashisht, A. A., Rezende AM, Wohlschlegel JA, Sturm NR, de Melo Neto OP, Campbell, D. A. (2017A). *Trypanosoma brucei* EIF4E2 cap-binding protein binds a homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein. *Current Genetics*, 64(4), 821–839.

Freire, E. R., Sturm, N. R., Campbell, D. A., & de Melo Neto, O. P. (2017B). The role of cytoplasmic mRNA cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. *Pathogens*, 6(4).pii: E55.

Freire, E. R., Vashisht, A. A., Malvezzi, A. M., Zuberek, J., Langousis, G., Saada, E. A., Nascimento, J. F., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., Hill K., De Melo Neto, O. P., Wohlschlege, I. J. A, Sturm, N. R., Campbell, D. A. (2014B). eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. *Rna*, 20(8), 1272–1286.

Freire, E., Vashisht, A., & Malvezzi, A. (2014). eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. *Rna*, 20, 1–15.

Garcia-Silva, M. R., Frugier, M., Tosar, J. P., Correa-Dominguez, A., Ronalte-Alves, L., Parodi-Talice, A., Rovira C, Robello C, Goldenberg S, Cayota, A. (2010). A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 171(2), 64–73.

Gingras, A., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 913–963.

- Goldenberg, S., Contreras, V. T., Bonaldo, M. C., Salles, J. M., Franco, M. P. A. L., Lafaille, J., et al. (1987). In vitro differentiating systems for the study of differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* development. *UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology (USA)*.
- Grams, J., Morris, J., Drew, M., Wang, Z., Englund, P., & Hajduk, S. (2002). A trypanosome mitochondrial RNA polymerase is required for transcription and replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 16952–16959.
- Guzikowski, A. R., Chen, Y. S., & Zid, B. M. (2019). Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 10(3), 1–17.
- Hinnebusch, A. G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 779–812.
- Holetz, F. B., Ávila, A. R., Nakamura, C. V., Krieger, M. A., Goldenberg, S. (2007). Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356, 1062–1067.
- Holetz, F. B., Alves, L. R., Probst, C. M., Dallagiovanna, B., Marchini, F. K., Manque, P., Buck G, Krieger MA, Correa A, Goldenberg, S. (2010). Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. *The FEBS Journal*, 277(16), 3415–3426.
- Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Yi, Z., Morlot, J. B., Munier, A., Fradet, M., Daunesse, M., Bertrand, E., Pierron, G., Mozziconacci, J., Kress, M., Weil, D. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell*, 68(1), 144-157.e5.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(2), 113–127.
- Jankowska-Anyszka, M., Lamphear, B. J., Aamodt, E. J., Harrington, T., Darzynkiewicz, E., Stolarski, R., Rhoads, R. E. (1998). Multiple Isoforms of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4E in *Caenorhabditis elegans* Can Distinguish between Mono- and Trimethylated mRNA Cap Structures. *Journal of Biological Chemistry*, 273(17), 10538–10542.
- Jannin, J. & Villa, L. (2007). An overview of Chagas disease treatment. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 95–97.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y. V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M. N., & Sonenberg, N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes and Development*, 19(1), 104–113.
- Kearse, M. G. & Wilusz, J. E. (2017). Non-AUG translation: A new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes and Development*, 31(17), 1717–1731.

- Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N. (2002). Evidence That Ternary Complex (eIF2-GTP-tRNA^{iMet})–Deficient Preinitiation Complexes Are Core Constituents of Mammalian Stress Granules. *Molecular Biology of the Cell*, 13(January), 195–210.
- Khong, A. & Parker, R. (2018). MRNP architecture in translating and stress conditions reveals an ordered pathway of mRNP compaction. *Journal of Cell Biology*, 217(12), 4124–4140.
- Klein, C., Terrao, M., Inchaustegui Gil, D., Clayton, C. (2015). Polysomes of *Trypanosoma brucei*: Association with Initiation Factors and RNA-Binding Proteins. *Plos One*, 10(8), e0135973.
- Kollien, A. & Schaub, G. (2000). The Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitology Today*, 16(9), 381–387.
- Kramer, S. (2012). Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 181(2), 61–72.
- Kramer, S. (2014). RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 5(2), 263–284.
- Kramer, S. (2017). The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. *PLoS Pathogens*, 13(6), 1–20.
- Kramer, S., Bannerman-Chukualim, B., Ellis, L., Boulden, E. a, Kelly, S., Field, M. C., Carrington, M. (2013). Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. *PloS One*, 8(1), e54004.
- Kramer, S., Marnef, A., Standart, N., Carrington, M. (2012). Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 12), 2896–2909.
- Kramer, S., Queiroz, R., Ellis, L., Webb, H., Hoheisel, J. D., Clayton, C., Carrington, M. (2008). Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 18), 3002–3014.
- Kumar, P., Hellen, C. U. T., Pestova, T. V. (2016). Toward the mechanism of eIF4F-mediated ribosomal attachment to mammalian capped mRNAs. *Genes and Development*, 30(13), 1573–1588.
- Laufer, G. & Günzl, A. (2001). In-vitro competition analysis of procyclin gene and variant surface glycoprotein gene expression site transcription in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 113, 55–65.
- Laufer, G., Schaaf, G., Bollgo, S., Gu, A. (1999). In Vitro Analysis of a -Amanitin-Resistant Transcription from the rRNA , Procyclic Acidic Repetitive Protein , and Variant Surface Glycoprotein Gene Promoters in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Cellular Biology*, 19(8), 5466–5473.

- Lenzi, H. L., Oliveira, D. N., Lima, M. T., Gattass, C. R. (1996). *Trypanosoma cruzi*: Paninfectivity of CL Strain during Murine Acute Infection. *Experimental Parasitology*, 27, 16–27.
- Li, C., Irmer, H., Gudjonsdottir-Planck, D. (2006). Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *Rna*, 12, 2171–2186.
- Liang, X., Haritan, A., Uliel, S., Michaeli, S. (2003). trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryotic Cell*, 2(5), 830–840.
- Luo, Y., Na, Z., Slavoff, S. A. (2018). P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry*, 57(17), 2424–2431.
- Marintchev, A. & Wagner, G. (2005). eIF4G and CBP80 share a common origin and similar domain organization: Implications for the structure and function of eIF4G. *Biochemistry*, 44(37), 12265–12272.
- Martínez-Calvillo, S., López, I., Hernández, R. (1997). pRIBOTEX expression vector: a pTEX derivative for a rapid selection of *Trypanosoma cruzi* transfectants. *Gene*, 199, 71–76.
- Mata, J., Marguerat, S., Bähler, J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: A genome-wide perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(9), 506–514.
- Merrick, W. C. & Pavitt, G. D. (2018). Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12).
- Michaeli, S. (2011). Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiology*, 6(4), 459–474.
- Moore, M. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309, 1514–1518.
- Moura, D. M. N., Reis, C. R. S., Xavier, C. C., Costa Da Lima, T. D., Lima, R. P., Carrington, M., & Melo De Neto, O. P. (2015). Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biology*, 12(3), 305–319.
- Palenchar, J. B. & Bellofatto, V. (2006). Gene transcription in trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 146(2), 135–141.
- Parker, R. & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell*, 25(5), 635–646.
- Parker, T. M. & R. (2018). Multiple modes of protein-protein interaction promote RNA granules assembly. *Journal of Molecular Biology*, 176(5), 139–148.
- Pereira, M. M. C., Malvezzi, A. M., Nascimento, L. M., Da Costa Lima, T. D. C., Alves, V. S., Palma, M. L., Freire ER, Moura DM, Reis CR, De Melo Neto, O. P. (2013). The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to

differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 190(2), 82–86.

Pitula, J., Ruyechan, W. T., Williams, N. (1998). *Trypanosoma brucei*: Identification and purification of a poly(A)-binding protein. *Experimental Parasitology*, 88(2), 157–160.

Protter, D. S. W. & Parker, R. (2016). Principles and Properties of Stress Granules. *Trends in Cell Biology*, 26(9), 668–679.

Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388–1402.

Reddy, R., Singh, R., Shimba, S. (1992). Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: Structure, synthesis and functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 54(3), 249–267.

Reis, C. R. S. (2009). Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator eIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major*. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

Reolon, L. W., Vichier-Guerre, S., de Matos, B. M., Dugué, L., Assunção, T. R. da S., Zanchin, N. I. T., Pochet S, Guimarães, B. G. (2019). Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* EIF4E5 translation factor homologue in complex with mRNA cap-4. *Nucleic Acids Research*, 47(11), 5973–5987.

Safaei, N., Kozlov, G., Noronha, A. M., Xie, J., Wilds, C. J., Gehring, K. (2012). Interdomain Allostery Promotes Assembly of the Poly(A) mRNA Complex with PABP and eIF4G. *Molecular Cell*, 48(3), 375–386.

Shatsky, I. N., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., & Terenin, I. M. (2014). Transcriptome-wide studies uncover the diversity of modes of mRNA recruitment to eukaryotic ribosomes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(2), 164–177.

Shelley, R. Starck, Jordan C. Tsai, Keling Chen, Michael Shodiya, L. W., Kinnoyuke Yahiro, Manuela Martins-Green, Nilabh Shastri, and P. W. (2016). Translation from the 5' untranslated region shapes the integrated stress response. *Science*, 351, aad3867.

Sheth, U., Pitt, J., Dennis, S., Priess, J. R. (2010). Perinuclear P granules are the principal sites of mRNA export in adult *C. elegans* germ cells. *Development (Cambridge, England)*, 137(8), 1305–1314.

Shrivastava, R., Drory-Retwitzer, M., Shapira, M. (2019). Nutritional stress targets LeishIF4E-3 to storage granules that contain RNA and ribosome components in *Leishmania*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(3), 1–30.

Skeiky, Y. A. W., Guderian, J. A., Benson, D. R., Bacelar, O., Carvalho, E. M., Kubin, M., Badaro, R., Trinchieri, G., Reed, S. G. (1995). A Recombinant *Leishmania* Antigen that Stimulates Human Peripheral Blood Mononuclear Cells to Express a Th1-Type Cytokine Profile and to Produce Interleukin 12. *Journal of Experimental Medicine*, 181(April), 1527–1537.

Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), 731–745.

- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., Kosmman, C., Sincero, T. C. M., Stoco, P. M., Murta, S. M. F., Carvalho-Pinto, C. J., Grisard, E. C. (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(1), 25–32.
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R. E., McKerrow, J., Reed S, Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation*, 118(4), 1301–1310.
- Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V, Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M., & Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), 400–419.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. a, Brengues, M., Parker, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(4), 371–382.
- Van Treeck, B., Protter, D. S. W., Matheny, T., Khong, A., Link, C. D., Parker, R. (2018). RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(11), 2734–2739.
- Vanhamme, L. & Pays, E. (1995). Control of Gene Expression in Trypanosomes. *Microbiological Reviews*, 59(2), 223–240.
- WHO. (2019). Chagas disease (American trypanosomiasis).
- Yoffe, Y., Léger, M., Zinoviev, A., Zuberek, J., Darzynkiewicz, E., Wagner, G., Shapira, M. (2009). Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3243–3253.
- Yoffe, Y., Zuberek, J., Lerer, A., Lewdorowicz, M., Stepinski, J., Altmann, M., Darzynkiewicz E., Shapira, M. (2006). Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryotic Cell*, 5(12), 1969–1979.
- Zinoviev, A., Léger, M., Wagner, G., Shapira, M. (2011). A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Research*, 39(19), 8404–8415.
- Zoltner, M., Krienitz, N., Field, M. C., Kramer, S. (2018). Comparative proteomics of the two *T. brucei* PABPs suggests that PABP2 controls bulk mRNA. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), 1–18.