

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA QUINASE
INOSITOL POLIFOSFATO (IP6K) DE
*Leishmania braziliensis***

YETE GAMBARINI FERRI

ORIENTADOR: MARCELO SANTOS DA SILVA

CO-ORIENTADOR: JENNIFER ANN BLACK

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitos e Microorganismos.

**BOTUCATU – SP
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

Ferri, Yete Gambarini.

Caracterização funcional da quinase inositol polifosfato (IP6K) de *Leishmania braziliensis* / Yete Gambarini Ferri. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Marcelo Santos da Silva

Coorientador: Jennifer Ann Black

Capes: 21301000

1. *Leishmania brasiliensis*. 2. Proteínas recombinantes.
3. Difosfatos. 4. Fosfatos de Inositol.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*; Pirofosfatos de inositol; Pirofosforilação; Proteínas recombinantes; Tripanossomatídeos.

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 e recombinação homóloga (HR). No entanto, as proteínas-alvo dos PP-IPs, assim como seu mecanismo de ação, ainda não estão bem estabelecidas. IP₇ e IP₈ são sintetizados através de vias complementares que envolvem a participação das quinases IP6K e PP-IP5K. Tripanossomatídeos (e.g., *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.) possuem um gene ortólogo para IP6K, mas aparentemente não possuem ortólogos para PP-IP5K, *i.e.*, teoricamente não sintetizam IP₈, o que os torna excelentes modelos para o estudo de IP₇. Este projeto consistiu em caracterizar funcionalmente a quinase IP6K de *Leishmania braziliensis* (LbrIP6K). Além disso, também realizamos a caracterização da quinase IP5K, a qual será utilizada como controle em ensaios futuros. Para isso, realizamos análises *in silico* utilizando o banco de dados TritypDB. Encontramos os genes IP6K (LbrM.14.0340) e IP5K (LbrM.20.3290) e desenhamos primers para amplificação dos mesmos a partir do DNA genômico de *L. braziliensis*. No caso de LbrIP6K, amplificamos seu sítio catalítico (LbrIP6K*domain*). Adicionamos sítios para enzimas de restrição nas extremidades 5' de cada primer para permitir posterior subclonagem direcional. Os produtos de PCR (*amplicons*) foram purificados, clonados em vetor de clonagem, inseridos por transformação em bactérias competentes *E. coli*, selecionados na presença de X-gal/IPTG, multiplicados e recuperados através de extração plasmidial. Realizamos a confirmação da clonagem por PCR e digestões enzimáticas. Em seguida, LbrIP6K*domain* e LbrIP5K foram excisados do plasmídeo utilizando enzimas de restrição específicas e subclonados direcionalmente no vetor de expressão pET28a+. O produto desta ligação foi transformado em bactérias competentes *E. coli* (cepas BL21-CódonPlus (DE3)-RP e Arctic Express RIL) para posterior expressão induzida por IPTG. As expressões de LbrIP6K*domain* e LbrIP5K foram analisadas em SDS-PAGE e confirmada por Western Blot utilizando anticorpos α -His-Tag. Os resultados demonstraram que essas quinases são expressas na fração insolúvel do extrato bacteriano quando lisadas utilizando sonicação. Porém, ao lisar as células por alta pressão (*French-press*), conseguimos solubilizá-las parcialmente. Após isso, realizamos a purificação das proteínas pelo método de cromatografia de alta afinidade por metal imobilizado (IMAC) e confirmamos a eluição de ambas proteínas recombinantes por SDS-PAGE e Western Blot.

Palavras-chaves: Pirofosfatos de inositol, pirofosforilação, proteínas recombinantes, *Leishmania braziliensis*, tripanossomatídeos.

ABSTRACT

In model eukaryotes, inositol pyrophosphates (PP-IPs) – mainly the so-called IP₇ and IP₈ – are involved in a wide range of cellular processes, such as regulation of telomere length and homologous recombination (HR). However, the target proteins of PP-IPs and their mechanism of action are not yet well established. IP₇ and IP₈ are synthesized through complementary pathways involving the participation of IP6K and PP-IP5K kinases. Trypanosomatids (e.g., *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp.) have an orthologous gene for IP6K, but apparently do not have orthologs for PP-IP5K, *i.e.*, they do not synthesize IP₈, which makes them excellent models for studying IP₇. This project consisted of functionally characterizing the recombinant IP6K kinase from *Leishmania braziliensis* (LbrIP6K). Also, we performed the characterization of the IP5K kinase, which will be used as a control in future assays. For this, we performed *in silico* analyzes using the TriTrypDB database. We found the IP6K (LbrM.14.0340) and IP5K (LbrM.20.3290) genes and designed primers to amplify them from the genomic DNA of *L. braziliensis*. In the case of LbrIP6K, we amplified its catalytic site (LbrIP6K*domain*). Restriction enzyme sites were added at the 5' ends of each primer to allow further directional subcloning. The amplicons were purified, cloned into a cloning vector, transformed into competent *E. coli* cells, selected in the presence of X-gal/IPTG, and recovered by plasmid extraction. The cloning process was confirmed by PCR and enzymatic digestion. Then, LbrIP6K*domain* and LbrIP5K were excised from the plasmid using specific restriction enzymes and directionally subcloned into the pET28a+ expression vector. The product of this ligation was transformed into competent *E. coli* cells (strains BL21-CodonPlus (DE3)-RP and Arctic Express RIL) for further induced expression. LbrIP6K*domain* and LbrIP5K expression levels were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot using α -His-Tag antibody. The results obtained showed that these kinases are expressed in the insoluble fraction of the bacterial extract when the cells are lysed using sonication. However, when using a high-pressure method of lysis (*French-press*), it was possible to partially solubilize them. Finally, we purified the proteins by the immobilized metal high-affinity chromatography (IMAC) method and confirmed the elution of both recombinant proteins by SDS-PAGE and Western Blot.

Keywords: Inositol pyrophosphates, phosphorylation, recombinant proteins, *Leishmania braziliensis*, trypanosomatids.

ABREVIACES

ALT - Alternative Lengthening of Telomeres

HR - Homologous Recombination

IPs - Inositol Phosphates

IP₄ - Inositol Tetrakisphosphate

IP₆ - Inositol Hexakisphosphate

IP₇ - Inositol Heptakisphosphate

IP₈ - Inositol Octakisphosphate

IP5K - Inositol Pentakisphosphate Kinase

IP6K - Inositol Polyphosphate Kinase

NHEJ - Non-Homologous End Joining

PP-IP5K - Diphosphoinositol Pentakisphosphate Kinases

LISTA DE 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).....	09
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. em seus diferentes estágios de desenvolvimento...	11
Figura 3. Mapa do vetor de expressão de levedura pYES2.....	20
Figura 4. Amplificação de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K.....	21
Figura 5. Ensaio de PCR e digestão evidenciam que as clonagens de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K no vetor pGEM foram realizadas com sucesso.....	22
Figura 6. As subclonagens de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K no vetor pET28a foram realizadas com sucesso.....	22
Figura 7. LbrIP5K recombinante é aparentemente expressa em maior quantidade após 2 h de indução com 1 mM IPTG na fração insolúvel de bactérias <i>E. coli</i> BL21.....	24
Figura 8. LbrIP5K é predominantemente expressa a partir de 2 h após indução.....	24
Figura 9. LbrIP6Kdomain é predominantemente expressa a partir de 1 h após indução.....	25
Figura 10. Western blot evidenciando que LbrIP6Kdomain é expressa a partir de 1 h após indução.....	25
Figura 11. LbrIP6Kdomain é expressa na fração insolúvel do extrato bacteriano após 2 h de indução e lise por sonicação.....	26
Figura 12. LbrIP5K é aparentemente expressa em ambas frações (insolúvel e solúvel) do extrato de <i>E. coli</i> Arctic Express RIL, após lise por sonicação.....	27
Figura 13. LbrIP6Kdomain é aparentemente expressa na fração insolúvel de <i>E. coli</i> Arctic Express RIL, após lise por sonicação.....	27
Figura 14. LbrIP6Kdomain é expressa na fração insolúvel e LbrIP5K é expressa em ambas frações (solúvel e insolúvel) do extrato bacteriano de <i>E. coli</i> Arctic Express RIL após lise por French-press.....	29
Figura 15. LbrIP6Kdomain e LbrIP5K são parcialmente expressas na fração solúvel do extrato bacteriano lisado utilizando o método <i>French Press</i>	30
Figura 16. Solubilidade de LbrIP6Kdomain recombinante utilizando diferentes concentrações de Ureia.....	31
Figura 17. Análise da expressão e solubilidade de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K em <i>E. coli</i> Arctic Express RIL lisadas por <i>French-press</i> (volume 5 L).....	33
Figura 18. Análise da purificação de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K utilizando o método de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC).....	34
Figura 19. Comparação entre IP6K de <i>L. braziliensis</i> (LbrIP6K) e seus homólogos em <i>E.</i>	

<i>histolytica</i> (EIP6K) e <i>Homo sapiens</i> (HsIP6K2).....	36
Figura 20. Análise <i>in silico</i> de LbrIP6K.....	37
Figura 21. LbrIP6K foi clonada com sucesso no vetor pYES2.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i> elaborados para amplificação dos genes IP6K (LbrM.14.0340) e IP5K (LbrM.20.3290).....	13
Tabela 2. <i>Primers</i> elaborados para amplificação do gene LbrIP6K (LbrM.14.0340) para posterior subclonagem em vetor de expressão de levedura pYES2.....	20
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de LbrIP5K e LbrIP6K <i>domain</i> obtidos através do software ExPASy ProtParam.....	23

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Cultivo de <i>Leishmania braziliensis</i>	13
3.2 Extração de DNA genômico de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	13
3.3 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes LbrIP6K e LbrIP5K	13
3.4 Clonagem e subclonagem em vetor de expressão bacteriano pET28a+	14
3.4.1 Sequenciamento	15
3.5 Expressão em sistema heterólogo bacteriano utilizando pET28a+	15
3.6 Lise bacteriana e solubilização de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K	17
3.6.1 Lise bacteriana por sonicação e tentativa de solubilização com ureia	17
3.6.2 Lise bacteriana por alta pressão (French Press)	18
3.7 Purificação e quantificação de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K.....	18
3.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	19
3.9 Predições estruturais de LbrIP6K	19
3.10 Ensaio de complementação em levedura	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação de IP6Kdomain e LbrIP5K.....	21
4.2 Análises preliminares e primeiras tentativas de expressão das quinases LbrIP5K e IP6Kdomain em sistema heterólogo bacteriano e lise por sonicação	23
4.2.1 Expressão em <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus (DE3)-RP	23
4.2.2 Expressão em <i>E. coli</i> Arctic Express RIL	26
4.3 Expressão das quinases LbrIP5K e IP6Kdomain em sistema heterólogo bacteriano e lise mecânica por alta pressão (<i>French-press</i>)	28
4.4 Tentativa de solubilização de LbrIP6Kdomain utilizando Ureia.....	30
4.5 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes LbrIP6Kdomain e LbrIP5K	32
4.6 Diálise e dicroísmo circular (CD).....	35
4.7 Modelagem molecular por homologia	35
4.8 Ensaio funcional de complementação em levedura <i>S. cerevisiae</i>	38
5. Conclusões.....	38
6. Agradecimentos	40
7. Referências	40

1. INTRODUÇÃO

Os pirofosfatos de inositol (PP-IPs) são um grupo especializado de moléculas solúveis que possuem moléculas de difosfato de alta energia ligadas ao seu anel de inositol (Saiardi et al., 2004; Jadav et al., 2013; Cordeiro et al., 2017). Nos eucariotos modelo, os PP-IPs melhor 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, 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). No entanto, o mecanismo de ação dos PP-IPs nas vias relacionadas ao metabolismo do DNA 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).

Tripanossomatídeos como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. (agentes etiológicos de doenças humanas e animais) possuem genes ortólogos para a quinase IP6K, mas aparentemente não possuem ortólogos para PP-IP5K, o que teoricamente prejudicaria a síntese de IP₈ (isótopo 5,6-IP₈). Contudo, um estudo recente evidenciou a presença do isótopo 1,5-IP₈ em diferentes estágios de vida de *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico da Doença de Chagas) (Mantilla et al., 2021). Cabe destacar que a quinase responsável pela síntese do isótopo 5,6-IP₈ de fato ainda não foi encontrada em tripanossomatídeos (Figura 1).

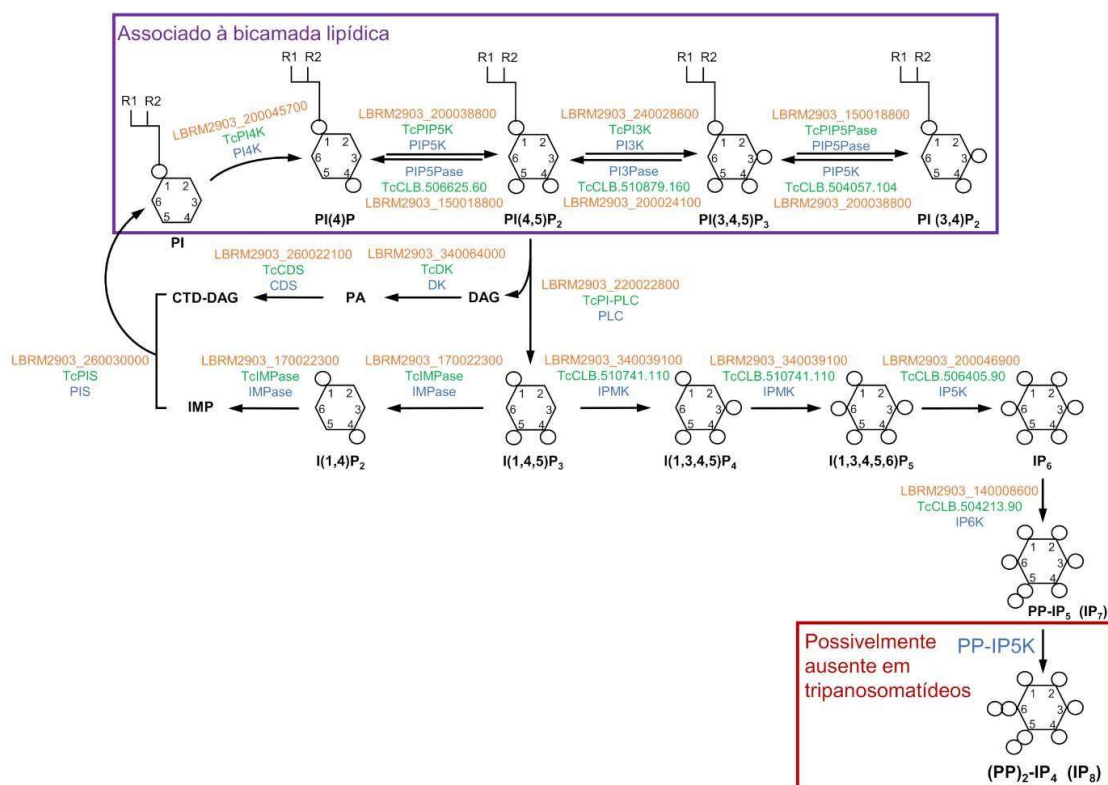


Figura 1. Possível via para a síntese de PP-IPs mostrando os principais genes ortólogos correspondentes em *T. cruzi* (verde) e *L. braziliensis* (laranja). Resumidamente, PLC (TcPI-PLC / LBRM2903_220022800) hidrolisa PI(4,5)P₂ gerando I(1,4,5)P₃. O I(1,4,5)P₃ é fosforilado por IPMK (TcCLB.510741.110 / 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.

Resumidamente, esse estudo realizado em *T. cruzi* demonstrou que as enzimas envolvidas na síntese dos fosfatos de inositol são essenciais na fase infecciosa do ciclo de vida deste parasito. Já em seu estágio multiplicativo (seja no hospedeiro invertebrado ou vertebrado), a quinase TcIPMK aparentemente não é necessária. Porém, a quinase TcIP5K demonstrou ser indispensável em todas as fases do ciclo de vida de *T. cruzi*. Além disso, as formas epimastigotas (formas multiplicativas de *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado) com TcIP6K depletada apresentaram defeitos relacionados a motilidade e proliferação (Mantilla, et al., 2021). Até o momento, não há estudos que evidenciem a dinâmica destas quinases em *Leishmania* spp.

Leishmania spp. são agentes etiológicos das leishmanioses, um conjunto de doenças com amplo espectro clínico. As leishmanioses possuem, ao menos, três formas principais: leishmaniose visceral (também conhecida como Kalazar), que apresenta uma mortalidade de aproximadamente 95% se não tratada; leishmaniose cutânea, que causa lesões cutâneas, deixando os pacientes com graves deficiências ou estigmas; e leishmaniose mucocutânea, que destroem as membranas mucosas da boca, nariz e garganta (Nazzaro et al., 2014; Burza et al., 2018). Até o momento, não existem vacinas humanas efetivas disponíveis. Além disso, os parasitos têm apresentado resistência contra medicamentos de primeira linha (antimoniais) utilizados no tratamento (Croft and Olliaro, 2011; Perez-Franco et al., 2016; Patino et al., 2019), o que torna a leishmaniose um grande problema de saúde global. Assim como *T. cruzi*, *Leishmania* spp. possui um ciclo de vida digenético (heteroxênico), ou seja, vive alternadamente em dois hospedeiros: um hospedeiro vertebrado (sendo mais comum mamíferos) e um invertebrado (inseto vetor). Nos hospedeiros mamíferos, os parasitos assumem a forma replicativa chamada amastigota (arredondada e com flagelo curto), que se multiplica obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (neutrófilos e principalmente macrófagos). À medida que as formas amastigotas se multiplicam, os macrófagos se rompem liberando parasitas que são fagocitados por outros macrófagos. As espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros dos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo) e *Phlebotomus* (no Velho Mundo). Nestes insetos, as

leishmanias vivem no meio extracelular, na luz do trato digestivo. As formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo, se diferenciam em formas flageladas replicativas chamadas promastigotas (que são morfológica e bioquimicamente distintas das amastigotas). Posteriormente, as formas promastigotas migram para a probóscide do mosquito e se diferenciam em formas infectivas não-replicativas chamadas promastigotas metacíclicos, sendo posteriormente inoculadas na corrente sanguínea dos vertebrados durante a picada. Neste momento, as formas infectivas são inoculadas na corrente sanguínea, sendo então fagocitada por neutrófilos/macrófagos e se diferenciando novamente em amastigotas (Figura 2) (da Silva and Cano, 2017; Burza et al., 2018; Assis et al., 2021).

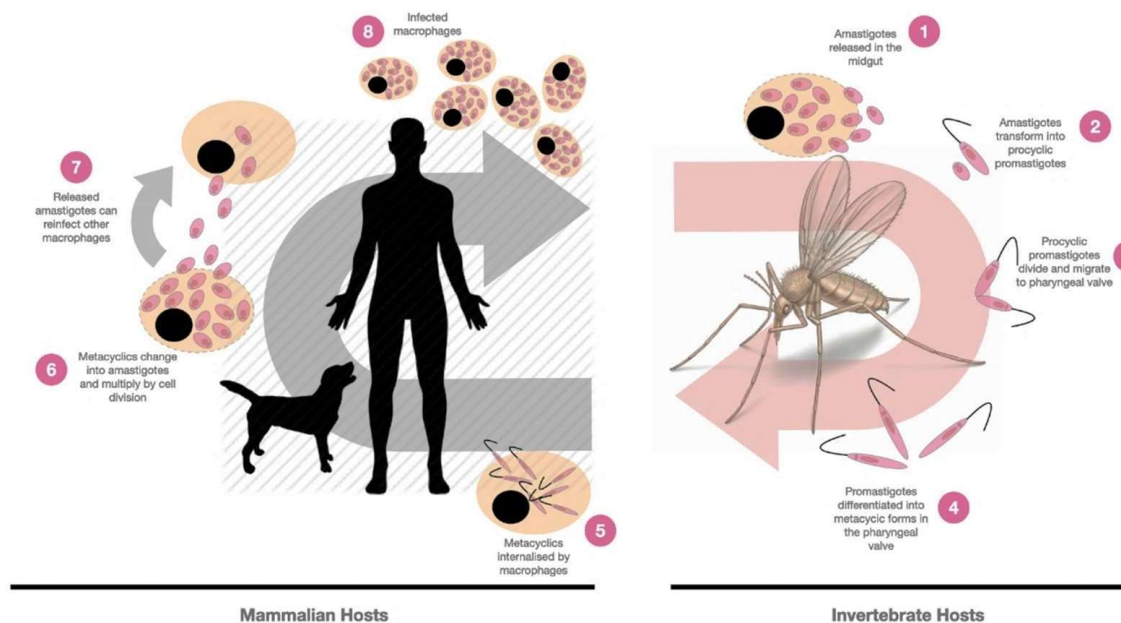


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. em seus diferentes estágios de desenvolvimento. 1. Flebotomíneos fêmeas são infectados com formas amastigotas durante o repasto sanguíneo. 2,3. Formas amastigotas do parasita se transformam em promastigotas procíclicas e se proliferam no intestino dos flebotomíneos. 4. Promastigotas então migram para a probóscide e se diferenciam em formas metacíclicas. 5. As formas metacíclicas são inoculadas nos hospedeiros mamíferos durante um novo repasto sanguíneo e infectam macrófagos e outras células do sistema fagocitário mononuclear. 6,7. Dentro dos macrófagos, os parasitas mudam das formas metacíclicas para as formas amastigotas e se multiplicam, causando a lise dos macrófagos infectados e reinfectando novos macrófagos. 8. Novos flebotomíneos ingerem os macrófagos infectados pelo parasita, ocorrendo um novo ciclo de infecção (Adaptado de Assis et al., 2021).

Leishmania spp. pertencem ao supergrupo Excavata (Adl et al., 2012) e apresentam algumas peculiaridades marcantes em relação à sua biologia molecular quando comparado aos modelos eucariotos, como a ausência praticamente absoluta de íntrons (da Silva and Cano, 2017) e o uso universal da transcrição de longos clusters policistrônicos pela RNA polimerase II (Clayton, 2019). Dentre os papéis relacionados ao metabolismo de DNA atribuído aos PP-IPs, HR destaca-se em *Leishmania* spp. principalmente por ser a mais importante via de reparo de quebras de DNA na forma dupla fita (DSBs) (da Silva, 2021), as quais podem surgir de

diferentes formas durante seu ciclo de vida, uma vez que a via de reparo NHEJ canônico é ausente (Zhang and Matlashewski, 2019). Contudo, se HR age da mesma maneira em todas as fases do ciclo celular nesse organismo é uma questão que requer investigação adicional. Além disso, a relação entre os PP-IPs e a regulação no comprimento dos telômeros é algo que vale muito a pena ser investigado em *Leishmania* spp., já que as proteínas teloméricas deste protozoário são divergentes (da Silva et al., 2010, 2017) e existe a possibilidade de uma interação compartilhada entre o reparo por HR e o mecanismo alternativo de alongamento telomérico (ALT). Essa característica levanta a questão se a homeostase telomérica em *Leishmania* é similar ou diferente quando comparada aos eucariotos modelos. Apesar dessa relevância, pouco se sabe sobre essas importantes vias e sua correlação com os PP-IPs em tripanossomatídeos, muito menos os potenciais alvos dos PP-IPs relacionados a essa via.

Até o momento, poucos estudos foram realizados sobre a investigação de pirofosfatos de inositol em tripanossomatídeos (Cordeiro et al., 2017; Mantilla et al., 2020, Mantilla et al., 2021). Um destes estudos, realizado em *T. cruzi*, identificou prováveis substratos proteicos que são pirofosforilados por IP₇ (principalmente proteínas que contém domínios o-acetil-transferase para colina/carnitina, envolvidos no metabolismo do carbono dos parasitos) (Mantilla et al., 2021). Entretanto, ainda não existem estudos correlacionando pirofosforilação mediada por PP-IPs em *Leishmania* spp., demonstrando que esta é uma área de pesquisa ainda pouco explorada.

Assim, este projeto tem como principal objetivo caracterizar funcionalmente a quinase IP6K utilizando como modelo *Leishmania braziliensis*, uma espécie endemicamente brasileira e agente etiológico da leishmaniose mucocutânea nas Américas. Com este projeto, pretendemos dar um importante passo na elucidação do papel dos PP-IPs em vias ainda desconhecidas (algumas delas possivelmente relacionada ao metabolismo de DNA). Vale destacar que a pirofosforilação por PP-IPs não é enzimática e representa um novo e ainda desconhecido mecanismo de sinalização intracelular.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho foi obter a quinase inositol polifosfato IP6K de *Leishmania braziliensis* (LbrIP6K), com foco do seu sítio catalítico (LbrIP6K_{domain}). Paralelamente, também realizamos a caracterização da quinase LbrIP5K, a qual será utilizada como controle em ensaios futuros, para a síntese de IP₆ que não é um pirofosfato de inositol, porém é um precursor na via de síntese de IP₇

2.2 Objetivos específicos

- Identificação e amplificação de LbrIP6K (LbrIP6Kdomain) e LbrIP5K a partir do DNA genômico de *L. braziliensis*;
- Clonagem dos amplicons em vetor de clonagem e transformação;
- Subclonagem em vetor de expressão e transformação;
- Expressão e purificação das proteínas recombinantes;
- Diálise e *refolding* das proteínas recombinantes purificadas;
- Confirmação do *refolding* correto utilizando dicroísmo circular (CD);

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo de *Leishmania braziliensis*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* 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.

3.2 Extração de DNA genômico de formas promastigotas de *L. braziliensis*

O DNA genômico foi extraído das formas promastigotas originadas de culturas em fase exponencial de crescimento $8.10^6 - 2.10^7$ cells.mL⁻¹. Os parasitas foram separados do meio de cultura por centrifugação e lavados em tampão PBS. Para proceder com a lise celular e posterior isolamento do DNA genômico, foi utilizado o método fenol:clorofórmio, conforme descrito em da Silva et al., 2017 (da Silva et al., 2017).

3.3 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação dos genes LbrIP6K e LbrIP5K

Após análise *in silico* utilizando o banco de dados TritypDB (tritypdb.com), os oligonucleotídeos (*primers*) foram desenhados para a amplificação dos genes LbrIP6K (LbrM.14.0340) e LbrIP5K (LbrM.20.3290) (Tabela 1), utilizando como molde o DNA genômico de formas promastigotas de *L. braziliensis*. Vale ressaltar que os primers foram elaborados com sítios para enzimas de restrição nas extremidades 5' (enzimas Nde I e Hind III), as quais estão presentes no sítio de policlonagem do vetor pET28a+ e ausentes na sequência do gene.

Tabela 1. *Primers* elaborados para amplificação dos genes LbrIP6K (LbrM.14.0340) e LbrIP5K (LbrM.20.3290)

Gene	Nome dos Primers	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Amplicom (bp)	GenBank
LbrIP5K	Lbr_IP5K_F_NdeI Lbr_IP5K_R_HindIII	CATATGGATGCCTCTTTCATTCTCTTTC TCGAAGCTTTCACGCACCCCTCTTG	1402	LbrM.20.3290
LbrIP6K	Lbr_IP6K_F_NdeI Lbr_IP6K_F2_NdeI Lbr_IP6K_R_HindIII	CATATGTCTGAGCGGACACGAGAC CATATGGATGTGCTTCGCTGCGAG AAGCTTCTACGCCAGCAGGGAG	3144 ou 720 (domínio IPK)	LbrM.140340

Primeiramente, prosseguimos com as amplificações da LbrIP6K (3144 pb) e do seu domínio (IP6K*domain*) (720 pb), além da IP5K (1402 pb) utilizando reações de PCR padrão. Nesta etapa, foram realizadas inúmeras tentativas de amplificação do gene inteiro LbrIP6K por PCR e posterior purificação do DNA para que sua clonagem fosse realizada no vetor pET28a+. Porém, não obtemos resultados satisfatórios nas tentativas de padronização da PCR e clonagem, impossibilitando que prosseguíssemos com as demais etapas para a o gene completo (LbrIP6K). Assim, decidimos primeiramente amplificar apenas o domínio contendo o sítio catalítico da LbrIP6K (IP6K*domain*) e a quinase LbrIP5K.

Para tal, as condições no termociclador utilizadas foram de 98 °C por 30 segundos, 98 °C por 10 seg, 58 °C por 30 seg para IP6K*domain* e 56 °C para IP5K, 72 °C por 1 min (repetição 35 ciclos), coma extensão final de 72 °C por 10 min e *hold* de 4 °C. O aparelho de PCR utilizado foi C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio Rad). Os amplicons obtidos correspondentes aos genes IP6K*domain* e IP5K foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X, utilizando o intercalante de DNA SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific).

Após confirmar o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos (720 bp para IP6K*domain* e 1402 bp para LbrIP5K), os amplicons foram excisados do gel e purificados utilizando o Kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de DNA foi realizada no aparelho Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek Instruments).

3.4 Clonagem e subclonagem em vetor de expressão bacteriano pET28a+

Para a realização da clonagem, foi utilizado o vetor pGEM®-T Easy VectorSystem I (Promega). Alternativamente também foi utilizado o vetor CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). A relação vetor:inserto utilizada foi calculada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O vetor de clonagem contendo o gene de interesse foi transformado em bactérias competentes *E. coli* (cepa XL1-Blue). Em seguida, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB àgar contendo ampicilina 100 µg.mL⁻¹, X-gal 40 µg.mL⁻¹ e IPTG 0,1 mM e, posteriormente, foram incubadas a 37 °C *overnight*. As colônias bacterianas que apresentaram cor branca foram selecionadas para inóculo em meio LB e posterior extração do DNA plasmidial em pequena escala utilizando o kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) de acordo com as recomendações do fabricante. Para a confirmar a clonagem, foi realizada a PCR utilizando os primers desenhados anteriormente e 1 µL do DNA plasmidial (~200 ng.µL⁻¹). As condições da PCR foram as mesmas descritas anteriormente.

Após confirmação, os genes *IP6Kdomain* e *LbrIP5K* foram excisados do respectivo vetor de clonagem utilizando as enzimas de restrição Nde I e Hind III e, posteriormente, purificados utilizando kit específico (QIAGEN). O mesmo procedimento (digestão com as enzimas de restrição Nde I e Hind III) foi realizado com o vetor de expressão pET28a+.

Por fim, realizamos a ligação (subclonagem) dos genes de interesse (*IP6Kdomain* e *IP5K*) no vetor pET28a+ e posterior transformação em bactérias *E. coli* (cepa XL1-Blue) objetivando o aumento do número de cópias plasmidiais. Após realização de extração do DNA plasmidial, confirmamos a clonagem por digestão (utilizando as enzimas Nde I e Hind III) e também por PCR (utilizando os primers descritos anteriormente).

3.4.1 Sequenciamento

As construções pET28+*IP6Kdomain* e pET28+*LbrIP5K* foram enviadas para sequenciamento junto com os *primers* utilizados na clonagem e *primers* internos. Este serviço foi realizado pela empresa Omikka.

3.5 Expressão em sistema heterólogo bacteriano utilizando pET28a+

Antes de iniciar a expressão de *LbrIP6Kdomain* e *LbrIP5K*, averiguamos *in silico* as propriedades bioquímicas utilizando a estrutura primária de cada uma dessas proteínas e o banco de dados ExPASy Protein Parameter (ProtParam) (<https://web.expasy.org/protparam/>). Obtivemos a massa molecular, ponto isoelétrico (PI), % aminoácidos e coeficiente de extinção para *LbrIP6Kdomain* e *LbrIP5K*.

Inicialmente, prosseguimos com a transformação das construções (pET28+*IP6Kdomain* e pET28+*LbrIP5K*) em bactérias *E. coli* [cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP]. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB ágar contendo 20 µL kanamicina (50 µg.mL⁻¹) e 20 µL cloranfenicol (25 µg.mL⁻¹) e incubadas a 37 °C *overnight*. Em seguida, prosseguimos com ensaios piloto realizando um pré-inóculo (5 mL) a partir de uma colônia bacteriana selecionada da placa. A incubação ocorreu a 37 °C a 1000 rpm *overnight* no equipamento Thermomixer (Eppendorf). Em seguida, utilizando um frasco erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 50 mL de meio LB com os devidos antibióticos e 5 mL do pré-inóculo para serem incubados a 37 °C sob agitação até atingir adensidade ótica adequada (OD₆₀₀ entre 0.4 a 0.6). Para isso, foram retiradas amostras de 1 mL a cada 30 min. Ao atingirmos a densidade ótica adequada, testamos diferentes períodos de expressão (1, 2, 3, 4 h e *overnight*) após indução com 1 mM IPTG. Como controle, foi utilizado um cultivo celular em condições de meio, temperatura e rotação idênticas, porém sem a indução com IPTG. Os diferentes níveis de

expressões foram checados em géis de poliacrilamida 12% contendo SDS (SDS-PAGE) (após lise bacteriana por sonicação), e posteriormente corados com solução Coomassie Brilliant Blue R-250.

Além da verificação da expressão por SDS-PAGE, também realizamos a verificação da expressão por Western Blot utilizando anticorpo α -His-tag. Para isso, foi realizada a etapa de transferência das proteínas recombinantes separadas no SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose Amersham Protan Premium 0,2 μ m NC (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com o protocolo geral para Western Blotting descrito pelo fabricante do aparelho Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad). Os parâmetros utilizados para a transferência foram de 120 mA por um período aproximado de 14 h. Em seguida, as membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) foram coradas com Ponceau S Staining Solution 1%, lavadas com água MiliQ e incubadas em solução de bloqueio (Blocking Agent, GE Healthcare) por 3 h. Posteriormente, foi usado anticorpo primário α -His-tag (diluição 1:5000) (Thermo Fisher Scientific), e anticorpo secundário α -mouse IgG HRP (diluição 1:10000) (Thermo Fisher Scientific). A revelação foi feita utilizando-se o substrato ECL (Thermo Scientific SuperSignal ECL).

Adicionalmente, também realizamos a transformação das construções (pET28+IP6K*domain* e pET28+LbrIP5K) em bactérias *E. coli* [cepa Arctic Express RIL]. As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio de cultura LB ágar (20 mL) contendo 50 μ g.mL⁻¹ kanamicina e 20 μ g.mL⁻¹ gentamicina, e incubadas a 37 °C *overnight*. Em seguida, prosseguimos com a realização de um ensaio piloto realizando um pré-inóculo (37 °C a 1000 rpm *overnight*) a partir de uma colônia bacteriana selecionada da placa. Utilizamos tubos estéreis (15 mL) contendo 3 mL de meio LB em cada um deles. Antes de inocular as bactérias, a temperatura do meio de cultura foi estabilizada mediante incubação a 30 °C sob agitação. Após isso, foram adicionados 60 μ L do pré-inóculo para LbrIP6K*domain* e para LbrIP5K e novamente incubados a 30 °C por mais 15 min sob agitação de 1000 rpm. Em seguida, a cultura foi incubada a 10 °C durante 3h antes da indução com 1 mM de IPTG. Posteriormente, testamos diferentes períodos de expressão (2, 4 e 24 h) após indução com 1 mM IPTG. Como controle, utilizamos um cultivo celular em condições de meio, temperatura e rotação idênticas, porém sem a indução com IPTG. Os diferentes níveis de expressões foram verificados em SDS-PAGE 12% (após lise por sonicação), e posteriormente corados com solução de coomassie.

Após padronizar os ensaios pilotos, expressamos LbrIP6K*domain* e LbrIP5K utilizando 1 L de meio LB, realizando as adequações proporcionalmente. Os períodos checados foram de 2 h em *E. coli* [cepa BL21-CodonPlus (DE3)-RP] e de 2 a 24 horas em *E. coli* [cepa Arctic Express RIL] após indução com 1 mM de IPTG. Como controle, utilizamos culturas não-

induzidas. Da mesma forma, a expressão foi verificada por SDS-PAGE 12%, após lise por sonicação. Posteriormente, também foi confirmada a expressão por Western Blot. Para LbrIP6Kdomain foi utilizado anticorpo primário α -His-tag (1:10000), e anticorpo secundário α -mouse IgG HRP (1:10000) enquanto que para LbrIP5K, utilizamos os mesmos anticorpos, porém na diluição de 1:5000 para o anticorpo primário.

Para obtermos uma maior quantidade de proteína para posterior purificação, expressamos novamente as duas proteínas recombinantes em 5 L de cultura cada, utilizando somente a cepa *E. coli* Arctic Express RIL. A etapa de indução com 1 mM de IPTG em baixa temperatura, foi realizada no Instituto de Biotecnologia da UNESP de Botucatu (IBTEC), utilizando câmara fria previamente mantida a 10 °C, gentilmente cedida pelo Professor Doutor Deilson Elgui de Oliveira. Da mesma forma, a expressão foi checada por SDS-PAGE 12% por Western Blot conforme descritos anteriormente.

3.6 Lise bacteriana e solubilização de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K

Os *pellets* bacterianos resultantes das expressões (5 L) foram centrifugados a 4 °C, 10.000 g por 15 min e armazenados a -80 °C até sua utilização.

3.6.1 Lise bacteriana por sonicação e tentativa de solubilização com ureia

Após verificarmos que a proteína LbrIP6Kdomain e parte da proteína LbrIP5K estavam sendo expressas na fração insolúvel do extrato de lise bacteriano (*pellet*), iniciamos os procedimentos para repetirmos a centrifugação e tentarmos realizar a solubilização das proteínas utilizando diferentes concentrações de ureia.

Para tal, repetimos a expressão em ~20 mL de cultura. Coletamos as bactérias por centrifugação (10000 g, 15 min a 4 °C), ressuspendemos o pellet em tampão de lise (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 200 μ g.mL⁻¹ lisozima, 1X inibidor de protease) e incubamos a 4 °C por 3 h. Após o período de incubação, realizamos a sonicação das amostras com os seguintes parâmetros estipulados no equipamento “Disruptor de célula – UNIQUE”: potência 40, tempo 20 seg., intervalo 30 seg e 35 repetições por amostra em uma temperatura de 4 °C. As amostras foram centrifugadas nas mesmas condições e o sobrenadante foi separado do *pellet*. Nesta etapa, também separamos alíquotas de 100 μ L para serem utilizadas como controle na análise por SDS-PAGE.

Para iniciar o ensaio de solubilidade de LbrIP6Kdomain, preparamos inúmeras soluções (volume final de 2 mL) com diferentes concentrações de ureia (1 M; 1,5 M; 2 M; 2,5 M; 3 M; 3,5 M; 4 M; 4,5 M; 5 M; 5,5 M; 6 M; 6,5 M; 7 M; 7,5 M; e 8 M) e Tris (0,1 M)

(controle). Ressuspendemos o pellet resultante da última centrifugação em 16 mL de água deionizada e separamos 16 alíquotas de 1 mL cada. Centrifugamos novamente, descartamos o sobrenadante e adicionamos 1 mL de cada uma das soluções com diferentes concentrações de ureia descritas anteriormente. Ressuspendemos todas as amostras e incubamos por 1 h, sob agitação constante em temperatura ambiente. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi separado. O precipitado de cada amostra (pellet) foi ressuspensão em 1 mL de água deionizada. Aproximadamente 100 µL de cada amostra (pellet e sobrenadante) foram separados e analisadas por SDS-PAGE 12%.

3.6.2 Lise bacteriana por alta pressão (*French Press*)

Todos os ensaios de lise bacteriana por alta pressão (*French Press*), foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Patógenos (LBMP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em colaboração com o professor Nilmar S. Moretti. O equipamento utilizado foi o French Pressure Cell Press (Thermo Spectronic).

Inicialmente, as amostras provenientes da expressão em larga escala (5 L) foram descongeladas a 4 °C e cada uma delas foi ressuspensa em 120 mL de tampão de lise (200 mM NaCl, 25 mM HEPES pH 7,5, Glicerol 5%, 5 mM β-mercaptoetanol, 20 mM imidazol, 20 µg.mL⁻¹ lisozima, 1x inibidor de protease) e incubadas por 30 min a 4 °C.

Após o período de incubação, as amostras foram subdivididas em 30 mL (volume máximo para cada rodada de aplicação na French press) e mantidas a 4 °C. Cada amostra (30 mL) foi submetida a pressão de 2000 psi por 4 ciclos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, 12.000 g, por 15 min. As frações solúveis e insolúveis (*pellet* e sobrenadante) foram separadas e imediatamente armazenadas a -80 °C. Vale ressaltar que, antes do armazenamento, alíquotas foram retiradas para verificação da eficiência do processo de lise através de SDS-PAGE 12% e Western Blot.

3.7 Purificação e quantificação de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K

Para purificar as proteínas recombinantes, utilizamos o método de cromatografia de afinidade com metal (Ni²⁺) imobilizado (IMAC) em colunas HisTrap™ HP (1 mL) (Cytiva) preparadas de acordo com as orientações especificadas pelo fabricante. Para isso, utilizamos as colunas HisTrap com seringas (10mL) para a purificação manual das proteínas.

Inicialmente, as colunas foram equilibradas com 10 mL de tampão de equilíbrio (200 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7.5, 5% Glicerol e 20 mM Imidazol). Cada amostra (sobrenadante) proveniente do processo de lise *French Press* descrito anteriormente foi

aplicada em coluna Ni^{2+} . Para aumentar o rendimento da purificação, as amostras foram recuperadas do *flowthrough* e reaplicadas três vezes na mesma coluna. Em seguida, a coluna foi lavada com 30 mL de tampão de lavagem (200 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 7.5, 5% Glicerol, 5 mM β -mercaptoetanol e 20 mM Imidazol). Para a etapa de eluição, utilizamos tampões com a mesma composição anterior, apenas aumentando a concentração de Imidazol (60 mM, 100 mM e 300 mM). As amostras eluídas foram coletadas e armazenadas para análises posteriores.

3.8 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

As medições de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) foram realizadas no espectropolarímetro JASCO modelo J-815 (JASCO Inc., Tóquio, Japão) equipado com um termocontrolador Peltier. Conforme a indicação do fabricante, testamos diferentes volumes da solução de proteína (entre 100 μl -700 μl) com diferentes concentrações (3-10 μM) utilizando tampão que não possui alta absorbância nesta região do espectro. Os experimentos foram realizados usando um comprimento de caminho óptico de 0,5 mm com uma velocidade de varredura de 100 nm/min, uma largura de banda de 2 nm, o tempo de resposta de 1 s e um passo de dados de 0,5 nm a 20 °C. O tampão utilizado na diluição das replicatas das amostras (50 mM glicina, pH 8,0) foi analisado individualmente e usado como controle. A deconvolução dos espectros de CD foi realizada usando o servidor online DichroWeb. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, UNESP, campus de Botucatu.

3.9 Predições estruturais de LbrIP6K

Para realização das predições estruturais de IP6K de *L. amazonensis* (LbrM.14.0340) utilizamos programas de bioinformática como AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>), LigPlot+v2.2.7 (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/download2.html>) e PyMolv2.5 (<https://pymol.org/2/>). Nesta abordagem, comparamos as possíveis estruturas e interações entre LbrIP6K e seus substratos com a IP6K de *Entamoeba histolítica* (EhIP6K) e humana (HsIP6K2) (Wang, et al., 2014). Com esta abordagem foi possível prever alguns padrões conservados na estrutura secundária/terciária de LbrIP6K.

3.10 Ensaio de complementação em levedura

Paralelamente aos ensaios realizados, elaboramos uma estratégia para realização de um ensaio de complementação em uma cepa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* mutante

para IP6K (KCS1^{-/-}). Cabe destacar que KCS1 é o homólogo de IP6K em *S. cerevisiae*. Assim, a primeira parte desta abordagem consistiu na subclonagem do gene IP6K completo de *L. braziliensis* (LbrIP6K) no vetor de expressão de levedura pYES2 (ThermoFischer) (Figura 3).

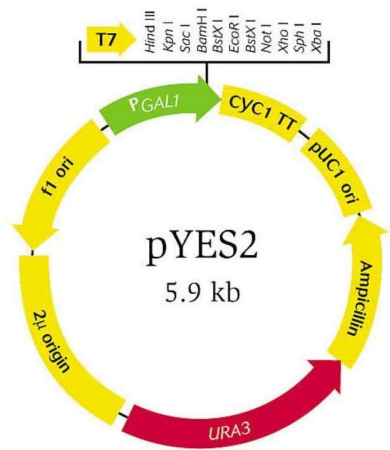


Figura 3. Mapa do vetor de expressão de levedura pYES2. O vetor pYES2 é projetado para expressão nativa da proteína de interesse em *S. cerevisiae*. Contém o gene URA3 (para seleção em levedura), gene que confere resistência à ampicilina (para seleção em bactérias) e origem 2μ para manutenção de um alto número de cópias.

Para tal, desenhamos oligonucleotídeos específicos para amplificação de LbrIP6K a partir do DNA genômico de *L. braziliensis* e posterior clonagem direcional no vetor pYES2 (Tabela 2). Após amplificação, seguimos a mesma estratégia descrita anteriormente. Resumidamente, purificamos o *amplicon* LbrIP6K, clonamos em vetor de clonagem pGEM T-easy (construção pGEM+LbrIP6K), transformamos a construção em bactérias competentes XL1-blue, selecionamos colônias para realização de extração de DNA plasmidial (*mini-prep*), confirmamos a clonagem por PCR e digestões com as enzimas específicas, removemos o inserto do vetor pGEM para posterior subclonagem no vetor pYES2 (digerimos a construção pGEM+LbrIP6K e o vetor pYES com as enzimas Hind III e Eco RI), transformamos a construção pYES2+LbrIP6K em bactérias competentes XL1-Blue, selecionamos colônias para realização de extração de DNA plasmidial (*mini-prep*) e por fim, confirmamos a clonagem por PCR e digestões com as enzimas selecionadas (Hind III e Eco RI). Atualmente, as transfecções da construção pYES2+LbrIP6K na linhagem mutante de levedura *S. cerevisiae* (KCS1^{-/-}) estão sendo realizadas em colaboração com o grupo do Dr. José Renato R. Cussiol (EPM-UNIFESP, São Paulo).

Tabela 2. Primers elaborados para amplificação do gene LbrIP6K (LbrM.14.0340) para posterior subclonagem em vetor de expressão de levedura pYES2

Gene	Nome dos Primers	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')	Amplicom (bp)	GenBank
LbrIP6K	Lbr_IP6K_F_HindIII_ZR	CCCAAGCTTATGTCTGAGCGGACACGAGAC	3147	LbrM.140340
	Lbr_IP6K_R_EcoRI_ZR	CCGGAATTCCTACGCCAGCAGGGAGAG		

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como mencionado anteriorente, devido a dificuldades técnicas enfrentadas no processo de amplificação e clonagem do gene inteiro LbrIP6K, decidimos focar na caracterização de seu sítio catalítico, aqui denominado LbrIP6K*domain*. Para objetivos futuros do nosso grupo, a expressão apenas do domínio funcional da quinase IP6K aparentemente será suficiente para catalisar a síntese de IP₇, como demonstrado nos estudos para a IP6K de *T. cruzi* (TcIP6K), onde o sítio catalítico ArgRIII foi suficiente para realizar a síntese de IP₇ a partir de IP₆ e ATP (Mantilla et al., 2021).

4.1 Construção dos oligonucleotídeos e amplificação de IP6K*domain* e LbrIP5K

A síntese dos oligonucleotídeos (*primers*) necessários para realização da amplificação gênica foi realizada pela empresa Exxtend. Após o envio dos oligonucleotídeos, realizamos aos ensaios de PCRs utilizando como molde o DNA genômico de *L. braziliensis*. A Figura 4 apresenta dois géis de agarose 1% mostrando a amplificação dos fragmentos de 720 pb para IP6K*domain* (Figura 4A) e 1402 pb para IP5K (Figura 4B). Na sequência nos poços, tem-se primeiramente o marcador de peso molecular (*ladder*), as amostras para IP6K*domain* em A e LbrIP5K em B, e o controle negativo de ambos [C(-)].

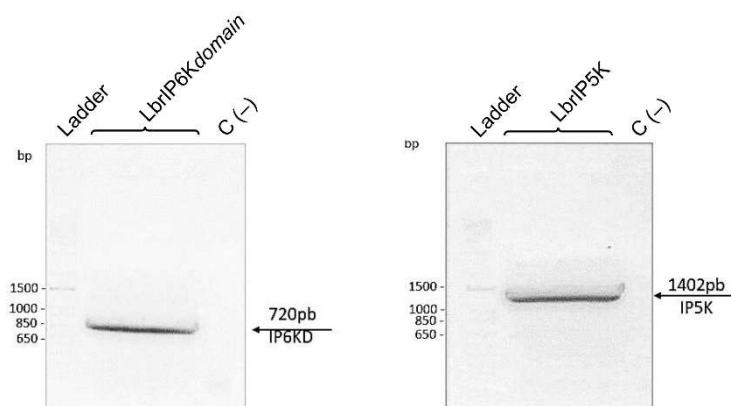


Figura 4. Amplificação de LbrIP6K*domain* e LbrIP5K. Amplicons evidenciando a amplificação de LbrIP6K*domain* (A) e LbrIP5K (B) em gel de agarose 1%. C (-) = controle negativo.

Os *amplicons* de cada gene (IP6K*domain* e LbrIP5K) foram excisados, purificados e clonados no vetor de clonagem pGEM (construções pGEM+IP6K*domain* e pGEM+ LbrIP5K). Para confirmação, realizamos PCRs utilizando como molde os respectivos DNAs plasmidiais recuperados após *mini-prep* e digestões das construções utilizando as enzimas de restrição Nde I e Hind III (utilizadas para subclonagem direcional). A Figura 5^a-B apresentam géis de agarose evidenciando os resultados da PCR, *i.e.*, amplificação dos fragmentos de 720 pb para IP6K*domain* (Figura 5^a – três colônias) e 1402 pb para LbrIP5K (Figura 5B – três colônias),

respectivamente. A Figura 5C apresenta um gel de agarose evidenciando as bandas correspondentes após digestões realizadas (enzimas Nde I e Hind III), demonstrando o sucesso da clonagem de ambos os genes no vetor pGEM.

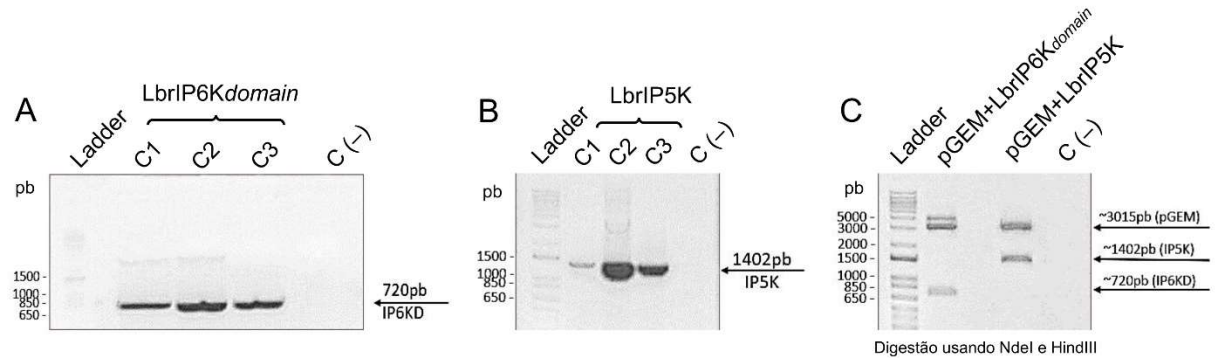


Figura 5. Ensaios de PCR e digestões evidenciam que as clonagens de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K no vetor pGEM foram realizadas com sucesso. A-B. *Amplificons* evidenciando a presença de LbrIP6Kdomain (A) e LbrIP5K (B) nas respectivas construções pGEM+ LbrIP6Kdomain e pGEM+LbrIP5K. **C.** Digestões realizadas com as enzimas Nde I e Hind III para confirmar as construções pGEM+ LbrIP6Kdomain e pGEM+LbrIP5K .

Em seguida, prosseguimos com a subclonagem de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K no vetor de expressão pET28a+. Para isso, após as digestões dos genes (LbrIP6Kdomain e LbrIP5K) e do plasmídeo (pET28a+) com as enzimas NdeI e Hind III, realizamos purificação das bandas, clonagem direcional, transformação bacteriana e extração do DNA plasmidial em pequena escala (*mini-prep*) para ambas construções. Para confirmar a subclonagem, realizamos PCR e digestão dos plasmídeos utilizando as mesmas enzimas (Nde I e Hind III). A Figura 6A-B apresentam géis de agarose evidenciando os resultados da PCR, *i.e.*, amplificação dos fragmentos de 720 pb para IP6Kdomain (Figura 6A) e 1402 pb para LbrIP5K (Figura 6B), respectivamente. A Figura 6C apresenta um gel de agarose evidenciando as bandas correspondentes após digestões realizadas (enzimas NdeI e Hind III). Cabe destacar que a baixa intensidade da banda de 720 pb (LbrIP6Kdomain) se deve, provavelmente, a algum fenômeno eletroforético, onde as bandas de menor massa perdem a intensidade ao serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (comparar banda LbrIP6Kdomain com o *ladder*).

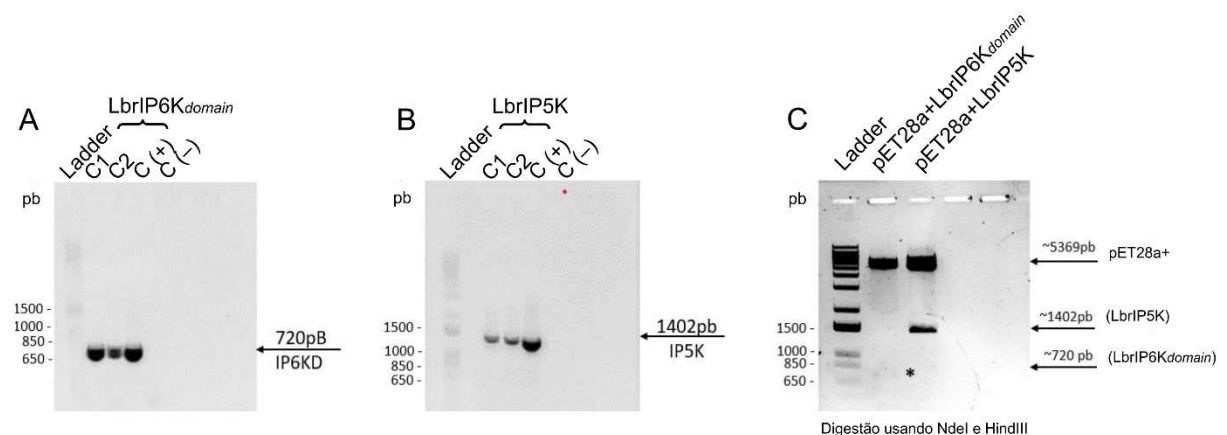


Figura 6. As subclonagens de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K no vetor pET28a+ foram realizadas com sucesso. A-B. Amplicons evidenciando a subclonagem de IP6Kdomain e LbrIP5K em pET28a+. C. Digestões realizadas com as enzimas NdeI e HindIII para confirmar a subclonagem de IP6Kdomain e LbrIP5K em pET28a+. O asterisco (*) indica uma banda de pouca intensidade (~720 bp), correspondente à LbrIP6domain. A baixa intensidade desta banda provavelmente se deve a um fenômeno eletroforético não compreendido, onde as bandas de menor massa perdem a intensidade ao serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (comparar banda LbrIP6Kdomain com ladder).

Após confirmar a correta subclonagem dos genes LbrIP6Kdomain e LbrIP5K no vetor pET28a+, submetemos as construções para sequenciamento afim de confirmar a ausência de possíveis mutações que possam interferir da expressão destas proteínas recombinantes (dados não-mostrados).

4.2 Análises preliminares e primeiras tentativas de expressão das quinases LbrIP5K e IP6Kdomain em sistema heterólogo bacteriano e lise por sonicação

Primeiramente, realizamos uma análise bioquímica *in silico* utilizando a estrutura primária (sequência de aminoácidos) de LbrIP5K e LbrIP6Kdomain com o *software* ExPASy ProtParam. Os principais parâmetros calculados e gerados através desta ferramenta estão presentes na Tabela 3 e serão fundamentais nas análises subsequentes.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos de LbrIP5K e LbrIP6Kdomain obtidos através do *software* ExPASy ProtParam

	Nº aminoácidos	Massa Molar (Da)	Ponto Isoelétrico	Coefficiente de extinção molar ($M^{-1} cm^{-1}$)
LbrIP5K	459	49845.40	6.55	48080
LbrIP6Kdomain	235	27212.95	9.06	30745

Em seguida, iniciamos os testes de expressão de ambas quinases recombinantes em sistema heterólogo bacteriano, utilizando duas cepas de *E. coli*: BL21-CodonPlus (DE3)-RP e Arctic Express RIL.

4.2.1 Expressão em *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP

Utilizamos inicialmente 1 mM IPTG para induzir a expressão das proteínas recombinantes LbrIP5K e LbrIP6Kdomain em bactérias *E. coli* (cepa BL21 CodonPlus (DE3)-RP). Com o objetivo de otimizar o período de expressão, foram retiradas alíquotas entre os períodos de 0 a 4 h e *overnight* (16 h). Os extratos proteicos foram analisados em SDS-PAGE 12% após sonicação. Cabe destacar que estes parâmetros para sistemas de expressão heteróloga em bactérias são frequentemente utilizados pela maioria dos grupos de pesquisa (Rosano e Ceccarelli, 2014).

A Figura 7 apresenta quatro SDS-PAGEs referentes à expressão da LbrIP5K, onde em

A temos as amostras não-induzidas (frações solúveis e insolúveis do extrato bacteriano após sonicação) e em B as amostras induzidas (frações solúveis e insolúveis do extrato bacteriano após sonicação). Neste caso, LbrIP5K apresentou maior expressão após 2 h de indução na fração insolúvel após sonicação (Figura 7B, à direita).

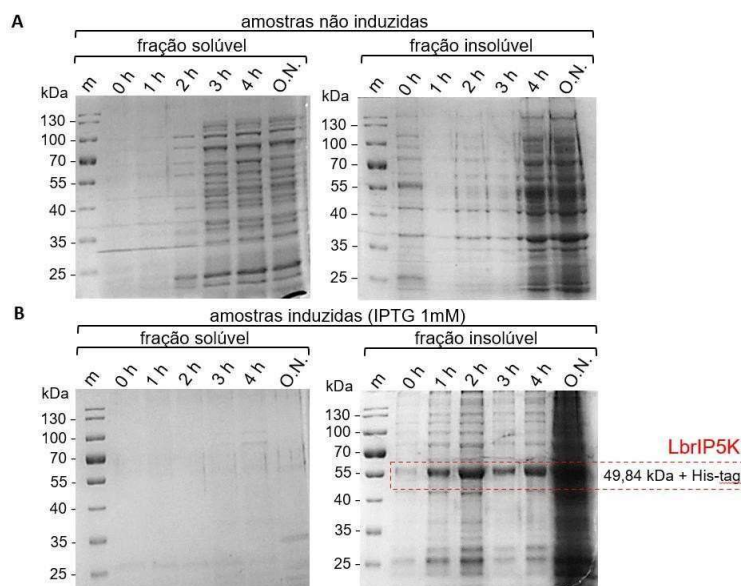


Figure 7. LbrIP5K recombinante é aparentemente expressa em maior quantidade após 2 h de indução com 1 mM IPTG na fração insolúvel de bactérias *E. coli* BL21. A. SDS-PAGE mostrando as frações não-induzidas ao longo do tempo (0-4 h e ON). Esquerda: fração solúvel, direita: fração insolúvel. B. SDS-PAGE mostrando as frações coletadas após indução ao longo do tempo (0-4 h e ON). Esquerda: fração solúvel, direita: fração insolúvel.

Para obtermos mais evidências de que a expressão de fato ocorreu, realizamos ensaio Western blot utilizando anticorpo α -His-Tag. A Figura 8 evidencia que LbrIP5K é predominantemente mais expressa na fração insolúvel a partir de 2 h após indução com IPTG e lise bacteriana por sonicação.

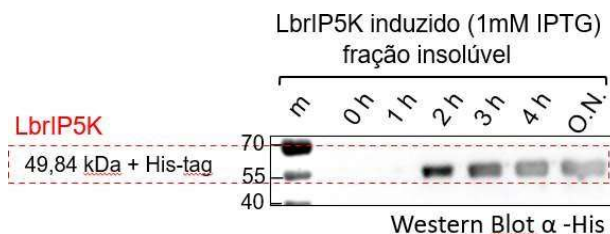


Figura 8. LbrIP5K é predominantemente expressa a partir de 2 h após indução. Western blot evidenciando que LbrIP5K é expressa em maior quantidade a partir de 2 h, após indução com 1 mM IPTG, na fração insolúvel. Este ensaio foi realizado utilizando-se anticorpo α -His-tag para reconhecimento da cauda 6XHis expressa em fusão com LbrIP5K.

A Figura 9 apresenta dois SDS-PAGEs referentes à expressão da IP6K domain, onde em A temos as amostras induzidas e em B as amostras não-induzidas. Cabe destacar que, para este ensaio, optamos por realizar a separação das frações solúveis e insolúveis do processo de

lise por sonicação posteriormente. IP6K*domain* apresentou expressão a partir de 1 h e após 2 h de indução, foi expressa em maior quantidade (Figura 9A).

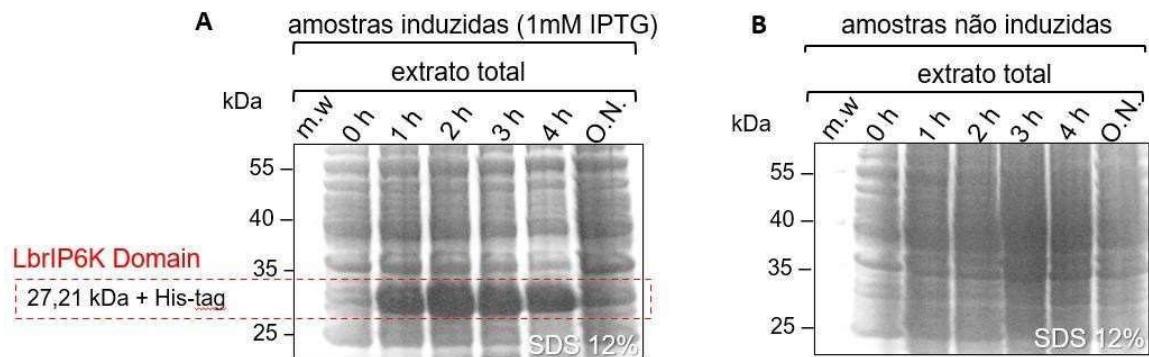


Figura 9. LbrIP6K*domain* é predominantemente expressa a partir de 1 h após indução. A. SDS-PAGE mostrando as frações induzidas ao longo do tempo (0-4 h e ON). B. SDS-PAGE mostrando as frações não-induzidas ao longo do tempo (0-4 h e ON).

Assim como descrito para LbrIP5K, para obtermos mais evidências de que a expressão ocorreu, realizamos ensaio Western blot utilizando anticorpo α -His-tag. A Figura 10 evidencia que IP6K*domain* é predominantemente expressa a partir de 1 h após indução com 1 mM IPTG. Além disso, IP6K*domain* apresentou maior expressão após 2 h de indução.

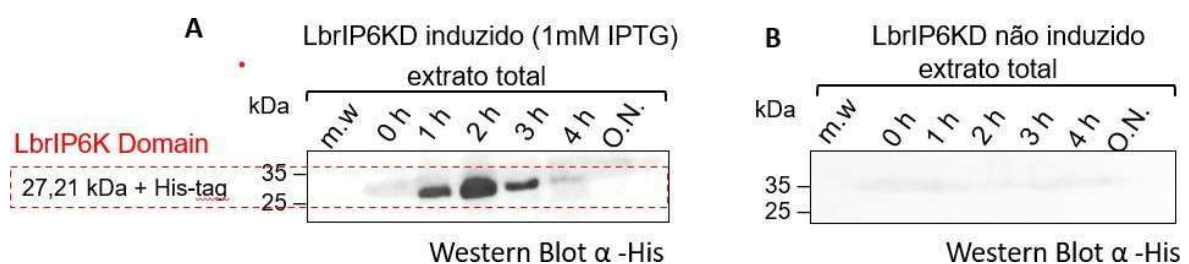


Figura 10. Western blot evidenciando que LbrIP6K*domain* é expressa a partir de 1 h após indução. Este ensaio foi realizado utilizando-se anticorpo α -His-Tag para reconhecimento da cauda 6XHis expressa em fusão com IP6K*domain*. A. Amostras induzidas. B. Amostras não-induzidas.

Como neste primeiro ensaio não realizamos a separação das frações solúveis e insolúveis após lise bacteriana por sonicação, realizamos um segundo ensaio de expressão onde coletamos as amostras apenas após 2 h de indução e separamos as frações solúveis e insolúveis após lise bacteriana por sonicação para verificarmos em qual delas LbrIP6K*domain* estava sendo expressa. A Figura 11 mostra um gel SDS-PAGE 12% evidenciando que LbrIP6K*domain* foi expressa na fração insolúvel após sonicação (Figura 11A). Adicionalmente, realizamos um novo ensaio western-blot utilizando anticorpo α -His-Tag, evidenciando novamente que a

expressão de *IP6Kdomain* ocorreu apenas na fração insolúvel após sonicação (Figura 11B).

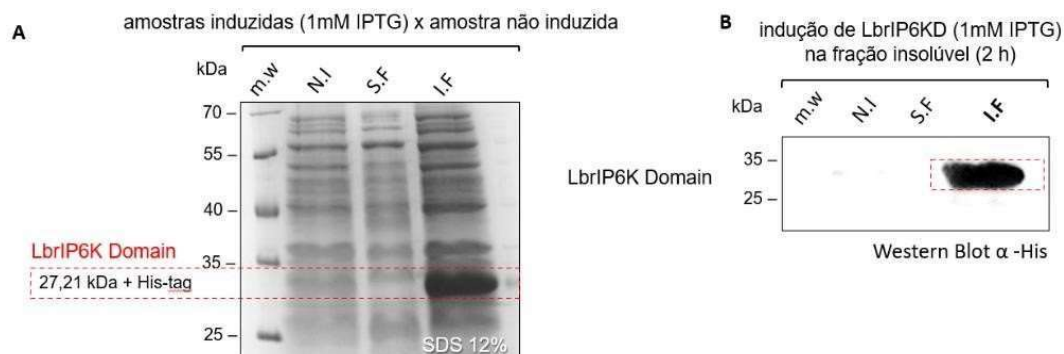


Figura 11. LbrIP6Kdomain é expressa na fração insolúvel do extrato bacteriano após 2 h de indução e lise por sonicação. A. SDS-PAGE mostrando as amostras não-induzidas (NI) e induzidas [(fração solúvel (SF) e fração insolúvel (IF)] após 2 h com IPTG. B. Western blot evidenciando que LbrIP6Kdomain é apenas expressa na fração insolúvel. Este ensaio foi realizado utilizando-se anticorpo α -His-Tag para reconhecimento da cauda 6xHis expressa em fusão com LbrIP6Kdomain. m.w. = marcador de massa molecular.

Após observarmos a expressão de LbrIP5K e LbrIP6Kdomain, repetimos novamente o ensaio de expressão, porém utilizando volumes maiores (500 mL e 1 L) para aumento do rendimento após os possíveis processos de purificação e diálise destas quinases. Para isso, utilizamos as mesmas condições de meio, temperatura e indução (1 mM IPTG) utilizadas anteriormente. A verificação da expressão destas quinases em grandes volumes foi realizada em SDS-PAGE 12% e Western Blot após sonicação (dados não mostrados).

4.2.2 Expressão em *E. coli Arctic Express RIL*

Como ambas quinases recombinantes (LbrIP5K e LbrIP6Kdomain) foram expressas nas frações bacterianas insolúveis após lise por sonicação (Figuras 7 – 11), resolvemos realizar a expressão utilizando *E. coli* cepa Arctic Express RIL (Agilent Technologies, Inc.). Teoricamente, o uso desta cepa favorece a expressão de proteínas bacterianas em frações solúveis em baixas temperaturas, sendo uma estratégia amplamente utilizada para controlar o nível de expressão ao longo do tempo de proteínas recombinantes, pois há evidências de que altos níveis de expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* levam à formação de corpúsculos de inclusão (Palmer, I., e Wingfield, P.T., 2012; Mital, et al., 2021). Após transformação nas *E. coli* competentes, testes de expressão em diferentes períodos foram realizados após indução com 1 mM IPTG a 10 °C. Foram retiradas alíquotas entre os períodos de 2, 4 e 24 h e os extratos proteicos foram analisados em SDS- PAGE 12%.

A Figura 12 mostra dois SDS-PAGEs referentes à expressão da LbrIP5K, onde em A temos as frações insolúveis e em B as frações solúveis após lise bacteriana por sonicação. Os resultados evidenciaram a expressão de LbrIP5K após 24 h de indução em ambas frações

(solúvel e insolúvel) do extrato bacteriano após sonicação.

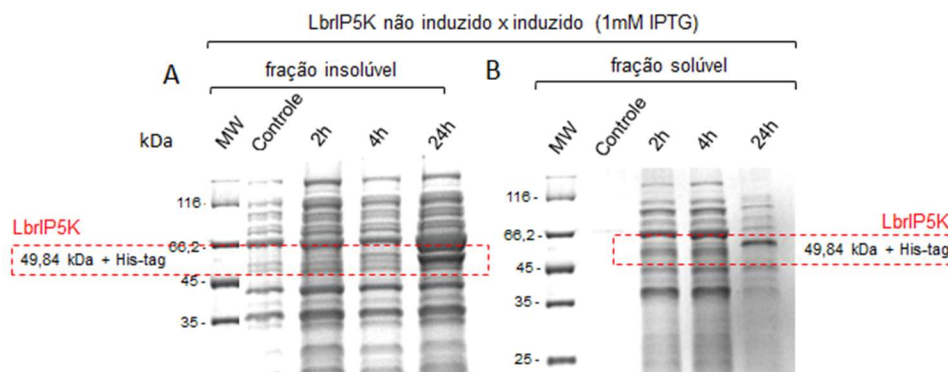


Figura 12. LbrIP5K é aparentemente expressa em ambas frações (insolúvel e solúvel) do extrato de *E. coli* Arctic Express RIL, após lise por sonicação. A. SDS- PAGE mostrando a amostra não-induzida (controle) e amostras induzidas ao longo do tempo (2, 4 e 24 h) na fração insolúvel do extrato bacteriano. B. SDS-PAGE mostrando a fração não-induzida (controle) e as amostras induzidas ao longo do tempo (2, 4 e 24 h) na fração solúvel do extrato bacteriano.

A Figura 13 mostra um gel SDS-PAGE 12% referente à expressão de LbrIP6Kdomain, onde em A temos as frações insolúveis e em B as frações solúveis após lise bacteriana por sonicação. Diferentemente de LbrIP5K, LbrIP6Kdomain aparenta ser expressa somente na fração insolúvel do extrato bacteriano após sonicação (Figura 13A).

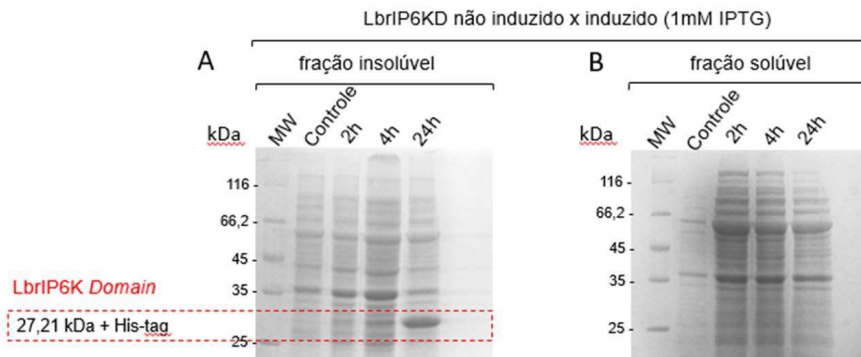


Figura 13. LbrIP6Kdomain é aparentemente expressa na fração insolúvel de *E. coli* Arctic Express RIL, após lise por sonicação. A. SDS-PAGE mostrando amostras não-induzida (controle) e induzidas ao longo do tempo (2, 4 e 24 h) provenientes da fração insolúvel do extrato bacteriano. B. SDS-PAGE mostrando a amostra não-induzida (controle) e induzidas ao longo do tempo (2, 4 e 24 h) na fração solúvel do extrato bacteriano.

Mesmo utilizando uma cepa bacteriana que teoricamente favorece a expressão de proteínas recombinantes solúveis, aparentemente não conseguimos obter a quinase LbrIP6Kdomain nesta condição após lise bacteriana por sonicação. Porém, percebemos que parte da quinase recombinante LbrIP5K também foi expressa na fração solúvel do extrato bacteriano após sonicação. Vale lembrar que, embora as diferentes cepas de *E. coli* propiciem um alto rendimento de proteínas em um curto período de tempo, raramente expressam quinases ativas na forma solúvel (Rodríguez- Carmona, et al., 2010; Francis e Page, 2010). Dentre as

possíveis explicações para isso é que, o curto período da expressão favorece o mal dobramento dessas proteínas heterólogas, as quais podem precisar um tempo maior ou até mesmo de um número maior de chaperonas para que ocorra o dobramento correto. Outros fatores, como a incapacidade de *E. coli* realizar modificações pós-traducionais eucarióticas, também podem resultar na expressão de proteínas recombinantes em corpúsculos de inclusão (fração insolúvel), sugerindo que talvez modificações pós-traducionais sejam importantes para o dobramento e a atividade de proteínas recombinantes (Rodríguez- Carmona, et al., 2010; Francis e Page, 2010).

Além disso, outra explicação possível para a não obtenção destas quinases na forma solúvel está no método utilizado para lise bacteriana (sonicação). Nesta abordagem, combinamos diferentes métodos para a ruptura das células (mecânico, enzimático e térmico) visando a obtenção das proteínas recombinantes na fração solúvel do extrato bacteriano. Esse método é amplamente utilizado na rotina laboratorial e geralmente fornece resultados satisfatórios (Falgenhauer et al., 2021; Shrestha et al., 2012). Entretanto, em um estudo comparativo, foi evidenciado que a lise bacteriana por meio de alta pressão (*French Press*) favorece a ruptura completa das células, enquanto no processo sonicação, a ruptura das células ocorre de maneira parcial, dificultando a liberação eficaz da proteína recombinante (Jorgensen et al., 1995).

4.3 Expressão das quinases LbrIP5K e IP6Kdomain em sistema heterólogo bacteriano e lise mecânica por alta pressão (*French Press*)

Primeiramente, para testarmos o método de lise bacteriana por alta pressão (*French Press*), repetimos os ensaios de expressão para LbrIP5K e LbrIP6Kdomain em diferentes quantidades (500 mL e 1 L) utilizando a cepa de *E. coli* Arctic Express RIL). Assim como descrito anteriormente, retiramos uma pequena alíquota das amostras afim de confirmar a confirmação das expressões por SDS-PAGE 12% e Western Blot pelo método de sonicação (Figura 14) para que posteriormente, pudéssemos utilizar de fato, somente as amostras confirmadas para a realização da lise por alta pressão, objetivando a comparação de ambos resultados pelos diferentes métodos de lise, utilizando as mesmas amostras.

A Figura 14A-B mostra dois SDS-PAGE 12% evidenciando a expressão de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K em *E. coli* Arctic Express RIL. Na Figura 14A, temos as frações solúveis do extrato bacteriano após lise por sonicação e na Figura 14B, as frações insolúveis. Sequencialmente, temos o controle não-induzido (NI) e as amostras que foram colhidas em diferentes períodos (2, 4 e 24 h) após indução e lise por *sonicação*. Novamente, os resultados evidenciaram LbrIP5K é expressa em ambas frações (solúvel e insolúvel) do extrato bacteriano

e LbrIP6Kdomain somente na forma insolúvel. Para confirmar o resultado obtido, realizamos novamente o Western Blot utilizando anticorpo α -His-Tag. Os resultados corroboram o observado no SDS-PAGE, evidenciando que LbrIP6Kdomain é expressa somente na fração insolúvel (Figura 14C e D) e IP5K é expressa em ambas frações (solúvel e insolúvel após lise por *French Press*) a partir de 2 h de indução (Figura 14C e D).

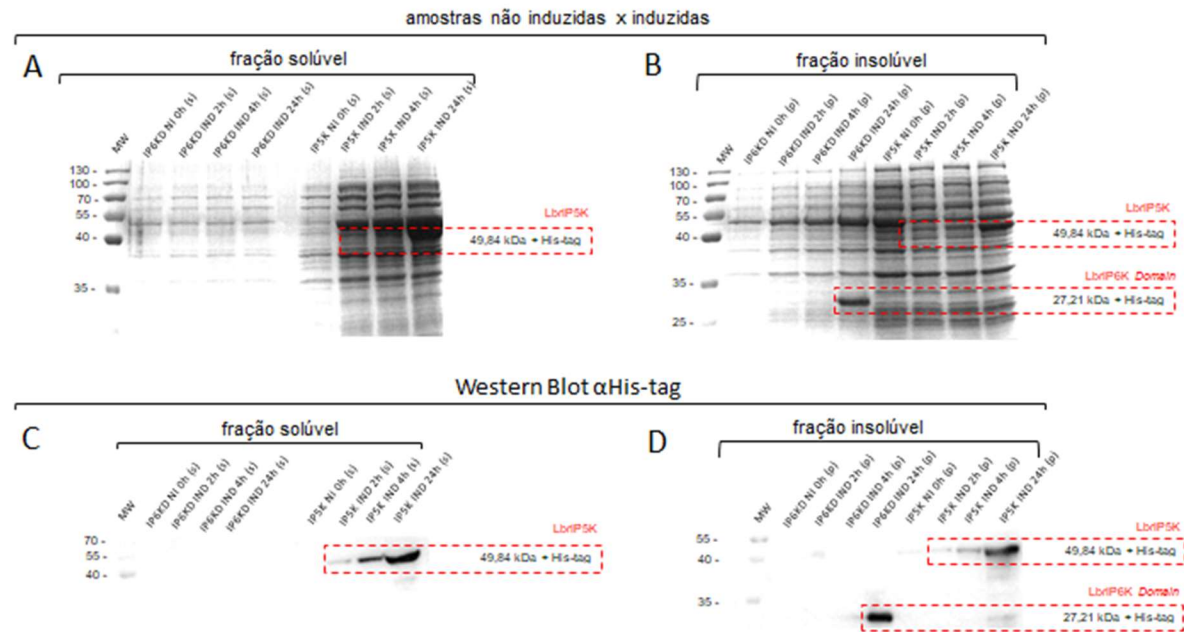


Figura 14. LbrIP6Kdomain é expressa na fração insolúvel e LbrIP5K é expressa em ambas frações (solúvel e insolúvel) do extrato bacteriano de *E. coli* Arctic Express RIL após lise por *French Press*. **A.** SDS-PAGE 12% mostrando amostras de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K não-induzida (controle) e induzidas ao longo do tempo (2, 4 e 24 h) provenientes da fração solúvel do extrato bacteriano após lise por sonicação. **B.** SDS-PAGE 12% mostrando amostras de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K não-induzida (controle) e induzidas ao longo do tempo (2, 4 e 24 h) provenientes da fração insolúvel do extrato bacteriano. **C-D.** Western blot evidenciando que LbrIP5K é expressa em ambas frações e LbrIP6Kdomain somente na fração insolúvel do extrato bacteriano após lise por sonicação. Estes blottings foram realizados utilizando-se anticorpo α -His-Tag.

Sendo assim, utilizamos as mesmas amostras da expressão anterior de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K, porém coletamos amostras apenas após 24 h de indução com 1 mM IPTG. Na figura 15 temos um SDS-PAGE 12% mostrando a separação dessas amostras, porém lisadas por alta pressão (*French Press*).

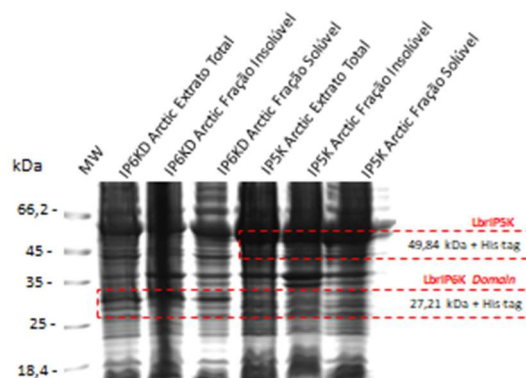


Figura 15. LbrIP6Kdomain e LbrIP5K são parcialmente expressas na fração solúvel do extrato bacteriano lisado utilizando o método *French Press*. SDS-PAGE mostrando as amostras induzidas de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K em *E. coli* Arctic Express RIL (extrato total e frações solúveis e insolúveis) após a lise bacteriana por *French Press*.

Ao lisarmos as células de *E. coli* Arctic Express RIL pelo método *French Press*, os resultados evidenciaram que LbrIP6Kdomain passou a ser parcialmente expressa na fração solúvel. Em relação à LbrIP5K, houve uma melhora aparente em sua solubilidade (Figura 18). Vale lembrar que, em todos os ensaios anteriores, LbrIP6Kdomain sempre foi expressa na fração insolúvel do extrato bacteriano, demonstrando que o método por alta pressão (*French-Press*) foi aparentemente eficaz na melhora da solubilidade, mesmo que ainda parte dessa proteína se mantenha na fração insolúvel.

Como a lise das células *E. coli* BL21 (DE3) CódonPlusRP por meio da *French Press* não se mostrou eficiente em relação ao aumento da solubilidade de LbrIP5K ou LbrIP6Kdomain (imagens não demonstradas), decidimos utilizar para as próximas etapas (purificação e diálise), somente as proteínas recombinantes provenientes da expressão em *E. coli* Arctic Express RIL, que teoricamente favorece processos de redobramento proteico entre 4 e 12 °C devido às chaperonas Cpn10 e Cpn60 presentes nesta cepa modificada (Rosano, G.L., Morales, E.S. and Ceccarelli, E.A., 2019). No entanto, decidimos realizar algumas tentativas de solubilização de LbrIP6Kdomain expressas nas frações insolúveis de *E. coli*, cepa Arctic Express RIL, utilizando o agente desnaturante Ureia.

4.4 Tentativa de solubilização de LbrIP6Kdomain utilizando Ureia

Conforme discutimos anteriormente, altos níveis de expressão proteica em *E. coli* podem levar a formação de corpúsculos de inclusão, o que dificulta a obtenção de proteínas recombinantes na forma solúvel (Palmer e Wingfield, 2012). Frente a isso, um dos métodos mais utilizados para resolver essa questão é fazer o uso de tampões contendo agentes caotrópicos desnaturantes, como Ureia. (Palmer e Wingfield 2012; Kurien, et al., 2019;

Miskiewicz e MacPhee, 2018). A principal função da ureia nesse contexto é promover o rompimento de interações hidrofóbicas que possam estar estabilizando a estrutura secundária/terciária desta quinase. Contudo, sabe-se que um dos desafios ao se utilizar um agente desnaturante está na recuperação das proteínas redobradas corretamente (re-solubilização) e funcionalmente biotivas, uma vez que cada proteína possui características únicas, sendo necessário estabelecer protocolos de re-solubilização específicos para cada proteína recombinante (Roufarshbaf, M., Akbari, V., 2023).

Inicialmente, testamos a solubilidade de *LbrIP6Kdomain* (proveniente das frações insolúveis de *E. coli*, Arctic Express RIL) através de um miniensaio de solubilidade onde a fração insolúvel de *LbrIP6Kdomain* (pellet) foi subdividida e ressuspensa em diferentes concentrações de Ureia (1 M; 1,5 M; 2 M; 2,5 M; 3 M; 3,5 M; 4 M; 4,5 M; 5 M; 5,5 M; 6 M; 6,5 M; 7 M; 7,5 M e 8 M) e 0,1 M Tris (controle). Em seguida, as frações solúveis (sobrenadante) e insolúveis (*pellet*) foram separadas por centrifugação e analisados em SDS-PAGE conforme mostrado na Figura 16.

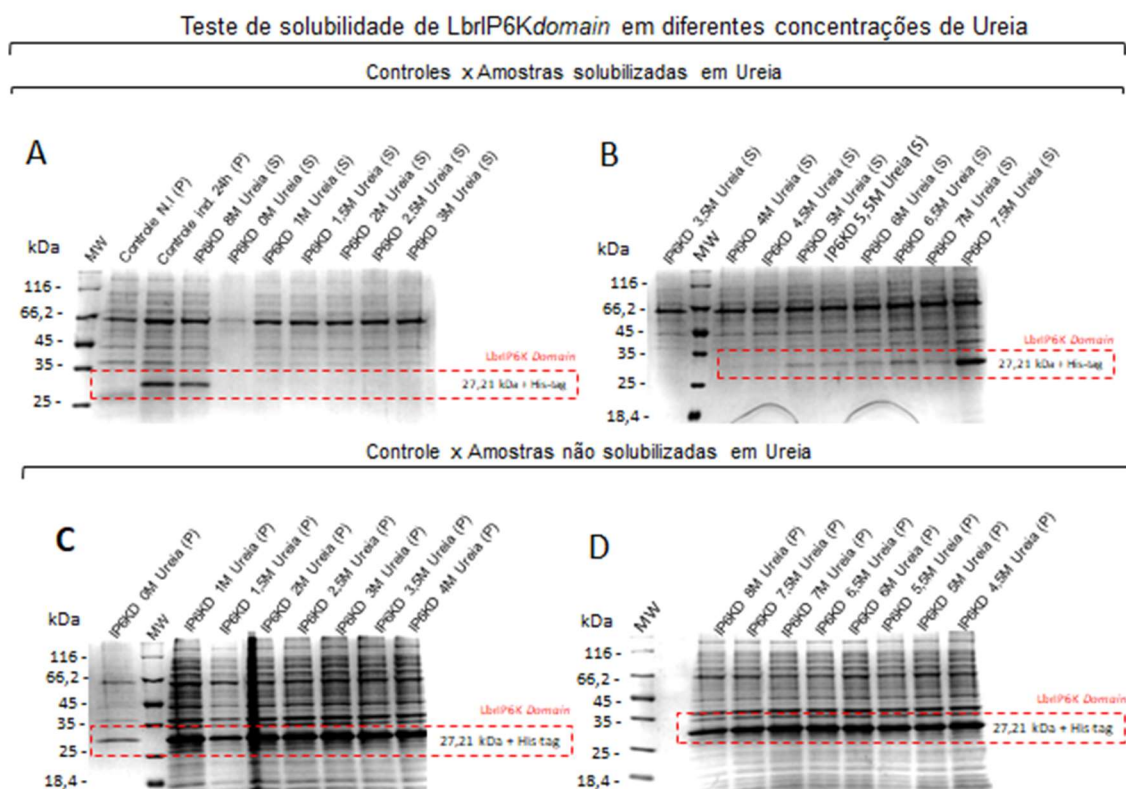


Figura 16. Solubilidade de *LbrIP6Kdomain* recombinante utilizando diferentes concentrações de Ureia. A,B. SDS-PAGE 12% contendo as frações solúveis de *LbrIP6Kdomain* após tentativas de solubilização em diferentes concentrações de Uréia (1 – 8 M). C, D. SDS-PAGE 12% contendo as frações insolúveis de *LbrIP6Kdomain* após tentativas de solubilização em diferentes concentrações de Uréia (1 – 8 M). MW = molecular weight, NI = amostra não-induzida, S = sobrenadante, P = *pellet*.

Percebemos que LbrIP6K*domain* começa a ser solubilizada em concentrações de Ureia a partir de 5 M (Figura 16B), apresentando maior solubilidade em 7,5 M Ureia (Figura 16B). Contudo, a maior parte da proteína ainda permanece nas frações insolúveis (Figura 16C, D). Estes resultados evidenciam que LbrIP6K*domain* pode ser parcialmente solubilizada a partir de 5 M de ureia. De certa forma, esse resultado reforça a hipótese de que LbrIP6K está presente em corpúsculos de inclusão e que o método por sonicação é insuficiente para a solubilização da proteína.

Decidimos deixar esses resultados como um plano B (*backup*), caso a expressão e lise de LbrIP6K pelo método *French-press* não seja suficiente para obtermos um bom rendimento desta quinase em sua forma solúvel. Essa decisão se deu pelo fato de que a obtenção de uma quantidade adequada desta proteína para realização de *refolding*, ressolubilização e obtenção de uma quinase funcional, será bastante desafiadora (Roufarshbaf, M., Akbari, V., 2023). Vale lembrar também que este ensaio não foi realizado com a quinase recombinante LbrIP5K pelo fato desta quinase estar sendo expressa na forma solúvel ao utilizarmos *E. coli* Arctic Express RIL.

Deste modo, prosseguimos para a etapa de expressão em larga escala e purificação utilizando as proteínas recombinantes de LbrIP6K*domain* e LbrIP5K obtidas pelo método de lise por alta pressão – *French Press*.

4.5 Expressão em larga escala e purificação das proteínas recombinantes LbrIP6K*domain* e LbrIP5K

Para realizarmos os ensaios de purificação, primeiramente expressamos novamente LbrIP6K*domain* e LbrIP5K em grandes volumes (5 L) utilizando somente a cepa bacteriana *E. coli* Arctic Express RIL. O resultado da expressão (após 24 h de indução e lise por *French-press*) foi analisado por SDS-PAGE 12% e Western Blot, conforme demonstrado na Figura 17. A seguir, prosseguimos com a etapa de purificação destas proteínas recombinantes.

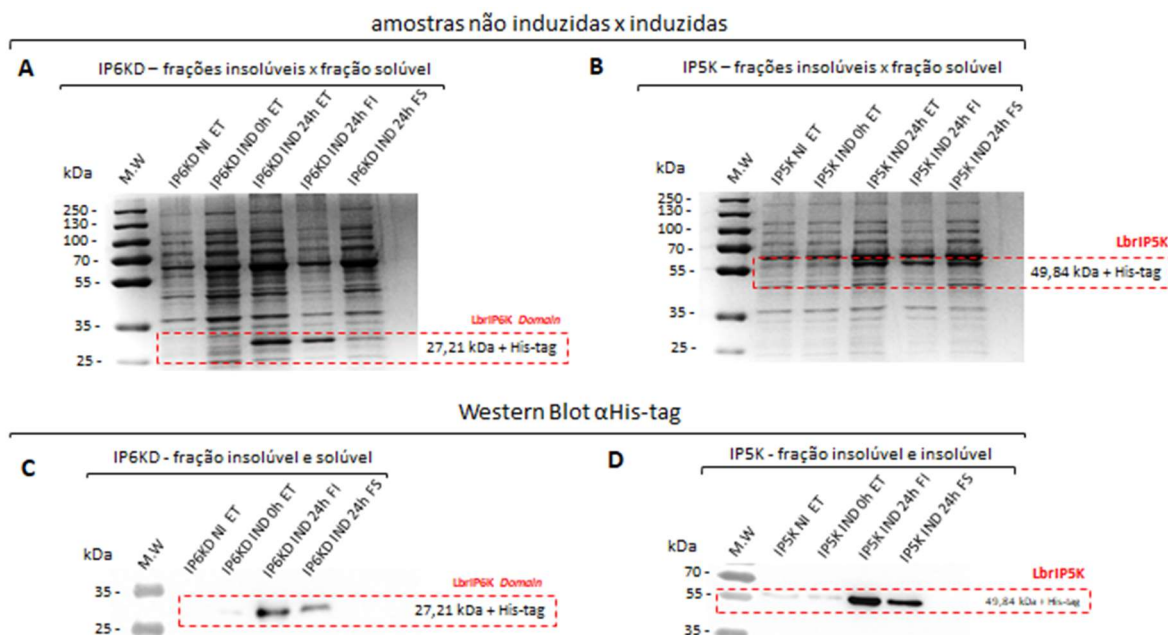


Figura 17. Análise da expressão e solubilidade de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K em *E. coli* Arctic Express RIL lisadas por French-press (volume 5 L). A. SDS- PAGE 12% da expresssão de LbrIP6Kdomain nos períodos de 0 h e 24 h (frações solúveis e insolúveis). **B.** SDS- PAGE 12% da expresssão de LbrIP5K nos períodos de 0 h e 24 h (frações solúveis e insolúveis). MW = molecular weight, NI = amostra não-induzida, ET = extrato total, FI = fração insolúvel, FS = fração solúvel. **C, D.** Western blot evidenciando que LbrIP6Kdomain e LbrIP5K foram expressas em ambas frações (solúvel e insolúvel), respectivamente. Estes blottings foram realizados utilizando-se anticorpo α-His-Tag.

Para purificar as proteínas recombinantes, utilizamos o método de cromatografia por afinidade com metal imobilizado (IMAC). Este método é comumente utilizado para a purificação de proteínas marcadas com cauda de polihistidina (6xHis), a qual possui afinidade por íons metálicos de transição como Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} (Falke, e Corbin, 2013; Chang, et al., 2017). Esta interação ocorre por meio da ligação específica entre as proteínas de fusão marcadas com histidina e os sítios de coordenação do íon metálico presente na resina da coluna, onde os grupos doadores de elétrons presentes na superfície desse resíduo de aminoácido (cadeia lateral do imidazol da histidina, que é carregada em condições neutras e alcalinas fracas) irão interagir e formar complexos com os íons imobilizados, resultando na adsorção das proteínas de interesse na coluna que contém o íons bivalente (e.g.: Ni^{2+}) (Cheung, et al., 2012).

Para esta etapa, utilizamos colunas de Ni^{2+} HisTrap™ HP de 1 mL. Nas etapas de lavagem e eluição das proteínas alvo testamos diferentes concentrações de Imidazol. Sabidamente, o imidazol compete com a cauda de Histidina pela sua ligação na resina carregada com Ni^{2+} . Porém, nestas primeiras etapas da purificação, baixas concentrações de Imidazol, teoricamente, interferem nas ligações fracas de possíveis proteínas inespecíficas (contaminantes), contribuindo para uma eluição mais ‘limpa’ (aumento da pureza do eluato). Por outro lado, ao realizar a eluição, se faz necessária uma concentração mais elevada de Imidazol para que as proteínas marcadas com histidina possam ser eluídas. (Cheung, et al.,

2012).

A análise das purificações de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K utilizando o IMAC foi realizada por SDS-PAGE 12%, seguida por Western Blot (Figura 18). Conforme descrito anteriormente, utilizamos no tampão de lise bacteriana contendo 20 mM de Imidazol, tanto para LbrIP6Kdomain, como para LbrIP5K. Portanto, utilizamos a mesma concentração de Imidazol no tampão de equilíbrio da coluna (etapa de ligação). Na etapa seguinte (lavagem), realizamos vários testes com diferentes concentrações de Imidazol (20 mM, 30 mM, 40 mM, e 60 mM) e chegamos as concentrações de 30 mM e 60 mM de Imidazol para LbrIP6Kdomain e LbrIP5K, respectivamente (Figura 18A,B). Ao utilizar essas concentrações de Imidazol, percebemos que a maior parte das proteínas recombinantes permaneceram na coluna, enquanto que outras proteínas inespecíficas foram eluídas, demonstrando a eficácia da purificação durante esta etapa. O volume final de tampão utilizado foi de 10 mL (volume da coluna = 1 mL). Para eluirmos LbrIP6Kdomain e LbrIP5K, utilizamos 300 mM de Imidazol em 6 mL de tampão de eluição, sendo que para cada 1 mL colocado na coluna, retiramos uma amostra (eluato) com o mesmo volume. Percebemos nesta etapa que, nas eluições 1 a 3, outras proteínas inespecíficas estavam sendo eluídas juntamente com as proteínas recombinantes alvo. Porém, a partir da eluição 4, percebemos uma melhor purificação destas proteínas. Vale destacar que nós realizamos um teste anterior a este, utilizando tampão de eluição com 250 mM de Imidazol. Utilizamos 20 mL de tampão (20 eluições de 1mL) e não obtivemos este mesmo resultado nesta etapa da purificação, pois após 7 volumes (7 mL) de tampão de eluição, estas proteínas não eram mais eluídas (dados não-mostrados). Por esta razão, padronizamos a purificação em 6 volumes (6 mL) de tampão de eluição.

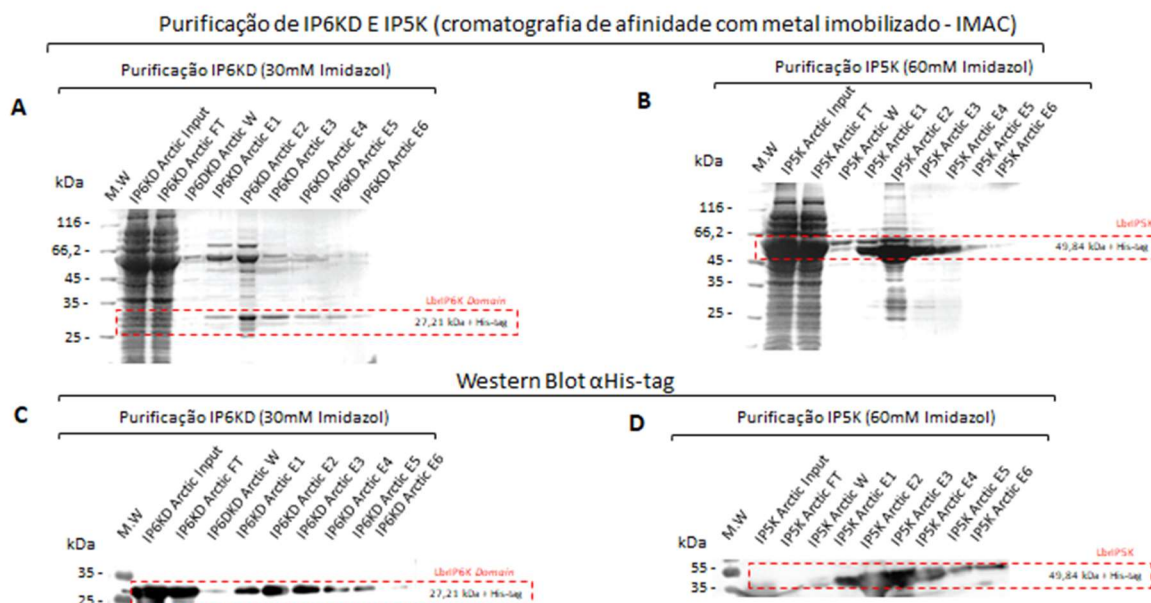


Figura 18. Análise da purificação de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K utilizando o método de cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC). **A.** SDS-PAGE 12% contendo amostras do processo de purificação de LbrIP6Kdomain: Flowthrough (FT), Lavagem (W), Eluição (E1-E6). **B.** SDS-PAGE 12% contendo amostras do processo de purificação de LbrIP5K: Flowthrough (FT), Lavagem (W), Eluição (E1-E6). **C.** Western blot evidenciando a presença de LbrIP6Kdomain durante as etapas de purificação. **D.** Western blot evidenciando a presença de LbrIP5K durante as etapas de purificação. Estes blottings foram realizados utilizando-se anticorpo α -His-Tag.

Para confirmar a purificação, realizamos Western Blot (Figura 18C, D) e os resultados evidenciaram a presença de LbrIP6Kdomain e LbrIP5K em todo o processo de purificação e a eluição das mesmas (exceto na etapa de lavagem pelos motivos já descritos anteriormente). Após realizarmos a purificação, as proteínas recombinantes foram armazenadas a -80 °C para posterior diálise e verificação do dobramento correto por dicroísmo circular (CD).

4.6 Diálise e dicroísmo circular (CD)

Após purificação das proteínas recombinantes LbrIP6Kdomain e LbrIP5K, prosseguimos com a realização de uma diálise escalonada para remoção do imidazol, β -mercaptor, altas concentrações de sais e demais compostos não essenciais para a estabilidade da proteína. Em seguida, verificamos a conformação estrutural destas quinases por dicroísmo circular (CD). Estes ensaios foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes, UNESP, campus de Botucatu. As figuras referentes a este ensaio estão sendo elaboradas.

4.7 Modelagem molecular por homologia

Devido às dificuldades que encontramos no processo de expressão de LbrIP6Kdomain, resolvemos realizar ensaios *in silico* para predição das estruturas secundárias e terciárias da LbrIP6K completa e, com isso, obter informações que possam contribuir para melhorar as abordagens utilizadas. Para isso, utilizamos como ferramenta a modelagem por homologia/comparação (*comparative protein modeling*) em colaboração com o aluno Bryan E. Abuchery, membro do nosso grupo que está trabalhando com este *software* na Universidade de Cincinnati, USA. A partir de análises comparativas tridimensionais com proteínas similares já caracterizadas bioquimicamente, essa abordagem permite a identificação de estruturas secundárias conservadas (hélices α e folhas β) e estruturas desordenadas (*random coil*) contituídas por alças (*loops*) (Branden et al., 2009).

Primeiramente, realizamos o alinhamento das estruturas primárias (resíduos de aminoácidos da IP6K de *L. braziliensis* (LbrIP6K), de *E. histolytica* e de *Homo sapiens* (IP6K2), sendo as duas últimas utilizadas como modelo, haja visto que já foram bioquimicamente caracterizadas (Wang et al., 2014). Ao compararmos LbrIP6K a estas

estruturas, obtivemos 19,72% de similaridade em relação à *E. histolytica* e 28,53% de identidade em relação à isoforma humana, conforme demonstrado na Figura 19. Além disso, identificamos algumas estruturas conservadas como hélices α e folhas β , *loops*, e um motivo de aminoácidos DFA (ácido aspártico, fenilalanina, alanina) na porção C terminal desta quinase (quadrados com linha preta) (Figura 19).

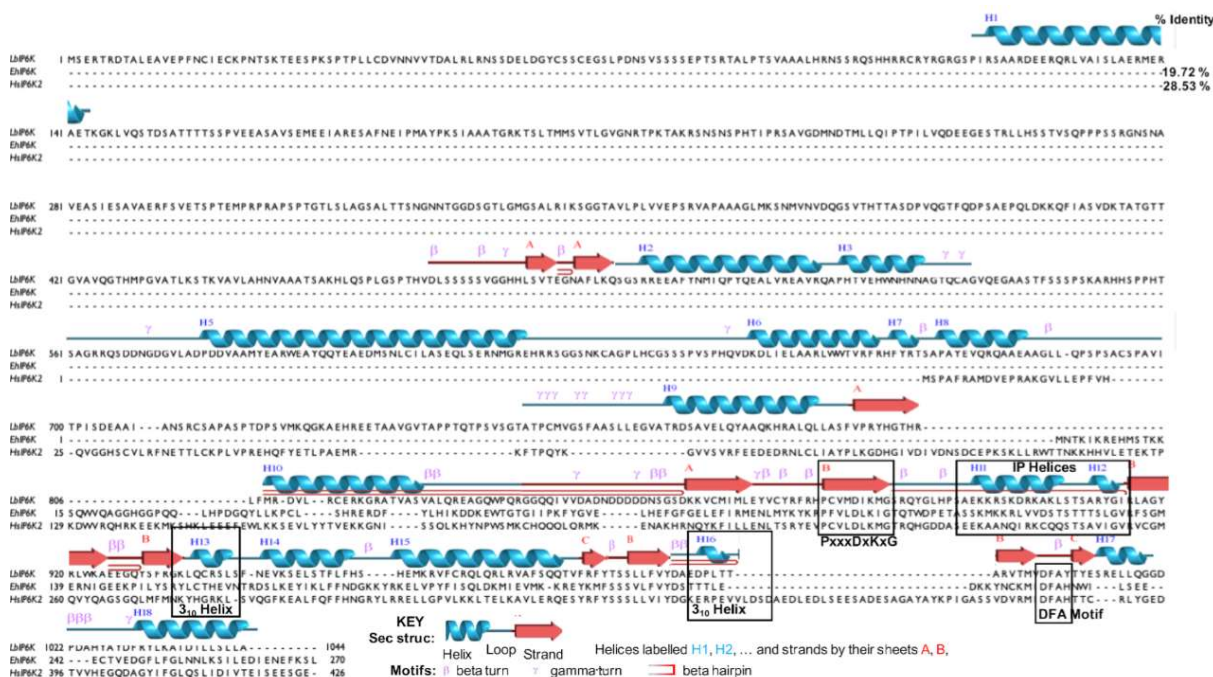


Figura 19. Comparação entre IP6K de *L. braziliensis* (LbrIP6K) e seus homólogos em *E. histolytica* (EIP6K) e *Homo sapiens* (HsIP6K2). Alinhamento entre as estruturas primárias revelou um % de identidade de 19,72% e 28,53% para EIP6K e HsIP6K2, respectivamente. O mapeamento das estruturas proteicas de *L. braziliensis* foi previsto pelo banco de dados Pictorial de estruturas 3D do EMBL-EBI no Protein Data Bank (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>). As coordenadas das estruturas destacadas nas caixas pretas foram estimadas usando as estruturas conhecidas de EIP6K como referência. O alinhamento foi visualizado usando Jalview v2.11.1.5.

Na Figura 20, mostramos a simulação da topologia molecular da estrutura secundária (Figura 20A) e terciária (Figura 20B) de LbrIP6K. Para determinação da estrutura secundária, utilizamos o *software* AlphaFold2, que utilizou a estrutura cristalizada de IP6K+ATP+IP₆ de *E. histolytica* presente no Protein Data Bank (PDB ID: 404F) como referência (Wang et al., 2014). Para visualizarmos a sobreposição e o mapeamento do substrato utilizamos a ferramenta PyMol v2.5. O complexo *E. histolytica* IP6K+ATP+IP₆ foi sobreposto à LbrIP6K para elucidar os resíduos de aminoácidos que interagem com ATP e IP₆ no bolso do substrato de LbrIP6K (Figura 20B-C). Na figura 23C-D, podemos observar LbrIP6K interagindo com IP₆, visualizado pelo LigPlot+v2.2.7.

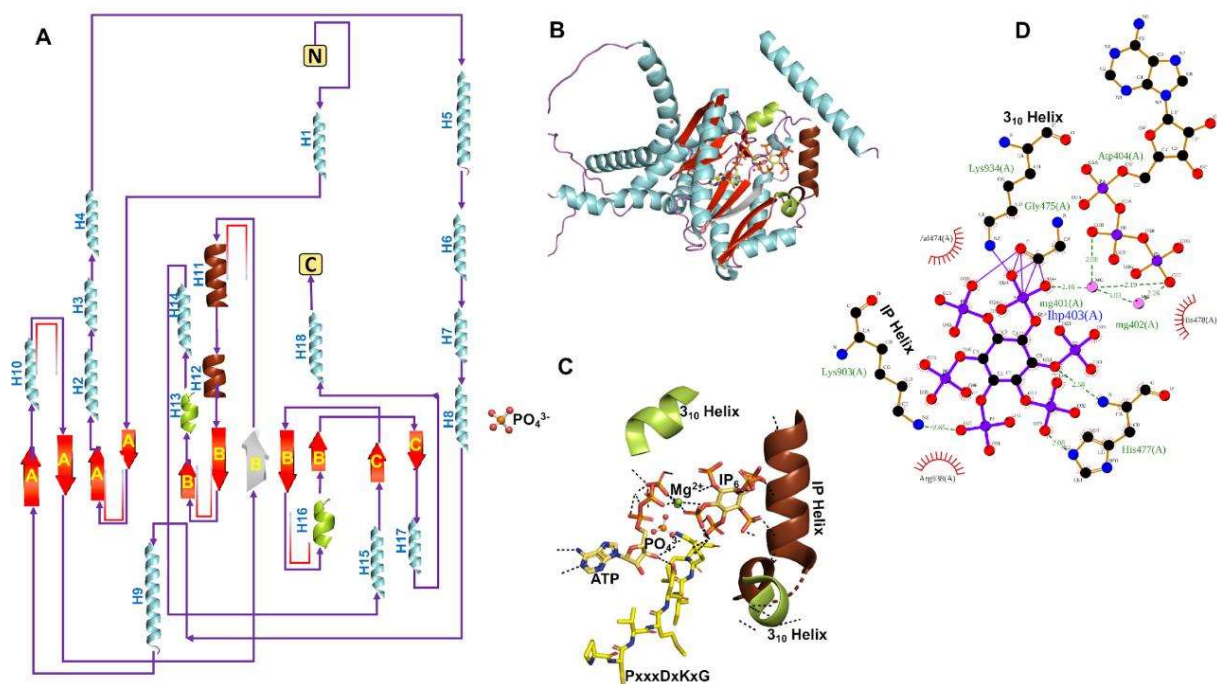


Figura 20. Análise *in silico* de LbrIP6K. A. Topologia da estrutura terciária de LbrIP6K conforme previsto pelo banco de dados Pictorial de estruturas 3D do EMBL-EBI no Protein Data Bank (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum>). B. Estrutura terciária de LbrIP6K predita por AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) e sobreposta à estrutura cristalizada de *E. histolytica* IP6K+ATP+IP₆. A sobreposição e o mapeamento do substrato foram visualizados por PyMol v2.5 (<https://pymol.org/2/>). A estrutura secundária da IP6K da *E. histolytica*, exceto os ligantes, foi ocultada para permitir a visualização da IP6K de *L. braziliensis*. A figura demonstra as fitas β (vermelho), α -hélices (azul) e as alças (roxo). Os motivos e α -hélices do sítio catalítico estão demonstradas em cinza e marrom escuro, respectivamente. ATP e IP₆ são mostrados como bastões (Amarelo = Carbono, Azul Escuro = Nitrogênio, Vermelho = Oxigênio, Laranja = Enxofre). Os íons de magnésio e fósforo são representados por bolas e bastões (bolas verdes = íons de magnésio, bolas laranjas = fósforo, bolas vermelhas = oxigênio, bastões brancos = ligações fósforo-oxigênio). C. Sítio de substrato de LbrIP6K representado como bastões ligados a hélices em interação. Traços pretos pontilhados representam contatos polares de moléculas em interação. D. LbrIP6K interagindo com IP₆ no bolso do substrato visualizado pelo LigPlot+v2.2.7 do EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/download2.html>). A estrutura é representada como uma figura 2D de bola e bastão (bolas pretas = carbono, bolas azuis escuras = nitrogênio, bolas vermelhas = oxigênio, bolas roxas = fósforo, bolas rosa = íons de magnésio, bastões laranja = interações independentes de IP₆, bastões roxos = interações dependes de IP₆, linhas pontilhadas verdes = distâncias atômicas). As estruturas que irradiam para o vermelho representam aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas.

A partir dessas análises podemos inferir que, mesmo apresentando uma longa sequência desestruturada em relação aos seus homólogos (porção N-terminal), LbrIP6K aparentemente possui o sítio catalítico e demais motivos (incluindo o DFA motif) conservados e capazes de realizar a síntese de IP₇ a partir de IP₆ e ATP. A porção contendo o sítio catalítico de IP6K de *L. braziliensis* que utilizamos (LbrIP6Kdomain) engloba as estruturas conservadas da porção C-terminal (α -hélices, fitas- β , loops, e DFA motif) mencionadas anteriormente (quadrados com linha preta). Porém, apresentou dificuldades em se apresentar de forma solúvel em nossos ensaios. Isso nos permite hipotetizar que, talvez, as α -hélices presentes na porção N-terminal cumpram alguma função da estabilidade desta quinase. Porém, mais ensaios envolvendo a proteína inteira são necessários para colhemos evidências que suportem esta

hipótese.

4.8 Ensaio funcional de complementação em levedura *S. cerevisiae*

Paralelamente aos ensaios previamente descritos, realizamos a clonagem de LbrIP6K no vetor de expressão de levedura pYES2 visando executar um ensaio de complementação na cepa de *S. cerevisiae* mutante para IP6K ($KCS1^{-/-}$) em parceria com o prof. Dr. José Renato R. Cussiol, UNIFESP-EPM, São Paulo. Após amplificação de LbrIP6K, ligação no vetor de clonagem pGEM T-easy e extração de DNA plasmidial, prosseguimos com a digestão do inserto (LbrIP6K) e do vetor pYES2 utilizando as enzimas específicas Eco RI e Hind III. Em seguida, realizamos a ligação do inserto no vetor pYES2 e transformamos essa construção em bactérias competentes XL1-blue. A Figura 21 apresenta um esquema da construção realizada e um gel de agarose evidenciando a presença de LbrIP6K no vetor pYES2 por PCR de colônias bacterianas (10 colônias positivas). Os ensaios de complementação estão sendo realizados pelo grupo do Dr. Renato Cussiol e até o momento não obtivemos resultados que possam evidenciar se LbrIP6K é capaz de sintetizar IP_7 em *S. cerevisiae*.

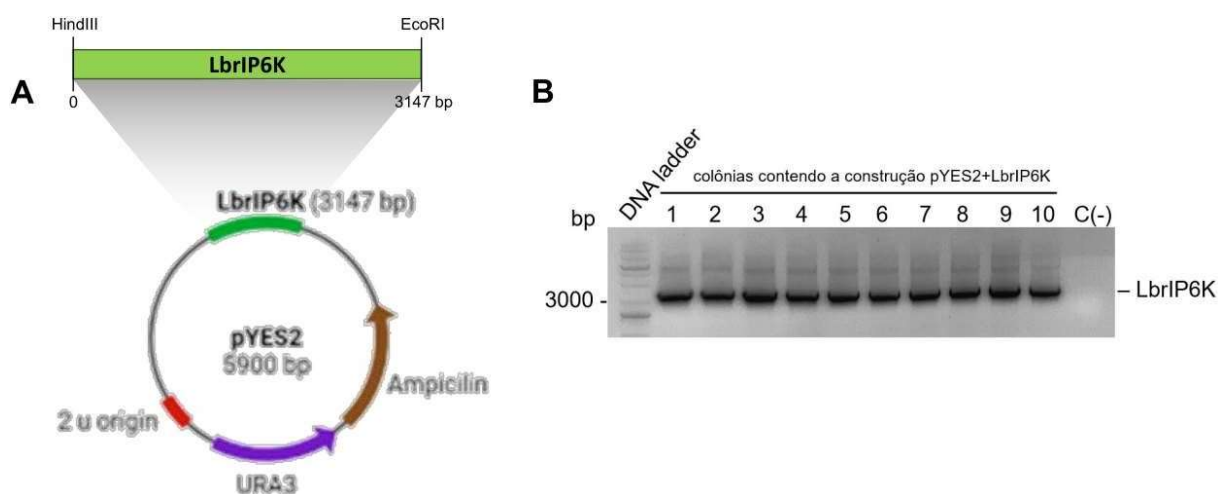


Figura 21. LbrIP6K foi clonada com sucesso no vetor pYES2. A. Esquema elucidando a construção pYES2 + LbrIP6K. B. Amplicons de 10 colônias selecionadas após transformação da construção pYES2+LbrIP6K em bactérias XL1-blue evidenciando a amplificação de LbrIP6K a partir dos *primers* específicos.

5. Conclusões

Nossos ensaios evidenciaram que as quinases envolvidas na via de síntese de pirofosfatos de inositol (LbrIP6K/LbrIP6Kdomain e LbrIP5K) são expressas em sistema heterólogo bacteriano, predominantemente na fração insolúvel do extrato bacteriano (após lise por sonicação) a partir de 2 h de indução com 1 mM IPTG utilizando *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RP. Ao substituímos a cepa de *E. coli* (Arctic Express RIL), observamos uma melhora

no percentual da proteína LbrIP5K expressa na fração solúvel do extrato bacteriano após indução por 24 h e lise por sonicação. Contudo LbrIP6Kdomain ainda permaneceu predominantemente expressa na fração insolúvel. Nossa hipótese é que essas quinases estavam sendo expressas em corpúsculos de inclusão. Para desafiar esta hipótese, utilizamos o método de lise bacteriana por alta pressão (*French-press*) para tentarmos romper estes corpúsculos presentes no extrato bacteriano da cepa *E. coli* Arctic Express RIL. Caso nossa hipótese esteja correta, essa abordagem possibilitaria um aumento do percentual de proteína expressa na fração solúvel do extrato bacteriano. Observamos que, de fato, após a lise por *French-press*, tanto LbrIP6Kdomain como LbrIP5K foram expressas parcialmente nas frações solúveis, embora em pouca quantidade. Em resumo, podemos concluir que a cepa *E. coli* Arctic Express RIL, bem como o método de lise bacteriana por alta pressão (*French-press*), são mais eficientes do que os métodos tradicionais (expressão em cepa *E. coli* BL21 DE3 e lise por sonicação) para solubilizar proteínas expressas em corpúsculos de inclusão.

Além disso, observamos que essas quinases são purificadas com certa facilidade pelo método de cromatografia por afinidade com metal (Ni^{2+}) imobilizado (IMAC). Acreditamos que a utilização de um cromatógrafo de última geração e colunas de cobalto imobilizado (Co^{2+}) permitirão uma otimização ainda maior na eficiência do processo de purificação destas quinases.

Futuramente, LbrIP6K / LbrPIP6Kdomain recombinante será usada para a síntese de IP₇ a partir de, respectivamente, I(3,4,5,6)P₅ e IP₆ isolados de *L. braziliensis* e um kit comercial contendo ATP marcado (γ -[(Propargil)-imido]-ATP). Como controle, usando a mesma abordagem, LbrIP5K recombinante será usada para sintetizar IP₆ (que não é um pirofosfato) a partir de I(3,4,5,6)P₅, usando o mesmo kit comercial contendo γ -[(propargil)-imido]-ATP. Após a obtenção dessas moléculas, extratos proteicos de *L. braziliensis* serão utilizados para realizar reações de pirofosforilação *in vitro*, nos quais se espera que haja apenas a hidrólise da porção pirofosfato de IP₇ e transferência não enzimática dos grupos β -fosfato para as proteínas-alvo. Em seguida, durante processo de purificação, as proteínas-alvo pirofosforadas serão capazes de reagir com azida acoplada à biotina, permitindo sua captura por *pull-down* usando esferas de estreptavidina. As proteínas capturadas serão identificadas por espectrometria de massas (LC-MS/MS) e análises posteriores serão capazes de identificar os resíduos de aminoácidos capazes de receber esta pirofosforilação.

Vale destacar que, em um estudo recente realizado pelo grupo de pesquisa liderado pelo Dr. Roberto Docampo, foi evidenciado que diversas quinases relacionadas a via de síntese de PP-IPs (sobretudo IP6K) aparentam ser fundamentais para manutenção do metabolismo de

T. cruzi. Resultados de nosso grupo de pesquisa evidenciam que a remoção de um único alelo de IP6K causou defeitos de motilidade e afetou a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Assim, acreditamos que a via de síntese dos PP-IPs contenha potenciais alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos contra parasitos tripanosomatídeos (incluindo *Leishmania* spp.). Deste modo, a compreensão do mecanismo de ação de IP₇, por exemplo, pode ser fundamental para uma abordagem direcionada para este fim, o que torna este trabalho ainda mais pertinente e relevante.

6. Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – números de processo 2019/10753-2, 2020/10277-3 e 2020/16465-6. Agradecemos ainda aos colaboradores que nos ajudaram na realização de diversos ensaios presentes nesta dissertação como prof. Dr. Nilmar S. Moretti (UNIFESP, São Paulo), prof. Dr. José Renato R. Cussiol (UNIFESP, São Paulo), prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (UNESP, Botucatu) e Dr. Jennifer A. Black (University of Glasgow, UK).

7. Referências

- . Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., et al. (2012). The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493. doi:10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- . Assis, L.H., Andrade-Silva, D., Shiburah, M.E., de Oliveira, B.C., Paiva, S.C., Abuchery, B.E., Ferri, Y.G., et al., (2021). Cell Cycle, Telomeres, and Telomerase in *Leishmania* spp.: What Do We Know So Far?. *Cells*, 10(11), 3195. doi:10.3390/cells10113195.
- . Brändén Carl-Ivar and John Tooze. 2009. *Introduction to Protein Structure*. 2nd ed. New York NY: Garland Pub.
- . Burza, S., Croft, S. L., and Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* 392, 951–970. doi:10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- . Chang, Y.-Y., Li, H., & Sun, H. (2017). Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) for Metalloproteomics and Phosphoproteomics. *Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells*, 329–353. doi:10.1016/b978-0-12-803814-7.00009-5
- . Cheung, R. C., Wong, J. H., & Ng, T. B. (2012). Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(6), 1411–1420. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4507-0>
- . Choi, J. H., Williams, J., Cho, J., Falck, J. R., and Shears, S. B. (2007). Purification, sequencing, and molecular identification of a mammalian PP-InsP5kinase that is activated when cells are exposed to hyperosmotic stress. *J. Biol. Chem.* 282, 30763– 30775. doi:10.1074/jbc.M704655200.
- . Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open biology*, 9(6), 190072. doi: 10.1098/rsob.190072.
- . Cordeiro, C. D., Saiardi, A., and Docampo, R. (2017). The inositol pyrophosphate synthesis pathway in *Trypanosoma brucei* is linked to polyphosphate synthesis in acidocalcisomes. *Mol. Microbiol.* 106,

319–333. doi:10.1111/mmi.13766.

. Croft, S. L., and Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin. Microbiol. Infect.* doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x.

. da Silva, M. S., and Cano, M. I. N. (2017). *Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids*. Bentham Science Publishers Available at: <http://ebooks.benthamscience.com/book/9781681084053/chapter/150163/> [Accessed May 1, 2017].

. da Silva, M. S., Perez, A. M., da Silveira, R. de C. V., de Moraes, C. E., Siqueira-Neto, J. L., Freitas-Junior, L. H., et al. (2010). The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiol.* 10, 136. doi:10.1186/1471-2180-10-136.

. da Silva, M. S., Segatto, M., Pavani, R. S., Gutierrez-Rodrigues, F., Bispo, V. da S., de Medeiros, M. H. G., et al. (2017). Consequences of acute oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1864, 138–150. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.11.001.

. da Silva M. S. (2021). DNA Double-Strand Breaks: A Double-Edged Sword for Trypanosomatids. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 669041. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.669041>

. Falgenhauer, E., von Schönberg, S., Meng, C., Mückl, A., Vogele, K., Emslander, Q., Ludwig, C., & Simmel, F. C. (2021). Evaluation of an E. coli Cell Extract Prepared by Lysozyme- Assisted Sonication via Gene Expression, Phage Assembly and Proteomics. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 22(18), 2805–2813. <https://doi.org/10.1002/cbic.202100257>

. Falke, J. J., & Corbin, J. A. (2013). Affinity Tags for Protein Purification. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 61–65. doi:10.1016/b978-0-12-378630-2.00173-0

. Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science, Chapter 5*(1), 5241–5.24.29. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>

. Jadav, R. S., Chanduri, M. V. L., Sengupta, S., and Bhandari, R. (2013). Inositol pyrophosphate synthesis by inositol hexakisphosphate kinase 1 is required for homologous recombination repair. *J. Biol. Chem.* 288, 3312–3321. doi:10.1074/jbc.M112.396556.

. Jorgensen, L., O'Neill, BK, Thomas, CJ *et ai*. Liberação de cloranfenicol acetil transferase de *Escherichia coli* recombinante por sonicação e prensa francesa. *Biotechnol Tech* 9, 477-480(1995). <https://doi.org/10.1007/BF00159561>

. Kurien, Biji T.; Scofield, R. Hal (2019). [Methods in Molecular Biology] Electrophoretic Separation of Proteins Volume 1855 (Methods and Protocols) || Lysis Buffer Choices Are Key Considerations to Ensure Effective Sample Solubilization for Protein Electrophoresis. , 10.1007/978-1-4939-8793-1(Chapter 5), 61–72. doi:10.1007/978-1-4939-8793-1_5

. Mantilla, B. S., Kalesh, K., Brown, N. W., Jr, Fiedler, D., & Docampo, R. (2021). Affinity- based proteomics reveals novel targets of inositol pyrophosphate (5-IP₇)-dependent phosphorylation and binding in *Trypanosoma cruzi* replicative stages. *Molecular microbiology*, 115(5), 986–1004. <https://doi.org/10.1111/mmi.14672>

. Mantilla, B. S., Amaral, L. D. Do, Jessen, H. J., and Docampo, R. (2021). The Inositol Pyrophosphate Biosynthetic Pathway of *Trypanosoma cruzi*. *ACS Chem. Biol.* doi:10.1021/acscchembio.0c00759.

. Mital, S., Christie, G., & Dikicioglu, D. (2021). Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial cell factories*, 20(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01698-w>

. Miskiewicz, E. I., & MacPhee, D. J. (2018). Lysis Buffer Choices Are Key Considerations to Ensure Effective Sample Solubilization for Protein Electrophoresis. *Electrophoretic Separation of Proteins*, 61–72. doi:10.1007/978-1-4939-8793-1_5

- . Morrison, B. H., Bauer, J. A., Kalvakolanu, D. V., and Lindner, D. J. (2001). Inositol Hexakisphosphate Kinase 2 Mediates Growth Suppressive and Apoptotic Effects of Interferon- β in Ovarian Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 24965–24970. doi:10.1074/jbc.M101161200.
- . Nagata, E., Luo, H. R., Saiardi, A., Bae, B. Il, Suzuki, N., and Snyder, S. H. (2005). Inositol hexakisphosphate kinase-2, a physiologic mediator of cell death. *J. Biol. Chem.* 280, 1634– 1640. doi:10.1074/jbc.M409416200.
- . Nazzaro, G., Rovaris, M., and Veraldi, S. (2014). Leishmaniasis: A disease with many names. *JAMA Dermatology* 150, 1204. doi:10.1001/jamadermatol.2014.1072.
- . Palmer, I., & Wingfield, P. T. (2012). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current protocols in protein science, Chapter 6, Unit 6.3*. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0603s70>.
- . Patino, L. H., Imamura, H., Cruz-Saavedra, L., Pavia, P., Muskus, C., Méndez, C., et al. (2019). Major changes in chromosomal copy number, gene expression and gene dosage driven by SbIII in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Sci. Rep.* doi:10.1038/s41598-019- 45538-9.
- . Perez-Franco, J. E., Cruz-Barrera, M. L., Robayo, M. L., Lopez, M. C., Daza, C. D., Bedoya, A., et al. (2016). Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. *PLoS Negl. Trop. Dis.* doi:10.1371/journal.pntd.0004739.
- . Pesesse, X., Choi, K., Zhang, T., and Shears, S. B. (2004). Signaling by higher inositol polyphosphates: Synthesis of bisdiphosphoinositol tetrakisphosphate (“InsP8”) is selectively activated by hyperosmotic stress. *J. Biol. Chem.* 279, 43378–43381. doi:10.1074/jbc.C400286200.
- . Rodríguez-Carmona, E., Cano-Garrido, O., Seras-Franzoso, J., Villaverde, A., & García- Fruitós, E. (2010). Isolation of cell-free bacterial inclusion bodies. *Microbial cell factories*, 9, 71. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-71>
- . Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172.
- . Rosano, G.L., Morales, E.S. and Ceccarelli, E.A. (2019), New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28: 1412-1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- . Roufarshbaf, M., Akbari, V. (2023). Desenvolvimento de Tampões de Solubilização e Redobrimento. In: Kopp, J., Spadiut, O. (eds) *Inclusion Bodies. Methods in Molecular Biology*, vol 2617. Humana, Nova York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2930-7_10
- . Saiardi, A., Bhandari, R., Resnick, A. C., Snowman, A. M., and Snyder, S. H. (2004). Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science* (80-.). 306, 2101–2105. doi:10.1126/science.1103344.
- . Saiardi, A., Caffrey, J. J., Snyder, S. H., and Shears, S. B. (2000). The inositol hexakisphosphate kinase family. Catalytic flexibility and function in yeast vacuole biogenesis. *J. Biol. Chem.* 275, 24686–24692. doi:10.1074/jbc.M002750200.
- . Shrestha, P., Holland, T. M., & Bundy, B. C. (2012). Streamlined extract preparation for *Escherichia coli*-based cell-free protein synthesis by sonication or bead vortex mixing. *BioTechniques*, 53(3), 163–174. <https://doi.org/10.2144/0000113924>
- . Wang, H., DeRose, E., London, R. et al. IP6K structure and the molecular determinants of catalytic specificity in an inositol phosphate kinase family. *Nat Commun* 5, 4178 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms5178>
- . Zhang, W.-W., and Matlashewski, G. (2019). Single-Strand Annealing Plays a Major Role in Double-Strand DNA Break Repair following CRISPR-Cas9 Cleavage in *Leishmania*. *mSphere* 4. doi:10.1128/msphere.00408-19.