

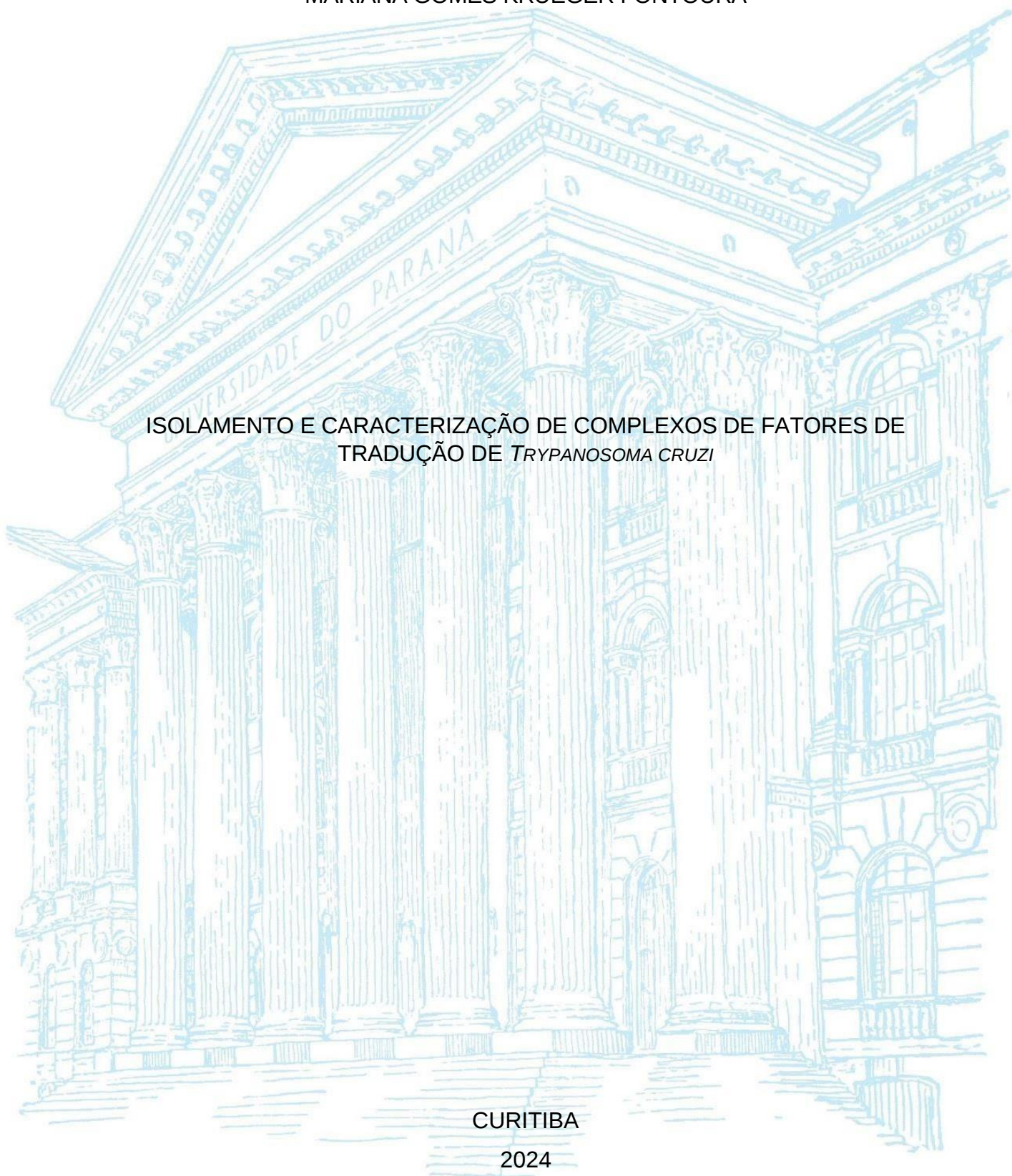
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA GOMES KRUEGER FONTOURA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE FATORES DE
TRADUÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

CURITIBA

2024



MARIANA GOMES KRUEGER FONTOURA

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE FATORES
DE TRADUÇÃO DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de graduação em
Biomedicina, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do
Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Wanderson Duarte
da Rocha

Coorientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin
Zanchin

CURITIBA

2024

Dedico este trabalho a minha avó e meu padrinho, que sempre me apoiaram para que eu pudesse realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, minha avó e meu padrinho, que sempre me incentivaram e tentaram me ajudar em tudo que fosse necessário com os meus estudos e que hoje se esforçam para entender o assunto dos meus estudos, porque eles sabem o quanto isso é importante para mim.

Ao meu orientador da Iniciação Científica, Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, pela oportunidade e confiança a mim concedidas e por ter me guiado durante esse ano de grande aprendizado, tendo me ajudado a aprofundar os meus conhecimentos em biologia molecular e a enxergar novas possibilidades de pesquisa que antes me eram completamente desconhecidas.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Estrutural e Engenharia de Proteínas – FIOCRUZ por terem tido paciência comigo ao ingressar em um laboratório e uma área de pesquisa novos e por terem me apoiado ao explicar aspectos de procedimentos de bancada que eu não conseguiria saber sem eles.

Às minhas amigas, que sempre me escutam falar sobre o que eu estudo e pesquiso apesar de não entenderem sobre o assunto e por me lembrarem de descansar um pouco.

Aos meus professores por terem me proporcionado a base de conhecimentos sobre a qual eu pude me apoiar para me aprofundar em áreas mais complexas sobre as quais desejo aprender mais.

Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você fizer nada, não
existirão resultados

(MAHATMA GANDHI)

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, uma doença que acomete milhões de pessoas na América Latina a qual ainda é tratada com medicamentos que apresentam eficiência discutível. Para possibilitar o desenvolvimento de inibidores específicos contra estes patógenos é necessário um melhor entendimento dos mecanismos moleculares que os diferenciam de seus hospedeiros. Um desses mecanismos é o processo de tradução, o qual apresenta particularidades nestes patógenos e cujas diferenças concentram-se na etapa de iniciação. O RNA mensageiro destes organismos apresenta modificações covalentes adicionais na sua extremidade 5', a qual é denominada cap-4. Este cap difere daquele encontrado em outros eucariotos, o cap-0, por apresentar sete grupamentos metil a mais. Também é específico dos tripanossomatídeos a diversidade de homólogos dos fatores de iniciação da tradução eIF4E e eIF4G e de proteínas ligantes de cauda de poliadeninas de mRNA, e as interações entre esses homólogos é particular de cada espécie. Assim, este trabalho tem por objetivo caracterizar complexos formados por eIF4E de *T. cruzi* por meio do isolamento desses complexos em resina de agarose acoplada a cap-4 a partir de extratos de *T. cruzi*.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*, Tradução, cap-4, Fatores de iniciação, eIF4E, eIF4G, eIF4F.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the protozoan that causes Chagas disease, which affects millions of people in Latin America and is still being treated with outdated medicine with questionable efficiency. To enable the development of specific inhibitors, a better understanding of the molecular mechanisms that differentiate the pathogenic trypanosomatids from their hosts is necessary. One of these mechanisms is the translation process, which presents specific features in these pathogens, most of them concentrated in the initiation phase. The mRNA of these organisms possesses a hypermodified 5' end structure called cap-4. This cap differs from the one found in other eukaryotes, cap-0, by presenting seven additional methyl groups. In addition, trypanosomatids also present a diversity of homologues of the translation initiation factors eIF4E and eIF4G and of mRNA polyadenine tail binding proteins. In addition, the interactions between these homologues are specific to each species. Thus, in this work we aimed to characterize the complexes formed by eIF4E from *T. cruzi* by affinity purification using a cap-4 analogue immobilized on agarose beads.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Translation, cap-4, Initiation factors, eIF4E, eIF4G, eIF4F.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> , ilustrando suas formas tripomastigota, amastigota e epimastigota de acordo com o hospedeiro e o estágio da infecção	14
Figura 2 – Esquema representando a iniciação da tradução em eucariotos	17
Figura 3 – Estruturas do cap-0 e do cap-4	19
Figura 4 – Estrutura tridimensional do eIF4E humano e do eIF4E5 de <i>T. cruzi</i>	20
Figura 5 – Representação fora de escala das interações de proteínas com diferentes complexos eIF4F-like identificados em <i>T. brucei</i>	23
Figura 6 – Distribuição das proteínas entre as purificações com cap-0 e cap-4	29
Figura 7 – Perfil das proteínas purificadas de acordo com a sua função	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos códigos e dos nomes dos fatores de iniciação encontrados separados de acordo com o cap com o qual eles estão em associação.....	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

eIFs – do inglês, *Eukaryotic initiation factors*

mRNA – do inglês, *messenger ribonucleic acid*

rRNA – do inglês, *ribosomal ribonucleic acid*

tRNA – do inglês, *transporter ribonucleic acid*

GTP – guanosina trifosfato

PABP – do inglês, *poli-adenylation binding protein*

TC – complexo ternário

ORF – do inglês, *Open Reading Frame*

RBP23 – do inglês, *RNA binding protein 23*

IP – do inglês, *interacting protein*

TUT3 – do inglês, *terminal uridyl transferase 3*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. OBJETIVOS.....	12
1.1.1. Objetivo geral.....	12
1.1.2 Objetivos específicos	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	12
2.2. TRADUÇÃO.....	14
2.2.1. Iniciação da tradução em procariotos	15
2.2.2. Iniciação da tradução em eucariotos	15
2.2.3. Diferenças na iniciação da tradução em tripanossomatídeos	18
2.2.4. Caracterização de complexos eIF4F	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. PREPARAÇÃO DA COLUNA DE AFINIDADE CONTENDO ANÁLOGO DE CAP-4 IMOBILIZADO	23
3.2. TESTE DA EFICÁCIA DA REAÇÃO DE ACOPLAMENTO	24
3.3. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS DE CÉLULAS DE <i>T. CRUZI</i>	24
3.4. PURIFICAÇÃO DE COMPLEXOS DE LIGAÇÃO CAP-4 DE <i>T. CRUZI</i>	25
3.5. IDENTIFICAÇÃO DE COMPLEXOS DE LIGAÇÃO CAP-4 DE <i>T. CRUZI</i>	25
3.6. ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS OBTIDOS PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	26
3.7. ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NESTE TRABALHO COM ESTUDOS DE IMUNOPURIFICAÇÃO DE COMPLEXOS DE FATORES DE TRADUÇÃO	27
4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	28
4.1. ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS OBTIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	28

4.2. FATORES DE INICIAÇÃO ENCONTRADOS NO EXPERIMENTO.....	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
5.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	36
REFERÊNCIAS	37

1. INTRODUÇÃO

Os tripanossomatídeos são um grupo de protozoários composto entre outros por alguns agentes patogênicos de importância para a saúde pública: o *Trypanosoma cruzi*, o *Trypanosoma brucei* e *Leishmania sp.* Este grupo difere dos demais eucariotos, incluindo os seus hospedeiros, em um aspecto importante da regulação da expressão gênica: tripanossomatídeos possuem os genes que codificam proteínas organizados de forma policistrônica, cuja transcrição é constitutiva. Desta forma, enquanto outros eucariotos costumam se apoiar em mecanismos de regulação da expressão de nível transcricional, tripanossomatídeos precisam regular a expressão gênica em níveis pós-transcricional e traducional. Neste contexto encontra-se outro ponto de interesse na comparação de tripanossomatídeos com os hospedeiros de suas espécies patogênicas, eles possuem um cap 5' no RNA mensageiro (mRNA) com mais grupamentos metil do que aquele encontrado em mamíferos. Os fatores de iniciação da tradução (eIFs) interagem com o cap 5' em um processo que recruta o ribossomo para o mRNA, possibilitando a sua tradução. O eIF responsável por reconhecer diretamente o cap é denominado eIF4E, e este forma um complexo chamado eIF4F em conjunto com eIF4G, que recruta o ribossomo por meio da interação com eIF3, e eIF4A, uma helicase responsável por linearizar o mRNA para a tradução. Este complexo apresenta ainda outra diferença característica de tripanossomatídeos, eles possuem seis homólogos de eIF4E (1-6) e cinco homólogos de eIF4G (1-5), enquanto humanos possuem apenas três homólogos de cada. Além disso, a importância de cada um dos homólogos é específica para o estágio no qual o protozoário se encontra. Assim sendo, a relação do cap 5' com a função dos eIF4Fs torna-se uma perspectiva de interesse na pesquisa com tripanossomatídeos patogênicos por evidenciar várias diferenças que podem vir a servir como base para estratégias terapêuticas.

Embora estudos já tenham sido realizados para caracterizar os complexos eIF4F de tripanossomatídeos, estes estudos foram realizados, em sua maioria, pela imunoprecipitação de eIF4Es e eIF4Gs, sendo que a interação dos eIFs com o cap foi pouco estudada, e, mesmo quando isso ocorreu, foi utilizado apenas o cap-0, sendo que a sua afinidade pelo cap-4 quando comparada com o cap-0 ainda não havia sido avaliada. Ademais, a composição dos complexos envolvendo proteínas auxiliares além do eIF4F ainda não está bem estabelecida. Assim, torna-se essencial avaliar o

comportamento destes complexos quando interagindo com o cap-4.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo geral

Caracterizar complexos eIF4E4 estágio-específicos durante o ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

1.1.2 Objetivos específicos

- i) Preparar extratos celulares de *T. cruzi*.
- ii) Preparar a coluna de afinidade contendo cap-4 imobilizado.
- iii) Fracionamento do extrato e caracterização da composição das frações selecionadas por espectrometria de massas.
- iv) Purificar adicionalmente os complexos caracterizados por troca iônica e exclusão por tamanho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

É estimado que entre 6 e 7 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras da Doença de Chagas e 75 milhões estejam em risco de contrai-la, sendo que a maioria dessas pessoas está na América Latina (OPAS, 2023). A doença é curável caso seja detectada logo após a infecção, entretanto estima-se que apenas 10% dos portadores sejam diagnosticados. Dessa forma, até 30% dos pacientes não tratados podem desenvolver alterações irreversíveis no coração, sistema digestório e nervoso, e aproximadamente 10 mil mortes causadas por Doença de Chagas são registradas por ano nas Américas (OPAS, 2023).

A Doença de Chagas é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, um parasita intracelular dixênico. Ele possui vetor invertebrado, insetos triatomíneos hematófagos, que pode o transmitir para mamíferos por meio da excreção durante o repasto sanguíneo (Fig. 1). Ele também pode ser transmitido oralmente por alimentos contaminados, congenitamente e por transfusões de sangue. Uma vez que o parasita infecta o hospedeiro vertebrado, ele inicia a fase aguda, que dura de algumas semanas a dois meses e apresenta sintomas inespecíficos ou é assintomática. Esta fase termina quando o sistema imune reduz a quantidade de parasitos circulantes

drasticamente. Neste ponto, o paciente inicia a fase crônica indeterminada, quando a infecção está controlada, mas o *T. cruzi* continua a se multiplicar nos cardiomiócitos. Como nesta fase não há muitos parasitos sanguíneos, o diagnóstico por visualização de sangue ao microscópio torna-se inviável, refletindo nas baixas taxas de diagnóstico citadas. Entre 10% e 40% dos pacientes desenvolve a fase crônica sintomática da doença, na qual o hospedeiro desenvolve as complicações no coração, sistema digestório e nervoso e pode vir a óbito (Chatelain, 2016; Siqueira-Batista, 2020).

Atualmente, o único fármaco em uso no Brasil para o tratamento da Doença de Chagas é o benzonidazol. Ele foi introduzido há mais de 50 anos, mas é altamente eficaz na forma aguda da doença, proporcionando a cura. Entretanto, quando a doença está em sua forma crônica, a medicação tende a ser menos eficaz. Isso se deve ao fato de que neste estágio da doença, o parasito se encontra em sua forma intracelular, de forma que a exposição do parasito ao medicamento está dificultada. A medicação também tende a afetar as células do hospedeiro, o que leva a diversos efeitos adversos, desde erupções cutâneas e náuseas até falência hepática e renal (Clayton, 2010; Bern, 2011).

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado pertencente ao grupo dos tripanossomatídeos, que inclui também outros organismos de importância para a saúde humana, como o *Trypanosoma brucei*, causador da tripanossomíase africana, também conhecida como doença do sono, e as espécies de *Leishmania*, causadoras da leishmaniose. Esse grupo divergiu de outros eucariotos há aproximadamente 600 milhões de anos e desenvolveu características não encontradas em nenhum outro grupo, como transcrição policistônica, *trans-splicing*, cap 5' com mais grupamentos metil, ausência de regulação da transcrição e a presença de uma base incomum, β -D-glucosil-hidroximetiluracil (J), em seu genoma (Vesteg et al., 2019; Maslov et al., 2019).

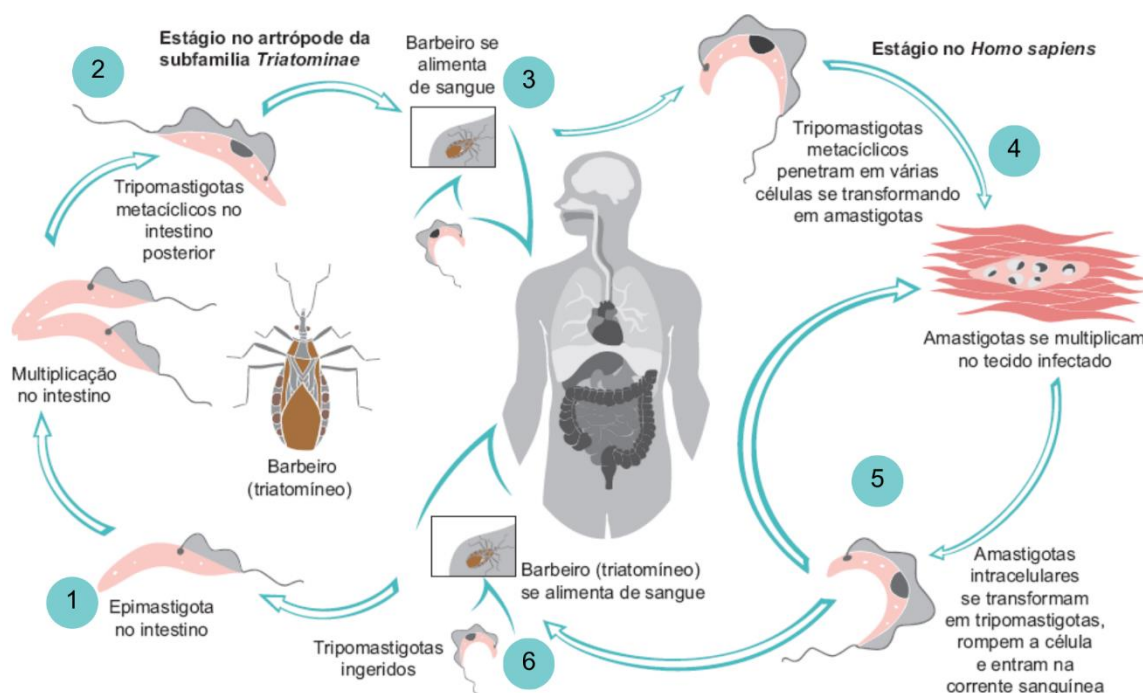


Figura 1. Ciclo de vida do *T. cruzi*, ilustrando suas formas tripomastigota, amastigota e epimastigota de acordo com o hospedeiro e o estágio da infecção. O *T. cruzi* está presente na sua forma epimastigota na região posterior do intestino médio do triatomíneo, onde ele é capaz de se reproduzir por divisão binária, porém não invade as células do hospedeiro invertebrado (1). Uma vez que eles alcançam o intestino posterior, eles se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, a sua forma infectiva (2). Quando o inseto realiza o repasto sanguíneo, ele possui o instinto de defecação (3). A picada causa um estímulo de coceira, que promove um espalhamento das fezes contendo o parasito. Uma vez em contato com uma mucosa ou solução de continuidade de pele, o tripomastigota metacíclico alcança a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, onde ele pode invadir células por interações com proteínas da membrana basal. Dentro da célula, eles se diferenciam na forma amastigota, que se multiplicam por divisão binária (4). Os amastigotas intracelulares são capazes de se diferenciar em tripomastigotas sanguíneos, que rompem a célula e infectam outras células ou permanecem em vida livre na corrente sanguínea (5). Caso algum triatomíneo faça novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado previamente infectado, ele ingere tripomastigotas sanguíneas, que se diferenciam em epimastigotas, reiniciando o ciclo (6) (adaptado de Siqueira-Batista, 2020).

2.2. TRADUÇÃO

A síntese de proteínas é um processo essencial para todos os seres vivos e, como tal, a sua base é altamente conservada. Uma molécula de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) é lida, da extremidade 5' para a 3', pelo ribossomo em um processo denominado tradução (Berg et al., 2021).

A tradução pode ser dividida em três partes: a iniciação, a elongação e o término. No geral, a iniciação é caracterizada pelo recrutamento do ribossomo ao códon de início, o alongamento é composto pela adição de aminoácidos à cadeia polipeptídica nascente e o término consiste na liberação do polipeptídeo e do mRNA e na desassociação das subunidades do ribossomo, que serão recicladas para uma próxima tradução (Jackson et al., 2010).

2.2.1. Iniciação da tradução em procariotos

Nos procariotos, a tradução é iniciada conforme o mRNA ainda está sendo sintetizado a partir do molde de DNA. Os mRNAs de procariotos possuem uma região denominada Shine-Delgarno, caracterizada por ser rica em purinas, que é complementar a uma região do rRNA 16S, componente da subunidade ribossomal 30S, a menor em procariotos. Assim, o mRNA é capaz de, por si só, recrutar diretamente o ribossomo (Berg et al., 2021).

Entretanto, a iniciação da tradução em procariotos ainda requer três fatores de iniciação (IFs). IF1 e IF3 ligam-se à subunidade 30S de forma a impedir que ela complexe com a subunidade 50S, a maior. Já IF2 liga-se a GTP de forma a mudar sua conformação e permitir interação com o RNA transportador (tRNA), o fMet-tRNA^f, que carrega o aminoácido que sempre é o primeiro da cadeia nascente em procariotos, a formilmetionina. O tRNA do complexo IF2-GTP-tRNA possui uma sequência de três nucleotídeos denominada anticódon, que se pareia com o códon de iniciação do mRNA (geralmente AUG). O pareamento entre IF2-GTP-tRNA e mRNA ocorre na região correta da subunidade 30S devido ao pareamento entre a região de Shine-Delgarno e o rRNA 16S. Em seguida, IF1 e IF3 se dissociam e IF2 recruta a subunidade 50S para formar o ribossomo 70S. Com a interação entre as subunidades, IF2 hidrolisa GTP e é liberado. Esse evento termina a iniciação da tradução em procariotos (Berg et al., 2021).

2.2.2. Iniciação da tradução em eucariotos

A iniciação da tradução em eucariotos consiste no acoplamento do ribossomo a uma molécula de RNA e o escaneamento desta até que o códon de início (AUG), esteja pareado com o anticódon do RNA transportador iniciador, que transporta o primeiro aminoácido da cadeia nascente, a metionina (Jackson et al., 2010). Esse processo requer aproximadamente 12 fatores de iniciação eucariótica (eIFs), proteínas e complexos de proteínas que medeiam as interações responsáveis pela iniciação da tradução (Fig. 2) (Aitken, 2012).

Ao contrário do que ocorre com procariotos, em eucariotos o RNA não é capaz de ligar-se diretamente ao ribossomo. Em vez da sequência Shine-Delgarno, eucariotos possuem uma estrutura denominada cap, presente na extremidade 5' de

mRNAs (Fig. 3A). A síntese do cap que consiste na hidrólise de um grupamento fosfato do trifosfato do nucleotídeo 5' de um mRNA e na esterificação do difosfato com o fosfato de uma metilguanossina (Fig. 3A). Esse processamento ocorre no núcleo, onde o mRNA é sintetizado, antes dele ser transportado para o citoplasma, onde ele é traduzido (Jackson et al., 2010). Além da síntese do cap, o mRNA passa por outras modificações no núcleo, como a adição de uma sequência de adeninas (cauda poli-A) em sua extremidade 3' e splicing, que consiste na retirada de sequências não codificantes entre sequências que codificam um polipeptídeo (Berg et al., 2021). O cap é reconhecido pelo eIF4E, que é responsável também pela formação de complexo com outros fatores, o que culmina no recrutamento da subunidade 40S do ribossomo, a menor em eucariotos (Jackson et al., 2010).

Assim, o eIF4E interage com eIF4G, que interage com eIF4A, formando um complexo denominado eIF4F. eIF4G é responsável por agir como um “arcabouço”, interagindo com outros fatores, eIF4B e eIF3, de forma a posicioná-los em proximidade da extremidade 5' do mRNA. eIF4G também é capaz de se ligar a proteínas ligantes de cauda poli-A (PABP), circularizando o mRNA. A circularização aumenta a expressão do mRNA, provavelmente devido à ancoragem de eIF4F ao mRNA, mesmo que este se desassocie do cap (Jackson et al., 2010).

Foram identificados diferentes parálogos de eIF4E e eIF4G para a maioria das espécies de eucariotos investigadas, e esses parálogos combinam-se de forma parálogo-específica para formar diferentes complexos eIF4F-like. Para a maioria das espécies também foi identificado pelo menos um parálogo de eIF4E que não possui um par eIF4G e que, portanto, atua na inibição da expressão dos mRNAs aos quais ele se liga (Hernández et al., 2012).

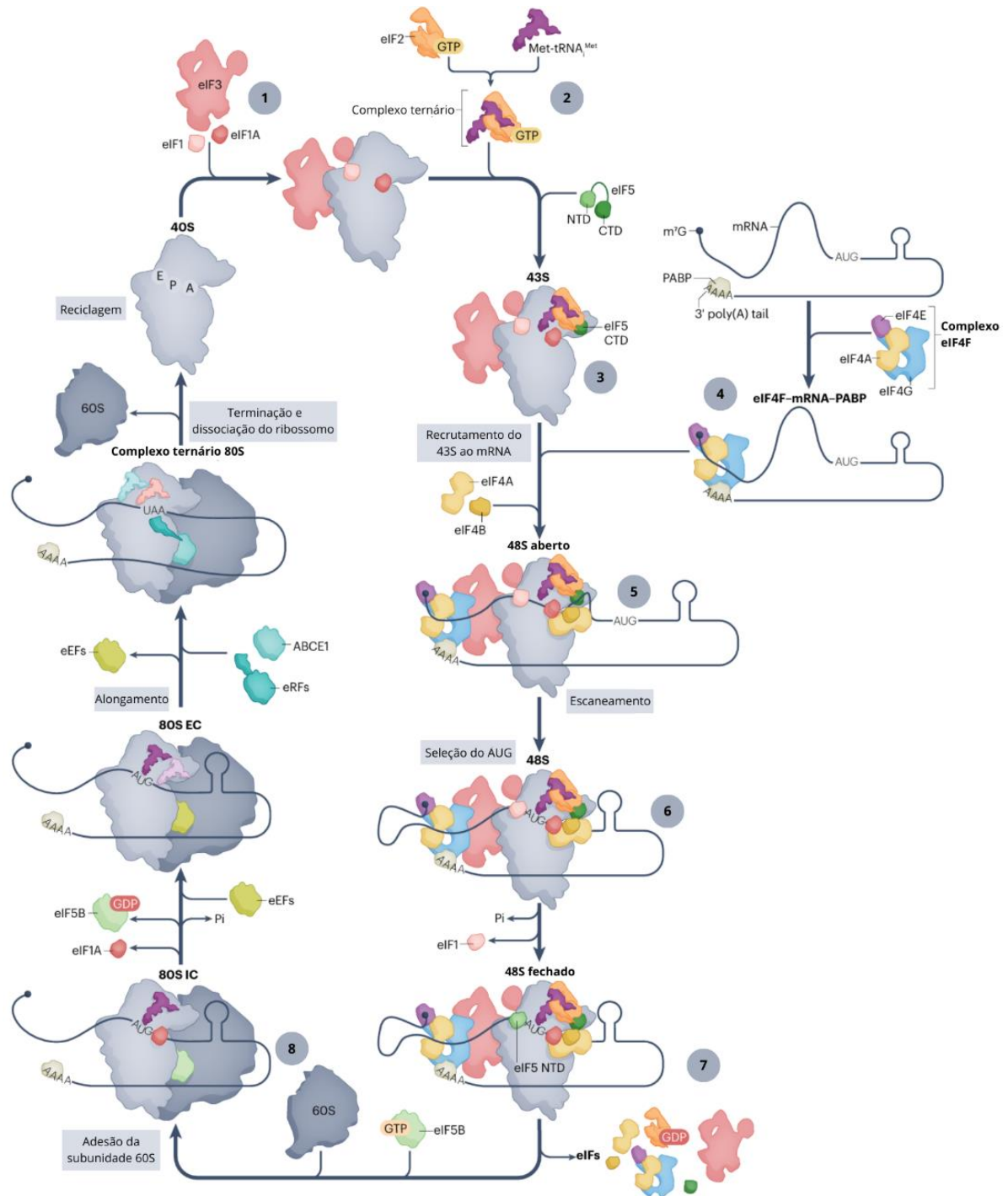


Figura 2. Esquema representando a iniciação da tradução em eucariotos. Primeiramente os fatores eIF1, eIF1A e eIF3 ligam-se à subunidade 40S de forma a impedir a sua associação com o 60S (1), e o eIF2 liga-se ao tRNA iniciador (Met-tRNA^{Met}), formando o complexo ternário (2). Em seguida, o complexo ternário e o eIF5 associam-se à subunidade 40S, formando o complexo 43S (3). Enquanto isso, eIF4E reconhece o cap 5' enquanto em complexo com eIF4G, uma proteína *scaffolding*, e eIF4A, uma helicase DEAD-box, formando o complexo eIF4F, que se liga à proteína ligante de poli-A (PABP), circularizando o mRNA (4). Então, o complexo mRNA-eIF4F-PABP interage com o 43S, formando o complexo 48S (5), que escaneia o RNA até que o códon de iniciação se pareie com o anticódon do Met-tRNA^{Met} (6), momento no qual o 48S se fecha, e os fatores de iniciação desassociam-se do complexo (8). Neste ponto, o fator eIF5B promove a interação do 60S com o 40S, de forma que a elongação da tradução pode começar (8) (adaptado de Querido, Díaz-López e Ramakrishnan, 2023).

2.2.3. Diferenças na iniciação da tradução em tripanossomatídeos

Ao contrário do que ocorre em outros eucariotos, os mRNAs de tripanossomatídeos não são transcritos separadamente de acordo com a proteína. Em vez disso, os genes codificantes de proteínas estão dispostos em sequência na fita de DNA e são transcritos em longas sequências de pré-mRNA que englobam várias proteínas não relacionadas. Essa forma de organização das sequências codificadoras é denominada de policistrônica. Após a transcrição dos pré-mRNA policistrônicos, é necessário que ele passe por um processo de maturação para gerar os mRNAs maduros, cada um codificando uma única proteína. O processamento dos pré-mRNAs policistrônicos envolve uma reação denominada *trans-splicing*, que adiciona o *spliced leader* contendo o cap na região 5' da ORF e, outra denominada de poliadenilação que ocorre na região 3' da ORF (Clayton et al., 2019).

A transcrição em tripanossomatídeos é constitutiva, já que eles não possuem promotores de transcrição entre as ORFs e ela produz um precursor policistrônico. O fato de não apresentarem estes promotores faz com que a regulação da expressão gênica seja realizada apenas após a síntese do pré-mRNA, tanto a nível pós-transcricional, na maturação do RNA, quanto a nível traducional (de Gaudenzi et al., 2011). De fato, o controle a nível traducional tem se mostrado de interesse, como discutido posteriormente.

Além disso, a estrutura do cap em tripanossomatídeos contém modificações encontradas apenas nesses organismos. A estrutura do cap encontrado em humanos, denominado cap-0, possui apenas o grupamento metil na posição N-7 da guanosina. Já o cap característico dos tripanossomatídeos, denominado cap-4, possui grupamentos metil adicionais nos quatro primeiros nucleotídeos na posição 2'-O da ribose, além de dois grupos metil na primeira adenosina e um na quarta uridina (Fig. 3B). Estudos de nocaute em genes de enzimas responsáveis pelas metilações 2'-O-ribose determinaram que a falta do grupo metil na primeira ribose não afeta a tradução. Entretanto a falta de grupo metil nas riboses três e quatro inibe a tradução, e a falta adicional do grupo metil na segunda ribose promove uma inibição ainda maior da tradução. Além disso, a ausência de grupo metil na posição 1 e na 2 ou dos grupos metil das posições 3 e 4 não produz parasitas viáveis. Dessa forma, a estrutura do cap 4 é a ideal para a maior expressão e uma quantidade mínima de grupos metil em posições específicas é necessária para a viabilidade dos tripanossomatídeos

(Zinoviev et al., 2012).

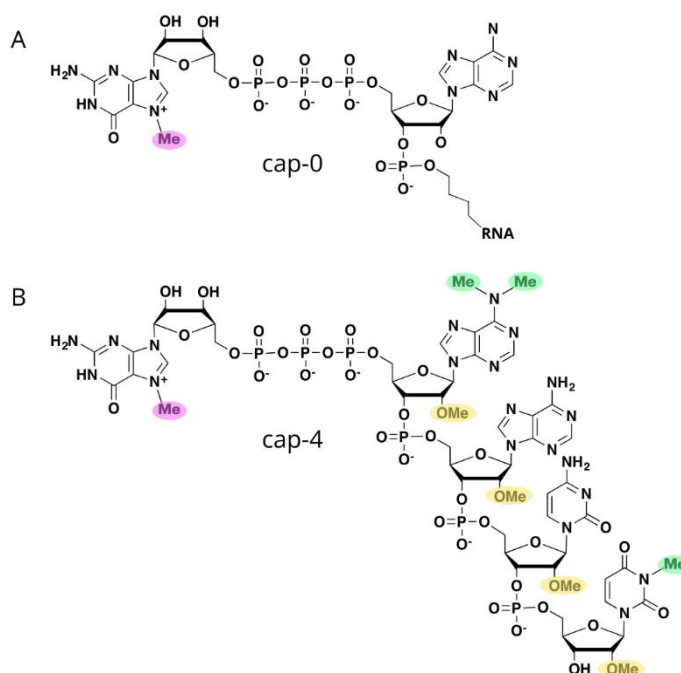


Figura 3. Estruturas do cap-0 e do cap-4. (A) Representação da estrutura de um cap 0 com o grupamento metil da m7-guanosina destacado em roxo. (B) Representação da estrutura do cap-4 com o grupo metil da guanosina marcada em roxo, os grupos metil das riboses em amarelo e os grupos metil das bases em verde.

O cap-4 é reconhecido pelo eIF4E em tripanossomatídeos assim como o homólogo de eIF4E em outros eucariotos reconhece o seu cap. Entretanto, a estrutura do eIF4E não é muito conservada entre tripanossomatídeos e outros eucariotos (Dejung et al., 2016), de forma que os resíduos de aminoácidos que interagem com a m7-guanosina diferem entre eIF4E humano e eIF4E5 de *T. cruzi* (Fig. 4B). Há pelo menos seis genes para homólogos de eIF4Es e cinco para homólogos de eIF4Gs no genoma de tripanossomatídeos, sendo que os homólogos variam em tamanho e estrutura. Os diferentes eIF4Es são capazes de interagir com diferentes eIF4Gs, formando complexos eIF4F-like distintos. Esses complexos possuem afinidades diferentes pelo cap 4 dependendo do homólogo de eIF4E (Freire et al., 2017).

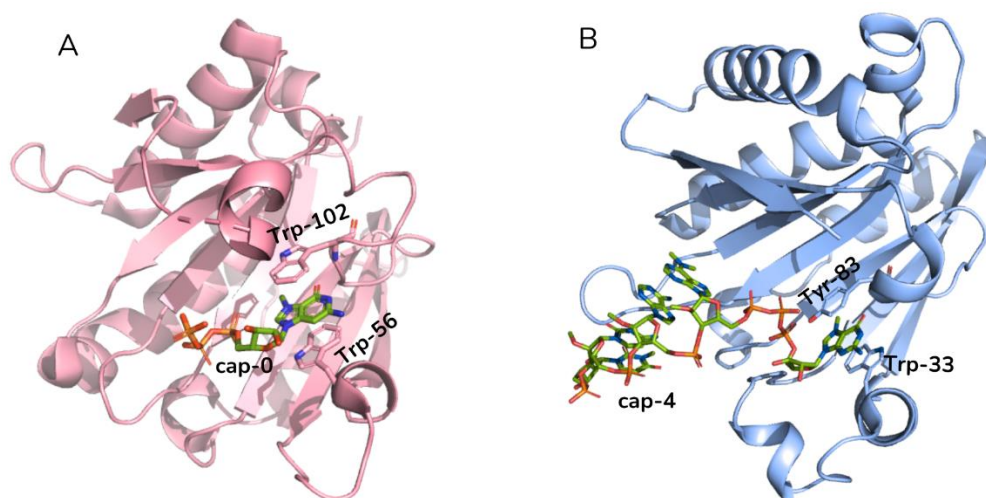


Figura 4. Estrutura tridimensional do eIF4E humano e do eIF4E5 de *T. cruzi*. (A) Estrutura tridimensional do eIF4E humano ligado ao cap-0 (em verde) entre dois resíduos de triptofano, Trp-102 e Trp-56, no bolso de ligação ao cap (código PDB: 2V8W). A ligação com eIF4G ocorre com o N-terminal e o C-terminal, não indicados na imagem (Piserà, 2018). (B) Estrutura tridimensional do eIF4E5 de *T. cruzi* ligado ao cap-4 (em verde) entre dois resíduos, um de tirosina e outro de triptofano (Tyr-83 e Trp-33). Outras partes da estrutura do cap-4 também interagem com outros resíduos do eIF4E de *T. cruzi* (código PDB: 6O7Y) (Reolon et al., 2019).

2.2.4. Caracterização de complexos eIF4F

A identificação de pares eIF4E/eIF4G e proteínas que formam o complexo eIF4F em *T. cruzi* foi realizada majoritariamente por imunoprecipitação de uma proteína do complexo e caracterização por espectrometria de massas de proteínas coprecipitadas. Assim foi identificado que o eIF4E de tripanossomatídeos que não possui par eIF4G e que reprime a expressão de mRNAs é o eIF4E1. Em vez de formar complexos com eIF4G, este fator interage com eIF4E-IP ou eIF4E-IP2 (Falk et al., 2022). eIF4E-IP também é capaz de recrutar TUT3 (Fig. 5A) (Falk et al., 2021).

Outro parálogo, eIF4E2, ainda não possui um par eIF4G determinado. Porém, ele se liga a SLBP2 (Fig. 5B), que possui um domínio de ligação a estruturas em grampo da região 3' de mRNAs de histonas. Entretanto, como mRNAs de tripanossomatídeos possuem cauda poli-A, essas regiões não ocorreriam em mRNAs codificantes de outras proteínas, de forma que a função de SLBP2 e do complexo como um todo ainda não é bem estabelecida (Freire et al., 2018). O nocaute, mas não o *knock down*, de eIF4E2 causa impedimento na multiplicação de tripomastigotas sanguíneas, mas não em procíclicos, e os mRNAs identificados como ligantes deste fator apresentam picos de expressão durante a fase S, o que indica que eIF4E2 está envolvida com o processo de divisão celular em *T. brucei* (Falk, 2022).

Já os complexos formados entre eIF4E3 e eIF4G4 e entre eIF4E4 e eIF4G3 já

estão bem estabelecidos para espécies de *Leishmania* e *T. brucei* e são considerados canônicos por terem inicialmente sido encontrados em concentrações equimolares com mRNA. Além disso, já se sabe que esses complexos reconhecem alguns mRNAs específicos (Bezerra et al., 2022; Falk et al., 2022).

eIF4E3/eIF4G4 liga-se a PABP2, eIF4A e outras helicases e várias RBPs diferentes (Fig. 5C) (Bezerra et al., 2022). O *knock down* de eIF4E3 causa a perda de viabilidade de tripomastigotas procíclicos e sanguícolas, enquanto o *knock down* de eIF4E4 causa a diminuição da viabilidade apenas de formas sanguícolas, o que sustenta que a função desses complexos também é específica quanto à fase do ciclo de vida do parasita (Bezerra et al., 2022).

Em *T. brucei*, eIF4E4/eIF4G3 liga-se a PABP1, eIF4A e RBP23 (*RNA binding protein 23*) (Fig. 5D). É provável que RBP23 e outras proteínas encontradas em experimentos de imunoprecipitação do complexo que possuem domínio de ligação a RNA também possuam algum papel em recrutar o complexo ao mRNA a ser traduzido (Bezerra et al., 2022). Além disso, foi mostrado em *Leishmania* que PABP1 e eIF4E4 podem ser fosforilados, o que deve cumprir algum papel na regulação da expressão gênica, entretanto isto ainda não é muito claro. A fosforilação é catalisada pela CRK-1, uma quinase reguladora da transição da fase G1 para a S, sugerindo que a regulação dessas proteínas está envolvida com o ciclo celular. Porém, foi encontrado também que eIF4E4 e PABP1 podem ser fosforiladas por proteínas MAP quinase-like, que não estão conectadas com o ciclo celular. Embora PABP1 seja essencial para a multiplicação de *Leishmania*, não há indícios de que a sua fosforilação seja, apenas de que ela cause uma menor associação a mRNA. Foi teorizado que a fosforilação de eIF4E4 e PABP1 simultânea cause diminuição na associação entre elas, como ocorre em células humanas (Neto, 2018).

Os fatores eIF4E5 e eIF4E6 foram caracterizados posteriormente em relação a eIF4E3 e eIF4E4 por serem ainda mais divergentes em relação a outros eucariotos. Entretanto, estudos mais recentes demonstram que estes fatores podem ser encontrados em quantidades similares àsquelas de eIF4E3 e eIF4E4 (Dejung, 2016). eIF4E5 pode formar complexos tanto com eIF4G1 quanto com eIF4G2, e cada eIF4F forma complexos com diferentes proteínas (Fig. 5E). eIF4G1 pode se ligar a uma proteína com atividade de síntese do cap, contendo domínios guanililtransferase e N7-metiltransferase, a uma proteína 14-3-3, sugerindo fosforilação, e a uma proteína ligante de RNA, RBP43. Já eIF4G2 também se liga a proteínas 14-3-3 e a uma

proteína ainda não caracterizada. Nenhum dos dois complexos foi copurificado com eIF4A ou outra helicase conhecida (Freire et al., 2014).

Em *Leishmania*, eIF4E5 apresenta atividade de ligação ao cap em sua fase promastigota, mas não na forma amastigota, de forma que eIF4E5 teria esta atividade apenas na forma que habita invertebrados (Shrivastava et al., 2021). Já para *T. brucei*, foi determinado que eIF4E5 não é essencial para tripomastigotas sanguíneas, sendo que a sua falta causa apenas pequenas alterações na sua multiplicação e motilidade; porém, quando o tripomastigota se diferencia em procíclico, eIF4E5 torna-se essencial (Falk, 2022).

Já eIF4E6 forma complexo com eIF4G5. Este complexo é recrutado para o cap por uma proteína denominada MKT-1, quando esta está formando complexo com PBP1, XAC1 e LSM12 e quando este complexo foi recrutado ao mRNA por uma outra proteína ligante de RNA (possivelmente ZC3H20, PUF9, ZC3H28, PUF6 ou CFB2). Adicionalmente, este complexo também recruta PABP2, circularizando o mRNA. Foi sugerido que, como várias proteínas neste complexo são capazes de se ligar a diferentes regiões do mRNA (Fig. 5F), ele poderia aumentar os níveis de transcrição dos mRNAs aos quais ele é recrutado por sua capacidade de estabilizar a estrutura e manter eIF4E ancorado. Uma outra proteína, denominada MKT1L, foi indicada como podendo também formar complexo com PBP1/XAC1/LSM12, entretanto, não foram identificados complexos entre MKT1L e proteínas ligantes de RNA (Nascimento et al., 2020).

A falta de eIF4E6 não afeta o crescimento da forma procíclica, ao contrário ocorre com eIF4E5, mas causa a inibição da multiplicação de formas sanguíneas (Falk, 2022). De fato, foi encontrado também que MKT1 e MKT1L não formam complexos com proteína ligante de RNA durante a fase procíclica, e a diminuição nos níveis de ambas causa inviabilidade de tripomastigotas sanguíneas. Ademais, uma terceira proteína do complexo, XAC1, foi apontada como essencial para todo o ciclo de vida de *T. brucei* (Nascimento et al., 2020).

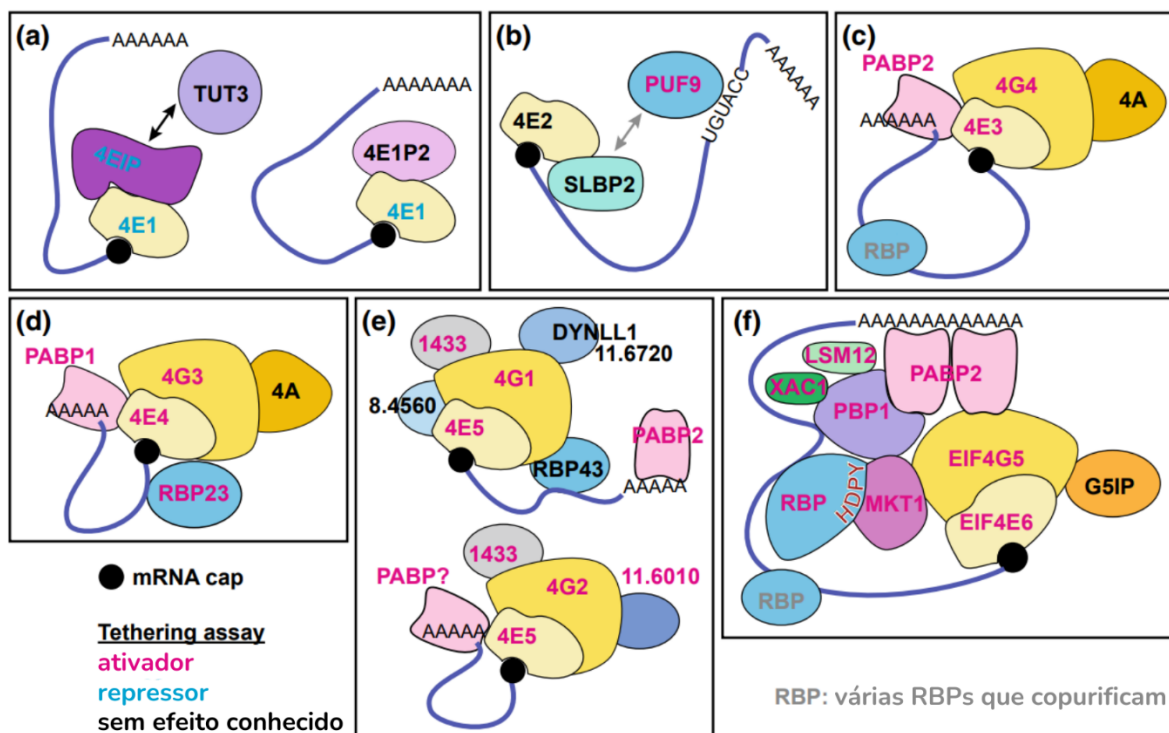


Figura 5. Representação fora de escala das interações de proteínas com diferentes complexos eIF4F-like identificados em *T. brucei*. Interações para complexos com eIF4E1 (A), eIF4E2 (B), eIF4E3 (C), eIF4E4 (D), eIF4E5 (E) e eIF4E6 (F). As interações entre as proteínas podem não ocorrer exatamente da forma apresentada (Falk, 2022).

Como foi demonstrado, a grande parte do conhecimento a respeito da maquinaria de iniciação da tradução em tripanossomatídeos foi obtida a partir de *Leishmania* e *T. brucei*, de forma que conhecimento a respeito da mesma maquinaria em *T. cruzi* continua escasso. Além disso, os complexos formados no cap são muito intrincados, e ainda há muitas proteínas que participam deles cujas funções não foram completamente elucidadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PREPARAÇÃO DA COLUNA DE AFINIDADE CONTENDO ANÁLOGO DE CAP-4 IMOBILIZADO

Por meio de colaboração com as pesquisadoras Sylvie Pochet e Sophie Vichier-Guerre do Instituto Pasteur, foi obtido o análogo de cap-4 contendo grupo alcino para acoplamento a microesferas de agarose que contêm o grupo azida. Como suporte sólido para o análogo de cap-4, foi adquirida e resina azida-agarose da empresa Jena

Bioscience como parte do kit de *click chemistry* CLK-1038-2, que também contém os demais reagentes da reação de adição azida-alcino catalisada por sal de cobre.

Para realizar a reação do kit, o cap-4 liofilizado foi diluído em água RNase-free, a resina azida-agarose foi lavada três vezes com o tampão fornecido pelo kit (fosfato de sódio a 100 mM), e foram combinados a água do kit, THPTA e sulfato de cobre (CuSO₄) em solução “premix” (CuSO₄:THPTA; 20 mM:100 mM). Todas essas soluções foram combinadas, foi acrescentado ascorbato de sódio a 1M, que inicia a reação, e a solução final foi colocada em agitador a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por uma hora. A resina foi, então, lavada cinco vezes com tampão PBS e aliqotada para a realização de experimentos futuros. A resina comercial de agarose acoplada a cap-0 também foi lavada com PBS e aliqotada.

3.2. TESTE DA EFICÁCIA DA REAÇÃO DE ACOPLAMENTO

A eficácia da reação de acoplamento foi testada pela comparação da habilidade das resinas em capturar e eluir TcEIF4E1 (0,5 mg/ml, 25 µg) previamente purificado. Para tanto, em três réplicas, foram acrescentados a uma alíquota de cada resina volumes iguais de TcEIF4E1 e tampão PBS antes de incubá-las por uma hora em agitador a 4°C ao abrigo da luz. Depois, o *flowthrough* foi retirado e a resina foi lavada quatro vezes com PBS. Para a eluição, foi acrescentada à resina de cap-0 solução de PBS com cap-0 0,1mM e à resina com cap-4 solução de PBS com cap-4 0,1 mM, o que foi incubado por 30 minutos a 4°C. Amostras do *flowthrough*, de cada uma das lavagens e da eluição foram separadas por eletroforese e coradas com azul de Coomassie. Com a confirmação de que ambas as resinas estavam funcionais pela visualização de TcEIF4E1 na eluição, os experimentos com extratos puderam ser realizados.

3.3. PREPARAÇÃO DE EXTRATOS DE CÉLULAS DE *T. CRUZI*

Foram produzidas em laboratório culturas de *T. cruzi* na forma de epimastigotas axênicos de crescimento exponencial. Foram obtidos seis pellets de $4,6 \times 10^6$ células, que foram ressuspensos em tampão de lise (20 mM tampão HEPES/HOH, pH 7,4, 50 mM KCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,5 % (v/v) n-octil-glucosídeo e inibidor de

proteases *complete protease inhibitor EDTA-free*, Roche). Os pellets depois de ressuspendidos foram combinados em um mesmo tubo e lisados por sonicação (10 vezes 30 segundos com 35 de amplitude). Finalmente, o extrato foi clarificado por centrifugação, de forma que agora podem purificados em resina por afinidade ao cap-4 ou ao cap-0.

3.4. PURIFICAÇÃO DE COMPLEXOS DE LIGAÇÃO CAP-4 DE *T. CRUZI*

Volumes iguais foram retirados do extrato e transferidos para três tubos contendo resina acoplada a cap-4 e para três tubos contendo resinas acopladas a cap-0. As misturas resina-extrato foram incubadas em agitador a 4°C e ao abrigo da luz por duas horas. Depois desse intervalo, o *flowthrough* foi recuperado e a resina foi lavada três vezes com tampão A1 (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 50 mM KCl; 2mM DTT; 2mM EDTA; NOG 0,5%, 1×inibidor de protease *complete protease inhibitor, EDTA-free*, Roche). Para a sedimentação da resina, a suspensão foi centrifugada a 3000 g por 30 segundos. Depois, a resina foi lavada três vezes novamente, porém com tampão A2 (20 mM HEPES/KOH pH 7,4; 50 mM KCl, 2mM DTT; 2 mM EDTA, NOG 0,2%). A eluição foi realizada com tampão A2 contendo 0,1 mM de cap-4 livre para as resinas acopladas a cap-4 ou 0,1 mM de cap-0 livre para as resinas acopladas a cap-0. As resinas foram incubadas com esta solução por 30 minutos a 4°C e, então, o eluido foi recuperado.

Foi realizada a eletroforese em gel de bis-acrilamida 13% de todas as amostras coletadas durante a purificação, e os géis foram corados em prata para a avaliação do desempenho da purificação.

3.5. IDENTIFICAÇÃO DE COMPLEXOS DE LIGAÇÃO CAP-4 DE *T. CRUZI*

Para remoção do detergente presente nas amostras, as amostras das últimas lavagens e das eluições de cada experimento foram concentradas e aplicadas em gel de poliacrilamida, no qual a eletroforese foi realizada apenas até que as amostras entrassem por aproximadamente 1 cm do gel de separação. Subsequentemente, as regiões do gel contendo as amostras foram cortadas e processadas para digestão com tripsina. A preparação das amostras desde a etapa de digestão com tripsina foi realizada na Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas -

Fiocruz, que está equipada com dois espectrômetros de massas (LTQ Orbitrap XL ETD e Orbitrap Fusion Lumos; Thermo Fisher Scientific). Os espectros obtidos foram então analisados pelo software MaxQuant (versão 2.2.0.0) (Cox e Mann, 2008). Os peptídeos identificados foram comparados com o genoma de *T. cruzi* Dm28c 2018 utilizando a plataforma de buscas integrada ao MaxQuant, Andromeda (Cox et al., 2011) e a razão de descobertas falsas (FDR, False Discovery Rate) foi calculada com base na comparação com as sequências inversas do genoma.

Para o uso de peptídeos na busca, foi estabelecido um limite mínimo de peptídeos de sete aminoácidos, sendo que pelo menos um desses peptídeos tinha que ser identificado em uma proteína para que ela fosse inclusa. Este um peptídeo poderia ser *razor*, um peptídeo em comum com pelo menos mais uma das demais proteínas identificadas. Proteínas que não se diferenciavam com base nos peptídeos encontrados foram agrupadas.

3.6. ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS OBTIDOS PELA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Os dados obtidos pela espectrometria de massas e processados pelo MaxQuant são exportados em forma de tabela. Esta pode ser aberta no Perseus (Tyanova et al., 2016), um programa para análises de dados de espectrometria compatível com o formato de tabelas do MaxQuant. Uma vez neste programa, foi possível excluir proteínas identificadas como possíveis contaminantes, identificadas por peptídeo ou identificadas apenas pelo sítio. Também foi usado para filtrar proteínas baseado no número de peptídeos únicos ou *razor* identificados, que deveria ser igual ou maior que três em todas as três réplicas de pelo menos uma condição. Para o iBAQ, o valor da intensidade de uma proteína normalizado de acordo com a quantidade de possíveis peptídeos formados em uma digestão triptica teórica, foi estabelecido um mínimo de 10^6 em todas as três réplicas de pelo menos um experimento.

O LFQ_i é o valor das intensidades normalizado por Levenberg-Marquardt de acordo com quantas vezes a intensidade de um peptídeo muda para cada par de amostras no qual ele é encontrado, de forma que as intensidades podem ser comparadas entre amostras de condições diferentes (Cox et al., 2014). O logaritmo de base 2 desse valor foi utilizado para comparar a presença das proteínas nas diferentes condições. Para que esses dados pudessem ser analisados, foi necessário realizar a imputação de valores de LFQ_i para proteínas que foram encontradas em apenas parte

das amostras. Para este estudo é necessário considerar que pode haver diferenças grandes o suficiente entre a interação de proteínas com cap-4 e cap-0 para estarem presentes em apenas uma das condições e que proteínas tenham sido enriquecidas com eficiência suficiente para que estejam presentes apenas em amostras da eluição quando comparadas com as lavagens. Desta forma, os dados faltantes observados devem ser considerados dentro da teoria de dados faltantes como dados faltantes não aleatoriamente, ou seja, a probabilidade de um valor variável estar faltando depende apenas do próprio valor faltante (Rubin, 1976), o que, em termos biológicos, seria considerar que a falta de uma proteína em uma amostra é devida à falta real dela nesta condição. Como foi demonstrado em estudos utilizando dados fabricados para se adequarem à cada um dos casos de dados faltantes, a imputação realizada por métodos mais simples e comuns, como por constante ou por distribuição normal, é inadequada para dados faltantes não aleatoriamente, alterando a covariância e a correlação de duas variáveis de maneira significativa (Enders, 2010). Assim, foi necessário eleger um método de imputação capaz de considerar múltiplos perfis de distribuição de dados entre amostras, sendo que dentro de cada perfil os dados possuem uma distribuição normal própria (Henry e Hofrichter, 1992). Para tanto, foi utilizada a imputação por decomposição de valor singular, que utiliza propriedades de matriz para identificar estes perfis e imputar os valores necessários.

Uma vez que os valores de LFQ_i haviam sido corretamente tratados, foi possível analisar as diferenças no enriquecimento das proteínas utilizando gráficos de dispersão construídos a partir das variâncias calculadas para cada proteína. Primeiramente, foram separadas as proteínas que foram significativamente enriquecidas com pelo menos um dos caps pela comparação da eluição com a lavagem (FDR = 0,05; $s_0 = 0,1$). Então, foram comparadas as presenças das proteínas entre as condições.

3.7. ANÁLISE COMPARATIVA DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS NESTE TRABALHO COM ESTUDOS DE IMUNOPURIFICAÇÃO DE COMPLEXOS DE FATORES DE TRADUÇÃO

Esta análise visa validar os resultados encontrados com as proteínas purificadas por afinidade a cap-4 imobilizado. As proteínas que copurificarem com fatores de tradução em outros estudos e estão presentes nas purificações por afinidade ao cap-4 tem maior chance de possuírem interações específicas no complexo de iniciação da

tradução. Para tanto, foram utilizados estudos que purificaram proteínas que fazem complexo com o cap ou estão presentes em outros complexos com RNA tanto em outros tripanossomatídeos quanto em humanos.

Para a comparação com outros tripanossomatídeos, as sequências das proteínas foram encontradas no banco de dados TriTrypDB e foram realizadas comparações de sequências utilizando o programa BLAST da própria plataforma TriTrypDB para encontrar os homólogos em outros tripanossomatídeos (Aslett et al., 2010). Então, os códigos das proteínas homólogas foram procurados nas tabelas disponibilizadas pelos artigos publicados, de acordo com a espécie utilizada no estudo.

Já para a comparação com humanos, as sequências das proteínas foram obtidas da mesma forma, mas as comparações de sequências foram realizadas na plataforma UniProt para proteínas humanas. Os homólogos foram, então, também procurados nas tabelas dos artigos publicados.

4. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

4.1. ANÁLISE COMPUTACIONAL DOS DADOS OBTIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Ao todo, 2.169 proteínas foram identificadas pelo MaxQuant nas amostras. Dessas, 460 proteínas foram significativamente purificadas ($s_0 = 0,1$), distribuídas de formas desigual entre as purificações com cap-0 e com cap-4 (Fig. 6).

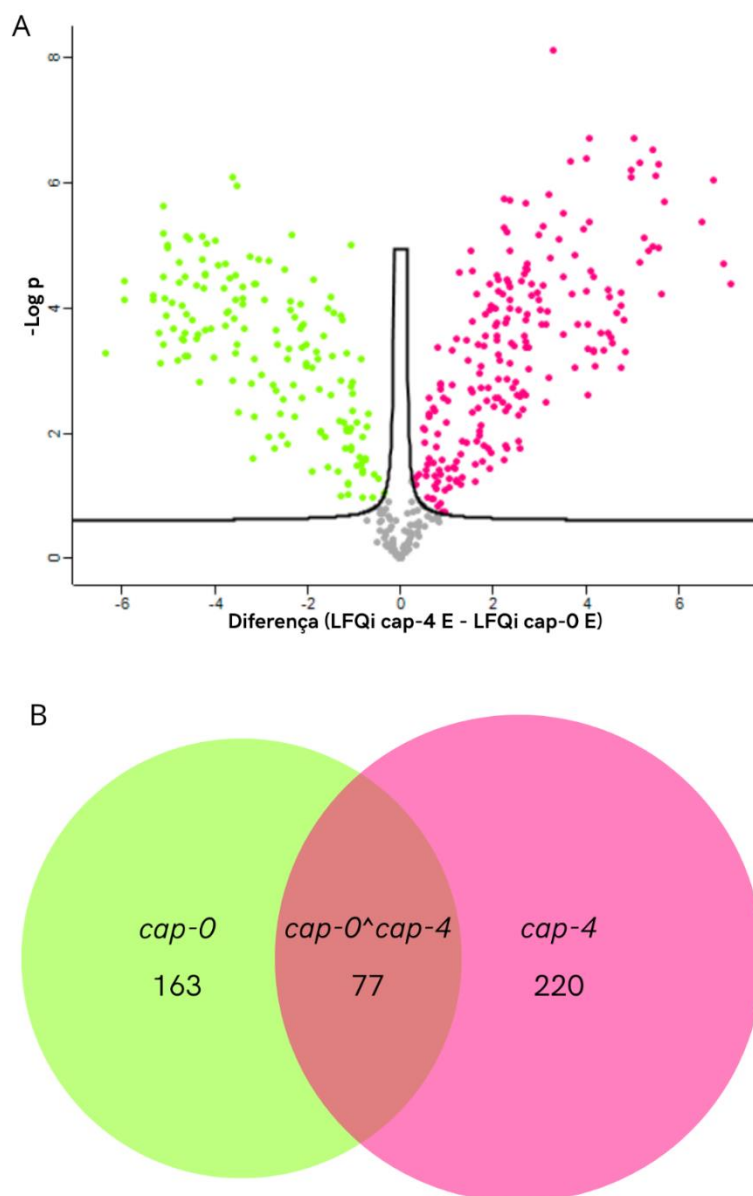


Figura 6. Distribuição das proteínas entre as purificações com cap-0 e cap-4. (A) Os pontos em amarelo (à direita) representam proteínas significativamente presentes na purificação com cap-4, enquanto os pontos em rosa (à esquerda) representam as proteínas significativamente enriquecidas com cap-0. Já os pontos em cinza ao centro representam as proteínas que não possuem diferença significativa entre as purificações. Os pontos dessas nuvens representam proteínas fortemente presentes em cada uma das purificações por afinidade, ao cap-0 ou ao cap-4, mas que não estão presentes na purificação com o outro tipo de cap (B) Diagrama proporcional para a quantidade de proteínas presente em cada grupo separado no gráfico A.

Em uma análise mais detalhada das proteínas presentes em cada purificação, é possível constatar que os perfis das funções das proteínas purificadas diferem consideravelmente entre os dois tipos de cap (Fig. 7). Pode ser observado que grupos de proteínas com funções relacionadas à tradução, como proteínas ribossomais e fatores de tradução, aparecem em ambas as purificações, embora a fração ocupada por cada grupo difira entre elas.

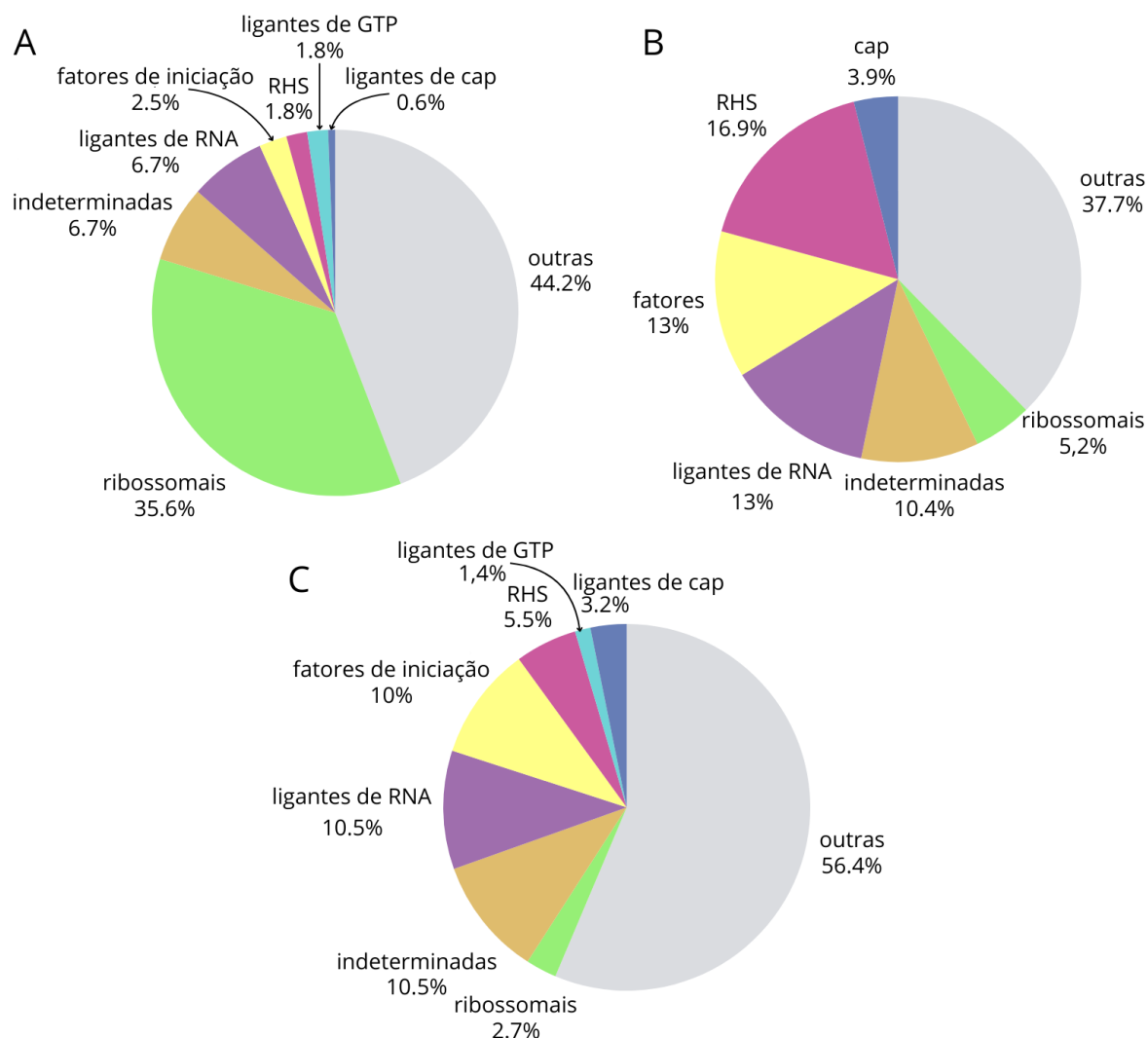


Figura 7. Perfil das proteínas purificadas de acordo com a sua função. Separadas entre significativas para cap-0 (A), presentes igualmente em ambos (B) e significativas para cap-4 (C). “indeterminadas”: proteínas de função ainda não determinada (anotadas como proteínas conservadas hipotéticas); “fatores”: fatores de iniciação da tradução; “RHS”: proteínas codificadas por *retrotransposon hotspot*; “GTP”: proteínas que interagem com GTP; “cap”: proteínas que atuam na síntese do cap ou ligam ao cap no núcleo.

É possível constatar que há uma menor quantidade de fatores de iniciação em associação com o cap-0 do que em associação com cap-4. Este resultado é de certa forma esperado considerando a importância de certos grupos metil do cap-4 de tripanossomatídeos apontada por estudos anteriores.

No caso das proteínas ribossomais, embora sejam encontradas, em teoria, em complexos formados tanto com o cap-0 como com o cap-4, elas estão presentes em maior quantidade na eluição da purificação com cap-0. Isso se deve, provavelmente, à presença de menor concentração de proteínas que se ligam ao cap. Dessa forma, a intensidade das proteínas ribossomais nas amostras da purificação com cap-0 seria maior em comparação com a purificação com cap-4 simplesmente por não serem

ofuscadas por maiores concentrações de proteínas ligantes de cap.

Além disso, foram encontradas algumas proteínas de síntese e clivagem do cap enriquecidas com ambos caps, o que acrescenta mais uma camada de complexidade à análise dos resultados obtidos. As enzimas de *decapping* (XRNA, C4B63_6g572; C4B63_42g93 e ALPH1, C4B63_49g176) podem ter de fato clivado o cap da resina, de forma a possibilitar a interação de certas proteínas com a cadeia curta de ribonucleotídeos que conecta o cap resina, como por exemplo proteínas ligantes de RNA mitocondriais (*mitochondrial RNA binding complex 1 subunit*, C4B63_11g70 e *DEAD-box ATP-dependent RNA helicase, mitochondrial*, C4B63_230g25), proteínas ligantes de RNAs citosólicos que não possuem cap (*rRNA processing protein*, C4B63_75g42 e *aspartyl-tRNA synthetase*, C4B63_42g203) e proteínas ligantes de mRNA não maduro (*Lariat debranching enzyme*, C4B63_25g106 e *Splicing factor TSR1*, C4B63_45g133). Também foram encontradas proteínas que interagem com o GTP (como *Inosine-5-monophosphate dehydrogenase*, C4B63_117g55 e *nucleolar GTP-binding protein 1*, C4B63_2g367), que devem ter interagido com o cap ainda ligado à resina após ter sido demetilado por proteínas de *decapping*. Entretanto, a identificação de proteínas de síntese do cap (*Cap-specific mRNA (nucleoside-2-O)-methyltransferase*, C4B63_28g37; *RNA capping enzyme, Bifunctional Monophosphate RNA Kinase/RNA guanylyltransferase*, C4B63_186g9 e *mRNA (2'-O-methyladenosine-N(6)-)-methyltransferase*, C4B63_14g109) além do eIF4G1-IP1 (C4B63_70g113), que possui função guanina-N(7)-metiltransferase, sugere que, uma vez que o cap tenha sido removido, ele pode ter sido novamente ligado à cadeia de ribonucleotídeos da resina. Assim sendo, é necessário analisar os resultados deste experimento não em um contexto estático de proteínas que se ligam ou não aos caps estudados, mas sim em um contexto dinâmico no qual proteínas constantemente associam-se e desassociam-se ao cap, incluindo proteínas que podem modificar a estrutura do cap. Dessa forma, pode se pensar na lista de proteínas obtidas como uma “foto” de um momento arbitrário desta dinâmica no qual espera-se que as proteínas encontradas em maior intensidade e, portanto, maior quantidade reflitam as proteínas que dentro da célula interagiriam mais fortemente com o cap.

Além destas, foram encontradas outras proteínas que interagem com o mRNA. Uma delas, a helicase DDX60 (C4B63_23g275) foi encontrada em associação com o complexo 43S de *T. cruzi*, interagindo com o N-terminal de eIF3c e eIF5, assim como com o rRNA 18S e diversas proteínas da subunidade 40S, por meio de domínios e

inserções ausentes no homólogo de mamíferos (Bochler et al., 2020). As demais proteínas ligantes de RNA encontradas não foram encontradas em outros estudos como possíveis participantes da iniciação da tradução, porém como muitas delas ainda não foram caracterizadas como integrantes de outros processos, é possível admitir que pelo menos parte delas pode ser componente auxiliar de algum complexo de iniciação, atuando na ancoragem do complexo ao mRNA, ou na linearização de estruturas secundárias do mRNA no caso de helicases. Entretanto, é igualmente possível que pelo menos parte destas proteínas tenha interagido inespecificamente e tenha sido enriquecida desta forma.

Também há uma grande fração composta pelas proteínas codificadas por *retrotransposon hotspot* e as de função ainda indeterminada em ambas as purificações. Como estes dois grupos não possuem uma função estabelecida, é possível que algumas das proteínas encontradas pertencentes a eles façam parte da tradução ou interajam com o RNA em outro contexto, mas não é possível afirmar o motivo da presença destas proteínas.

Entretanto, a maior quantidade de proteínas identificada está associada a funções não relacionadas à tradução, como proteínas de citoesqueleto ou do metabolismo, que provavelmente foram purificadas por estarem em grande concentração nas células e, portanto, formarem muitas interações inespecíficas com proteínas que fazem parte de complexos.

4.2. FATORES DE INICIAÇÃO ENCONTRADOS NO EXPERIMENTO

Todos os eIF4Es encontrados, que classicamente são responsáveis pela interação com o cap, e todos os eIF4Gs à exceção do eIF4G2, foram enriquecidos em maior proporção em associação ao cap-4 (Tabela 1). Entretanto, em contraste com estudos anteriores, não foi encontrado que eIF4E3 e eIF4E4 foram enriquecidos em maior quantidade em relação aos outros eIF4Es, o que seria esperado pelo papel principal na iniciação da tradução sugerido anteriormente (Bezerra et al., 2022; Falk et al., 2022). O eIF4E encontrado com iBAQ maior para o ensaio com cap-4 foi, na realidade, o eIF4E5, que, apesar de um de seus parceiros, o eIF4G2, não ter sido encontrado, seguido de eIF4E6, que foi agrupado por estudos anteriores com o eIF4E5 devido à similaridade entre as suas sequências e à maior diferença que elas apresentam em relação às eIF4Es humanas. Assim, estes resultados apontam que

em *T. cruzi* epimastigota eIF4E5 pode possuir um papel mais significativo na iniciação da tradução do que os demais eIF4Es e que seu complexo eIF4F com eIF4G1 é mais prevalente do que o formado com eIF4G2.

Outro ponto notável na descrição dos complexos eIF4F purificados foi que, ao contrário do que era inicialmente esperado, não foi possível correlacionar as intensidades e, portanto, as concentrações dos parceiros esperados. As eIF4Es de forma geral, à exceção da eIF4E3, demonstraram maior intensidade do que os seus parceiros eIF4Gs. Mesmo ao não se comparar os valores das intensidades diretamente, e sim o ranqueamento das eIF4Es pelas suas intensidades e aquele das eIF4Gs, as posições tomadas não se correlacionam entre os parceiros. Por exemplo, enquanto, como mencionado acima, os eIF4Es de maior intensidade foram eIF4E5 e eIF4E6, os eIF4Gs mais intensos foram eIF4G3 seguido de eIF4G4, cujo par, eIF4E3, foi o eIF4E de menor intensidade. Ao se realizar o agrupamento hierárquico das proteínas em relação ao iBAQ encontrado para as purificações com cap-4 e cap-0, os pares eIF4F assim como as eIF4Es e eIF4Gs não foram encontrados nos mesmos grupos. Dessa forma, fica claro que é impreciso estabelecer proteínas que formam complexo entre si utilizando-se apenas destes experimentos. Entretanto, ainda é possível inferir a possibilidade da instabilidade ou de uma dinâmica maior de complexos que previamente foram assumidos como bem estabelecidos.

Ainda, a subunidade d do eIF3, apontada mais recentemente como uma via alternativa de ligação ao cap e iniciação da tradução em humanos (Lee et al., 2016) e *Leishmania* (Bose et al., 2023), foi encontrada associada em maior proporção ao cap-0 (Tabela 1). Dessa forma, os resultados sugerem que, embora todos os eIF4Es tenham maior afinidade para o cap-4, o cap-0 pode possuir um papel em via alternativa de iniciação da tradução.

Além disso, foram enriquecidas em maior proporção com o cap-0 o fator de terminação da tradução ERF1 e a PABP1. A maior presença de PABP1 em associação ao cap-0 parece contraintuitiva, já que ela forma complexo com o eIF4F formado por eIF4E4 e eIF4G3, ambos fatores mais enriquecidos com cap-4. Entretanto, essa diferença poderia ser justificada caso seja encontrado que PABP1 também participa da via de iniciação da tradução do eIF3D, movendo a tendência de presença da PABP1 para amostras enriquecida com cap-0. Os resultados encontrados para PABP se tornam ainda mais complexos ao se considerar que a PABP2, que deveria interagir com os eIF4Fs eIF4E3/eIF4G4, eIF4E5/eIF4G1 e eIF4E6/eIF4G5, não foi

significativamente eluído em nenhuma amostra, o que indica que a associação destas proteínas ao complexo pode não ser tão forte quanto indicada por estudos de imunoprecipitação.

Também encontrado enriquecido em maior proporção com o cap-0 foi o eIF4G1-IP1, que possui atividade guanina-N(7)-metiltransferase além de formar complexo com o eIF4F formado por eIF4E5 e eIF4G1. As demais proteínas do complexo terem sido enriquecidas em maior proporção com o cap-4 indica que a eIF4G1-IP1 pode cumprir um papel no recrutamento do eIF4F para mRNAs cujos caps tenham sofrido demetilação e que ela pode se desassociar do complexo após restaurar a metilação do cap.

Além dos fatores de tradução já caracterizados, foram encontradas ainda as seguintes proteínas que possuem domínios relacionados com a iniciação da tradução: *Lupus La protein*, *Translation machinery-associated protein 22* (SUI1), *CCR4-NOT transcription complex subunit 1* e *NGG1 interacting factor 3*. Neste caso não é possível inferir a significância da presença destas proteínas em associação com o cap. Entretanto, é interessante apontar a comprovação de que elas podem estar de alguma relacionadas com a tradução, como é indicado pelas suas sequências.

id	nome	Log ₂ (LFQ _i cap-4)	Log ₂ (LFQ _i cap-0)
Mais presentes na coluna de afinidade a cap-0			
C4B63_70g113-t42_1-p1	EIF4G1-IP1, mRNA cap (guanine-N(7))-methyltransferase	18,64360746	23,39999262
C4B63_2g331-t42_1-t42_1-p1	PABP1	20,75023397	23,9497776
C4B63_18g223-t42_1-p1	EIF3D	22,1255455	24,79680634
C4B63_2g558-t42_1-p1	ERF1	21,17790985	23,25791168
Presentes na mesma proporção nas na colunas de afinidade a cap-0 e cap-4			
C4B63_7g223-t42_1-p1	EIF3G	23,53618304	23,85194778
C4B63_39g333-t42_1-p1	EIF3I	24,10429637	24,33895238
C4B63_58g143-t42_1-p1	Lupus La protein	23,92858505	24,10339355
C4B63_4g188-t42_1-p1	Elongation factor Tu, mitochondrial	21,74134191	21,79549281
C4B63_19g113-t42_1-p1	Translation machinery-associated protein 22 (SUI1)	21,2711188	21,3018074
C4B63_6g161-t42_1-p1	EIF4A-3	22,71824773	22,73418872
C4B63_25g237-t42_1-p1	EIF3B	24,6385746	24,39756076
C4B63_2g158-t42_1-p1	EIF4E-1-IP	28,44299507	28,06215096
C4B63_5g417-t42_1-p1	EIF2G	22,93535119	22,53462537
C4B63_28g170-t42_1-p1	EIF1	25,10315005	24,61955579

Mais presentes na coluna de afinidade a <i>cap-4</i>				
C4B63_85g83-t42_1-p1	EIF4A-1	23,05538368	22,49582481	
C4B63_13g145-t42_1-p1	EIF3L	26,06839498	25,26034737	
C4B63_12g6-t42_1-p1	EIF4E-2 <i>binding protein</i>	22,57064565	21,72006226	
C4B63_2g551-t42_1-p1	EIF4E-1	29,28768920	28,40811538	
C4B63_61g149-t42_1-p1	EIF3A	25,83008575	24,91854668	
C4B63_11g83-t42_1-p1	EIF3F	25,56136195	24,55927785	
C4B63_63g7-t42_1-p1	EIF3C	26,10117404	25,07793935	
C4B63_83g34-t42_1-p1	EIF4G-1	25,6698246	24,61502647	
C4B63_513g4-t42_1-p1	EIF4E-2	22,63040924	21,45578003	
C4B63_45g97-t42_1-p1	EIF3H	25,40393511	24,06776174	
C4B63_6g227-t42_1-p1	EIF3E	26,16411591	24,73737526	
C4B63_58g101-t42_1-p1	EEF1-alpha	28,82475408	27,29186376	
C4B63_40g97-t42_1-p1	EIF4G-4	24,94089063	23,26255671	
C4B63_330g12-t42_1-p1	EIF4E-3	25,41816839	23,697656	
C4B63_13g194-t42_1-p1	EIF4E-5	28,52418645	26,4031442	
C4B63_17g131-t42_1-p1	EIF4G5-IP	22,46014849	19,86973381	
C4B63_79g36-t42_1-p1	CCR4-NOT transcription complex subunit 1	23,20959028	20,51209259	
C4B63_55g173-t42_1-p1	EIF4G-3	26,1721789	23,4145546	
BCY84_00845-t36_1	EIF4E-4	28,1884524	25,09578133	
C4B63_21g47-t42_1-p1	EIF4G-5	25,89238739	22,37081019	
C4B63_8g546-t42_1-p1	EIF4E-6	27,69744428	22,33872096	
C4B63_70g67-t42_1-p1	NGG1 interacting factor 3	26,72729556	19,98205694	

Tabela 1. Relação dos códigos e dos nomes dos fatores de iniciação encontrados separados de acordo com o cap com o qual eles estão em maior associação.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados indicam que, conforme esperado, há uma diferença entre os complexos que se ligam ao cap-0 e ao cap-4 e que, provavelmente, as proteínas que interagem diretamente com o cap interagem com afinidades diferentes com os diferentes caps. É possível constatar que os fatores de iniciação da via clássica interagem mais fortemente com o cap-4 do que com o cap-0 e que os eIF4Es que foram enriquecidos em maior quantidade em associação ao cap-4 diferem daqueles sugeridos por parte da literatura como os eIF4Es principais, colocando o eIF4E5 e eIF4E6 em posições de maior destaque.

Ainda é possível que o cap-0 tenha importância para a iniciação da tradução em vias alternativas, em específico a via da eIF3d. Nesse sentido, uma possibilidade a ser estudada é a interação do eIF3d com mRNAs específicos de *T. cruzi* que devem ser traduzidos por essa via.

Apesar de este trabalho ter sido capaz de afirmar a importância do cap-4 para a interação com fatores de iniciação de tripanossomatídeos em favor do cap-0, ainda

há aspectos dos complexos de iniciação que não puderam ser completamente visualizados por este experimento. A falta de agrupamento hierárquico e correlação entre as intensidades e a grande presença de proteínas que não participam da tradução ou de interações com o RNA no geral dificultaram o estabelecimento de complexos de iniciação específicos. Entretanto, foi possível entender o cap como um local de interações dinâmicas que não se restringem apenas à iniciação da tradução, ao menos quando observado *in vitro*.

5.1. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos ainda deixam diversas dúvidas que podem ser respondidas em trabalhos futuros. Por exemplo, o uso da mesma técnica acoplada a cromatografias por troca iônica e exclusão por tamanho anteriormente à análise por espectrometria de massas pode trazer resultados mais específicos em relação às possíveis composições de complexos de iniciação da tradução. Esses estudos poderiam então comprovar a participação de algumas proteínas de potencial papel na iniciação da tradução, como aquelas identificadas como ligantes de RNA ou que possuem domínios característicos de iniciação da tradução. Uma vez que a importância dessas proteínas ainda não caracterizadas tenha sido comprovada, seria interessante estudar o papel funcional que estas proteínas podem cumprir nos complexos.

Além disso, seria interessante realizar os mesmos métodos para outras fases do ciclo do *T. cruzi*, já que se espera que os complexos eIF4F tenham significâncias diferentes a depender da fase. Além disso, purificações sequenciais para a separação de complexos diferentes também poderiam ser realizadas, já que também é possível que a função dos complexos mude devido à mudança em sua composição em estágios do ciclo de vida do parasito.

REFERÊNCIAS

Organização Pan-Americana Da Saúde (OPAS). **Menos de 10% das pessoas com Chagas recebem um diagnóstico.** 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/13-4-2023-menos-10-das-pessoas-com-chagas-recebem-um-diagnostico>. Acesso em: 23 nov. 2024.

Chatelain, E. **Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?** Comput Struct Biotechnol J. 2016 Dec 14;15:98-103. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.002. PMID: 28066534; PMCID: PMC5196238.

Siqueira-Batista, R. **Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica.** Grupo GEN, 2020. E-book. ISBN 9788527736473. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527736473/>. Acesso em: 23 nov. 2024.

Clayton, J. (2010). **Chagas disease: pushing through the pipeline.** Nature, 465(7301), S12–S15. <https://doi.org/10.1038/nature09224>

Bern, C. (2011). **Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease.** The New England journal of medicine, 364(26), 2527–2534. <https://doi.org/10.1056/NEJMct1014204>

Vesteg, M.; Hadariová, L.; Horváth, A.; Estrano, C. E.; Schwartzbach, S. D.; Krajčovič, J. **Comparative molecular cell biology of phototrophic euglenids and parasitic trypanosomatids sheds light on the ancestor of Euglenozoa.** Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2019, 94(5), 1701–1721. <https://doi.org/10.1111/brv.12523>

Maslov, D. A.; Opperdoes, F. R.; Kostygov, A. Y.; Hashimi, H.; Lukeš, J.; Yurchenko, V. **Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution.** Parasitology, 2019, 146(1), 1–27. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000951>

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; J., Jr. Gatto G.; Stryer, I. **Bioquímica**. Grupo GEN, 2021. E-book. ISBN 9788527738224. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527738224/>.

Jackson, R. J., Hellen, C. U., Pestova, T. V. **The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation**. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2010 Feb;11(2):113-27. doi: 10.1038/nrm2838. PMID: 20094052; PMCID: PMC4461372.

Aitken, C. E., Lorsch, J. R. **A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes**. Nature Structural & Molecular Biology. 2012 Jun 5;19(6):568-76. doi: 10.1038/nsmb.2303. PMID: 22664984.

Piserà, A., Campo, A., Campo, S. **Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and its role in cancer development and treatment**. Journal of Genetics and Genomics. 2018 Jan 20;45(1):13-24. doi: 10.1016/j.jgg.2018.01.003. PMID: 29396141.

Ramanathan A., Robb G. B., Chan S. H. **mRNA capping: biological functions and applications**. Nucleic Acids Res. 2016 Sep 19;44(16):7511-26. doi: 10.1093/nar/gkw551. PMID: 27317694; PMCID: PMC5027499.

Querido, J. B., Díaz-López, I., Ramakrishnan, V. **The molecular basis of translation initiation and its regulation in eukaryotes**. Nat Rev Mol Cell Biol. 2024 Mar;25(3):168-186. doi: 10.1038/s41580-023-00624-9. Epub 2023 Dec 5. PMID: 38052923.

Hernández, G., Proud, C. G., Preiss, T., Parsyan, A. 2012. **On the Diversification of the Translation Apparatus across Eukaryotes**. Comparative and functional genomics, 2012, 256848. <https://doi.org/10.1155/2012/256848>

Clayton, C. **Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription**. Open Biol. 2019 Jun 28;9(6):190072. doi: 10.1098/rsob.190072. PMID: 31164043; PMCID: PMC6597758.

De Gaudenzi, J. G., Noé, G., Campo, V. A., Frasch, A. C., Cassola, A. **Gene expression regulation in trypanosomatids**. Essays Biochemistry. 2011; 51:31-46. doi: 10.1042/bse0510031. PMID: 22023440.

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

Freire E. R., Sturm N. R., Campbell D. A., Neto O. P de M. **The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids**. Pathogens. 2017 Oct 27; 6(4):55. doi: 10.3390/pathogens6040055. PMID: 29077018; PMCID: PMC5750579.

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 Dec;26(12):1367-72. doi: 10.1038/nbt.1511. Epub 2008 Nov 30. PMID: 19029910.

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):1794-1805. doi:10.1021/pr101065j

Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. **Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ**. Mol Cell Proteomics. 2014;13(9):2513-2526. doi:10.1074/mcp.M113.031591

Tyanova, S., Temu, T., Cox, J. **The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics**. Nature Protocols, 2016 Dec; 11(12):2301-2319. doi: 10.1038/nprot.2016.136. PMID: 27809316.

RUBIN, Donald B. Inference and missing data. Biometrika, Volume 63, Issue 3, December 1976, Pages 581–592, <https://doi.org/10.1093/biomet/63.3.581>

ENDERS, Craig K. **Applied Missing Data Analysis**. New York: Guilford Press, 2010. E-book. ISBN: 9781606236390. Disponível em: <https://eric.ed.gov/?id=ED565768>.

Henry ER, Hofrichter J. **Singular value decomposition: Application to analysis of experimental data**. Methods in Enzymology, Academic Press, Volume 210, 1992, Pages 129-192. ISBN: 9780121821111. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(92\)10010-B](https://doi.org/10.1016/0076-6879(92)10010-B).

Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., Depledge, D. P., Fischer, S., Gajria, B., Gao, X., Gardner, M. J., Gingle A., Grant, G., Harb, O. S., Heiges, M., Hertz-Fowler, C., Houston, R., Innamorato, F., Iodice, J., Kissinger, J. C., Kraemer, E., Li, W., Logan, F. J., Miller, J. A., Mitra, S., Myler, P. J., Nayak, V., Pennington, C., Phan, I., Pinney, D. F., Ramasamy G., Rogers M. B., Roos, D. S., Ross, C., Sivam, D., Smith, D. F., Srinivasamoorthy, G., Stoeckert, C. J. Jr, Subramanian, S., Thibodeau, R., Tivey, A., Treatman, C., Velarde, G., Wang, H. **TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae**. Nucleic Acids Res. 2010 Jan;38(Database issue):D457-62. doi: 10.1093/nar/gkp851. Epub 2009 Oct 20. PMID: 19843604; PMCID: PMC2808979.

Reolon L. W., Vichier-Guerre S., de Matos B. M., Dugué L., Assunção T. R. D. S., Zanchin N. I. T., Pochet S., Guimarães B. G. **Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* EIF4E5 translation factor homologue in complex with mRNA cap-4**. Nucleic Acids Research. 2019 Jun 20;47(11):5973-5987. doi: 10.1093/nar/gkz339. PMID: 31066441; PMCID: PMC6582342.

Bezerra M. J. R., Moura D. M. N., Freire E. R., Holetz F. B., Reis C. R. S., Monteiro T. T. S., Pinto A. R. S., Zhang N., Rezende A. M., Pereira-Neves A., Figueiredo R. C. B. Q., Clayton C., Field M. C., Carrington M., de Melo Neto O. P. **Distinct mRNA and protein interactomes highlight functional differentiation of major eIF4F-like complexes from *Trypanosoma brucei***. Front. Mol. Biosci. 2022. 9:971811. doi: 10.3389/fmolb.2022.971811

Freire E. R., Dhalia R., Moura D. M., Lima T. D. da C., Lima R. P., Reis C. R., Hughes

K., Figueiredo R. C., Standart N., Carrington M., Neto, O. P de M. **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. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.011>

Falk F., Kamanyi Marucha K., Clayton C. **The EIF4E1-4EIP cap-binding complex of *Trypanosoma brucei* interacts with the terminal uridylyl transferase TUT3.** PLoS One, 2021. 16(11):e0258903. doi:10.1371/journal.pone.0258903

Freire E. R., Moura D. M. N., Bezerra M. J. R., Xavier C. C., Morais-Sobral M. C., Vashisht A. A., Rezende A. M., Wohlschlegel J. A., Sturm N. R., Neto O. P. de M., Campbell, D. A. ***Trypanosoma brucei* EIF4E2 cap-binding protein binds a homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein.** Current genetics, 2018. 64(4), 821–839. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0795-3>

Dejung M., Subota I., Bucerius F., Dindar G., Freiwald A., Engstler M., Boshart M., Butter F., Janzen C. J. **Quantitative Proteomics Uncovers Novel Factors Involved in Developmental Differentiation of *Trypanosoma brucei*.** PLoS pathogens, 12(2), 2016. e1005439. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005439>

Do Nascimento L. M., Terrao M., Marucha K. K., Liu B., Egler F., Clayton, C. **The RNA-associated proteins MKT1 and MKT1L form alternative PBP1-containing complexes in *Trypanosoma brucei*.** The Journal of biological chemistry, 2020. 295(32), 10940–10955. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013306>

Shrivastava R.; Tupperwar N.; Schwartz B.; Baron N.; Shapira M. **LeishIF4E-5 Is a Promastigote-Specific Cap-Binding Protein in *Leishmania*.** Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 3979. <https://doi.org/10.3390/ijms22083979>

Falk F., Palhares R. M., Waithaka A., Clayton C. **Roles and interactions of the specialized initiation factors EIF4E2, EIF4E5, and EIF4E6 in *Trypanosoma brucei*: EIF4E2 maintains the abundances of S-phase mRNAs.** Mol Microbiol. 2022;118(4):457-476. doi:10.1111/mmi.14978

Neto O. P. de M., Lima T. D. C. da C., Merlo K. C., Romão T. P., Rocha P. O., Assis L. A., Nascimento L. M., C. Xavier C. C., Rezende M. A., Reis c. R. S., Papadopoulou B. **Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation**, RNA Biology, 2018. DOI: 10.1080/15476286.2018.1445958

Bochler A, Querido JB, Prilepskaja T, Soufari H, Simonetti A, Del Cistia ML, Kuhn L, Ribeiro AR, Valášek LS, Hashem Y. **Structural Differences in Translation Initiation between Pathogenic Trypanosomatids and Their Mammalian Hosts**. Cell Rep. 2020 Dec 22;33(12):108534. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108534. PMID: 33357443; PMCID: PMC7773551.

Lee AS, Kranzusch PJ, Doudna JA, Cate JH. **eIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation**. Nature. 2016 Aug 4;536(7614):96-9. doi: 10.1038/nature18954. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27462815; PMCID: PMC5003174.

Bose P, Baron N, Pullaiahgari D, Ben-Zvi A, Shapira M. **LeishIF3d is a non-canonical cap-binding protein in *Leishmania***. Front Mol Biosci. 2023 May 30;10:1191934. doi: 10.3389/fmolb.2023.1191934. PMID: 37325473; PMCID: PMC10266417.