

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas

**PODERIAM OS PIROFOSFATOS DE INOSITOL TEREM
INFLUENCIADO O DESENVOLVIMENTO DO PARASITISMO
DENTRO DOS CINETOPLASTÍDEOS?**

Arthur de Oliveira Passos

Botucatu – SP
Março, 2023

Arthur de Oliveira Passos

**PODERIAM OS PIROFOSFATOS DE INOSITOL TEREM
INFLUENCIADO O DESENVOLVIMENTO DO PARASITISMO
DENTRO DOS CINETOPLASTÍDEOS?**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Genética do Instituto de Biociências, UNESP, câmpus de Botucatu, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas – Genética.

Orientador: Dr. Marcelo Santos da Silva
Coorientador: Dr. Antônio Mauro Rezende

Botucatu – SP
Março, 2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Passos, Arthur de Oliveira.

Poderiam os pirofosfatos de inositol terem influenciado o desenvolvimento do parasitismo dentro dos cinetoplastídeos? / Arthur de Oliveira Passos. - Botucatu, 2023

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcelo Santos da Silva

Coorientador: Antônio Mauro Rezende

Capes: 20202008

1. Parasitismo. 2. Fosfatos de inositol. 3. Leishmania. 4. Tripanosomatídeos. 5. Proteínas quinases.

Palavras-chave: Inositol pirofosfatos; Leishmania; Parasitismo; Quinases; Tripanosomatídeos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o financiado deste trabalho pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – números de processo 2019/10753-2, 2020/10277-3 e 2021/05861-0. O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço ainda aos colaboradores que nos ajudaram na realização de diversos ensaios presentes nesta dissertação, como os estudantes Bryan E. Abuchery (UNESP, Botucatu), Vitor L. da Silva (UNESP, Botucatu), Yete Gambarini Ferri (UNESP, Botucatu), Aleff F. Francisco (UNESP, Botucatu), e os docentes Dr. Antônio Mauro Rezende (Fiocruz-IAM), Simone G. Calderano (Instituto Butantan), profa. Dra. Maria Isabel Cano (UNESP, Botucatu), e prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (UNESP, Botucatu).

Agradeço também meus amigos que me ajudaram neste processo, ajudando a enfrentar as adversidades encontradas no caminho.

Por fim agradeço minha namorada, Anielly, por todo apoio profissional e pessoal que me permitiu chegar onde estou hoje, podendo alcançar cada vez mais em minha trajetória.

Dedico este trabalho a minha mãe, Neusa, que desde cedo me ensinou o valor do conhecimento para se entender o mundo e que me mostrou, pelo seu exemplo, que não há limites para a busca de um sonho.

RESUMO

Em eucariotos modelo, pirofosfatos de inositol (PP-IPs) – principalmente os chamados IP₇ e IP₈ – estão envolvidos em uma ampla gama de processos celulares, como regulação do comprimento dos telômeros, morte celular programada, recombinação homóloga (HR), entre outros. No entanto, o mecanismo de ação e o envolvimento destes metabólitos em outras vias espécie-específicas ainda são questões abertas. IP₇ e IP₈ são sintetizados através de vias complementares que envolvem a participação das quinases IP6K e PP-IP5K. Tripanosomatídeos parasitas (e.g., *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.) possuem um gene ortólogo para IP6K, mas aparentemente não possuem ortólogos para PP-IP5K, i.e., não sintetizam IP₈, o que os torna excelentes modelos para o estudo de IP₇. Além disso, estudos preliminares apontam que IP₈ está presente em organismos de vida livre da classe Kinetoplastea. Assim, esta dissertação consistiu inicialmente em investigar se a presença de IP₈ é mutuamente exclusiva em relação ao parasitismo dentro dos cinetoplastídeos. Para isso, realizamos análises evolutivas para confirmar a suposta perda da PP-IP5K em tripanosomatídeos. Reconstruímos árvores filogenéticas e obtivemos evidências robustas que confirmam a ausência de PP-IP5K em todos os tripanosomatídeos, exceto *Paratrypanosoma confusum*. As previsões das estruturas terciárias apontam que o domínio catalítico da PP-IP5K de *P. confusum* é naturalmente desestruturado, o que coloca em xeque sua função. Além disso, realizamos ensaios de dinâmica molecular com a PP-IP5K de *Bodo saltans* (BsPP-IP5K) e IP₇, que é utilizado como substrato (junto com cofator ATP) para síntese de IP₈. Nossas simulações sugerem que o BsPP-IP5K é totalmente capaz de sintetizar IP₈. Dessa forma, amplificamos o gene BsPP-IP5K e adicionamos a ele as regiões 3' e 5' UTR da Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase (GAPDH). Posteriormente, clonamos essa construção no vetor pSP72- α HYG α (Marc Ouellette lab), gerando um plasmídeo que fornece expressão constitutiva episomal de BsPP-IP5K em *Leishmania* spp. (episomal *knock-in*). Paralelamente, realizamos mutagênese sítio-dirigida para confirmar os resíduos de aminoácidos essenciais de BsPP-IP5K. A construção contendo a BsPP-IP5K mutada foi usada como controle nos ensaios *knock-in*. Com a inserção das construções em *Leishmania braziliensis*, realizamos a caracterização fenotípica das linhagens geradas, no qual, aparentemente, a presença da BsPP-IP5K não altera a proliferação e o ciclo celular. Futuramente, essas linhagens *knock-in* para PP-IP5-K serão utilizadas em ensaios de infecção para verificação da virulência e patogenicidade. Nossos achados até o momento sugerem que a transição de um estilo de vida livre para um estilo de vida parasitário resultou na perda de PP-IP5K. Os resultados deste trabalho poderão contribuir para a elucidação de novas rotas para o desenvolvimento de terapias antiparasitárias.

Palavras-chave: Parasitismo, tripanosomatídeos, inositol pirofosfatos, quinases, *Leishmania*

ABSTRACT

In model eukaryotes, inositol pyrophosphates (PP-IPs) – mainly IP₇ and IP₈ – are involved in a wide range of cellular processes, such as telomere length regulation, programmed cell death, homologous recombination (HR), among others. However, the mechanism of action and the involvement of these metabolites in other species-specific pathways are still open questions. IP₇ and IP₈ are synthesized through complementary pathways that involve the participation of IP6K and PP-IP5K kinases, respectively. Parasitic trypanosomatids (e.g., *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp.) have an ortholog gene for IP6K, but apparently lack orthologs for PP-IP5K, i.e., they do not synthesize IP₈, which makes them excellent models for the study of IP₇. Also, preliminary studies indicate that IP₈ is present in free-living organisms of the Kinetoplastea class. Thus, this project consists of investigating whether the presence of IP₈ is mutually exclusive in relation to parasitism within kinetoplastids. For this, we performed evolutionary analyzes to confirm the supposed loss of PP-IP5K in trypanosomatids. We reconstructed phylogenetic trees and obtained robust evidence confirming the absence of PP-IP5K in all trypanosomatids but *Paratrypanosoma confusum*. The predictions of tertiary structures indicate that the catalytic domain of *P. confusum* PP-IP5K is naturally unstructured, which calls into question its function. Also, we performed molecular dynamics assays with *B. saltans* PP-IP5K (BsPP-IP5K) and IP₇, which was used as a substrate (along with ATP) to synthesize IP₈. Our simulations suggested that the BsPP-IP5K is fully capable of synthesizing IP₈. Thus, we amplified the BsPP-IP5K gene and added to it the 3' and 5' UTR regions of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH). Subsequently, we cloned this construct into the pSP72- α HYG α vector (Marc Ouellette lab), generating a plasmid that provides episomal constitutive expression of BsPP-IP5K in *Leishmania* spp. (*knock-in* episomal). In parallel, we performed site-directed mutagenesis to confirm the essential amino acid residues of BsPP-IP5K. The construct containing the BsPP-IP5K was used as a control in the knock-in assays. With the insertion of constructs in *Leishmania braziliensis*, we performed the phenotypic characterization of the generated lineages, in which, apparently, the presence of BsPP-IP5K does not alter proliferation and cell cycle. In the future, these knock-in strains for PP-IP5-K will be used in infection assays to verify virulence and pathogenicity. To date, our findings suggest that the transition from a free to a parasitic lifestyle resulted in the loss of PP-IP5K. The results of this work may contribute to the elucidation of new routes for the development of antiparasitic therapies.

Keywords: Parasitism, trypanosomatids, inositol pyrophosphates, kinases, *Leishmania*

ABREVIACOES

ATP – Adenosina Trifosfato

ADP - Adenosina Difosfato

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – base pairs (pares de bases)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reao em Cadeia da Polimerase)

GAPDH – Gliceraldedo 3-Fosfato Desidrogenase

HA – Hemaglutinina

IP₆ - Inositol hexakisfosfato

IP₆K – Inositol polyphosphate kinase

IP₇ – Inositol heptakisphosphate

IP₈ – Inositol octakisphosphate

KI – Knock-in

KO – Knockout

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NPT – Normal Pressure and Temperature

NVT – Normal Volume and Temperature

PP-IP₅K - Diphosphoinositol pentakisphosphate kinases

PP-IPs – Inositol Pyrophosphates

R_g – Radius of gyration

RMSD – Root-Mean-Square Deviation

RMSF – Root-Mean-Square Fluctuation

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PDB – Protein Data Bank

TEV protease – Tobacco Etch Virus protease

UTR – Untranslated region

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. Possível via para a síntese de PP-IPs mostrando os principais genes ortólogos correspondentes em <i>T. cruzi</i> (verde) e <i>L. braziliensis</i> (laranja).....	2
Figura 2. Ciclo de vida dos tripanosomatídeos <i>Leishmania</i> spp (A) e <i>T. cruzi</i> (B).....	4
Figura 3. Linha do tempo evolutiva dos eucariotos.....	5
Figura 4. Resultado da varredura de homólogos da PP-IP5K humana em tripanossomatídeos utilizando o pacote de software HMMer.....	17
Figura 5. Análise do domínio catalítico da PP-IP5K de diferentes organismos.....	18
Figura 6. Árvore filogenética para PP-IP5K utilizando abordagem de máxima verossimilhança ...	19
Figura 7. Modelo estrutural teórico gerado para BsPP-IP5K.....	20
Figura 8. Sobreposição do modelo teórico estrutural da BsPP-IP5K (salmão) com o molde cristalográfico da PP-IP5K humana (azul claro).....	21
Figura 9. Simulações em triplicata de 300 ns do complexo BsPP-IP5K + IP7 + ATP a 20 °C	22
Figura 10. Simulações em triplicata de 300 ns do complexo BsPP-IP5K + IP7 + ATP a 26 °C	22
Figura 11. Simulações usando BsPP-IP5K, IP7 e ATP apontam os resíduos de aminoácidos essenciais durante a catálise de IP ₈	23
Figura 12. Comparação do domínio catalítico entre BsPP-IP5K (cima) e HsPP-IP5K (baixo).....	24
Figura 13. Western blotting utilizando extrato proteico total de <i>T. cruzi</i> pTEX_Ø e pTEX+BsPP-IP5K.....	25
Figura 14. Esquema ilustrando a abordagem mutagênese sítio-dirigida.	26
Figura 15. Estratégia utilizada para realização de knock-in episomal em <i>L. braziliensis</i>	27
Figura 16. Confirmação de BsPP-IP5K em <i>L. braziliensis</i> transfectadas.....	28
Figura 17. Curva de crescimento de clones WT, pSP72αHYGα, BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G).....	28
Figura 18. Perfil do conteúdo de DNA das linhagens WT, pSP72αHYGα, BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G) na fase exponencial de crescimento.....	29
Figura 19. Construções realizadas visando a subclonagem de BsPP-IP5K em vetor de expressão pET28a+.....	30
Figura 20. Teste de expressão BsPP-IP5K em BL21 DE3 RP codon plus.....	31
Figura 21. Teste de expressão BsPP-IP5K em BL21 DE3 PLysS.....	32
Figura 22. Ensaio Western blot não detectou a expressão de BsPP-IP5K.....	32

LEGENDAS DAS TABELAS

Tabela 1. Iniciadores (<i>primers</i>) utilizando durante o desenvolvimento do projeto.....	11
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
Pirofosfatos de Inositol	1
Cinetoplastídeos	2
Tripanosomatídeos e PP-IPs	6
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
Análises <i>in silico</i> e construção das árvores filogenéticas.....	7
Modelagem molecular e preparação dos complexos.....	9
Dinâmica Molecular	9
Síntese de BsPP-IP5K	10
Mutagênese sítio-dirigida na BsPP-IP5K.....	10
Cultivo de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e formas promastigotas procíclicas de <i>L. braziliensis</i>	11
Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pTEX e transfecção em <i>T. cruzi</i> (knock-in episomal).....	12
Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pSP72 α HYG α e transfecção em <i>L. brazilliensis</i> (<i>knock-in</i> episomal).....	12
Preparação de bactérias competentes	13
Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pET28a+ e tentativas de expressão	13
Extração de proteínas totais de <i>L. braziliensis</i>	14
Western Blot.....	14
RT-PCR e qPCR para verificar e quantificar a expressão de BsPP-IP5K em parasitos selvagens transfectados.....	15
Curva de crescimento	15
Citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular	16
5. RESULTADOS	16
PP-IP5K está presente nos genomas do tripanossomatídeo <i>Paratrypanosoma confusum</i> e do Bodonídeo <i>Bodo saltans</i>	16
PP-IP5K está presente em diversos grupos taxonômicos.....	18
BsPP-IP5K apresenta um domínio catalítico funcional	19
<i>Knock-in</i> episomal em <i>T. cruzi</i>	24
Mutagênese sítio-dirigida de BsPP-IP5K.....	25
<i>Knock-in</i> episomal em <i>L. braziliensis</i>	26
Crescimento e ciclo celular não apresentam alterações na presença de BsPP-IP5K.....	28
Expressão da BsPP-IP5K em sistema bacteriano.....	30
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	35
8. PLANO DE GERENCIAMENTO DE DADOS	36
9. REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

Pirofosfatos de Inositol (PP-IPs)

Os pirofosfatos de inositol (PP-IPs) são um grupo especializado de metabólitos solúveis que possuem moléculas de difosfato ligadas ao seu anel de inositol (Saiardi et al., 2004; Jadav et al., 2013; Cordeiro et al., 2017). Nos eucariotos modelo, os PP-IPs melhores caracterizados são IP₇ (5-diphosphoinositol pentakisphosphate) e IP₈ (bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate) (Saiardi et al., 2004; Jadav et al., 2013), que estão envolvidos em uma ampla gama de processos celulares, como apoptose, osmorregulação, morte celular programada, recombinação homóloga (HR) e regulação do comprimento dos telômeros (Morrison et al., 2001; Saiardi et al., 2004; Nagata et al., 2005; Choi et al., 2007; Jadav et al., 2013; Rao et al., 2014). Frequentemente, novas vias moleculares são associadas à participação dos PP-IPs, o que torna a função e importância destes metabólitos uma questão totalmente em aberto. Além disso, o mecanismo de ação dos PP-IPs na maior parte destas vias não é totalmente compreendido. Em mamíferos, IP₇ e IP₈ são sintetizados a partir de IP₆ (inositol hexakisphosphate) através de duas vias complementares que envolvem a participação das quinases IP6K e PP-IP5K, respectivamente (Saiardi et al., 2000; Pesesse et al., 2004) (Figura 1).

Os PP-IPs e IPs (fosfatos e inositol) são importantes atores na sinalização intracelular devido principalmente à sua alta força eletrostática direcionada pela presença de múltiplos grupamentos fosfatos ligados ao anel de inositol, apresentando de 9 a 10 cargas negativas em pH fisiológico (Chatree et al., 2020; Nguyen Trung et al., 2022). Esta carga elétrica naturalmente negativa permite e facilita a interação com a superfície de proteínas eletricamente positivas. Deste modo, os PP-IPs e IPs participam como cofatores em diversas vias metabólicas, agindo como uma espécie de “cola” molecular. Outro mecanismo bastante interessante utilizado na sinalização e regulação da atividade de uma proteína é a ação de pirofosforalização não-enzimática, cujo um grupo β -fosfato é transferido para um resíduo de aminoácido (serina/treonina) previamente fosforilado (Azevedo et al., 2009). Por fim, os PP-IPs e IPs também possuem um papel na homeostase de fosfatos, como já evidenciado em células tumorais HCT116. Após a depleção das duas isoformas de IP6K, os pesquisadores observaram um aumento da quantidade de ATP e fosfatos livres na célula, além de uma inabilidade na captação de grupos fosfatos (Wilson et al., 2019).

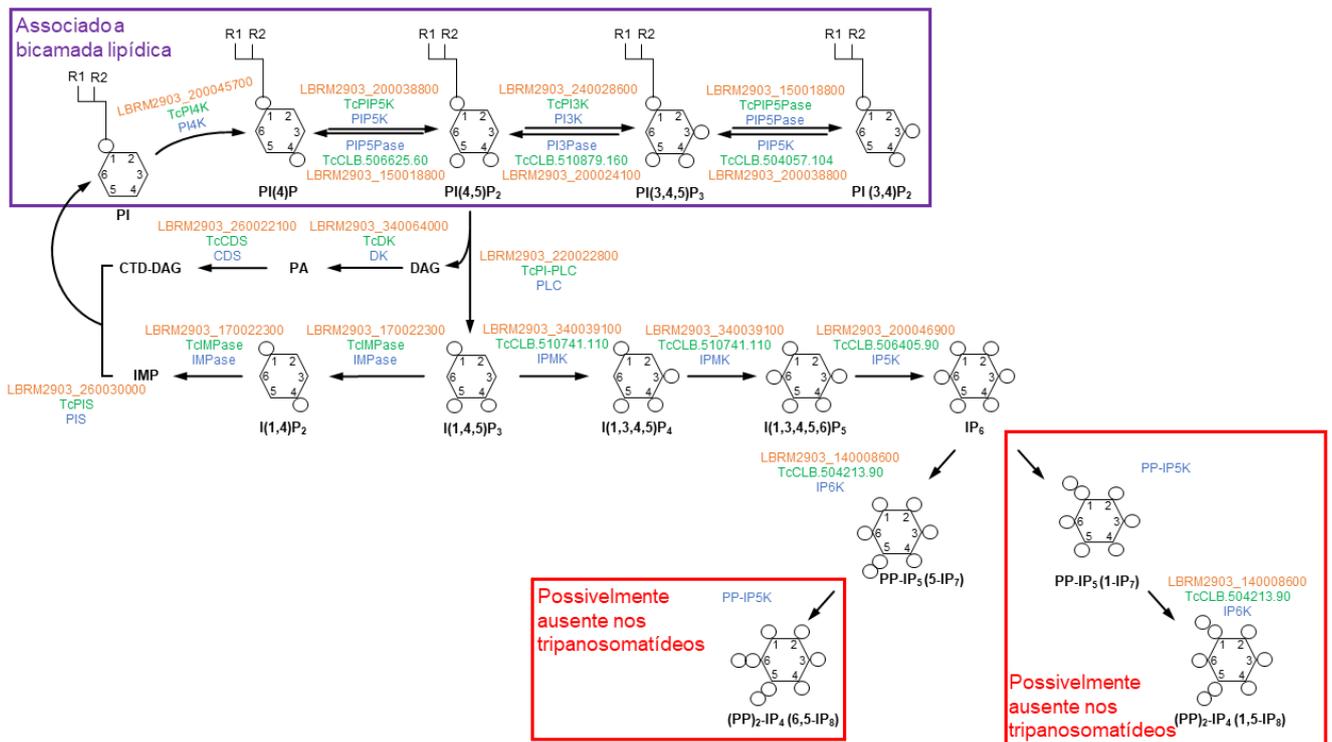


Figura 1. Possível via para a síntese de PP-IPs mostrando os principais genes ortólogos correspondentes em *T. cruzi* (verde) e *L. braziliensis* (laranja). Resumidamente, PLC (TcPI-PLC / LBRM2903_220022800) hidrolisa PI(4,5)P₂ gerando I(1,4,5)P₃. O I(1,4,5)P₃ é fosforilado por IPMK (TcCLB.510741.110 / LBRM2903_340039100) para gerar I(3,4,5)P₄ e I(3,4,5,6)P₅. I(3,4,5,6)P₅ é fosforilado por IP5K (TcCLB.506405.90 / LBRM2903_200046900) para gerar IP₆. I(3,4,5,6)P₅ e IP₆ podem ser ainda fosforilados por IP6K (TcCLB.504213.90 / LBRM2903_140008600) para gerar PP-IP₅ (IP₇). Os tripanossomatídeos (aparentemente) não possuem ortólogos para PP-IP5K. PI = Fosfatidilinositol, DAG = diacilglicerol, PA = ácido fosfático, CTD-DAG = domínio citoplasmático de DAG, IMP = inosina monofosfato, R1 = ácido palmico, R2 = ácido oleico.

Cinetoplastídeos

Os cinetoplastídeos (ordem Kinetoplastida, Honigberg, 1963) são um grupo de protozoários flagelados que englobam diversas famílias com características distintas, sendo bastante conhecidos pela sua relevância médica, uma vez que englobam a família de parasitas tripanossomatídeos. Curiosamente a maior parte das famílias dentro da ordem Kinetoplastida não são parasitos/simbiontes, e sim vida-livre e são encontradas predominantemente colonizando em diferentes ambientes aquáticos ou terrestres (Kostygov et al., 2021). Os cinetoplastídeos estão contidos no filo Euglenozoa, supergrupo Excavata (Adl et al., 2012), e são caracterizados pela presença do cinetoplasto (*kinetoplast*), um grânulo em forma de bastão que contém DNA (kDNA). Essa estrutura está localizada em uma região específica de uma grande mitocôndria (única nesse grupo de organismos) e está associada com a base dos flagelos (da Silva and Cano, 2017).

Os cinetoplastídeos de vida-livre correspondem cerca de 5-20% da biomassa de heterótrofos flagelados, estando presente tanto em águas marinhas quanto em águas continentais com diferentes salinidades. Gêneros como *Bodo*, *Neobodo*, *Rhynchomonas* e *Dimastigella* têm um importante papel ecológico nos ambientes aquáticos bentônicos pois são bacterívoros (Boenigk & Arndt, 2002;

Kostygov et al., 2021). Outros ambientes que cinetoplastídeos podem ser encontrados são solos e diferentes substratos orgânicos como fezes. A maioria dos cinetoplastídeos de vida-livre se alimentam de bactérias, mas há gêneros como *Rhynchobodo* que são predadores de outros flagelados (Patterson & Larsen, 1991; Kostygov et al., 2021). Para os representantes parasitas do grupo, o nicho pode ser bastante diverso quanto ao tipo de hospedeiro, com espécies colonizando vertebrados no geral, como por exemplo do gênero *Ichthyobodo* que pode ser encontrado parasitando diversas espécies de peixes, ou os mais conhecidos *Trypanosoma* e *Leishmania* que possuem hospedeiros mamíferos, répteis, além de invertebrados como insetos, aracnídeos e ascídias (Kostygov et al., 2021).

Os tripanosomatídeos (família Trypanosomatidae, Doflein, 1901) compõem uma família de protozoários parasitos/simbiontes dentro da ordem Kinetoplastida e englobam patógenos humanos de grande relevância médica, como *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da doença de Chagas), *Trypanosoma brucei* (agente etiológico da doença do sono) e *Leishmania spp.* (agente etiológico de distintas formas de leishmaniose). Ao todo, esses parasitas infectam cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo (com mais de dois milhões de novos casos por ano), levando a aproximadamente 50.000 de mortes anualmente (Field et al., 2017; da Silva and Cano, 2017; WHO, 2021). Estes organismos apresentam um ciclo de vida heteroxênico (ou seja, possuem mais de um hospedeiro), alternando entre formas replicativas (geralmente não infecciosas) e não-replicativas (infecciosas) (Figura 2). No Brasil, *T. cruzi* é o patógeno do gênero *Trypanosoma* de maior incidência, justamente pela presença bem estabelecida dos reservatórios e vetores em território brasileiro (Barros et al., 2021; Faria et al., 2021; Jansen et al., 2018). Para o gênero *Leishmania*, a espécie *Leishmania braziliensis* é o principal agente etiológico das leishmanioses no Brasil, causando a forma conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (da Silva-Viera et al., 2019).

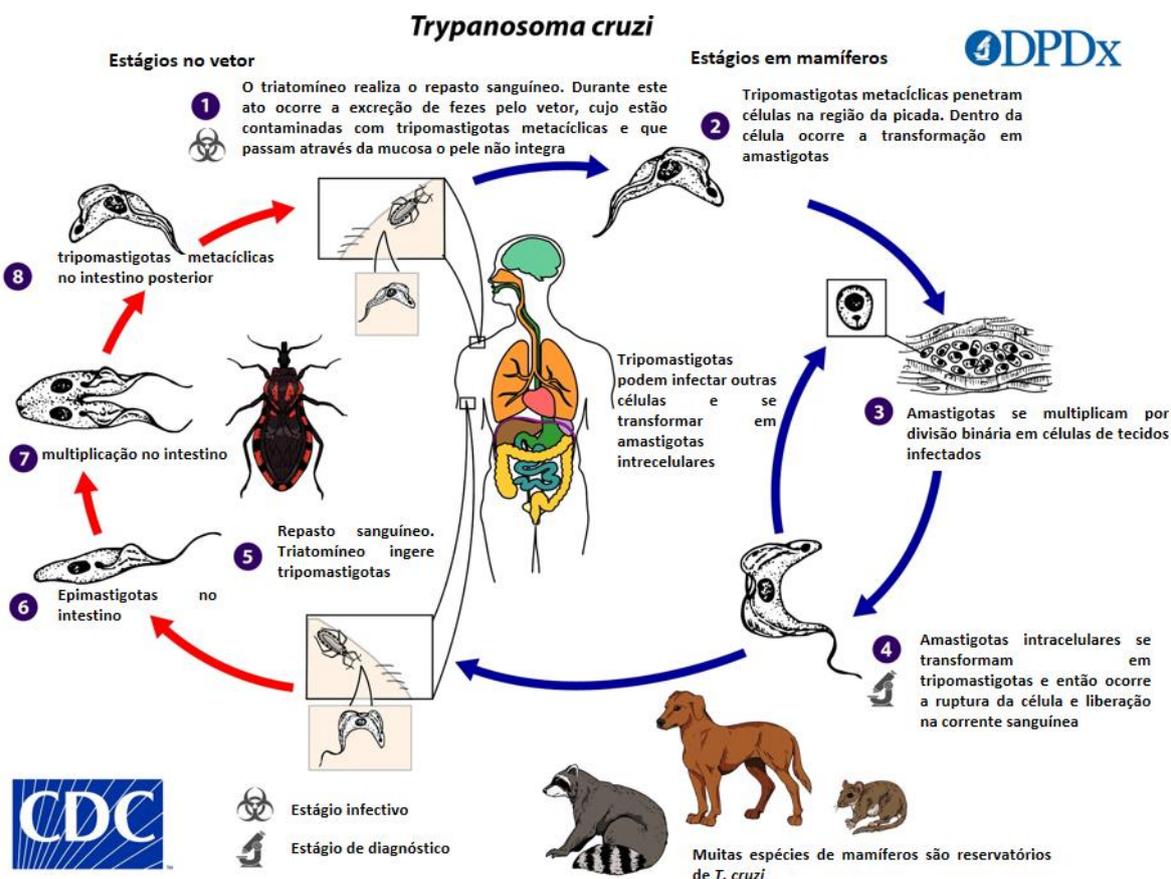
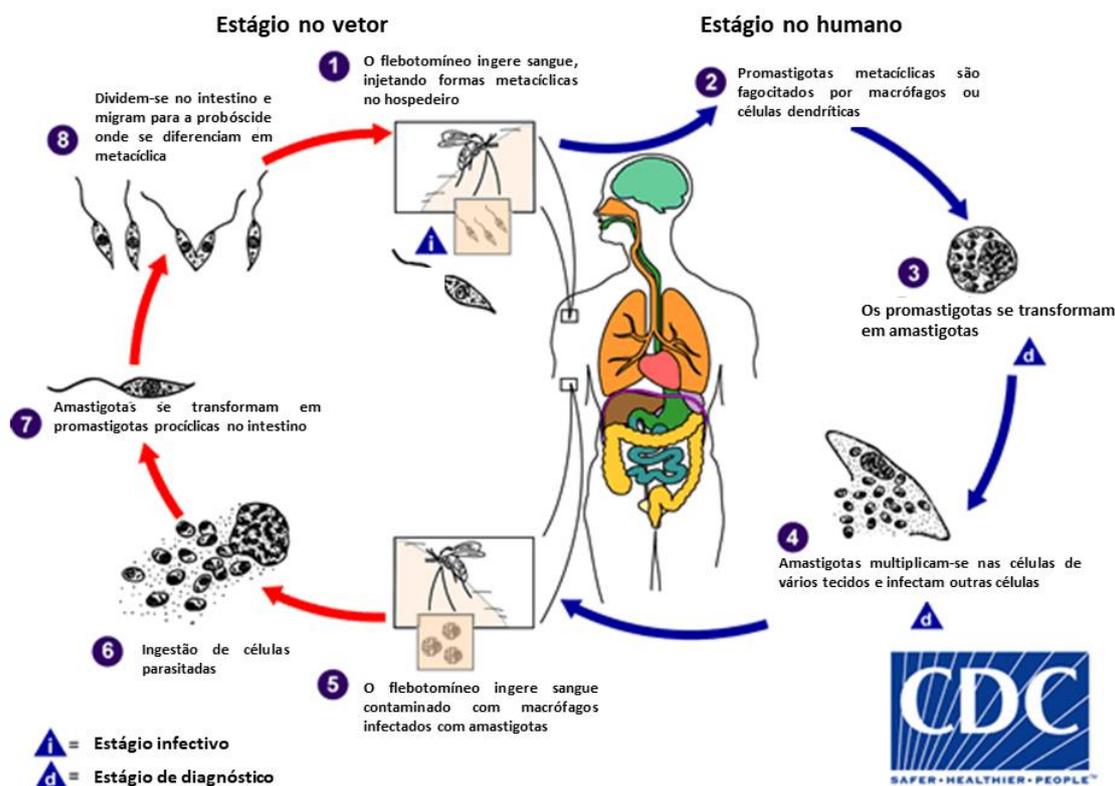


Figura 2. Ciclo de vida dos tripanosomatídeos *Leishmania* spp (cima) e *T. cruzi* (baixo). O ciclo de vida destes parasitas é denominado heteroxênico, possuindo assim um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/>

Tripanosomatídeos divergiram de outros eucariotos por volta de 200–500 milhões de anos atrás (da Silva et al., 2017b), que compreende o período entre o surgimento de artrópodes e mamíferos (Figura 3). Este fato sugere que os tripanosomatídeos divergiram como resultado de novos nichos fornecidos pelo surgimento dos metazoários, o que provavelmente levou a processos de co-evolução parasitárias e simbióticas (SIMPSON et al., 2004; Simpson et al., 2006; Flegontov et al., 2013).

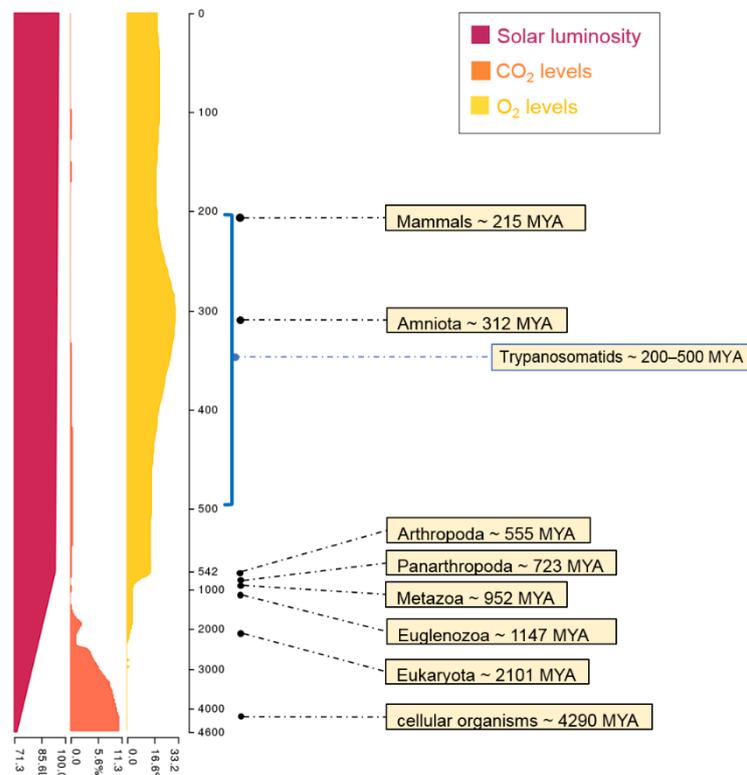


Figura 3. Linha do tempo evolutiva dos eucariotos. Os tripanosomatídeos divergiram há cerca de 200–500 milhões de anos atrás (MYA), concomitante a provável ocupação de novos nichos propiciados pelo surgimento dos metazoários, permitindo uma co-evolução entre estes organismos e seus hospedeiros artrópodes e/ou vertebrados. Extraído de da Silva et al., 2017b.

Tripanosomatídeos apresentam algumas características únicas entre os eucariotos, incluindo a ausência praticamente absoluta de íntrons (da Silva and Cano, 2017), o uso quase universal da transcrição de longos clusters policistrônicos pela RNA polimerase II (Oppendoes et al., 2016; da Silva et al., 2017b), a ausência da via de reparo de DNA quebrado na forma de dupla fita chamada cNHEJ (classical non-homologous end joining) (Burton et al., 2007; Passos-Silva et al., 2010; Nenarokova et al., 2019) e relativa plasticidade genômica frente a agentes genotóxicos (Laffitte et al., 2016; Bussotti et al., 2018; da Silva 2021; Black et al., 2023). Essas características peculiares podem ser explicadas pelo fato destes organismos pertencerem ao filo Euglenozoa, o que possibilitaria a retenção de algumas características 'primitivas' desse grupo ou pelo processo chamado *genome streamlining*, uma vez que aparentemente a transição de um estilo de vida livre para parasitário resultou na perda de muitos genes codificadores de proteínas nesses organismos (Albalat and Cañestro, 2016; Oppendoes et al., 2016). Ainda não está claro, em termos moleculares, o que permitiu

essa transição e compreender melhor esse processo pode abrir novos caminhos para intervenções específicas visando a eliminação parasitária.

Os bodonídeos (família Bodonidae, Bütschli 1883) compõem um grupo de protozoários de vida-livre dentro da ordem Kinetoplastida. São comumente representados pela espécie *Bodo saltans*, protozoário que se alimenta de bactérias em ambientes marinhos e de água doce (Mitchell et al., 1988). Possuem algumas características típicas dos cinetoplastídeos como flagelos emanando de uma bolsa flagelar especializada, edição de RNA mitocondrial e presença de kDNA (Blom et al., 2000; Jackson et al., 2008). *Bodo saltans* é o parente mais próximo (com estilo de vida livre) conhecido dos tripanosomatídeos, uma vez que o *Paratrypanosoma confusum* já é um parasita bem estabelecido (Flegontov et al., 2013). Assim, análises moleculares comparativas entre *B. saltans* e tripanosomatídeos podem fornecer uma visão sobre ganhos e perdas genômicas importantes que ocorreram durante a transição evolutiva para o parasitismo. Uma exploração mais precisa de genes/proteínas essenciais para o parasitismo pode fornecer uma nova rota, nunca explorada, para o desenvolvimento de novos fármacos que combatam essas doenças tropicais negligenciadas mencionadas anteriormente (e.g.: Leishmanioses e doença de Chagas).

Tripanosomatídeos e PP-IPs

Tripanosomatídeos possuem genes ortólogos para a IP6K, mas aparentemente não possuem ortólogos para PP-IP5K (Mantilla et al, 2021), o que hipoteticamente impede a síntese de IP₈. As implicações deste truncamento ainda precisam ser determinadas, mas isso faz dos tripanosomatídeos excelentes modelos para o estudo dos PP-IPs (Cordeiro et al., 2017). Porém, recentemente, um trabalho do grupo coordenado pelo Dr. Roberto Docampo encontrou um isômero de IP₈ em *T. cruzi*, um resultado extremamente intrigante. Uma possível explicação para este achado seria a síntese de IP₈ através de possíveis vias metabólicas alternativas, até então não identificadas (Mantilla et al, 2021).

Apesar de relevante, pouco se sabe sobre vias relacionadas ao desenvolvimento do parasitismo nos cinetoplastídeos e sua possível correlação com os PP-IPs. Até agora, poucos estudos foram feitos investigando fosfatos e pirofosfatos de inositol em tripanosomatídeos (Cestari and Stuart, 2015; Cordeiro et al., 2017; Mantilla et al., 2021). Um desses estudos evidenciou que a perturbação *upstream* na via de fosfatos de inositol leva a alterações na expressão das VSGs (genes localizados em regiões subteloméricas) em *T. brucei*, mecanismo essencial para parasitismo, fazendo com que este tripanosomatídeo seja capaz de driblar o sistema imune do hospedeiro (Cestari and Stuart, 2015). Em outro estudo mais recente, Mantilla et al. (2021) correlacionou PP-IPs e infectividade, evidenciando que linhagens KO de *T. cruzi* para as quinases IPMK e IP6K apresentaram menor

capacidade infectiva. Neste estudo os autores também observaram que a supressão da IPMK está associada a uma morfologia mitocondrial anormal (Mantilla et al, 2021).

Um ponto importante que já foi estabelecido é a relação dos PP-IPs com a patogenicidade fúngica. O IP₇ é essencial para a adaptação metabólica de fungos ao ambiente do hospedeiro, reconhecimento imunológico e patogenicidade, a exemplo do patógeno *Cryptococcus neoformans* (Lev et al., 2015). Em *Candida albicans*, a depleção da quinase para síntese do IP₈ além de ocasionar efeitos deletérios, como localização anormal e degradação de proteínas relacionadas à autofagia, também foi associada com desenvolvimento de hifas e diminuição da virulência durante a infecção sistêmica em camundongos (Ma et al., 2020). De maneira geral, estes estudos sugerem que os PP-IPs estão relacionados com processo de patogenicidade, o que potencialmente poderia ocorrer também em tripanosomatídeos.

Assim, esta dissertação teve como principal objetivo inicial avaliar o possível papel dos PP-IPs no desenvolvimento do parasitismo dentro da ordem Kinetoplastida. Nossa meta inicial era investigar se a presença de IP₈ é mutuamente exclusiva em relação ao parasitismo através de análises *in silico* e *in vitro*. Contudo, reajustamos o objetivo principal no decorrer do desenvolvimento do projeto (ver tópico objetivos). Nossos achados, até o momento, sugerem que a transição de um estilo de vida livre para um estilo de vida parasitário resultou na perda de PP-IP5K. Em conjunto, os resultados desta dissertação poderão contribuir para esclarecer se os PP-IPs possuem alguma relação com o parasitismo desenvolvido por alguns cinetoplastídeos (especialmente tripanosomatídeos), fornecendo mais uma evidência que suporta a grande importância destes metabólitos em diversas vias moleculares.

2. OBJETIVOS

O objetivo principal desta dissertação foi caracterizar a quinase PP-IP5K de *Bodo saltans* (BsPP-IP5K) e analisar possíveis diferenças fenotípicas em linhagens de tripanosomatídeos (*Leishmania braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*) transfectadas com esta quinase.

De modo geral, os objetivos específicos desta dissertação foram: caracterização da quinase PP-IP5K de *Bodo saltans* (*in silico* e *in vitro*); clonagem de seu domínio funcional em vetor específico; transfecção da construção gerada em *T. cruzi* e *L. braziliensis*; e caracterização das linhagens geradas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Análises *in silico* e construção das árvores filogenéticas

Utilizando o banco de dados públicos TriTrypDB e Uniprot, realizamos uma busca por possíveis sequências de PP-IP5K utilizando o software HMMer (com os parâmetros *default*). Usamos

como modelo a PP-IP5K2 humana. Após a busca, as sequências hipotéticas foram analisadas com o software Conserved Domain do NCBI, para identificação de possíveis domínios. Em seguida, realizamos um alinhamento múltiplo dos domínios PP-IP5K (sítio catalítico) das sequências encontradas, utilizando sequências de eucariotos modelos próximos e distantes filogeneticamente dos tripanossomatídeos.

Para construção das árvores filogenéticas, a estrutura primária de PP-IP5K (BSAL_90590 – *Bodo saltans*) foi baixada do TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>) e usada como base de consulta para busca de sequências ortólogas, tanto no TriTrypDB quanto em outras databases. As sequências de aminoácidos ortólogas obtidas foram usadas para gerar um arquivo de mapeamento composto por identificadores de sequência (nome de organismo e filo ao qual pertenciam). As sequências foram alinhadas usando o *software* Clustal Omega (Sievers et al., 2011) e, devido ao tamanho do arquivo fasta, foi usado o programa trimAl v1.4.rev15 (Capella-Gutierrez et al., 2009) para remoção de colunas desalinhadas usando um limiar de intervalo de 0,1. As sequências foram então realinhadas usando o *software* MUSCLE v3.8.1551 (Edgar, 2004) para gerar um arquivo de Alinhamento de Sequências Múltiplas (MSA). Para inferir uma árvore filogenética, foi usado o *software* RAxML-NG (Randomized Axelerated Maximum Likelihood – Next Generation), um programa para inferência sequencial e paralela de máxima verossimilhança (Kozlov et al., 2019) baseado em grandes árvores filogenéticas. O RAxML-NG infere a máxima verossimilhança com base na execução iterativa de séries integradas de eventos Subtree Pruning and Regrafting (SPR), o que permite pesquisar rapidamente a árvore ML mais conhecida (Kozlov et al., 2019) usando frequências base fornecidas pelos melhores modelos de ajuste (Jones-Taylor-Thorton, JTT).

Resumidamente, o Alinhamento de Sequências Múltiplas (MSA) é lido para garantir que não contenha sítios de caracteres indeterminados, sequências com caracteres indefinidos, nomes de táxons duplicados ou quaisquer outros erros de formato (Kozlov et al., 2019). Uma árvore foi então inferida usando os parâmetros padrão JTT-GAMMA (análise particionada) realizando 20 buscas em árvores usando 10 árvores iniciais aleatórias e 10 baseadas em parcimônia. A topologia de árvore de topologia com melhor pontuação foi escolhida e, em seguida, foi feito um *bootstrap* não paramétrico padrão reamostrando colunas de alinhamento e re-inferindo a árvore para cada réplica de *bootstrap* (100 réplicas) do MSA para obter valores de suporte precisos (Kozlov et al., 2019). Por padrão, o RAxML-NG executa o teste de *bootstrapping* (BS) baseado em MRE a cada 50 réplicas e terminou quando as estatísticas de diagnóstico caem abaixo do valor de corte computacional (Kozlov et al., 2019). Os valores de suporte de BS foram então mapeados para a árvore de ML com melhor pontuação/mais conhecida e uma avaliação de probabilidade de árvore foi finalmente feita para calcular a probabilidade de uma determinada topologia fixa, otimizando os parâmetros de modelo e/ou comprimento de ramificação naquela árvore (Kozlov et al., 2019).

A execução foi realizada no servidor grid do sistema da UNESP, (Intel(R) Xeon(R) CPU E5-2680 v4 @ 2.40GHz, 28 núcleos, 125 GB RAM) consistindo em esquema de paralelização autoconfig: 4 worker(s) x 7 thread(s) que levou 534173,699 segundos para ser executado. A energia consumida foi de 27.235,908 Wh. A árvore foi visualizada através do Interactive Tree Of Life v5 (iTOL) (<https://itol.embl.de/>).

Modelagem molecular e preparação dos complexos

O modelo teórico da estrutura terciária da PP-IP5K de *B. saltans* (UniProtKB - A0A0S4JC47) foi gerado com a ferramenta Swiss model. A construção do modelo foi realizada utilizando como molde a estrutura cristalográfica da PP-IP5K2 humana (PDB 3T99). As coordenadas conservadas entre as sequências do molde e do modelo foram copiadas do molde para o modelo. Casos de inserções e exclusões foram remodelados por meio de uma biblioteca de fragmentos e as cadeias laterais foram reconstruídas. Em seguida, a geometria do modelo resultante foi regularizada utilizando um campo de força. Finalmente, a qualidade do modelo global, e por resíduo, foi avaliada usando a função de pontuação QMEAN 1.

A construção dos complexos PP-IP5K + IP₇ (ou IP₆) + ATP foi realizada utilizando as coordenadas dos ligantes IP₆, IP₇ e ATP recuperadas de outras estruturas cristalográficas da PP-IP5K2 (PDB 3T9D e 3T9C). Cabe destacar que a construção PP-IP5K + IP₆ + ATP foi utilizada como controle e optamos por não apresentar os dados gerados.

Dinâmica Molecular

Uma vez que cada complexo (IP₆+PP-IP5K ou IP₇+PP-IP5K) foi corretamente definido quanto as moléculas/ligantes e grau de protonação, cada um dos conjuntos foi inserido em uma ‘caixa’ que simula (*in silico*) condições fisiológicas para a dinâmica molecular: e.g., os complexos foram solvatados e equilibrados em 0,150 M de Na⁺, Cl⁻ e Mg²⁺. Cada um dos sistemas foi envolvido por essa ‘caixa’ triclínica ou cúbica com bordas de 5 a 10 Å de distância, considerando como referência o átomo mais distante em cada eixo cartesiano. Todas as simulações foram realizadas no *software* Gromacs 2020 utilizando o campo de força CHARMM36m 2. Para as computações das interações não ligadas foram selecionados os átomos dentro da faixa de 10 Å em paralelo com uma função *switching* para contabilizar as interações de Van der Waals até 12 Å. Além disso, os átomos de hidrogênio foram fixados usando a função LINCS 3. Após execução dos procedimentos descritos anteriormente, cada sistema foi minimizado utilizando o algoritmo *Steepest Descent* para abaixo de 100 kJ/mol/nm. Então foram aplicadas restrições de posição nos átomos dos complexos IP₆+PP-IP5K e IP₇+PP-IP5K para as etapas de NVT (volume e temperatura constantes) e NPT (pressão e temperatura constantes). Para a etapa NVT, foram geradas velocidades de forma randômica, onde a temperatura dos sistemas foi mantida em 310 K e controlada usando o termostato V-rescale 4 a cada

0.1 ps durante 1 ns, de modo a equilibrar as velocidades dos átomos do sistema. Na etapa NPT, as posições e velocidades finais da NVT foram utilizadas, e então adicionado o barostato Berendsen 5, para acomodar os sistemas na pressão de 1 bar durante 1 ns. Por fim, livre de qualquer restrição, as simulações foram continuadas para executar triplicatas de 300 ns para cada um dos complexos utilizando o termostado Nosé-Hoover 6,7 e barostato Parrinello- Rahman 8 o monitoramento dessas variáveis foi realizado a cada 0.5 ps, uma vez que esses algoritmos permitem um controle mais fino e realista das variáveis termodinâmicas do sistema. Em nossos ensaios foram realizadas simulações em sistemas com as temperaturas de 20 °C (temperatura média do lago Kontanz, onde a cepa referência de *B. saltans* foi isolada) e 26 °C (temperatura média do intestino dos insetos vetores de *L. braziliensis* e *T. cruzi*).

Cabe destacar que este ensaio foi realizado em colaboração com o estudante de doutorado Aleff Ferreira Francisco e seu orientador Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, ambos do laboratório de Biologia Molecular Estrutural, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu.

Síntese de BsPP-IP5K

Devido à dificuldade de cultivo e carência de pesquisadores que trabalhem com *B. saltans*, decidimos sintetizar comercialmente o gene BsPP-IP5K (Genscript). Esse gene foi sintetizado contendo três sequências imunogênicas de hemaglutinina (3xHA) e um sítio para ação da TEV protease, para posterior remoção da cauda 3xHA, uma vez que quando obtermos a proteína recombinante, pretendemos realizar tentativas de cristalização para caracterização da estrutura da proteína. Para ampliar o número de cópias, BsPP-IP5K foi clonado no vetor pUC-19 (entre os sítios de restrição Hind III e Xho I) e posteriormente transformado e multiplicado em bactérias *E. coli* XL1 blue. Alternativamente, foram desenhados *primers* (Tabela 1) para amplificação por PCR do gene da BsPP-IP5K sem a cauda HA e sítio para TEV protease. Os processos de amplificação, clonagem, e transformação foram realizados da mesma forma.

Mutagênese sítio-dirigida na BsPP-IP5K

Conforme predito pelos ensaios de dinâmica molecular, alguns resíduos de aminoácidos de BsPP-IP5K apresentaram maior probabilidade de serem essenciais durante a síntese de IP₈. Assim, inicialmente, os códons correspondentes aos resíduos de lisina 203 e lisina 204 foram substituídas por códons para resíduos de glicina (K203G, K204G), com intuito de gerar uma sequência que codificasse para uma proteína inativa. Esta alteração foi realizada com o kit Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs). Ele se baseia na técnica de amplificação com a Q5 Hot Start High-Fidelity da sequência de interesse contida em um plasmídeo, utilizando primers

mutagênicos, cujas sequências são desenhadas para alterar a sequência de nucleotídeos original (Tabela 1).

As sequências amplificadas por PCR foram marcadas com um grupo fosfato nas regiões terminais para facilitar posterior seleção. Em seguida, as sequências fosforiladas foram circularizadas e o *template* original da PCR foi removido por ação enzimática. Estas reações foram realizadas utilizando-se o kit 10X KLD Enzyme Mix (New England Biolabs). Este produto foi então transformado em *E. coli* competentes. Para confirmação da mutagênese, os vetores foram sendo sequenciados.

Tabela 1. Iniciadores (*primers*) utilizando durante o desenvolvimento do projeto

Nome	Sequência 5' – 3'	Tm (°C)	Função
Bs_F1_PP-IP5K_HindIII	AAGCTTATGGAACATTTCATTATCAAACACAC CACTGCC	65	Amplificação de BsPP-IP5K sem as sequências para sítio TEV - cauda HA; sequenciamento
Bs_R1_PP-IP5K_XhoI	CTCGAGTACATACGCTCCTCCGC	66	
BsPP-IP5K_mut_F1	CTGCATGTCAggagggTTAAGGTCAGAGACG	55	Mutagênese sítio-digerida: resíduos K203G e K204G
BsPP-IP5K_mut_R1	CATACACCTAGGATGATC	56	
Bs_F2_PP-IP5K_seq	ATCAGGATAGCGCTACCGTAGG	61	Sequenciamento
Bs_F3_PP-IP5K_seq	AAGTCCTCCTCGATCGACGG	61	
Lbr_F_5'UTR-GAPDH_XbaI	AATATTTCTAGAATGGAACTCCACAAGGT TC	60	Amplificação da região 5'UTR da LbrGAPDH
Lbr_R_5'UTRGAPDH_HindIII	AAGCTTTGTATCGTGGTAGCTGTTTGG	61	
Lbr_F_3'UTR-GAPDH_XhoI	CTCGAGGGTATTCTTGCTTAGCTACTATAGCG G	64	Amplificação da região 3'UTR da LbrGAPDH
Lbr_R_3'UTR-GAPDH_SbfI	CCTGCAGGCAAAATCAATGGCACTC	64	
Lbr_IP6K_5'UTR_Fw	ACGTGTCGTTAGCCTACCG	57	Amplificação do gene de IP6K para confirmação na RT-PCR
Lbr_IP6K_midgene_Rv	TCTCCATCCGCTCAGCG	57	
Lbr_qPCR_IP6K_Fw	CAACACCTCTAAGACGGAAGAG	58	Amplificação do gene IP6K para qPCR
Lbr_qPCR_IP6K_Rv	CCTTACAGGAGCTGCAATA	55	

Cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas procíclicas de *L. braziliensis*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa CL Brener) foram cultivadas a 26 °C em meio LIT (Liver-Infusion Tryptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% (v/v) de solução antibiótica (estreptomicina/penicilina). As linhagens de *T. cruzi* contendo o construto pTEX+PP-IP5K foram cultivadas no mesmo meio supracitado, adicionalmente suplementado com 100 µg.mL⁻¹ de higromicina.

Formas promastigotas procíclicas de *L. braziliensis* (cepa M2903) foram cultivadas a 27 °C em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 mM HEPES, 2 µg.mL⁻¹ Biopterin e 1% (v/v) solução de antibióticos. As linhagens geradas após knock-in episomal foram cultivadas na presença dos respectivos antibióticos.

Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pTEX e transfecção em *T. cruzi* (knock-in episomal)

Para subclonagem direcional de BsPP-IP5K no vetor de transfecção em *T. cruzi* (pTEX), primeiramente digerimos a construção pUC-19 + BsPP-IP5K (para liberação do inserto) e o plasmídeo pTEX, com as enzimas Hind III e Xho I. Após eletroforese em gel de agarose, isolamos, purificamos e ligamos direcionalmente o gene BsPP-IP5K no vetor pTEX com auxílio da DNA ligase IV (Thermo-Fisher), gerando a construção pTEX + BsPP-IP5K. Vale a pena ressaltar que para este ensaio, não utilizamos o gene BsPP-IP5K mutado.

Após confirmação por digestão e PCR, transfectamos a construção pTEX + BsPP-IP5K em *T. cruzi* (cepa CL Brener) utilizando cubeta de 0,2 cm e o aparelho Nucleofector 2b (Lonza), na presença do tampão de transfecção (90 mM de fosfato de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, 0.15 mM de cloreto de cálcio, 50 mM de HEPES, pH 7.2). Foram utilizados 2 pulsos no programa X-014. Duas amostras de parasitas foram usadas durante a transfecção (uma usada como controle e outra para o *knock-in* de PP-IP5K) contendo $\sim 1.10^7$ parasitas.mL⁻¹ de formas epimastigotas de *T. cruzi* (CL Brener). À amostra *knock-in* PP-IP5K foi adicionado a construção pTEX + BsPP-IP5K. A amostra controle recebeu o mesmo tratamento, mas à ela foi adicionado tampão TE ao invés da construção. Em seguida, cada amostra foi colocada em 5 mL de meio de cultura e incubada a 26 °C por 24 h. No dia seguinte à eletroporação, as amostras receberam a adição do antibiótico de seleção necessário (hygromicina). Os parasitas foram incubados a 26 °C na presença de 5% de CO₂. A seleção da população policlonal foi alcançada ~14 dias após a transfecção, quando não foram encontradas células vivas no grupo controle. A população monoclonal foi obtida a partir da população policlonal após diluição limitante.

Cabe destacar que este ensaio foi realizado em colaboração com a Dra. Simone Guedes Calderano, do Laboratório de Ciclo Celular, Instituto Butantan, São Paulo.

Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pSP72αHYGα e transfecção em *L. braziliensis* (knock-in episomal)

Antes de seguirmos com a subclonagem, decidimos adicionar ao gene da BsPP-IP5K as regiões 5' UTR and 3' UTR do gene constitutivo GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) para propiciar uma expressão constitutiva ao mesmo. Desenhamos primers específicos contendo enzimas de restrição (Tabela 1) para clonagem direcional e amplificamos, a partir do DNA genômico de *L. braziliensis*, 324 bp da região 5' UTR e 482 bp da região 3' UTR. Estes fragmentos foram posteriormente clonados em vetor de clonagem pGEM-T, multiplicados e digeridos com as respectivas enzimas de restrição. Um procedimento similar foi realizado com a construção pUC-19 + BsPP-IP5K (liberação do inserto) e com plasmídeo pSP72αHYGα (linearização do plasmídeo). Após eletroforese em gel de agarose, isolamos, purificamos e ligamos direcionalmente cada fragmento de

interesse (utilizando DNA ligase IV), gerando o *constructo* pSP72 α HYG α + 5' UTR-GAPDH + BsPP-IP5K + 3' UTR-GAPDH. Cabe destacar que um procedimento similar foi utilizado para gerar um *constructo* contendo a BsPP-IP5K mutada (BsPP-IP5K-K203G,K204G). Após confirmação por digestão e PCR, essas construções foram transfectadas em *L. braziliensis* (cepa M2903) utilizando cubeta de 0,2 cm e o aparelho Nucleofector 2b (Lonza), na presença do tampão de transfecção específico (cytomix buffer – 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl₂, 10 mM K₂HPO₄, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA e 2 mM MgCl₂).

Preparação de bactérias competentes

Bactérias *E.coli* cepas BL21-DE3 (RP códon plus e PlysS) não-competentes foram espalhadas, com auxílio de uma alça *loop*, em uma placa contendo meio LB ágar e incubadas por 16 h para o crescimento de colônias isoladas. Em seguida, uma colônia foi selecionada e incubada em 5 mL de meio SOB (20 mg.mL⁻¹ bacto tryptone, 5 mg.mL⁻¹ yeast extract e 0,5 mg.mL⁻¹ NaCl) por 16 h. Este pré-inóculo foi posteriormente adicionado a 95 mL de meio SOB e incubado a 37 °C até atingir densidade ótica de 0,45 nm. Ao alcançar este valor, a amostra foi então dividida igualmente em 2 tubos. Estes tubos foram centrifugados por 15 min a 2500 g a 4 °C, com o descarte do sobrenadante, seguida de adição de 32 mL de tampão HTB (10 mM HEPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl e 55 mM MnCl₂) em cada tubo com uma nova etapa de centrifugação e posteriormente a adição de 8 mL de HTB e por fim a adição de DMSO. As amostras foram subdivididas (100 μ L) em tubos de 1,5 mL e armazenadas em freezer -80 °C.

Subclonagem de BsPP-IP5K em vetor pET28a+ e tentativas de expressão

Com intuito de realizar caracterizações bioquímica e biofísica de BsPP-IP5K, resolvemos tentar expressar essa proteína em sistema heterólogo bacteriano. Para isso, utilizamos o gene BsPP-IP5K completo (contendo sequências para sítio TEV e etiqueta HA) e também sem essas sequências (realizamos a remoção utilizando primers específicos – Tabela 1).

Para cada abordagem (clonagem da BsPP-IP5K contendo, ou não, sítio TEV e etiqueta HA em vetor pGEM), foi preparado um pré-inóculo (em 5 mL meio LB, 37 °C a 16 h) a partir de colônias bacterianas (*E. coli* cepa XL1 blue) contendo as construções pGEM + BsPP-IP5K e pGEM + BsPP-IP5K-s/HÁ (inseridas após transformação bacteriana). Posteriormente, foi realizada extração plasmidial conforme as especificações do kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). As amostras foram quantificadas com auxílio do aparelho de espectrofotometria e armazenadas em freezer -20 °C.

Para excisão do gene da BsPP-IP5K (ou BsPP-IP5K-s/HA) previamente inserido no vetor de clonagem e preparação do vetor de expressão (pET 28a+) para subclonagem, as amostras foram

digeridas com as enzimas de restrição Xho I e Hind III (New England BioLabs). Vale ressaltar que o sítio para cada uma destas enzimas havia sido previamente inserido nas extremidades do gene da BsPP-IP5K. A digestão foi confirmada por eletroforese horizontal de gel agarose 1%. Para isolamento do gene BsPP-IP5K (ou BsPP-IP5K-s/HA), o fragmento correspondente foi excisado do gel e em seguida purificado de acordo com as especificações do kit comercial QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Para ligação do gene BsPP-IP5K (ou BsPP-IP5K-s/HA) no vetor de expressão pET-28a+, a reação foi realizada em solução contendo buffer de ligação (Rapid 2X), água miliQ, DNA ligase IV, e incubada a 16 °C, por 16 h, para posterior transformação.

Em seguida, cada uma das ligações foi transformada em bactérias competentes [*E. coli* BL21 DE3 codon plus (alternativamente BL21 DE3 Plys e ArcticExpress RIL)] seguindo protocolo de transformação específico. Para a análise de expressão da BsPP-IP5K (ou BsPP-IP5K-s/HA) foram realizados diversos ensaios de mini-indução a fim de obter as melhores condições de expressão. Para isto, foram realizados diferentes períodos de indução com 1 mM IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) (amostras coletadas após 1, 2, 3, 4 e 16 h). Alternativamente para ArcticExpress RIL a temperatura do teste de expressão foi de 20 °C. Posteriormente, o extrato bacteriano foi submetido à lise por sonicação, na presença de tampão de lise (50 mM Tris – HCl, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA e 10 mg.μL⁻¹ lisozima). Em seguida, o extrato bruto foi separado por centrifugação em frações solúveis e insolúveis. Após a obtenção dos conteúdos proteicos destas frações, elas foram aplicadas em géis 10% SDS-PAGE corados com azul de Coomassie para a avaliação da expressão.

Extração de proteínas totais de *L. braziliensis*

As linhagens das formas promastigotas de *L. braziliensis* geradas anteriormente após transfecção (BsPP-IP5K e BsPP-IP5K-K203G,K204G) e respectivos controles (WT e vetor vazio) foram utilizadas para extração total de proteínas. Aproximadamente 2x10⁷ parasitos.mL⁻¹ (total 10 mL) de cada linhagem foram coletados por centrifugação (3500 g por 10 min) e lavados 2 vezes com PBS. Os parasitos foram então ressuspensos em Buffer A (20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 15 mM NaCl, 1 mM Espemidina, 0,3 mM Espermina e 1 mM DTT) e lisados por incubação rápida (1 min) em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram incubadas no gelo por 40 min. 0,5% de detergente NP-40 e 1x coquetel inibidor de protease foram adicionados em cada amostra. As amostras foram então homogeneizadas e centrifugadas a 10000 g por 20 min. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado, quantificado e armazenado à -80 °C.

Western Blot

As amostras contendo os extratos proteicos foram separadas de acordo com a massa molecular em gel SDS-PAGE 10% e posteriormente corados com solução de 0,1% Coomassie brilliant blue G-

250. Géis ‘espelhos’ aos corados foram transferidos para membranas Amersham Protran (GE Healthcare), usando o sistema mini-PROTEAN Tetra system (Bio-Rad) para realização de ensaio Western blot. Para isso, utilizamos o anticorpo α -Histag (mouse) (Sigma-Aldrich). Este anticorpo reconhece a cauda de poli histidina (6xHis) que é conjugada à proteína recombinante quando expressa no sistema pET-28a. A validação da transferência foi realizada utilizando a solução Pounceau S (0,2% Pounceau S, 5% ácido acético glacial). Em seguida, a membrana foi submetida a bloqueio e devidas incubações seguindo o protocolo Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) e utilizando o anticorpo primário α -Histag (mouse) (diluído 1:5000) e anticorpo secundário peroxidase anti-mouse (diluído 1:10000) (Sigma-Aldrich). As fotos foram obtidas com auxílio do aparelho G-BOX, tirando fotos a cada 1 min durante por 10 min.

RT-PCR e qPCR para verificar e quantificar a expressão de BsPP-IP5K em parasitos selvagens transfectados

O extrato de RNA total de formas promastigotas de *L. braziliensis* das linhagens geradas (BsPP-IP5K e BsPP-IP5K-K203G,K204G) e respectivos controles (WT e vetor vazio) foi isolado seguindo as recomendações do fabricante do reagente TRIzol (Thermo Scientific). Para este ensaio, foi utilizado $\sim 3 \times 10^8$ parasitos (n^os totais) em fase exponencial de crescimento. Após a extração, o RNA foi solubilizado em água estéril tratada com pirocarbonato de dietila para evitar a presença de RNases. Em seguida, as amostras foram tratadas com DNase I, RNase free (ThermoFisher) seguindo as recomendações do fabricante. A reação foi inativada usando 2 μ L de 50 mM de EDTA e incubada a 65 °C por 10 min. A concentração e pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria de absorção (OD₂₆₀), utilizando o equipamento Epoch (BioTek) e a integridade da amostra foi avaliada com a utilização do equipamento Qubit (Invitrogen). A ausência de DNA genômico nas amostras de RNA total foi confirmada por meio da realização de PCR, usando iniciadores (*primers*) para o gene BsPP-IP5K e um controle positivo (DNA genômico de Lbr WT). Para os ensaios de RT-PCR, utilizamos o kit SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, e utilizando iniciadores específicos para o gene BsPP-IP5K (Bs_F3_PP-IP5K_seq + Lbr_R_3'UTR-GAPDH_Sbfl - Tabela 1). Como controle positivo, realizamos a mesma reação com *primers* para IP6K (Lbr_IP6K_5'UTR_Fw + Lbr_IP6K_midgene_Rv).

Curva de crescimento

As culturas de *L. braziliensis* (diferentes linhagens geradas) foram cultivadas a 27 °C em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 mM HEPES, 2 μ g.mL⁻¹ Biopterin e 1% (v/v) solução de antibióticos. Para início da curva de crescimento, utilizamos 10 mL de meio contendo

1×10^5 parasitos.mL⁻¹. Durante 10 dias, coletamos e contamos cada amostra (triplicata) utilizando câmara de Neubauer. A fórmula para o cálculo de concentração foi a seguinte:

$$c = \bar{x} \text{ quadrantes} \cdot \text{diluição}^{-1} \cdot 10^4$$

Onde c é o número de células por mL, \bar{x} quadrantes é a média da somatória dos quadrantes e 10^4 é a constante da câmara de Neubauer. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 8.0.2, com o teste One-way Anova.

Citometria de fluxo para avaliação do ciclo celular

Para análise do conteúdo de DNA e inferência das fases do ciclo celular utilizamos citometria de fluxo. 1×10^7 células/mL das formas promastigotas de *L. braziliensis* das linhagens geradas (BsPP-IP5K e BsPP-IP5K-K203G, K204G) e respectivos controles (WT e vetor vazio) foram coletados for centrifugação (1000 g por 5 min) no 2°, 3° e 4° da curva de crescimento. Estas amostras foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas/permeabilizadas pela adição de metanol 70% (diluído em PBS) por 16 h a 4 °C. As amostras foram então centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS contendo 1 mg·mL⁻¹ Iodeto de propídio (para mensuração do conteúdo de DNA) e 20 mg·mL⁻¹ RNase A (para evitar interferência de RNA na leitura).

Os parasitos foram então analisados usando citometria de fluxo (Accuri C6 Plus – BD Bioscience). Para cada amostra, foram analisados 20.000 eventos. As análises consistiram em gerar dotplots FSC (Forward Scatter) x SSC (Side Scatter) e FL3-A x FL3-H, onde gates foram utilizados para selecionar apenas a população de interesse. Para as análises e construção dos gráficos foi utilizado o software FlowJo v.10.6.5 (FlowJo, LLC, Ashland, OR).

5. RESULTADOS

PP-IP5K está presente nos genomas do tripanosomatídeo *Paratrypanosoma confusum* e do Bodonídeo *Bodo saltans*

A varredura utilizando o pacote de software HMMer e sequências do banco de dados público TritrypDB, tanto para sequências de nucleotídeos e de aminoácidos, evidenciou que a maioria dos tripanosomatídeos não possuem a quinase PP-IP5K, sugerindo possível correlação com parasitismo. Curiosamente, nossas análises foram capazes de revelar um homólogo putativo para esta quinase no tripanosomatídeo *Paratrypanosoma confusum* (TritrypDB – PCON_0023530) e também no Kinetoplastida de vida livre *Bodo saltans* (Figura 4). Contudo, o homólogo presente no *P. confusum* apresenta um sítio catalítico incompleto quando comparado a outros organismos (Figura 5).

Query: PP-IP5KHUMAN [M=1243]										
Scores for complete sequences (score includes all domains):										
--- full sequence ---			--- best 1 domain ---			-#dom-				
E-value	score	bias	E-value	score	bias	exp	N	Sequence	Description	
2.4e-74	257.0	0.1	4.8e-74	256.0	0.1	1.5	1	PCON_0023530.mRNA-p1	transcript=PCON_0023530.mRNA	
6.5e-68	235.7	0.6	8.2e-68	235.3	0.6	1.0	1	BSAL_90590-t42_1-p1	transcript=BSAL_90590-t42_1 g	
3e-05	28.1	0.0	0.0039	21.1	0.0	2.4	2	rna_LpyrH10_02_6070-p1	transcript=rna_LpyrH10_02_6070	
5.2e-05	27.3	0.1	0.028	18.2	0.0	2.4	3	LmxM.28.1690.1-p1	transcript=LmxM.28.1690.1 gen	
0.00017	25.6	0.1	0.092	16.5	0.0	2.4	3	LAMA_000206200.1-p1	transcript=LAMA_000206200.1 g	
0.0009	23.2	0.1	0.36	14.6	0.0	2.5	3	LdCL_280023100-t42_1-p1	transcript=LdCL_280023100-t42_1	
0.00093	23.1	0.1	0.36	14.5	0.0	2.5	3	LdBPK.28.2.001810.1-p1	transcript=LdBPK.28.2.001810.1	
0.00094	23.1	0.1	0.36	14.5	0.0	2.5	3	LdBPK_281810.1.1-p1	transcript=LdBPK_281810.1.1 g	
0.00097	23.1	0.1	0.033	18.0	0.0	2.5	3	CFAC1_300028400.1-p1	transcript=CFAC1_300028400.1	
0.00098	23.1	0.1	0.033	18.0	0.0	2.5	3	CfaC1_30-4-662489-656436	organism=Crithidia fasciculata_	
0.001	23.0	0.0	0.35	14.6	0.0	2.4	2	LTRL590_280023800.1-p1	transcript=LTRL590_280023800.1	
0.0011	22.9	0.0	0.36	14.6	0.0	2.4	2	LAEL147_000499900.1-p1	transcript=LAEL147_000499900.1	
0.0013	22.7	0.0	0.36	14.6	0.0	2.2	2	LINF_280023200-T1-p1	transcript=LINF_280023200-T1	
0.0017	22.3	0.1	0.28	14.9	0.0	2.5	3	LENLEM3045_280024500.1-p1	transcript=LENLEM3045_280024500	
0.0017	22.3	0.0	0.3	14.8	0.0	2.4	2	LTULEM423_280023700.1-p1	transcript=LTULEM423_280023700.	
0.002	22.0	0.0	0.36	14.6	0.0	2.4	2	LGELEM452_280024500.1-p1	transcript=LGELEM452_280024500.	
0.002	22.0	0.0	0.36	14.6	0.0	2.4	2	LARLEM1108_280024300.1-p1	transcript=LARLEM1108_280024300	
0.0025	21.7	0.1	0.36	14.6	0.0	2.4	3	LmjF.28.1690:mRNA-p1	transcript=LmjF.28.1690:mRNA	
0.0029	21.5	0.2	0.36	14.6	0.0	2.4	3	LMJLV39_280024700.1-p1	transcript=LMJLV39_280024700.1	
0.0065	20.3	0.0	0.048	17.4	0.0	2.3	3	rna_Lsey_0023_0130-1-p1	transcript=rna_Lsey_0023_0130-1	
----- inclusion threshold -----										
0.015	19.1	0.2	0.36	14.6	0.0	2.3	3	LMJSD75_280024200.1-p1	transcript=LMJSD75_280024200.1	
0.016	19.0	0.0	26	8.4	0.0	2.5	3	BSAL_49280-t42_1-p1	transcript=BSAL_49280-t42_1 g	
0.018	18.9	0.0	27	8.3	0.0	2.5	3	CYKH0100012-2-6353-10771	organism=Bodo saltans strain La	

Figura 4. Resultado da varredura de homólogos da PP-IP5K humana em tripanossomatídeos utilizando o pacote de software HMMer. A busca foi feita utilizando seqüências providas do banco de dados TritypDB. Os dois melhores hits foram obtidos com as seqüências homólogas de PP-IP5K para *P. confusum* (score 257) e *B. saltans* (score 235.7).

Também há uma aparente redução da área adjacente ao domínio catalítico da seqüência de PP-IP5K quando se compara o ortólogo de *B. saltans* (448 aa) e *P. confusum* (547 aa) com outros protozoários como *G. lamblia* (2197 aa) e *P. falciparum* (2657 aa) (Figura 5A).

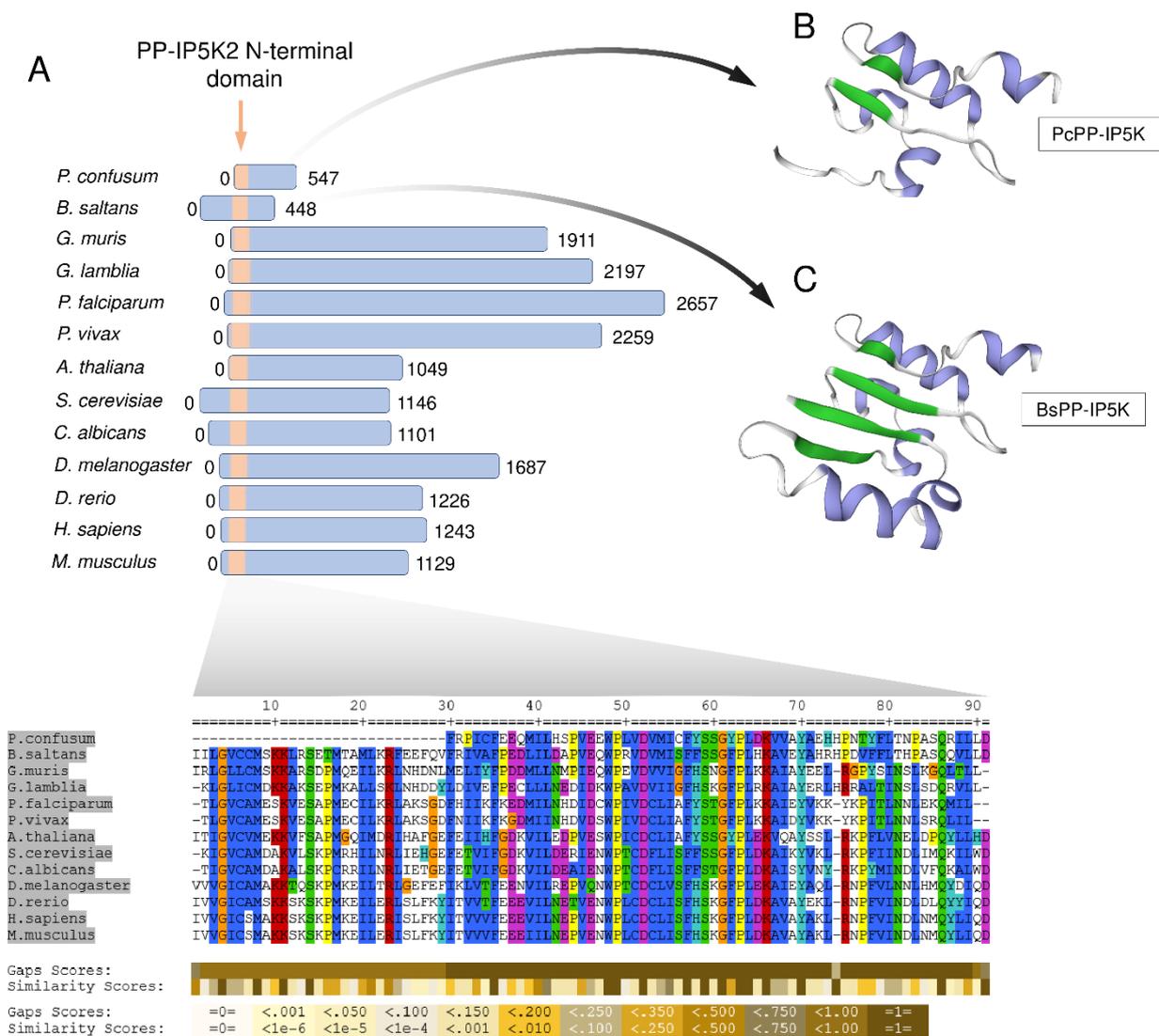


Figura 5. Análise do domínio catalítico da PP-IP5K de diferentes organismos. **A.** Alinhamento do sítio catalítico de BsPP-IP5K entre 13 organismos de diferentes classes usando os programas Muscle e Trimal. Os resultados apontam que o domínio catalítico de *P. confusum* PP-IP5K é naturalmente desestruturado. **B-C.** Predição da estrutura terciária dos domínios catalíticos dos homólogos de *P. confusum* (**B**) e *B. saltans* (**C**), com a cor verde representando áreas de folha β , azul para alfa hélices e a cor branca para áreas desestruturadas. Estas predições foram realizadas utilizando-se o software Swissmodel.

PP-IP5K está presente em diversos grupos taxonômicos

Utilizando sequências da PP-IP5K de diferentes organismos advindas dos bancos de dados TritypDB e Uniprot, elaboramos a árvore filogenética utilizando o script RAxML-NG. Organismos mais representativos foram utilizados buscando reconstruir uma história evolutiva mais restrita da PP-IP5K. Foram incluídos na árvore filogenética protozoários parasitas, bem como fungos, plantas e animais (Figura 6).

Para comparação entre os homólogos em alguns destes organismos, foram gerados modelos preditivos da estrutura terciária do domínio catalítico (domínio PPIP5K). No geral, esse domínio se mostrou conservado, tanto em organismos de vida-livre, como parasitas não-kinetoplastidas. Porém,

como já mencionado, o homólogo da PP-IP5K presente no único parasito kinetoplastida (*P. confusum*) se mostrou desestruturado e potencialmente não funcional.

Juntas, estas análises filogenéticas sugerem que a PP-IP5K se manteve relativamente conservada na maioria dos organismos. Porém, por alguma razão ainda desconhecida, esta quinase não foi retida pela família dos tripanosomatídeos (ordem Kinetoplastida). De nota, este ensaio foi realizado em colaboração com o aluno de mestrado Bryan E. Abuchery.

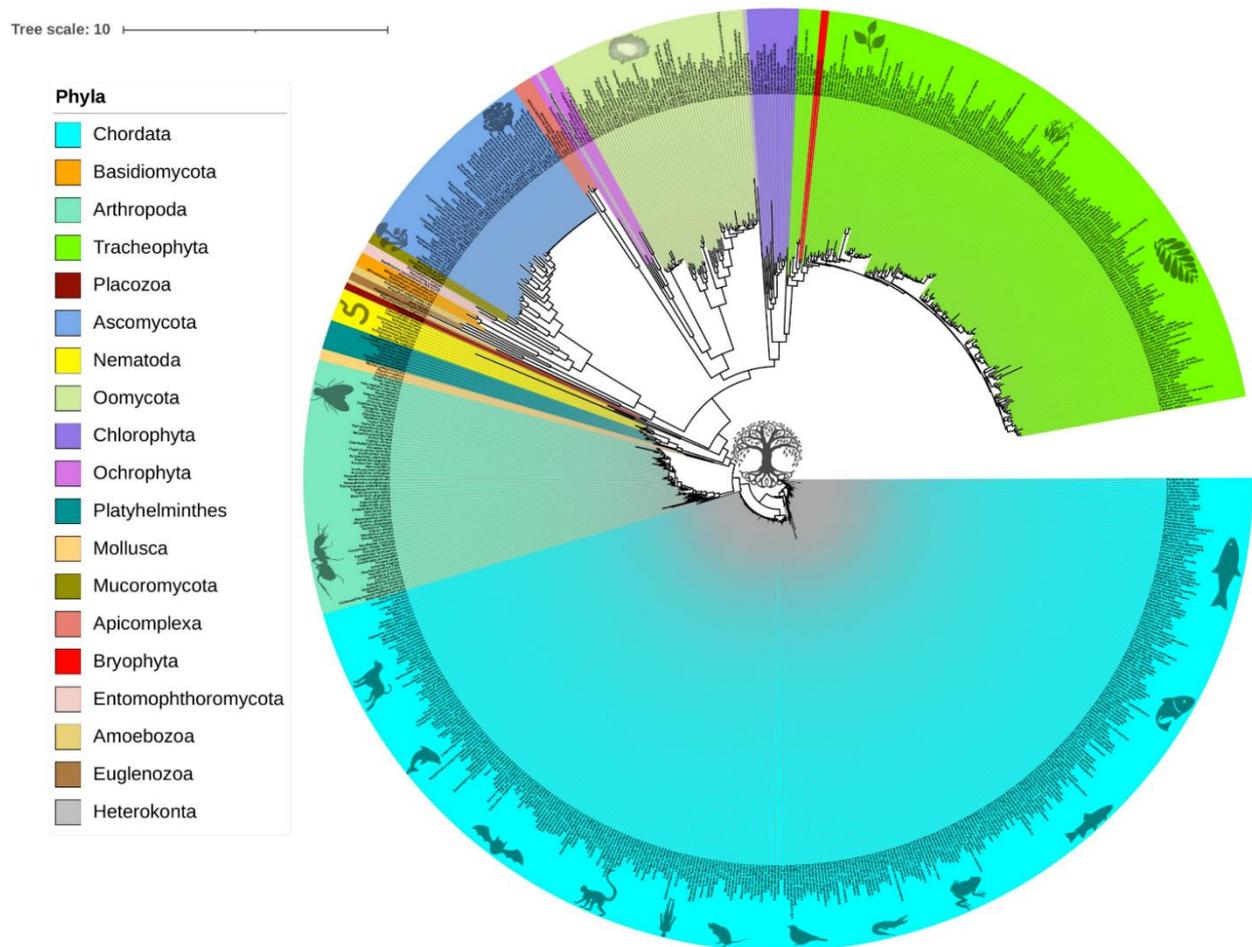


Figura 6. Árvore filogenética para PP-IP5K utilizando abordagem de máxima verossimilhança. 770 sequências representativas construídas sob a abordagem Maximum Likelihood com taxa de matriz “JTT+G” (LogLikelihood: -311948.156942) e 100 bootstraps revela que PP-IP5K apresenta extensa variabilidade entre eucariotos. Ortólogos de PP-IP5K em membros do mesmo grupo taxonômico (apresentados do lado esquerdo) apresentam considerável conservação.

BsPP-IP5K apresenta um domínio catalítico funcional

Para investigarmos se o possível gene homólogo de PP-IP5K presente em *B. saltans* (BsPP-IP5K) era capaz de codificar para uma quinase funcional, resolvemos elaborar um modelo estrutural teórico do sítio catalítico predito para a BsPP-IP5K utilizando a abordagem *molecular docking* e dinâmica molecular (DM). O modelo estrutural teórico gerado (Figura 7A) demonstrou uma

geometria satisfatória com 95.75% dos resíduos e 98.30% dos ratâmeros em regiões favoráveis no gráfico de Ramachandram (Figura 7B). A sobreposição do modelo estrutural da BsPP-IP5K com o molde PP-IP5K humana (PDB 3T99) apresentou um RMSD global de 0.161 Å entre os pares atômicos calculados (Figura 7A), evidenciando a qualidade atingida no modelo gerado.

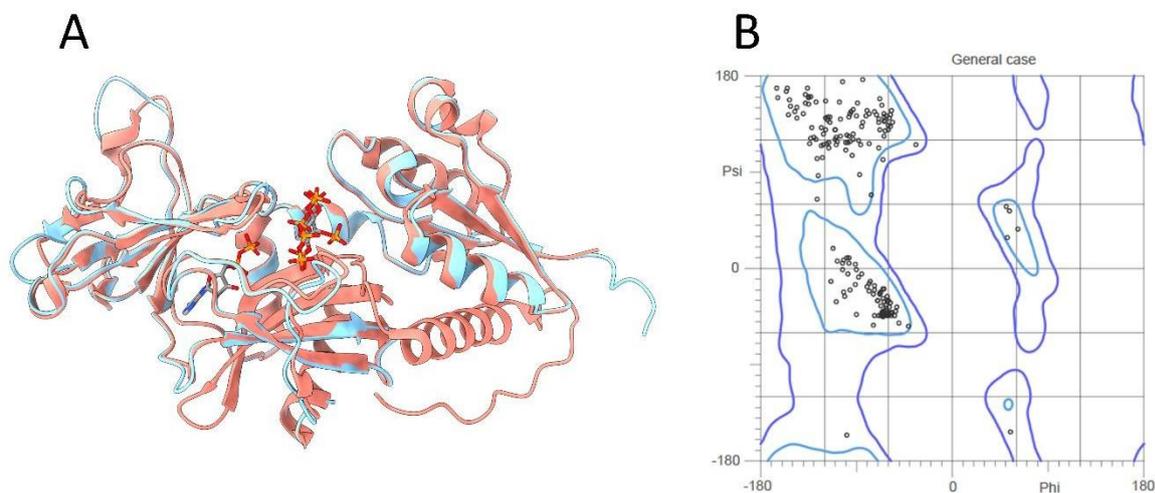


Figura 7. Modelo estrutural teórico gerado para BsPP-IP5K. A. Sobreposição entre BsPP-IP5K (em salmão) e PP-IP5K2 humana (azul claro), onde é possível notar a acomodação satisfatória dos ligantes originários da estrutura cristalográfica no modelo da BsPP-IP5K, sendo a esquerda a molécula de ATP e a direita a molécula de IP₇. B. Gráfico de Ramachandram gerado para o modelo da BsPP-IP5K.

O sítio catalítico da BsPP-IP5K (domínio PPIP5K) tem cerca de 42% de similaridade com seu homólogo encontrado em humanos, possuindo tanto o domínio N-terminal RimK/ATP-grasp kinase domain, quanto C-terminal HP2 phosphatase domain, com maior similaridade para a isoforma PP-IP5K2. No entanto, foi observado que a sequência da BsPP-IP5K não possui o domínio de coordenação de Mg²⁺ composto por duas folhas beta antiparalelas (Figura 8).

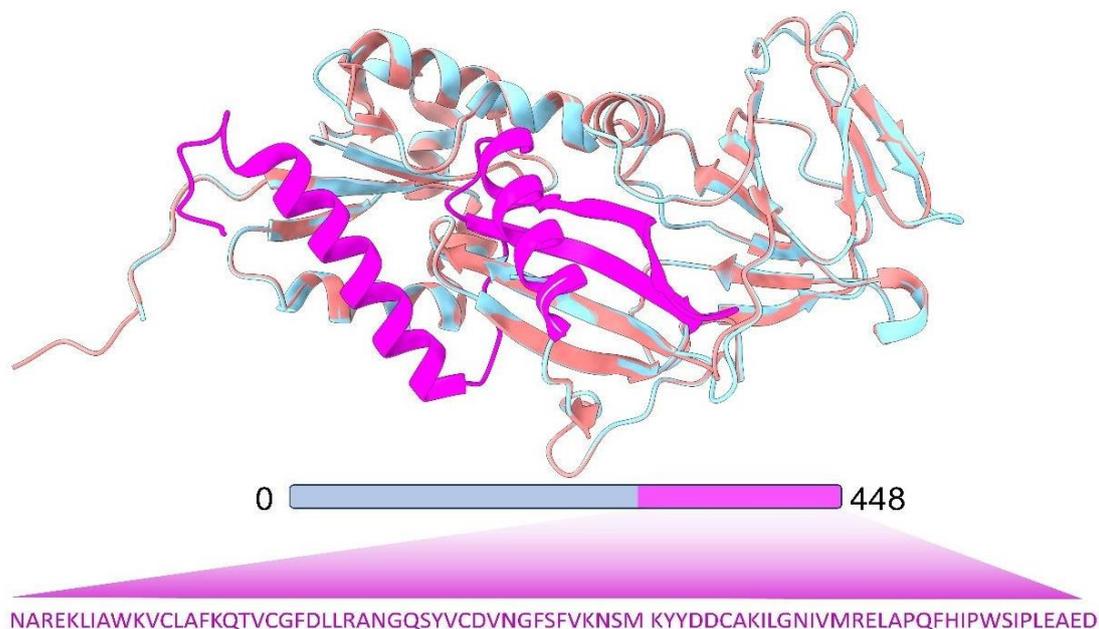


Figura 8. Sobreposição do modelo teórico estrutural da BsPP-IP5K (salmão) com o molde cristalográfico da PP-IP5K humana (azul claro). A sobreposição da BsPP-IP5K com a PP-IP5K humana evidencia a ausência de parte do C-terminal (rosa) na BsPP-IP5K. Esta região compõe o motivo de coordenação de íons Mg^{2+} , responsável pela coordenação do ATP. Imagens geradas com o software ChimeraX 1.4

Ainda assim, observamos uma elevada similaridade na região da cavidade do sítio ativo entre o modelo da BsPP-IP5K e estruturas cristalográficas da PP-IP5K2 (3T9C e 3T9D), que tornou viável a recuperação de coordenadas referentes aos substratos IP_7 e o cofator (ATP). Dessa maneira, foi possível realizar a montagem dos complexos BsPP-IP5K + IP_7 + ATP, que apresentaram uma acomodação satisfatória tanto dos pirofosfatos quanto do nucleotídeo. Deste modo, os complexos gerados foram submetidos a avaliação de estabilidade por meio de simulações DM.

Foram realizadas 3 simulações de 900 ns para cada um dos complexos a 20 °C (temperatura ambiente média do lago onde *B. saltans* foi isolado) e 26 °C (temperatura ambiente média dos insetos vetores de *L. braziliensis* e *T. cruzi*). A execução dessas simulações em triplicata proporcionou um panorama geral do comportamento da BsPP-IP5K em solução fisiológica (pH 7.4).

Notavelmente, as análises das trajetórias geradas para o complexo BsPP-IP5K + IP_7 + ATP revelou que, por mais que a estrutura da BsPP-IP5K apresente a perda do domínio responsável pela coordenação de Mg^{2+} , o sítio ativo não perde a capacidade de acomodar de forma estável o substrato IP_7 e o cofator ATP, mantendo uma ligação estável em ambas as temperaturas analisadas (20 e 26 °C) durante as simulações (Figuras 9 e 10). Contudo, é notável que o complexo BsPP-IP5K + IP_7 + ATP apresentou pequenas variações em relação ao RMSD (que estima a distância média entre grupos de átomos) para o ATP, na ordem de ± 0.1 nm a 20 °C, enquanto não variou significativamente a 26 °C (Figuras 9 e 10). Além disso, o raio de giro (Rg) do complexo apresentou maior variação a 26 °C do que a 20 °C (Figuras 9 e 10).

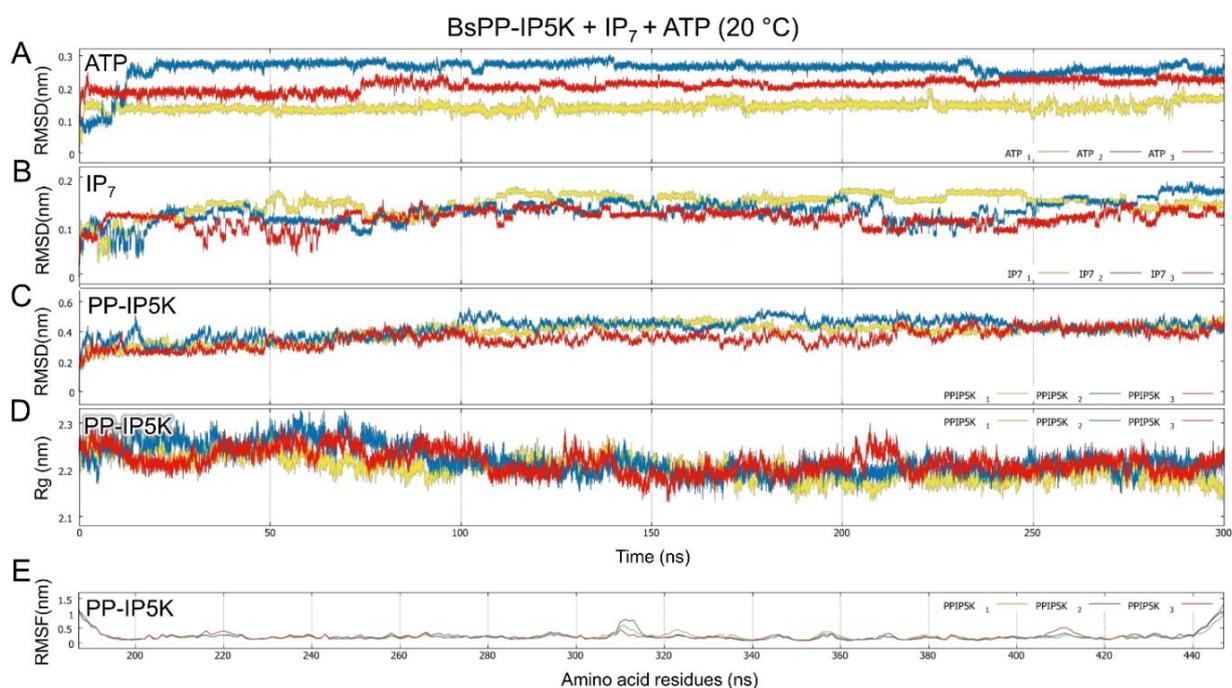


Figura 9. Simulações em triplicata de 300 ns do complexo BsPP-IP5K + IP7 + ATP a 20 °C. As três trajetórias de cada simulação (amarelo, azul e vermelho) foram analisadas individualmente por meio do RMSD global do cofator ATP (A), do substrato IP7 (B) e da cadeia principal de BsPP-IP5K (C). Além disso, analisamos o raio de giro (D) e a flutuação quadrática média (RMSF) (E) da cadeia principal de BsPP-IP5K. Adicionalmente, foram extraídas as médias de contatos e porcentagem de pontes de hidrogênio referentes às interações entre o substrato IP7 e resíduos do sítio ativo a 20 °C, durante os 900 ns de simulação.

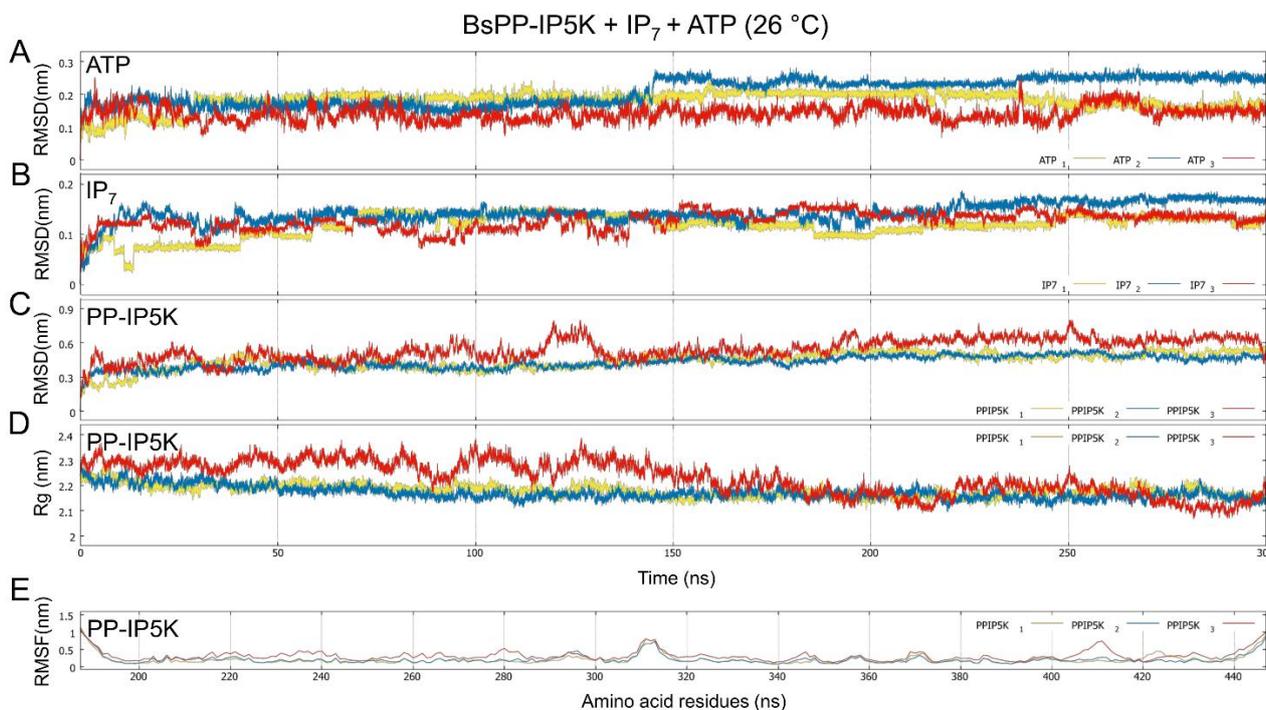


Figura 10. Simulações em triplicata de 300 ns do complexo BsPP-IP5K + IP7 + ATP a 26 °C. As três trajetórias de cada simulação (amarelo, azul e vermelho) foram analisadas individualmente por meio do RMSD global do cofator ATP (A), do substrato IP7 (B) e da cadeia principal de BsPP-IP5K (C). Além disso, analisamos o raio de giro (D) e a flutuação quadrática média (RMSF) (E) da cadeia principal de BsPP-IP5K. Adicionalmente, foram extraídas as médias de contatos e porcentagem de pontes de hidrogênio referentes às interações entre o substrato IP7 e resíduos do sítio ativo a 26 °C, durante os 900 ns de simulação.

Através dos ensaios de dinâmica molecular nós também conseguimos fazer uma predição de resíduos de aminoácidos importantes para a catálise de IP8 (tanto a 20 °C, como a 26 °C). Na PP-IP5K humana (PP-IP5K2), o resíduo de lisina 214 apresenta importante função na ancoragem do IP7 dentro do sítio catalítico. Quando alinhamos os modelos das estruturas terciárias de BsPP-IP5K e PP-IP5K2, observamos que este resíduo corresponde ao resíduo de lisina 368 da BsPP-IP5K. Em nossas simulações, este resíduo demonstrou uma relevante interação com o ligante, indicando uma função conservada nesta quinase. Outros resíduos importantes dentro do sítio catalítico da PP-IP5K2 (lisina 53, 54, 248 e 329 e arginina 213, 262, 273 e 281), também apresentaram importância na interação com o substrato (Wang et al., 2011). Seus correspondentes na BsPP-IP5K são as lisinas 203, 204, 404 e as arginina 367, 418, 429 e 437 que também demonstraram ser essenciais em nossas simulações (Figura 11).

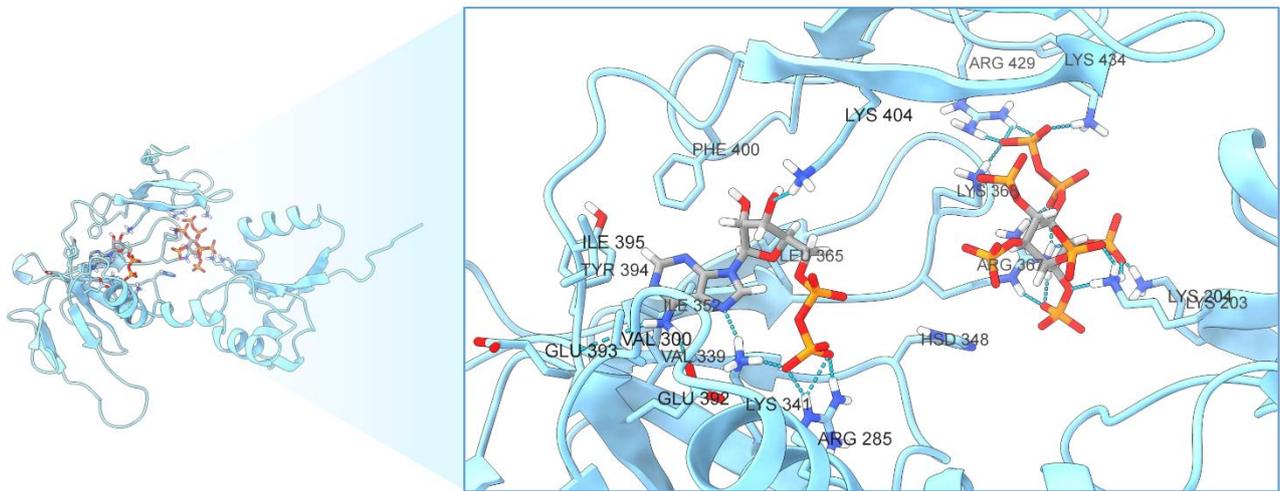
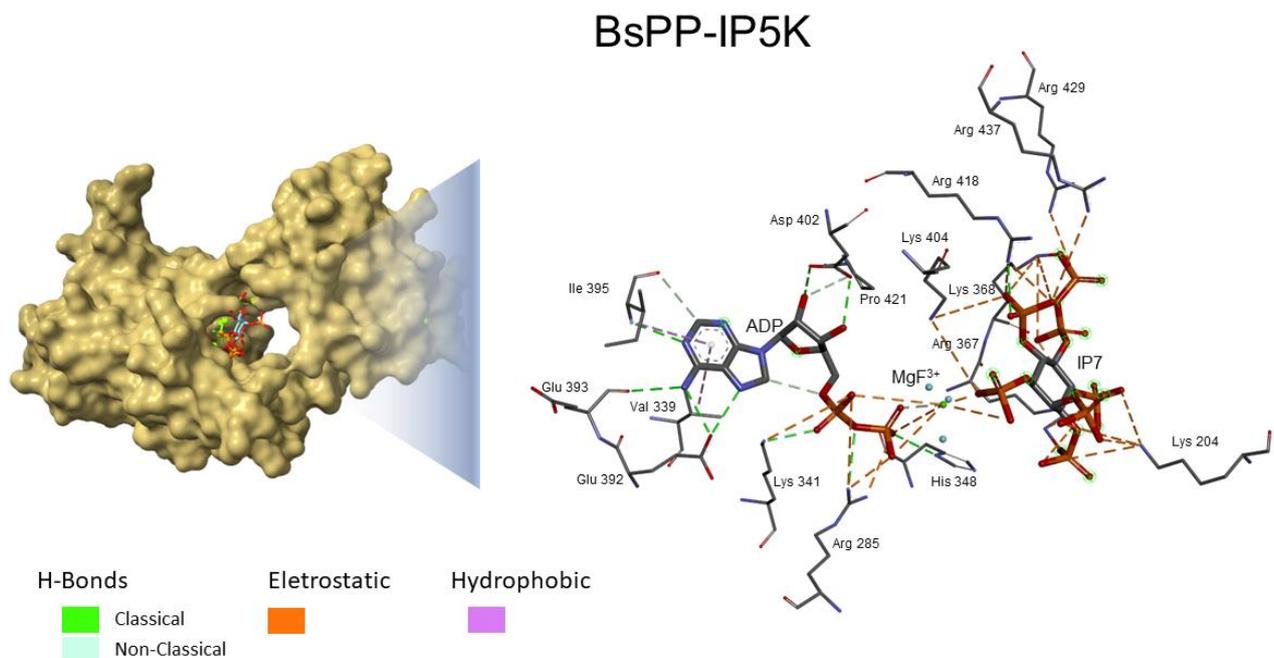


Figura 11. Simulações usando BsPP-IP5K, IP7 e ATP apontam os resíduos de aminoácidos essenciais durante a catálise de IP8. Além de evidenciar a importância de alguns aminoácidos, nossos ensaios de dinâmica molecular apontaram a presença de íons divalentes (e.g., Mg^{2+}) como cofatores essenciais. Imagens geradas com o software ChimeraX 1.4

Também analisamos os tipos de interações que o sítio catalítico da BsPP-IP5K realiza com os substratos. Utilizamos ADP para reconstruir o cenário de como aconteceria a transferência do grupo fosfato para a molécula de IP7. Assim como seu ortólogo em humanos, a quinase de *B. saltans* interage principalmente com o IP7 e ADP com ligações de hidrogênio. Além disso, é possível que a maioria dos resíduos de lisina e arginina da HsPP-IP5K, que são importantes para coordenação da síntese de IP8, possuem representantes na BsPP-IP5K. Desta maneira o padrão dos resíduos que interagiram com os substratos permaneceu (Figura 12).



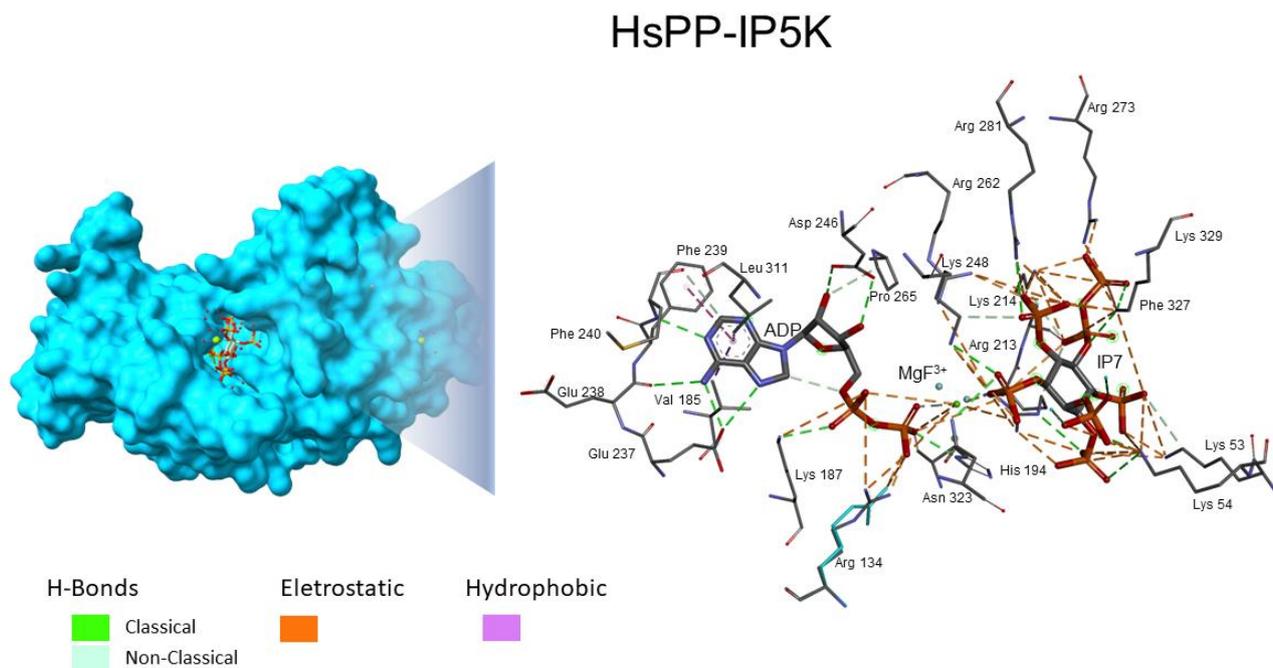


Figura 12. Comparação do domínio catalítico entre BsPP-IP5K (cima) e HsPP-IP5K (baixo). Representação visual da superfície da estrutura de BsPP-IP5K (cima) e HsPP-IP5K (baixo). A ampliação mostra a configuração dos resíduos do sítio catalítico com as ligações (linhas pontilhadas) com os substratos ADP e IP₇. A legenda ilustra os diferentes tipos de interações encontradas (H-bonds = ligações de hidrogênio; Eletrostatic = interações eletrostáticas; Hydrophobic = interações hidrofóbicas). Imagens geradas com o software BIOVIA Discovery Studio Visualizer.

Com a predição de resíduos importantes, realizamos ensaios de mutagênese sítio-dirigida para gerar uma BsPP-IP5K inativa, ou seja, incapaz de catalisar a síntese de IP₈. Como veremos mais adiante, a sequência mutada foi clonada em vetor específico e utilizada durante os ensaios de transfecção episomal em *L. braziliensis*. De nota, os ensaios de dinâmica molecular foram realizados em colaboração com o estudante de doutorado Aleff Ferreira Francisco e seu orientador Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, ambos do laboratório de Biologia Molecular Estrutural, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu.

Knock-in* episomal em *T. cruzi

Como nossas simulações evidenciaram que BsPP-IP5K seria capaz de sintetizar IP₈ a partir de IP₇ a 26 °C, surgiram as seguintes questões: O que aconteceria se adicionássemos a BsPP-IP5K em um tripanosomatídeo? O seu fenótipo seria o mesmo quando comparado ao grupo controle? Haveria alguma diferença significativa em relação à virulência e patogenicidade? Visando a realização de um ensaio piloto para começarmos a responder a estas questões, estabelecemos uma colaboração com a Dra. Simone Calderano (Instituto Butantan) para realização de um *knock-in* episomal em *T. cruzi* (CL Brener).

Conseguimos realizar a subclonagem de BsPP-IP5K no vetor pTEX (utilizado para transfecções em *T. cruzi*) e a transfecção foi realizada com sucesso. Porém, após obtenção da linhagem policlonal, não conseguimos identificar expressão de BsPP-IP5K (~55 kDa) utilizando anticorpo α -HA, haja visto que BsPP-IP5K foi sintetizada e clonada com cauda 3xHA (Figura 13).

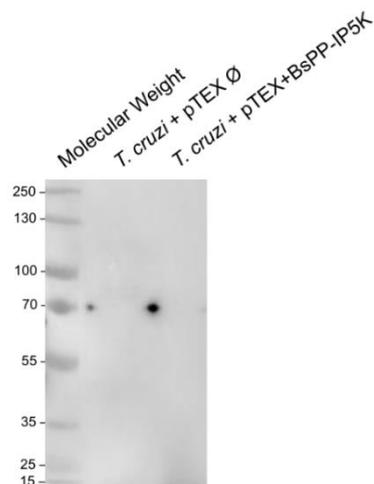


Figura 13. Western blotting utilizando extrato proteico total de *T. cruzi* pTEX_Ø e pTEX+BsPP-IP5K. As amostras proteicas foram separadas em 10% SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas Amersham Protran. A membrana foi revelada utilizando α -HA de acordo com as especificações do fabricante. De nota, de acordo com análise utilizando a ferramenta ProtParam (Expasy), BsPP-IP5K possui 484 aa, PI = 5.3 e ~55 kDa.

Ainda não conseguimos explicar este resultado e estamos realizando outros ensaios (PCR, RT-PCR e qPCR) para confirmar que, de fato, BsPP-IP5K não está sendo expressa. A realização de um controle positivo para eliminar a possibilidade de o anticorpo α -HA não estar funcionando também está sendo realizada. Deste modo, e para economizarmos tempo, resolvemos realizar uma abordagem similar utilizando *L. braziliensis*.

Mutagênese sítio-dirigida de BsPP-IP5K

Utilizando como base a lista de resíduos de aminoácidos essenciais para a catálise de IP₈ preditos durante nossas análises *in silico* (Figura 11), resolvemos realizar ensaios de mutagênese sítio-dirigida para converter (inicialmente) os resíduos de lisina 203 e lisina 204 para resíduos de glicina (K203G, K204G). Para isso, desenhamos primers específicos (Tabela 1) e utilizamos o kit Q5 Site-Directed Mutagenesis (ver material e métodos) (Figura 14).

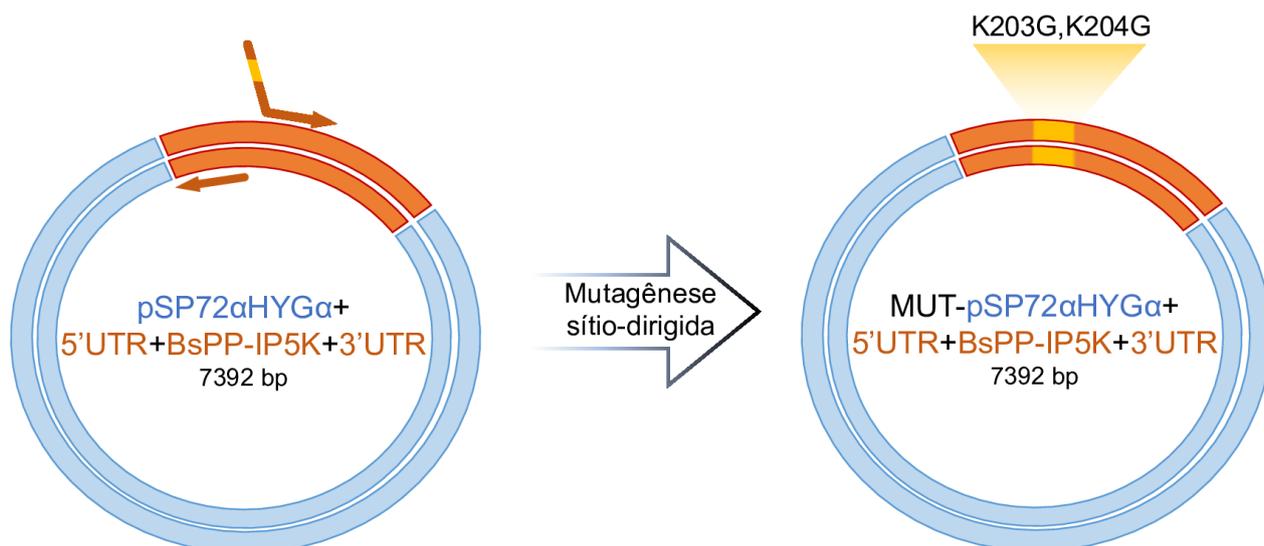


Figura 14. Esquema ilustrando a abordagem mutagênese sítio-dirigida. Inicialmente desenhamos primers mutagênicos que, após extensão utilizando uma DNA polimerase de alta fidelidade e eliminação das seqüências originais, geram uma seqüência PP-IP5K mutada, convertendo os resíduos de lisina 203 e lisina 204 para resíduos de glicina (K203G, K204G). O plasmídeo pSP72αHYGα está representado em azul, a seqüência 5'UTR+BsPP-IP5K+3'UTR está representada em laranja e os resíduos mutados estão representados em amarelo no esquema.

Atualmente estamos sequenciando os plasmídeos para confirmação das mutações inseridas. Os plasmídeos mutados serão utilizados durante o *knock-in* episomal em *L. braziliensis*, onde espera-se reversão do possível fenótipo observado após introdução da BsPP-IP5K. Futuramente pretendemos mutar outros resíduos essenciais evidenciados pelas análises *in silico*.

Knock-in* episomal em *L. braziliensis

Com o intuito de futuramente realizarmos ensaios de infecção para responder questões levantadas anteriormente, e como eventualmente não obtivemos sucesso na transfecção de *T. cruzi*, realizamos a construção do inserto para ser ligado ao vetor pSP72-αHYGα (vetor para transfecção em *Leishmania*). Como tripanosomatídeos não possuem promotores gênicos individuais, o controle da expressão gênica ocorre prioritariamente de forma pós-transcricional, com grande influência das regiões UTRs (Clayton, 2019). Embora o plasmídeo pSP72-αHYGα já possua regiões UTRs de α-tubulina de *Leishmania* sp., resolvemos adicionar as regiões 3' e 5' UTRs do *housekeeping* gene GAPDH de *L. braziliensis* para garantir a expressão constitutiva de BsPP-IP5K.

Desta maneira, desenhamos *primers* (Tabela 1) contendo sítios para enzimas de restrição específicas para posterior subclonagem direcional. Em seguida, realizamos amplificação por PCR das regiões 5'UTR e 3'UTR GAPDH diretamente do genoma de *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903, cepa que foi utilizada para estes ensaios. Realizamos então a ligação destes *amplicons* em vetor de

clonagem para aumento do número de cópias e, após recuperar o plasmídeo contendo o inserto, realizamos as devidas digestões para posterior subclonagem (Figura 15).

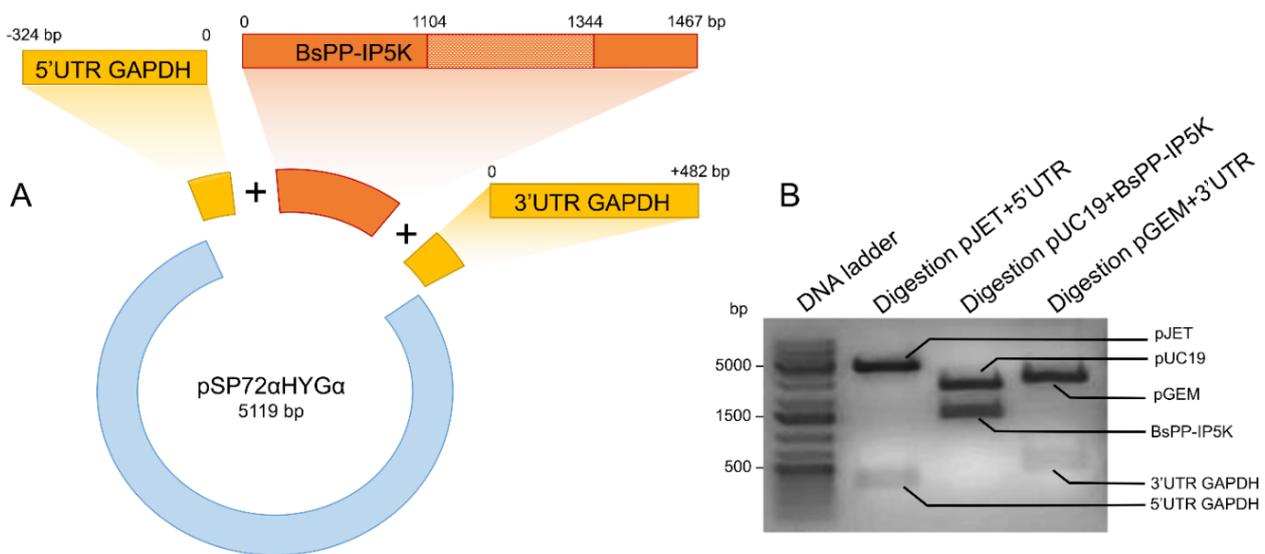


Figura 15. Estratégia utilizada para realização de knock-in episomal em *L. braziliensis*. A. Esquema ilustrando os detalhes da construção pSP72 α HYG α +5'UTR+BSP-IP5K+3'UTR, a tonalidade mais fraca de laranja corresponde a região que estaria presente a sequência que codifica para o domínio catalítico da proteína. B. Gel de agarose 1% evidenciando as amostras (após digestão com enzimas específicas) dos fragmentos gênicos que serão utilizados na construção pSP72 α HYG α +5'UTR+BSP-IP5K+3'UTR.

Os fragmentos 5' e 3' UTRs, (324 e 482 bp respectivamente) foram amplificados com *primers* contendo sítios de restrição para XbaI e HindIII (5'UTR) e XhoI e SbfI (3'UTR). De nota, os sítios XbaI e SbfI serão utilizados para ligação da construção 5'UTR+BSP-IP5K+3'UTR no vetor pSP72 α HYG α , enquanto HindIII e XhoI serão utilizadas para ligação direta das sequências UTRs à BSP-IP5K. Esse mesmo procedimento foi realizado para construção contendo a BSP-IP5K mutada (K203G, K204G).

Deste modo, para as análises foram gerados 4 grupos transfectados: WT, que foi eletroporado sem adição da construção para simular o mesmo estresse dos outros grupos; pSP72 α HYG α , que recebeu o vetor vazio; BSP-IP5K que recebeu o gene de PP-IP5K de *B. saltans*; e BSP-IP5K (K203G, K204G), que foi transfectado com a construção do gene mutado. Após passado o tempo de recuperação, realizamos a seleção clonal.

Para confirmação da presença ou ausência do gene de BSP-IP5K nos grupos analisados, foi feita uma PCR convencional a partir da extração plasmidial e genômica. Como é possível observar na Figura 16, clones dos grupos BSP-IP5K e BSP-IP5K (K203G,K204G) apresentaram bandas correspondentes a construção de 2273 bp (BSP-IP5K), enquanto para WT e pSP72 α HYG α não apresentam o mesmo *amplicon*.



Figura 16. Confirmação de BsPP-IP5K em *L. braziliensis* transfectadas. Visualização do amplicon de 2273 bp nos grupos BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G) e ausência no grupo WT e pSP72 α HYG α . Gel de agarose 1% corado com Syber safe. DNA ladder corresponde ao marcador de peso molecular (1 Kb plus, ThermoScientific).

Também fizemos RT-PCRs com os clones para confirmar a expressão de BsPP-IP5K. Porém, os ensaios foram inconclusivos, sendo necessário uma investigação mais aprofundada para entender os resultados. Contudo, uma vez que evidenciamos a presença da BsPP-IP5K via PCR convencional, decidimos dar prosseguimento para caracterização das linhagens geradas.

Crescimento e ciclo celular não apresentam alterações na presença de BsPP-IP5K

Para caracterização das linhagens geradas, foram realizados ensaios de curva de crescimento para analisar se a proliferação teria alguma alteração na presença do gene de BsPP-IP5K. Como é possível visualizar na Figura 17, os grupos de BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203, K204G) não apresentam alteração estatisticamente significativa em relação ao WT e pSP72 α HYG α . Também é importante salientar que não houve diferença entre esses dois últimos grupos.

Todos os grupos apresentaram os mesmos padrões para a curva de crescimento: fase exponencial se iniciando a partir do segundo dia, atingindo a fase estacionária por volta do sétimo dia e o declínio populacional ocorrendo a partir do nono dia.

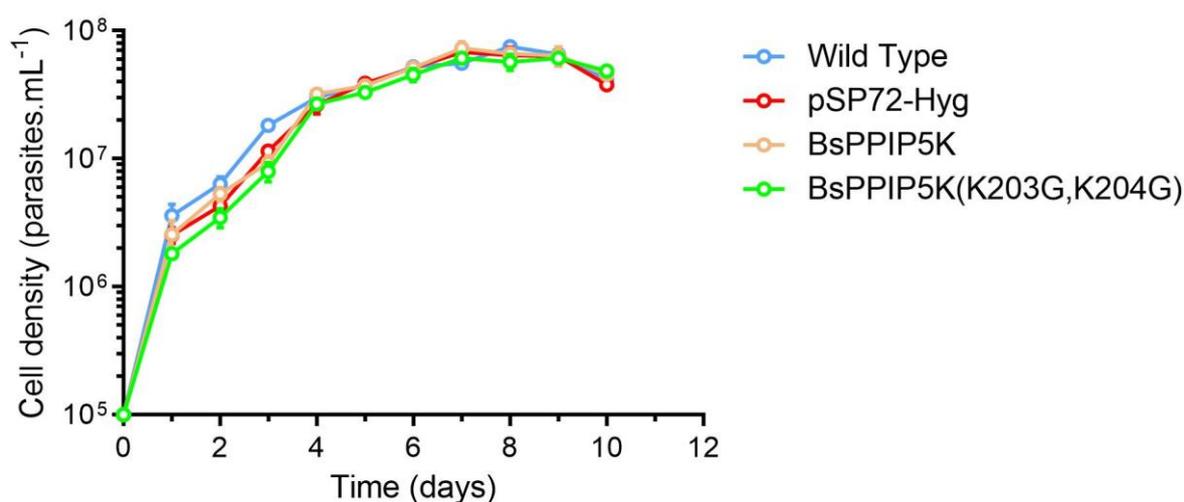


Figura 17. Curva de crescimento de clones WT, pSP72 α HYG α , BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G). As curvas foram montadas após contagem diária (a cada 24 h) em câmara de Neubauer. Este ensaio foi realizado em triplicata biológica. O gráfico foi montado utilizando-se o software GraphPad Prism, v8.0.2.

Durante a curva de crescimento, coletamos (concomitantemente à análise do número de células) $\sim 5 \times 10^7$ parasitos totais para análise do perfil do conteúdo de DNA. A coleta dessas amostras foi realizada no 2°, 3° e 4° dia da curva de crescimento. Curiosamente, não detectamos diferenças no perfil do conteúdo de DNA entre os grupos analisados (Figura 18).

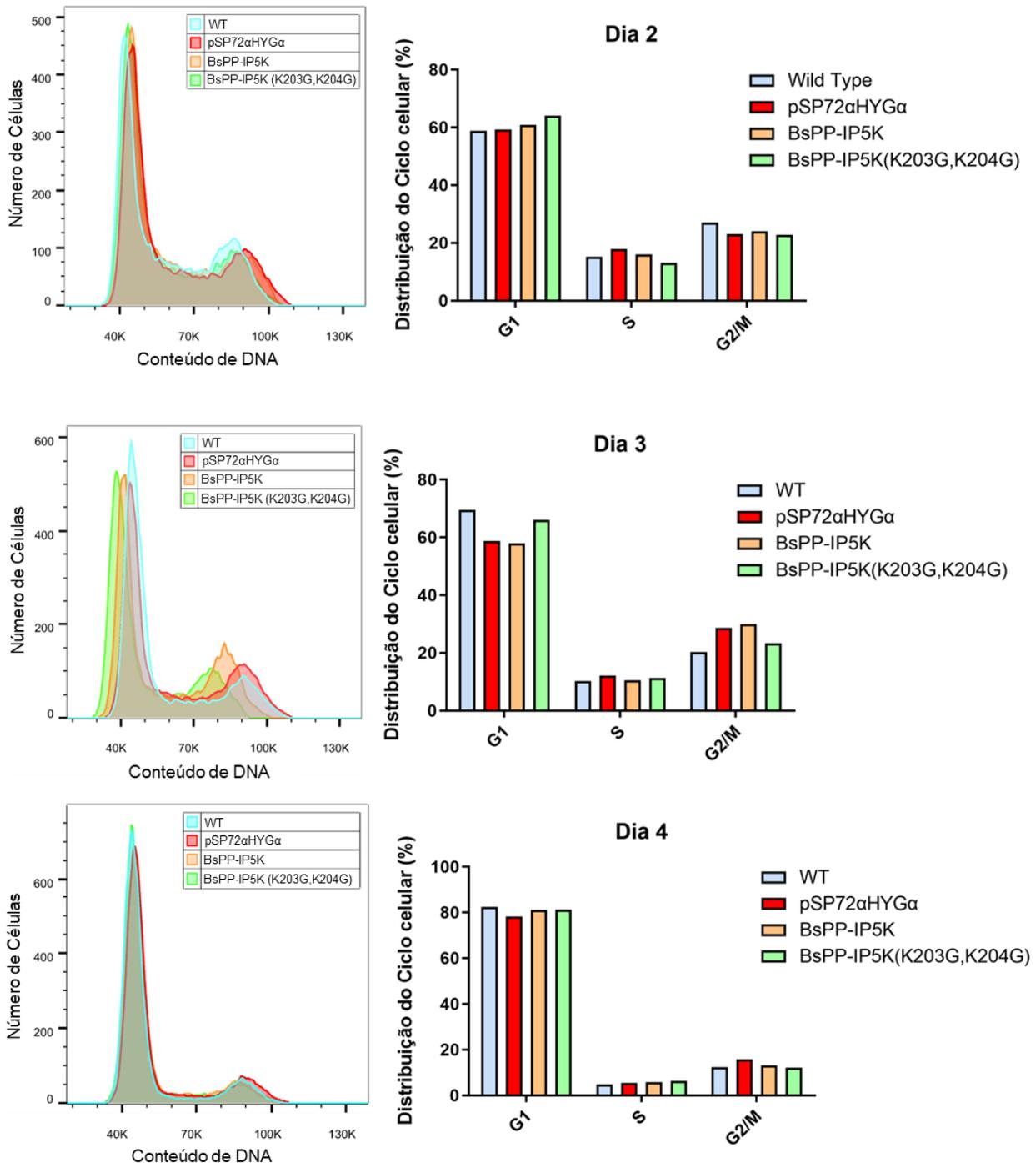


Figura 18. Perfil do conteúdo de DNA das linhagens WT, pSP72αHYGα, BsPP-IP5K e BsPP-IP5K (K203G, K204G) na fase exponencial de crescimento. Foram coletados parasitos de culturas em fase exponencial durante o 2°, 3° e 4° dias da curva de crescimento. Para determinação das fases do ciclo celular, os parasitos foram fixados em metanol e o conteúdo de DNA foi corado com iodeto de propídeo. Analisamos 20000 células para cada amostra. Os histogramas foram montados utilizando-se o software FlowJo v.10.6.5 e os gráficos foram montados utilizando-se o software GraphPad Prism v.8.0.2.

Expressão da BsPP-IP5K em sistema bacteriano

Além de investigarmos os possíveis fenótipos emergentes em decorrência da presença de BsPP-IP5K em tripanosomatídeos (*T. cruzi* ou *L. braziliensis*), também resolvemos caracterizar biofísicamente e bioquimicamente a quinase BsPP-IP5K, contribuindo assim para validação de nossas análises *in silico*. Para isso, subclonamos a BsPP-IP5K no vetor de expressão pET28a+ e transformamos esta construção em diferentes cepas de *E. coli* (Shilling et al., 2020) para realização de expressão heteróloga em sistema bacteriano. Este sistema demonstra ser adequado, já que apresenta baixo custo e alta eficiência (Jia e Jeon, 2016). A Figura 19 apresenta géis de agarose evidenciando as diferentes digestões confirmatórias das construções realizadas.

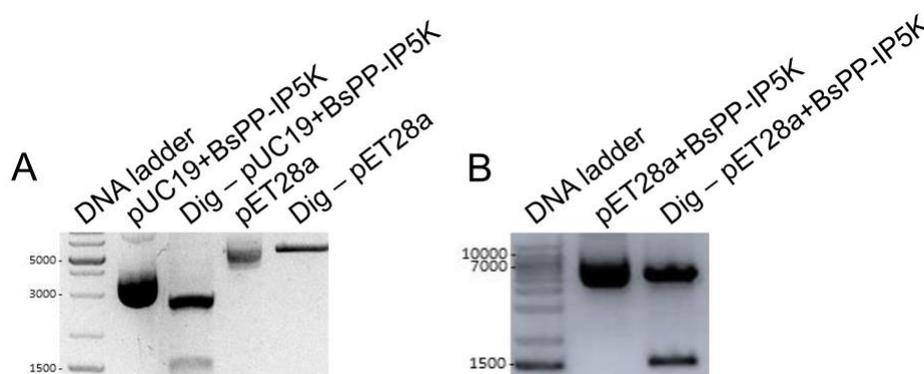


Figura 19. Construções realizadas visando a subclonagem de BsPP-IP5K em vetor de expressão pET28a+. A. Visualização das digestões pUC19+BsPP-IP5K e pET-28a+ utilizando as enzimas XhoI e HindIII. B. Confirmação da subclonagem de BsPP-IP5K no pET28a+. Gel de agarose 1% corado com Syber safe. DNA ladder corresponde ao marcador de peso molecular (1 Kb plus, ThermoScientific).

A construção pUC19+BsPP-IP5K foi digerida com as enzimas de restrição XhoI e HindIII, gerando um fragmento de 1467 bp e em seguida inserido no pET-28a previamente digerido pelas mesmas enzimas, permitindo assim uma clonagem direcional. A construção pET28+BsPP-IP5K foi inicialmente inserida por transformação em *E. coli* BL21 DE3 codon plus para realização dos testes de expressão.

Utilizamos 1 mM de IPTG para indução da expressão gênica por 0, 1, 2, 3, 4 h e *overnight*. Posteriormente, as amostras coletadas foram submetidas a processo de sonicação (lise bacteriana) para obtenção do extrato proteico das frações solúveis e insolúveis. Infelizmente, após visualização em SDS-PAGE 10%, não obtivemos resultados satisfatórios para a expressão da BsPP-IP5K (Figura 20).

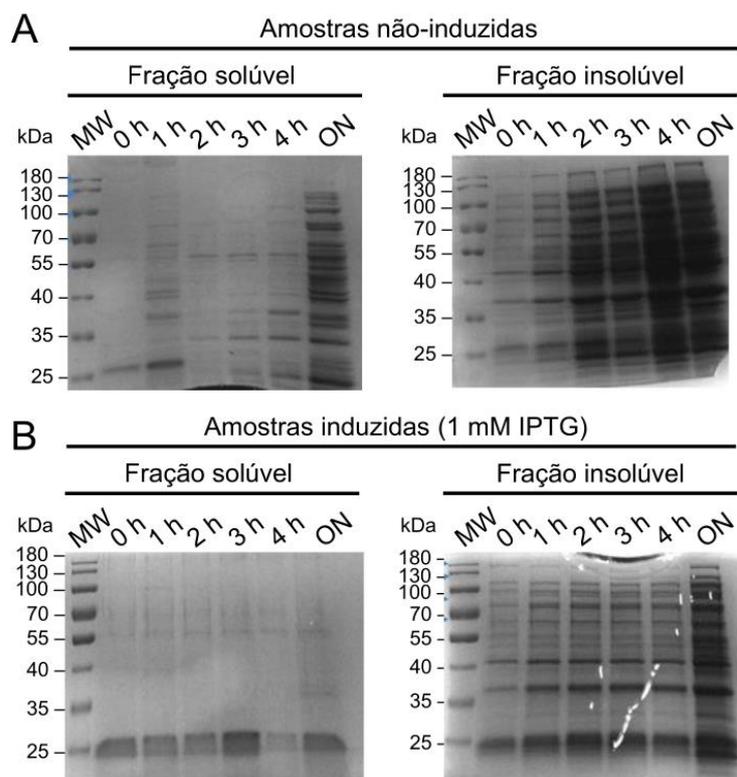


Figura 20. Teste de expressão BsPP-IP5K em BL21 DE3 RP codon plus . Extratos proteicos foram obtidos após lise bacteriana por sonicação. As amostras foram coletadas após 1, 2, 3, 4 h e overnight sem indução (**A**), ou induzido com 1 mM IPTG (**B**). As amostras proteicas foram separadas em gel 10% SDS-PAGE e corado com solução 0,1% Coomassie Blue. As siglas MW e ON correspondem, respectivamente, molecular weight (peso molecular) e overnight (ensaio realizado de um dia para o outro, i.e.: ~16 h).

Assim, realizamos uma segunda tentativa utilizando uma cepa de *E. coli* diferente da anterior (BL21 PlysS). Seguimos a mesma metodologia descrita anteriormente. Nesta tentativa, obtivemos uma banda que poderia ser indicação de uma expressão heteróloga da BsPP-IP5K (massa molecular estimada ~55 kDa) (Figura 21B).

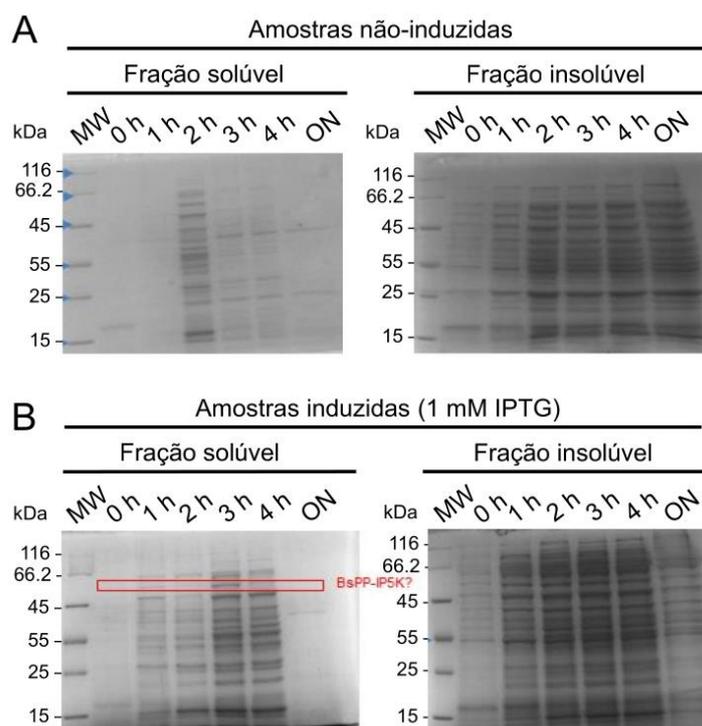


Figura 21. Teste de expressão BsPP-IP5K em BL21 DE3 PLYS. Extratos proteicos foram obtidos após lise bacteriana por sonicação. As amostras foram coletadas após 1, 2, 3, 4 h e overnight sem indução (A), ou induzido com 1 mM IPTG (B). As amostras proteicas foram separadas em gel 10% SDS-PAGE e corado com solução 0,1% Coomassie Blue. As siglas MW e ON correspondem, respectivamente, molecular weight (massa molecular) e overnight (ensaio realizado de um dia para o outro, i.e.: ~16 h).

Com a possibilidade de a BsPP-IP5K ter sido expressa, iniciamos o protocolo de Western Blotting. O sistema pET28 permite a expressão gênica em fusão a seis resíduos de histidina (6xHis), região essa suscetível a ser reconhecida pelo anticorpo comercial anti-HisTag. Porém, após realização de Western Blot utilizando o anticorpo α -HisTag, não conseguimos identificar bandas que confirmassem sucesso na expressão da BsPP-IP5K (Figura 22).

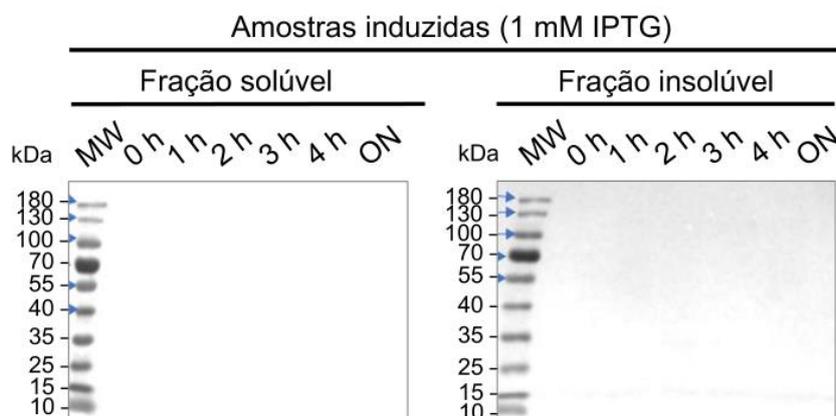


Figura 22. Ensaio Western blot não detectou a expressão de BsPP-IP5K. As amostras coletadas após 1, 2, 3, 4 h e overnight após indução com 1 mM IPTG foram aplicadas em 10% SDS-PAGE e posteriormente transferidas para membranas de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo primário α -Histag (rabbit), secundário α -rabbit conjugado com peroxidase e revelada com reagente ECL Prime WB Detection Reagent.

Devido a este insucesso, decidimos remover o sítio para TEV protease e a cauda de HA adicionadas durante a síntese do gene BsPP-IP5K. Nossa hipótese é que estes sítios adicionais poderiam estar, de alguma maneira, atrapalhando o processo traducional e/ou enovelamento de BsPP-IP5K. Para isso, desenhamos novos primers para amplificação apenas do gene BsPP-IP5K (Tabela 1). Contudo, mesmo após a remoção destes sítios, não observamos expressão de BsPP-IP5K (dados não mostrados).

Ponderamos também a possibilidade da temperatura de 37 °C estar prejudicando a expressão de BsPP-IP5K. Levantamos esta hipótese, pois a temperatura ambiental do habitat do *B. saltans* é ~20 °C. Assim, realizamos ensaios utilizando a cepa de *E. coli* ArticExpress RIL, que é capaz de realizar expressões de proteínas exógenas em baixas temperaturas (~ 4 °C). Para estes testes, usamos a BsPP-IP5K com e sem os sítios TEV protease+etiqueta HA. Novamente, não obtivemos sucesso nos ensaios de expressão da BsPP-IP5K a 4 °C (dados não mostrados).

Por fim, redesenhamos *primers* para substituir o vetor pET28a+ pelo vetor pET32a. Após realização das devidas subclonagens utilizando BsPP-IP5K com e sem os sítios TEV protease+etiqueta HA, realizamos ensaios de expressão (a 37 °C) e, novamente, não conseguimos observar a expressão de BsPP-IP5K (dados não mostrados).

Deste modo, momentaneamente, suspendemos as tentativas de expressão de BsPP-IP5K utilizando sistema heterólogo bacteriano. Pretendemos, no futuro, investigar as razões pela qual BsPP-IP5K não é expressa em sistema bacteriano.

6. DISCUSSÃO

Este trabalho evidencia de maneira inédita a ausência de ortólogos para a quinase PP-IP5K na família Trypanosomatidae. Curiosamente, encontramos o resquício de uma sequência homóloga que possui o domínio incompleto dessa quinase em *P. confusum*. Considerando que este é um tripanosomatídeo de uma linhagem basal dentro do grupo Euglenozoa (Flegontov et al., 2013), este achado sugere que ao longo da evolução, provavelmente durante a transição de um estilo de vida livre para parasitário, houve a perda de PP-IP5K.

Protozoários parasitas podem reter enzimas vestigiais, ou até mesmo vias metabólicas completas, não-funcionais por se aproveitarem do metabolismo do hospedeiro para suprirem suas necessidades metabólicas. Por exemplo, *Plasmodium falciparum* possui a via de biossíntese do grupo heme retida e até funcionalmente ativa, porém, quando no estágio intracelular no hospedeiro, esse parasita utiliza do mesmo para complementar sua necessidade metabólica relacionada a esta via (Sigala et al., 2015).

Vale ressaltar também que, em comparação com *B. saltans*, o genoma dos tripanosomatídeos perderam cerca 50% dos genes codificadores de proteínas durante a transição do estilo de vida livre para parasitário (Opperdoes et al., 2016). Como exemplo, podemos citar o gene codificador para catalase, importante enzima do sistema de defesa antioxidante contra espécies reativas de oxigênio (ausente na maioria dos tripanosomatídeos). Embora haja exceções para os gêneros monoxênicos (triplanosomatídeos que possuem um único hospedeiro), elas se justificam, pois muito provavelmente este grupo obteve uma catalase advinda de bactérias através de transferência lateral de genes (Opperdoes et al., 2016). Curiosamente, em *Trypanosoma brucei*, a ausência desta enzima (catalase) está associada com a proliferação e capacidade infectiva. Usando a técnica de CRISPR/Cas, pesquisadores inseriram o gene da catalase humana neste parasita (*knock-in*) e observaram que o parasito teve sua patogenicidade comprometida, levando a uma redução na parasitemia em camundongos (Horáková et al., 2020). Estas evidências suportam a hipótese de que a presença de PP-IP5K possa ser mutuamente exclusiva em relação ao parasitismo dentro do grupo kinetoplastida.

Nossos resultados sugerem que a PP-IP5K é uma quinase conservada em diversos clados, talvez por fazer parte de uma via metabólica responsável pela sinalização de diversos processos celulares (Morrison et al., 2001; Saiardi et al., 2004; Nagata et al., 2005; Choi et al., 2007; Jadav et al., 2013; Rao et al., 2014). A partir de banco de dados públicos, conseguimos identificar uma sequência hipotética de 448 aminoácidos para PP-IP5K no protozoário *B. saltans* (família Bodonidae). Esta sequência possui os domínios C-terminal HP2 phosphatase domain e N-terminal RimK/ATP-grasp kinase domain, os quais são fundamentais para coordenação do IP₇ e ATP, respectivamente (Laha et al., 2015; Benjamin et al., 2022). Contudo, notamos a ausência do domínio que coordena o magnésio e isso poderia potencialmente comprometer a capacidade de interação da BsPP-IP5K com o ATP (Wang et al., 2011). Essas particularidades são indicadores de que, possivelmente, a eficiência na catálise de IP₈ realizada por BsPP-IP5K seja influenciada pela temperatura (20 °C e 26 °C), o que poderia justificar a presença e/ou ausência de homólogos de PP-IP5K em grupos filogenéticos tão diversos (Figura 6). Ainda assim, nossas predições demonstraram uma elevada estabilidade nas interações entre BsPP-IP5K e seus substratos/cofatores, algo similar ao observado em estudos anteriores de dinâmica molecular com a PP-IP5K2 humana (An et al., 2019). Os mapas de interações gerado para BsPP-IP5K se assemelha bastante ao que é encontrado em humanos (PP-IP5K2), indicando a conservação deste domínio e possível funcionalidade nas temperaturas analisadas. Isso era esperado, pois como já visto em outras PP-IP5Ks, este grupo de enzimas é bastante conservado dentro do domínio Eukarya (Rosenbach et al., 2021). Isto reforça novamente que BsPP-IP5K é uma enzima potencialmente funcional. De modo geral, mais estudos são necessários para correlacionar o ‘ponto de inflexão de temperatura’ gerado durante a transição de vida-livre para um estilo de vida parasitário (nos kinetoplastidas) e a função de PP-IP5K.

Referente a proliferação e progressão do ciclo celular das linhagens analisadas, não visualizamos quaisquer alterações significativas quando comparado aos grupos controles (WT e/ou plasmídeo vazio). A PP-IP5K já foi associada com controle da proliferação em células tumorais HCT116, bem como células somáticas de mamíferos (Lee et al., 2020; Gu et al., 2021). Em fungos, o KO para VIP1/Asp1 (homólogo de PP-IP5K neste grupo) levou a uma menor capacidade de adaptação em situações de estresse ambiental ou colonização do hospedeiro (Lev et al., 2015; Pascual-Ortiz et al., 2018). Considerando a ampla gama de processos moleculares reportados onde os PP-IPs participam (Morrison et al., 2001; Saiardi et al., 2004; Nagata et al., 2005; Choi et al., 2007; Jadav et al., 2013; Rao et al., 2014), a atuação destes metabólitos (especialmente IP₈, sintetizado por PP-IP5K) pode variar de acordo com os organismos (Choi et al., 2007; Osada et al., 2012). Assim, uma investigação mais detalhada se faz necessária para compreendermos melhor o papel de IP₈ nos tripanosomatídeos.

Um fato curioso, e que vale a pena ser destacado, é que a maioria das quinases envolvidas na síntese dos PP-IPs são enzimas bifuncionais, podendo a mesma enzima fosforilar diferentes posições da molécula de inositol precursora (Shears et al., 2017, Mohanrao et al., 2021). Tanto em mamíferos quanto em leveduras, já foi identificada atividade de fosforilação da IP6K nas posições 1 e 5 do inositol hexaquisfosfato. A própria PP-IP5K consegue sintetizar IP₇ e este isômero (1-IP₇) pode ser novamente fosforilado pela IP6K gerando IP₈ (Shears et al., 2017, Mohanrao et al., 2021). Em *Trichomonas vaginalis*, foi caracterizada um homólogo da quinase IP6K que adiciona um grupamento pirofosfato na posição 6 do IP₆ (gerando 6-IP₇), ao contrário da reação mais comumente realizada por outros homólogos de IP6K: pirofosforilação na posição 5 (gerando 5-IP₇) (Wundenberg et al., 2018). Esta dupla funcionalidade na maioria destas quinases pode complementar a via de síntese dos inositol fosfatos/pirofosfatos, ajudando na regulação dos níveis de fosfatos inorgânicos disponíveis no citoplasma da célula (Pascual-Ortiz et al., 2021; Benjamin et al., 2022). Em tripanosomatídeos, a quinase IP6K poderia suprir a ausência de PP-IP5K e, conseqüentemente, a aparente necessidade metabólica por IP₈, uma vez que a presença deste metabólito foi reportada recentemente em *T. cruzi* (Mantilla et al., 2021). Além disso, estes organismos possuem organelas denominadas acidocalcisomas, que são reservas de fosfatos/pirofosfatos inorgânicos que podem atuar no controle da disponibilidade destes metabólitos no citoplasma (Docampo & Huang, 2022). Assim, são necessários mais estudos para verificar a possível correlação entre a perda de PP-IP5K e a função dos acidocalcisomas em tripanosomatídeos.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nossos resultados suportam a hipótese de que, possivelmente, a presença de PP-IP5K é mutuamente exclusiva em relação ao parasitismo dentro do grupo kinetoplastida. A linhagem gerada

de *L. braziliensis* expressando a PP-IP5K (*knock-in*) é um importante ponto de partida para melhor compreender a função dos PP-IPs nesse organismo e sua possível associação com virulência e patogenicidade. Futuramente, iremos quantificar os níveis de pirofosfatos de inositol nessa linhagem por HPLC e PAGE. Pretendemos também utilizar esta linhagem para realização de ensaios de infecção em células de macrófagos (humanos e murino) e, adicionalmente, realizar análises proteômicas para averiguar possíveis alterações nos níveis de proteínas comparado ao grupo controle.

Este trabalho abre possibilidade para novos estudos da atuação dos PP-IPs no parasitismo, com possibilidade da descoberta de novos alvos terapêuticos para fármacos antiparasitários. Outra eventual possibilidade é que, caso a linhagem *knock-in* para BsPP-IP5K apresente menor capacidade infectiva (infecção atenuada), será uma boa candidata para o desenvolvimento de uma vacina.

8. PLANO DE GERENCIAMENTO DE DADOS

Essa dissertação explora uma área da bioquímica e parasitologia molecular que até agora não foi estudada em detalhes. Assim, até a divulgação/publicação destes resultados, todos os dados obtidos estão sendo armazenados em cadernos de laboratório e no servidor do instituto (<https://ncc.unesp.br/gridunesp/docs/>), o que exige acesso pessoal. Posteriormente, pretendemos disponibilizar nossos dados brutos em repositórios públicos de acesso aberto, como o GitHub (<https://github.com/>).

9. REFERÊNCIAS

1. ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; LANE, C. E.; LUKES, J. et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, 59, n. 5, p. 429-493, Sep 2012.
2. ALBALAT, R.; CANESTRO, C. Evolution by gene loss. *Nat Rev Genet*, 17, n. 7, p. 379-391, Jul 2016.
3. AN, Y.; JESSEN, H. J.; WANG, H.; SHEARS, S. B. et al. Dynamics of Substrate Processing by PPIP5K2, a Versatile Catalytic Machine. *Structure*, 27, n. 6, p. 1022-1028 e1022, Jun 4 2019.
4. AVILA, C. C.; MULE, S. N.; ROSA-FERNANDES, L.; VINER, R. et al. Proteome-Wide Analysis of *Trypanosoma cruzi* Exponential and Stationary Growth Phases Reveals a Subcellular Compartment-Specific Regulation. *Genes (Basel)*, 9, n. 8, Aug 15 2018.
5. AZEVEDO, C. et al. Inositol pyrophosphate mediated pyrophosphorylation of AP3B1 regulates HIV-1 Gag release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 50, p. 21161–21166, 15 dez. 2009.
6. BENEKE, T.; MADDEN, R.; MAKIN, L.; VALLI, J. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci*, 4, n. 5, p. 170095, May 2017.
7. BENJAMIN, B.; GOLDGUR, Y.; JORK, N.; JESSEN, H. J. et al. Structures of Fission Yeast Inositol Pyrophosphate Kinase Asp1 in Ligand-Free, Substrate-Bound, and Product-Bound States. *mBio*, 13, n. 6, p. e0308722, Dec 20 2022.
8. BLACK, J. A.; REIS-CUNHA, J. L.; CRUZ, A. K.; TOSI, L. R. O. Life in plastic, it's fantastic!

How *Leishmania* exploit genome instability to shape gene expression. *Front Cell Infect Microbiol*, 13, p. 1102462, 2023.

9. BLOM, D.; DE HAAN, A.; VAN DEN BURG, J.; VAN DEN BERG, M. et al. Mitochondrial minicircles in the free-living bodonid *Bodo saltans* contain two gRNA gene cassettes and are not found in large networks. *RNA*, 6, n. 1, p. 121-135, Jan 2000.
10. BOENIGK, J.; ARNDT, H. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 1/4, p. 465–480, 2002.
11. BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol*, 106, n. 4, p. 1349-1358, Apr 1988.
12. BURTON, P.; MCBRIDE, D. J.; WILKES, J. M.; BARRY, J. D. et al. Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryot Cell*, 6, n. 10, p. 1773-1781, Oct 2007.
13. BUSSOTTI, G.; GOUZELOU, E.; CORTES BOITE, M.; KHERACHI, I. et al. *Leishmania* Genome Dynamics during Environmental Adaptation Reveal Strain-Specific Differences in Gene Copy Number Variation, Karyotype Instability, and Telomeric Amplification. *mBio*, 9, n. 6, Nov 6 2018.
14. CAPELLA-GUTIERREZ, S.; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25, n. 15, p. 1972-1973, Aug 1 2009.
15. CHATREE, S.; THONGMAEN, N.; TANTIVEJKUL, K.; SITTICHAROON, C.; VUCENIK, I. Role of Inositols and Inositol Phosphates in Energy Metabolism. *Molecules*, v. 25, n. 21, p. 5079, 1 nov. 2020.
16. CHOI, J. H.; WILLIAMS, J.; CHO, J.; FALCK, J. R. et al. Purification, sequencing, and molecular identification of a mammalian PP-InsP5 kinase that is activated when cells are exposed to hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 282, n. 42, p. 30763-30775, Oct 19 2007.
17. CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biol*, 9, n. 6, p. 190072, Jun 28 2019.
18. CORDEIRO, C. D.; SAIARDI, A.; DOCAMPO, R. The inositol pyrophosphate synthesis pathway in *Trypanosoma brucei* is linked to polyphosphate synthesis in acidocalcisomes. *Mol Microbiol*, 106, n. 2, p. 319-333, Oct 2017.
19. COSTA, F. C.; FRANCISCO, A. F.; JAYAWARDHANA, S.; CALDERANO, S. G. et al. Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9 functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. *PLoS Negl Trop Dis*, 12, n. 4, p. e0006388, Apr 2018.
20. SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. *Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids*. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2017.
21. DA SILVA, M. S.; MUNOZ, P. A. M.; ARMELIN, H. A.; ELIAS, M. C. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 64, n. 6, p. 756-770, Nov 2017.
22. DA SILVA, M. S.; PAVANI, R. S.; DAMASCENO, J. D.; MARQUES, C. A. et al. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. *Trends Parasitol*, 33, n. 11, p. 858-874, Nov 2017.
23. DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania*

- promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun*, 55, n. 11, p. 2802-2806, Nov 1987.
24. DALTON, A. C.; BARTON, W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci*, 23, n. 5, p. 517-525, May 2014.
 25. DIAS, M. H.; FONSECA, C. S.; ZEIDLER, J. D.; ALBUQUERQUE, L. L. et al. Fibroblast Growth Factor 2 lethally sensitizes cancer cells to stress-targeted therapeutic inhibitors. *Mol Oncol*, 13, n. 2, p. 290-306, Feb 2019.
 26. DOCAMPO, R.; HUANG, G. New insights into the role of acidocalcisomes in trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 69, n. 6, p. e12899, Nov 2022.
 27. EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.
 28. FLEGONTOV, P.; VOTYPKA, J.; SKALICKY, T.; LOGACHEVA, M. D. et al. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr Biol*, 23, n. 18, p. 1787-1793, Sep 23 2013.
 29. GU, C.; LIU, J.; LIU, X.; ZHANG, H. et al. Metabolic supervision by PPIP5K, an inositol pyrophosphate kinase/phosphatase, controls proliferation of the HCT116 tumor cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118, n. 10, Mar 9 2021.
 30. HORAKOVA, E.; FAKTOROVA, D.; KRAEVA, N.; KAUR, B. et al. Catalase compromises the development of the insect and mammalian stages of *Trypanosoma brucei*. *FEBS J*, 287, n. 5, p. 964-977, Mar 2020.
 31. JACKSON, A. P.; OTTO, T. D.; ASLETT, M.; ARMSTRONG, S. D. et al. Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. *Curr Biol*, 26, n. 2, p. 161-172, Jan 25 2016.
 32. JACKSON, A. P.; QUAIL, M. A.; BERRIMAN, M. Insights into the genome sequence of a free-living Kinetoplastid: *Bodo saltans* (Kinetoplastida: Euglenozoa). *BMC Genomics*, 9, p. 594, Dec 9 2008.
 33. JADAV, R. S.; CHANDURI, M. V.; SENGUPTA, S.; BHANDARI, R. Inositol pyrophosphate synthesis by inositol hexakisphosphate kinase 1 is required for homologous recombination repair. *J Biol Chem*, 288, n. 5, p. 3312-3321, Feb 1 2013.
 34. JIA, B.; JEON, C. O. High- recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biol*, 6, n. 8, Aug 2016.
 35. KOSTYGOV, A. Y., KARNKOWSKA, A.; VOTÝPKA, J.; TASHYREVA, D.; MACISZEWSKI, K.; YURCHENKO, V.; & LUKEŠ, J. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*, v. 11, n. 3, mar. 2021.
 36. KOZLOV, A. M.; DARRIBA, D.;throughput FLOURI, T.; MOREL, B. et al. RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35, n. 21, p. 4453-4455, Nov 1 2019.
 37. KRIEG, P. A.; MELTON, D. A. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol*, 155, p. 397-415, 1987.
 38. LAFFITTE, M. N.; LEPROHON, P.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res*, 5, p. 2350, 2016.
 39. LAHA, D.; JOHNEN, P.; AZEVEDO, C.; DYNOWSKI, M. et al. VIH2 Regulates the Synthesis of Inositol Pyrophosphate InsP8 and Jasmonate-Dependent Defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*,

27, n. 4, p. 1082-1097, Apr 2015.

40. LEE, S.; KIM, M. G.; AHN, H.; KIM, S. Inositol Pyrophosphates: Signaling Molecules with Pleiotropic Actions in Mammals. *Molecules*, 25, n. 9, May 8 2020.
41. MANTILLA, B. S.; AMARAL, L. D. D.; JESSEN, H. J.; DOCAMPO, R. The Inositol Pyrophosphate Biosynthetic Pathway of *Trypanosoma cruzi*. *ACS Chem Biol*, 16, n. 2, p. 283-292, Feb 19 2021.
42. MARAN, S. R.; DE LEMOS PADILHA PITTA, J. L.; DOS SANTOS VASCONCELOS, C. R.; MCDERMOTT, S. M. et al. Epitranscriptome machinery in Trypanosomatids: New players on the table? *Mol Microbiol*, 115, n. 5, p. 942-958, May 2021.
43. MITCHELL, G. C.; BAKER, J. H.; SLEIGH, M. A. Feeding of a Freshwater Flagellate, *Bodo saltans*, on Diverse Bacteria. *The Journal of Protozoology*, v. 35, n. 2, p. 219–222, maio 1988.
44. MOHANRAO, R.; MANORAMA, R.; GANGULI, S.; MADHUSUDHANAN, M. C. et al. Novel Substrates for Kinases Involved in the Biosynthesis of Inositol Pyrophosphates and Their Enhancement of ATPase Activity of a Kinase. *Molecules*, 26, n. 12, Jun 11 2021.
45. MORRISON, B. H.; BAUER, J. A.; KALVAKOLANU, D. V.; LINDNER, D. J. Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, 276, n. 27, p. 24965-24970, Jul 6 2001.
46. NAGATA, E.; LUO, H. R.; SAIARDI, A.; BAE, B. I. et al. Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J Biol Chem*, 280, n. 2, p. 1634-1640, Jan 14 2005.
47. NENAROKOVA, A.; ZAHONOVA, K.; KRASILNIKOVA, M.; GAHURA, O. et al. Causes and Effects of Loss of Classical Nonhomologous End Joining Pathway in Parasitic Eukaryotes. *mBio*, 10, n. 4, Jul 16 2019.
48. NGUYEN TRUNG, M.; FURKERT, D.; FIEDLER, D. Versatile signaling mechanisms of inositol pyrophosphates. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 70, p. 102177, 1 out. 2022.
49. OPPERDOES, F. R.; BUTENKO, A.; FLEGONTOV, P.; YURCHENKO, V. et al. Comparative Metabolism of Free-living *Bodo saltans* and Parasitic Trypanosomatids. *J Eukaryot Microbiol*, 63, n. 5, p. 657-678, Sep 2016.
50. OSADA, S.; KAGEYAMA, K.; OHNISHI, Y.; NISHIKAWA, J. et al. Inositol phosphate kinase Vip1p interacts with histone chaperone Asf1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Rep*, 39, n. 4, p. 4989-4996, Apr 2012.
51. PATTERSON, D. J.; LARSEN J. (EDS.). *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. Oxford, New York: Oxford University Press, 1992.
52. PASCUAL-ORTIZ, M.; SAIARDI, A.; WALLA, E.; JAKOPEC, V. et al. Asp1 Bifunctional Activity Modulates Spindle Function via Controlling Cellular Inositol Pyrophosphate Levels in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol*, 38, n. 9, May 1 2018.
53. PASCUAL-ORTIZ, M.; WALLA, E.; FLEIG, U.; SAIARDI, A. The PPIP5K Family Member Asp1 Controls Inorganic Polyphosphate Metabolism in *S. pombe*. *J Fungi (Basel)*, 7, n. 8, Jul 31 2021.
54. PASSOS-SILVA, D. G.; RAJAO, M. A.; NASCIMENTO DE AGUIAR, P. H.; VIEIRA-DARROCHA, J. P. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids*, 2010, p. 840768, Oct 4 2010.
55. PESESSE, X.; CHOI, K.; ZHANG, T.; SHEARS, S. B. Signaling by higher inositol polyphosphates. Synthesis of bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate ("InsP8") is selectively

activated by hyperosmotic stress. *J Biol Chem*, 279, n. 42, p. 43378-43381, Oct 15 2004.

56. RAO, F.; CHA, J.; XU, J.; XU, R. et al. Inositol pyrophosphates mediate the DNA-PK/ATM-p53 cell death pathway by regulating CK2 phosphorylation of Tti1/Tel2. *Mol Cell*, 54, n. 1, p. 119-132, Apr 10 2014.
57. RAO, F.; XU, J.; FU, C.; CHA, J. Y. et al. Inositol pyrophosphates promote tumor growth and metastasis by antagonizing liver kinase B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, n. 6, p. 1773-1778, Feb 10 2015.
58. RICO, E.; JEACOCK, L.; KOVAROVA, J.; HORN, D. Inducible high-efficiency CRISPR-Cas9-targeted gene editing and precision base editing in African trypanosomes. *Sci Rep*, 8, n. 1, p. 7960, May 21 2018.
59. SAIARDI, A.; BHANDARI, R.; RESNICK, A. C.; SNOWMAN, A. M. et al. Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science*, 306, n. 5704, p. 2101-2105, Dec 17 2004.
60. SAIARDI, A.; CAFFREY, J. J.; SNYDER, S. H.; SHEARS, S. B. The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J Biol Chem*, 275, n. 32, p. 24686-24692, Aug 11 2000.
61. SHEARS, S. B.; BAUGHMAN, B. M.; GU, C.; NAIR, V. S. et al. The significance of the 1-kinase/1-phosphatase activities of the PPIP5K family. *Adv Biol Regul*, 63, p. 98-106, Jan 2017.
62. SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol*, 7, p. 539, Oct 11 2011.
63. SIGALA, P. A.; CROWLEY, J. R.; HENDERSON, J. P.; GOLDBERG, D. E. Deconvoluting heme biosynthesis to target blood-stage malaria parasites. *Elife*, 4, Jul 14 2015.
64. SILVA, M. S. D.; VITARELLI, M. O.; SOUZA, B. F.; ELIAS, M. C. Comparative Analysis of the Minimum Number of Replication Origins in Trypanosomatids and Yeasts. *Genes (Basel)*, 11, n. 5, May 8 2020.
65. SIMPSON, A. G.; GILL, E. E.; CALLAHAN, H. A.; LITAKER, R. W. et al. Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist*, 155, n. 4, p. 407-422, Dec 2004.
66. SIMPSON, A. G.; STEVENS, J. R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol*, 22, n. 4, p. 168-174, Apr 2006.
67. TANAKA, A. K.; GORIN, P. A.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigote glycosphingolipids in macrophage infectivity. *Braz J Med Biol Res*, 40, n. 6, p. 799-806, Jun 2007.
68. TEIXEIRA, T. L.; CASTILHOS, P.; RODRIGUES, C. C.; DA SILVA, A. A. et al. Experimental evidences that P21 protein controls *Trypanosoma cruzi* replication and modulates the pathogenesis of infection. *Microb Pathog*, 135, p. 103618, Oct 2019.
69. PATTERSON, D. J.; LARSEN, J.; SYSTEMATICS ASSOCIATION. *The Biology of Free-living Heterotrophic Flagellates*. [s.l.] Clarendon Press, 1991.
70. WANG, H.; FALCK, J. R.; HALL, T. M.; SHEARS, S. B. Structural basis for an inositol pyrophosphate kinase surmounting phosphate crowding. *Nat Chem Biol*, 8, n. 1, p. 111-116, Nov 27 2011.
71. WILSON, M. S.; JESSEN, H. J.; SAIARDI, A. The inositol hexakisphosphate kinases IP6K1 and -2 regulate human cellular phosphate homeostasis, including XPR1-mediated phosphate export.

Journal of Biological Chemistry, v. 294, n. 30, p. 11597–11608, jul. 2019.

72. WUNDENBERG, T.; NALASKOWSKI, M. M.; LOSER, B.; FANICK, W. et al. A novel 6-pyrophosphorylating IP6 kinase (IP6-6K) discovered in the protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol*, 227, p. 53-63, Jan 2019.
73. YAGOUBAT, A.; CROBU, L.; BERRY, L.; KUK, N. et al. Universal highly efficient conditional knockout system in *Leishmania*, with a focus on untranscribed region preservation. *Cell Microbiol*, 22, n. 5, p. e13159, May 2020.