

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/09/2024.

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 Biotecnologia, 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. Ensaaios 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

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.