

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Departamento de Genética e Evolução

ELLEN GOMES ALVES

Caracterização funcional da E3 ubiquitina ligase LinfCRL1 de *Leishmania infantum*

São Carlos – SP

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Departamento de Genética e Evolução

ELLEN GOMES ALVES

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA E3 UBIQUITINA LIGASE LINCRL1 DE
*LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira

São Carlos - SP

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular
Departamento de Genética e Evolução

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Mestrado da candidata Ellen Gomes Alves, realizada em 28/11/2024:

Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira
UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Lia Carolina A. S. Medeiros
Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR

Prof. Dra. Fernanda Aníbal
UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

DEDICATÓRIA

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha mãe, Ligia, por sempre acreditar que os sonhos de sua filha não são impossíveis, por ser tão persistente e cuidadosa sempre. Por me ouvir e me dar o suporte necessário para que eu esteja aqui hoje. Por me ensinar o respeito à natureza e assim criar a curiosidade necessária para a busca de respostas.

Para além disto, gostaria também de expressar meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira, pela oportunidade de ingressar no programa de mestrado e por todo o apoio ao longo dessa jornada. Também estendo meus profundos agradecimentos à Prof. Dra. Sandra Regina Maruyama, pela confiança depositada em mim durante este percurso acadêmico.

Minha gratidão ao Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho do Instituto de Biologia da Unicamp pela generosidade ao disponibilizar os protocolos de transfecção e os plasmídeos que foram essenciais para o desenvolvimento dos experimentos. Agradeço, ainda, à Dra. Juliana Ide Aoki, cuja supervisão na execução dos ensaios de infecção *in vitro* foi fundamental, me orientando com extrema maestria e dedicação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Santos da Silva, do Instituto de Química da USP, sou imensamente grata pela orientação valiosa nos ensaios de EdU e citometria celular. Sua vasta experiência no estudo do ciclo celular de tripanossomatídeos foi de grande inspiração e aprendizado para mim. Não poderia deixar de mencionar meus colegas Vitor Luiz da Silva e Marcos Antônio Fernandes de Oliveira, que estiveram ao meu lado durante a execução dos experimentos, me oferecendo apoio e tratando-me com muita atenção e carinho ao longo desse processo.

Aos meus atuais parceiros de laboratório, Camila, Carol, Wesley, Taissa e Mariele, obrigada por tornarem os dias mais leves, agradeço infinitamente pela amizade e consideração que possuem comigo. Aos meus antigos colegas de laboratório Luana, Nayore e Giovana, meus sinceros agradecimentos por acreditarem e serem pacientes ao longo deste percurso, vocês adicionaram e adicionam muito tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido ao prof. Dr. Felipe Roberti Teixeira em seu projeto regular (Processo 2020/15771-6) e aos auxílios vinculados ao projeto, em forma de bolsa e reserva técnica para que eu pudesse participar de Congressos e Encontros, e compras de materiais necessários para

a realização deste projeto. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“Todos os seres olham para o céu e enxergam estrelas; nós, humanos, olhamos e enxergamos constelações”.

Walt Whitman

RESUMO

Enzimas E3 ubiquitina–ligases do tipo CRL1s são um complexo enzimático composto por quatro proteínas principais: SKP1, CUL1, RBX1 e uma proteína F-box, que se liga à SKP1 através de seu domínio F-box, recrutando substratos para a ubiquitinação. O processo de ubiquitinação ocorre em várias etapas e é altamente regulado, envolvendo três enzimas essenciais: E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) e E3 (ligases de ubiquitina), que desempenham um papel crucial no reconhecimento e na transferência de ubiquitina para a proteína-alvo. Esse processo garante a regulação da função e o destino das proteínas-alvo, direcionando-as para o proteossoma para degradação ou modulando suas funções. As CRL1s são a classe mais estudada de E3 ligases em eucariotos, sendo responsável pela regulação de vários processos incluindo o ciclo celular. Em parasitas *Leishmania*, esta classe de enzimas ainda não havia sido descrita. Neste estudo, identificamos genes ortólogos aos de CRL1s de *H. sapiens* em *L. infantum*, mostrando conservação das regiões de interação entre as proteínas do complexo. Geramos linhagens nocaute de *L. infantum* para os genes LINF_110018100 (*LinfSKP1*), LINF_21000530 (*LinfRBX1*) e LINF_240029100 (*LinfCUL1*) utilizando o sistema CRISPR-Cas9. O nocaute de *LinfCUL1* resultou em uma linhagem viável, mas com comprometimento da proliferação de promastigotas e causou um acúmulo de células na fase S final do ciclo celular, como evidenciado por ensaios de citometria de fluxo e EdU. Além disso, o nocaute de *LinfCUL1* induziu a formação de rosetas na cultura celular e interferiu significativamente na infectividade dos promastigotas. Adicionalmente, nocautes de *LinfSKP1* e *LinfRBX1* resultaram em parasitas inviáveis, sugerindo que esses genes são potencialmente essenciais para o parasita. A expressão do gene *LinfCUL1* na linhagem $\Delta cul1$ restaurou o fenótipo do tipo selvagem quanto a proliferação de promastigotas, o que não ocorreu quando um mutante de *LinfCUL1* (*LinfCul1* DN) incapaz de formar o complexo LinfCRL1, foi utilizado, confirmando que o efeito do nocaute está relacionado à função do complexo LinfCRL1. Nossos resultados indicam que o gene *LinfCUL1* está associado à regulação do ciclo celular, viabilidade e infectividade de *L. infantum*.

ABSTRACT

CRL-type E3 ubiquitin ligases are enzymatic complexes composed of four main proteins: SKP1, CUL1, RBX1, and an F-box protein, which binds to SKP1 through its F-box domain, recruiting substrates for ubiquitination. The ubiquitination process occurs in multiple steps and is highly regulated, involving three essential enzymes: E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), and E3 (ubiquitin ligases), which play a crucial role in recognizing and transferring ubiquitin to the target protein. This process ensures the regulation of target protein function and fate, directing them to the proteasome for degradation or modulating their functions. CRLs are the most studied class of E3 ligases in eukaryotes and are responsible for regulating various processes, including the cell cycle. In *Leishmania* parasites, this class of enzymes has not yet been described. In this study, we identified orthologous genes to human CRLs in *L. infantum*, showing conservation of interaction regions between the complex proteins. We generated knockout strains of *L. infantum* for the genes LINF_110018100 (*LinfSKP1*), LINF_21000530 (*LinfRBX1*), and LINF_240029100 (*LinfCUL1*) using the CRISPR-Cas9 system. The knockout of *LinfCUL1* resulted in a viable strain but showed impaired promastigote proliferation and led to an accumulation of cells in the late S phase of the cell cycle, as evidenced by flow cytometry and EdU assays. Furthermore, *LinfCUL1* knockout induced rosette formation in cell culture and significantly interfered with promastigote infectivity. Additionally, knockouts of *LinfSKP1* and *LinfRBX1* resulted in non-viable parasites, suggesting that these genes are potentially essential for the parasite. The add-back strain of *LinfCUL1* restored the wild-type phenotype in terms of promastigote proliferation, which did not occur when a mutant *LinfCUL1* (*LinfCul1* DN), incapable of forming the *LinfCRL1* complex, was used, confirming that the knockout effect is related to the function of the *LinfCRL1* complex. Our results indicate that CRL genes are associated with cell cycle regulation, viability, and infectivity in *L. infantum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida das <i>Leishmania spp.</i>	18
Figura 2. Ciclo celular de tripanosomatídeos.	19
Figura 3. Sistema ubiquitina-proteassoma.	22
Figura 4. Representação esquemática do proteassoma 20S e unidades 26S catalíticas constitutivas e imunoproteassoma.	23
Figura 5. Classes de Cullin-RING ligases de eucariotos.	24
Figura 6. Regulação do ciclo celular por E3 ubiquitina-ligases CRL1 e APC.	25
Figura 7. Sistema para amplificação por PCR de fragmentos direcionados.	33
Figura 8. Mapa pLEXSY-Neo.	37
Figura 9. Desenho da sequência <i>LinfCul1 DN</i> (dominante negativo).	38
Figura 10. Digestão do vetor pLexy-Neo com as enzimas <i>NcoI</i> e <i>NotI</i>	39
Figura 11. Digestão puc 57 <i>LinCul1 DN</i>	39
Figura 12. Linearização com <i>SwaI</i>	41
Figura 13. Confirmação nocaute de <i>LinfCUL1</i>	45
Figura 14. Confirmação dos clones de Δ <i>cull1</i>	46
Figura 15. Efeitos do nocaute de <i>LinfCUL1</i> em promastigotas de <i>L. infantum</i>	47
Figura 16. Demonstração esquemática da sequência de <i>LinfCul1</i> selvagem (WT) e <i>LinfCul1 DN</i>	48
Figura 17. Determinação estrutural de <i>LinfCul1 DN</i> ou <i>LinfCul1</i> com <i>LinfSkp1</i> pelo AlphaFold2.	49
Figura 18. Ensaio de co-imunoprecipitação entre <i>3xmyc-mCherry-LinfSkp1</i> com <i>LinfCul1-HA</i> ou <i>LinfCul1 DN-HA</i> em <i>L. infantum</i>	50

Figura 19. Interferência da reintrodução do gene <i>LinfCUL1 WT</i> ou <i>LinfCul1 DN</i> na linhagem $\Delta cul1$	51
Figura 20. Agregação de rosetas <i>in vitro</i>	53
Figura 21. Análise de formação de rosetas.	56
Figura 22. Análise do ciclo celular de $\Delta cul1$ e da linhagem celular parental.....	59
Figura 23. Análises dos dados de infecção <i>in vitro</i>	62
Figura 24. Infecção <i>in vitro</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers utilizados para inserção do cassette de reparo com gene de resistência para nocaute dos genes da LinfSKP1 e LinfCul1 e LinfRbx1, disponíveis no sítio: http://www.leishgedit.net/Home.html	31
Tabela 2 - Primers utilizados para amplificação dos sgDNAs para os genes LinfSKP1 e LinfCul1 e LinfRbx1, disponíveis no sítio: http://www.leishgedit.net/Home.html	31
Tabela 3 - Primers utilizados para avaliação da construção das linhagens de <i>Leishmania infantum</i> nocaute para os genes <i>LinfSKP1</i> e <i>LinfCul1</i> e <i>LinfRbx1</i> por PCR.	31
Tabela 4 - Primers utilizados para verificação da inserção dos genes de resistência nas linhagens nocaute de <i>L. infantum</i> Cas9T7 por PCR.	32
Tabela 5- Reação e ciclagem de PCR para amplificação dos cassetes de reparo.	32
Tabela 6 - Reação e ciclagem de PCR para amplificação dos sgRNAs.	32
Tabela 7 - Primers utilizados para inserção dos sítios de restrição <i>NcoI</i> e <i>NotI</i> nas extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente.....	40
Tabela 8 - Ciclagem utilizada para amplificação do gene LinfCUL1.	41
Tabela 9 - Sequência de aminoácidos (sequência primária). Apenas a sequência de LinfCul1 DN foi entregue ao AlphaFold2 para sua predição estrutural.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

18S rRNA ou SSU 18S – Subunidade menor do RNA ribossomal de 18S

ATP - adenosina trifosfato

BMDM - Macrófagos derivados de medula óssea (Bone marrow-derived macrophage)

CaCl₂ - Cloreto de cálcio

Cas9 - CRISPR-associated enzyme 9

CO₂ - Dióxido de carbono

CRL - Cullin RING Ligase

CUL - Cullin protein

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

dNTP - desoxinucleotídeos trifosfatos

DN - Dominante negativo

DNA - ácido desoxirribonucleico

DUB - Enzimas deubiquitinases

E1 - Enzima ativadora de ubiquitina

E2 - Enzima carreadora de ubiquitina

E3 - enzima conjugadora de ubiquitina

Edu - 5-ethynyl-2'-deoxyuridin

G0 - estado de quiescência do ciclo celular

G1 - Gap1, primeira fase do ciclo celular

G2 - Gap 2, segunda fase do ciclo celular

HCl – Ácido clorídrico

HEPES - ácido N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(2-etano sulfônico)

HECT - Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus

HS - *H. sapiens*

K - kinetoplasto

Kb - Kilobase

KDa - quilodalton

KCl – Cloreto de potássio

LC – Leishmaniose cutânea

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LV – Leishmaniose visceral

M199 - meio de cultivo
M – Molar
M - Mitose
Mb – Mega base
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
MgCl₂ – Cloreto de magnésio
mL – Mililitro
mm - milímetros
mM – Milimolar
MOI - Multiplicidade de infecção
N - Núcleo
ng – Nanograma
Pb – Pares de base
PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
Pol II - RNA Polimerase II
RBX - Ring box protein
RING - Really interesting new gene
RNA - ácido ribonucleico
S - Fase de síntese do ciclo celular
sgRNA - RNA guia
SBF - Soro Bovino Fetal
SCF - Skp1-Cul1-F-box complex
SKP - S-phase kinase-associated protein
SUP - Sistema ubiquitina proteassoma
T7 - polimerase T7
μL – Microlitro
μM - micromolar
Ub - ubiquitina
UAE - Ubiquitin-Activating Enzymes
UBC - Ubiquitin-Conjugating Enzymes
UEV - Ubiquitin E2 Variant

WT - Wild type

SUMÁRIO

1. Introdução

1.2 Ciclo Celular de Leishmania.....	18
1.2.1 Fases G0 e G1	19
1.2.2 Fase S.....	20
1.3.3 Fase G2	20
1.2.4 Fase M.....	20
1.3 Sistema Ubiquitina Proteassoma e enzimas E3 do tipo Cullin-RING Ligases (CRLs).....	21
1.4 Sistema ubiquitina proteassoma em <i>Leishmania spp</i>	25

2. Objetivos

2. 1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos	28
2.3. Hipótese	28

3. Metodologia

3.1 Cultivo de promastigotas de <i>L. infantum</i>	28
3.1. 1 Obtenção de clones a partir das culturas promastigota	28
3.2 Nocaute gênico por CRISPR-Cas9	29
3.3 Curva de crescimento de promastigotas	34
3.3.1 Taxa de proliferação celular por Population Doubling (PD)	34
3.4 Análise do Ciclo Celular.....	34
3.5 Análise de Formação de Rosetas	35
3.6 Análise de ciclo celular e incorporação de Edu	35
3.7 Obtenção de linhagens add-back de LinfCul1 selvagem e dominante negativo	36
3.7.1 Construção dos cassetes para addback	36
3.7.2 Construção da sequência de LinfCUL1 dominante negativo.....	37
3.7.4 Clonagem LinfCul1-HA WT	40
3.7.5 Linearização e preparação dos cassetes para transfecção	41
3.8- Co-imunoprecipitação	42
3.9 Ensaio de infecção in vitro com cultura celular primária	42
3.9.1 Extração e cultivo de macrófagos	42
3.10 Análise estrutural de LinfCul1 DN por AlphaFold.....	43

4. Resultados e Discussão

4.1 Nocaute por CRISPR-Cas9 dos genes LinfSKP1, LinfCUL1 e LinfRBX1.....	45
4.2 Seleção de clones da linhagem $\Delta cull1$	46

4.3 Caracterização da linhagem $\Delta cul1$	46
4.3.1 Proliferação celular	46
4.3.2 Expressão do gene <i>LinfCUL1</i> selvagem ou mutante (add-back) na linhagem $\Delta cul1$.	48
4.3.3 Formação de Rosetas.....	51
4.3.4 Relação de LinfCul1 no ciclo celular de <i>L. infantum</i>	57
4.4 Infecção <i>in vitro</i>	60
5.1. Publicação de Artigos	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmania: epidemiologia e ciclo de vida

Existem mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* que causam leishmanioses, um conjunto de doenças parasitárias potencialmente fatais, estando entre as 10 principais doenças tropicais negligenciadas, com 700.000 a 1.000.000 de pessoas infectadas anualmente ¹. A complexa transmissão do parasita ocorre por meio da picada de vetores flebotomíneos fêmeas, com distinção dos vetores, sendo *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. As diferentes espécies de *Leishmania* provocam manifestações clínicas variadas, sendo classificadas em leishmaniose tegumentar ou visceral. Na leishmaniose tegumentar as lesões cutâneas podem se manifestar de maneira localizada, mucocutânea, cutânea difusa ou disseminada. Já na forma visceral, geralmente é causada pelos parasitas do complexo *Leishmania donovani*, que inclui *L. donovani* e *L. infantum*, sendo esta última o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) no Brasil, como descrito pelo Ministério da Saúde ². Em 2022, o Brasil concentrou em 92% dos casos notificados de LV, tendo em média cerca de 3.500 casos registrados anualmente, com incidência 2 casos/100.000 por habitante e possuindo uma letalidade média de 8,2% ³⁻⁵.

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam dois estágios celulares principais: o estágio extracelular flagelado, conhecido como promastigota, e a forma intracelular que possui o seu flagelo reduzido e internalizado, denominada de amastigota. Estes parasitas apresentam ciclo de vida dixênico, ou seja, possuem dois hospedeiros, sendo um vertebrado e um inseto vetor. O ciclo inicia quando insetos flebotomíneos realizam a hematofagia de um hospedeiro vertebrado infectado, e as formas amastigotas do parasita são absorvidas pelo vetor (**Figura 1**). Quando estes parasitas se dirigem ao intestino médio do vetor, eles diferenciam em promastigotas procíclicas (forma flagelada e divisível) que migrarão para a porção média anterior do intestino do vetor, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas através da metaciclogênese (forma infectante e não divisível) ^{3,4}.

O outro momento importante na diferenciação celular deste parasita se dá no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos do hospedeiro vertebrado infectado, em que as formas promastigotas se diferenciam no estágio intracelular amastigota. Recentemente, foi revelado que promastigotas metacíclicas são capazes de se re-diferenciar em promastigotas pró-cíclicas no vetor, aumentando seu crescimento populacional em um segundo momento de hematofagia (**Figura 1**). ^{6,7}

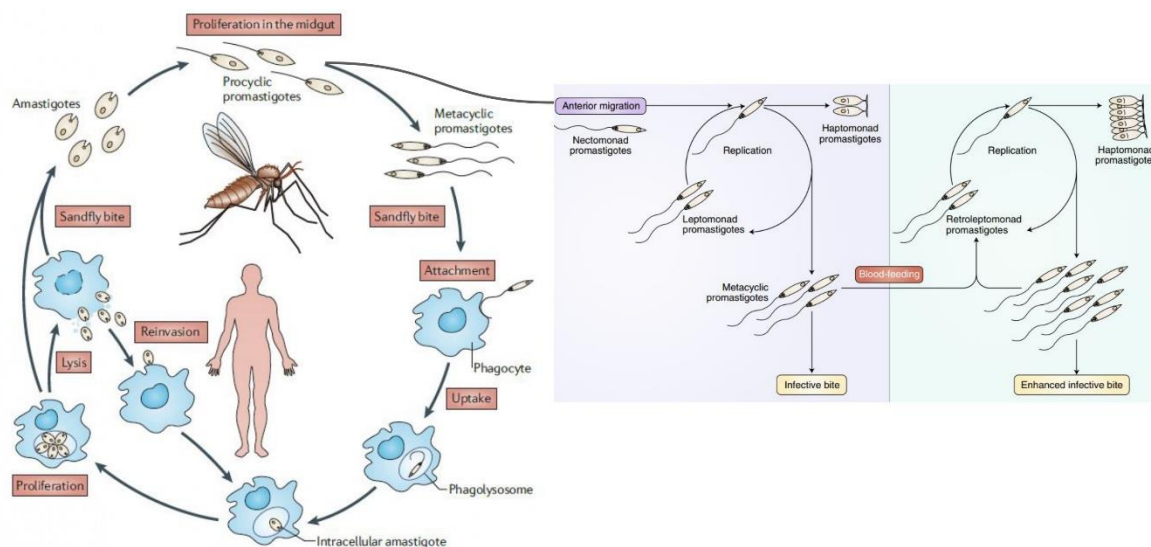


Figura 1. Ciclo de vida das *Leishmania spp.*

O parasita alterna entre duas formas principais – promastigota no hospedeiro invertebrado (flebotomíneo) e amastigota no hospedeiro vertebrado. No inseto vetor, as promastigotas proliferam no trato digestivo e migram para a região bucal, onde são transmitidas durante a picada. No hospedeiro vertebrado, como humanos e cães, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e se transformam em amastigotas, forma intracelular que prolifera e causa a leishmaniose. Além disso, outro estágio do ciclo de vida da *Leishmania* que ocorre quando estes parasitas se duplicam no intestino do flebotomíneo após múltiplas e sucessivas hematofagias. Adaptada de ^{6,7}.

1.2 Ciclo Celular de *Leishmania*

Os Tripanossomatídeos são protozoários flagelados pertencentes à família *Trypanosomatidae*, da qual se destacam os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* que possuem as sequências dos eventos relacionados ao ciclo celular conservadas ao longo da evolução. No entanto, eles apresentam características estruturais singulares entre suas formas replicativas e não replicativas (**Figura 2**) ⁸. Entre as diversas espécies do gênero *Leishmania*, estes parasitas apresentam um estilo de vida heteroxênico (as espécies transitam entre diferentes tipos de hospedeiros ao longo do seu ciclo de vida). Essa característica implica em alterações morfológicas especificamente distintas ^{9,10}. Além disso, os tripanossomatídeos são conhecidos pela sua alta plasticidade genômica, adaptando-se rapidamente a ambientes desafiadores. A

replicação e o reparo não ortodoxos do DNA, os fatores de estresse da replicação e as repetições do DNA são reconhecidos em *Leishmania* como contribuintes para essa instabilidade intrínseca.

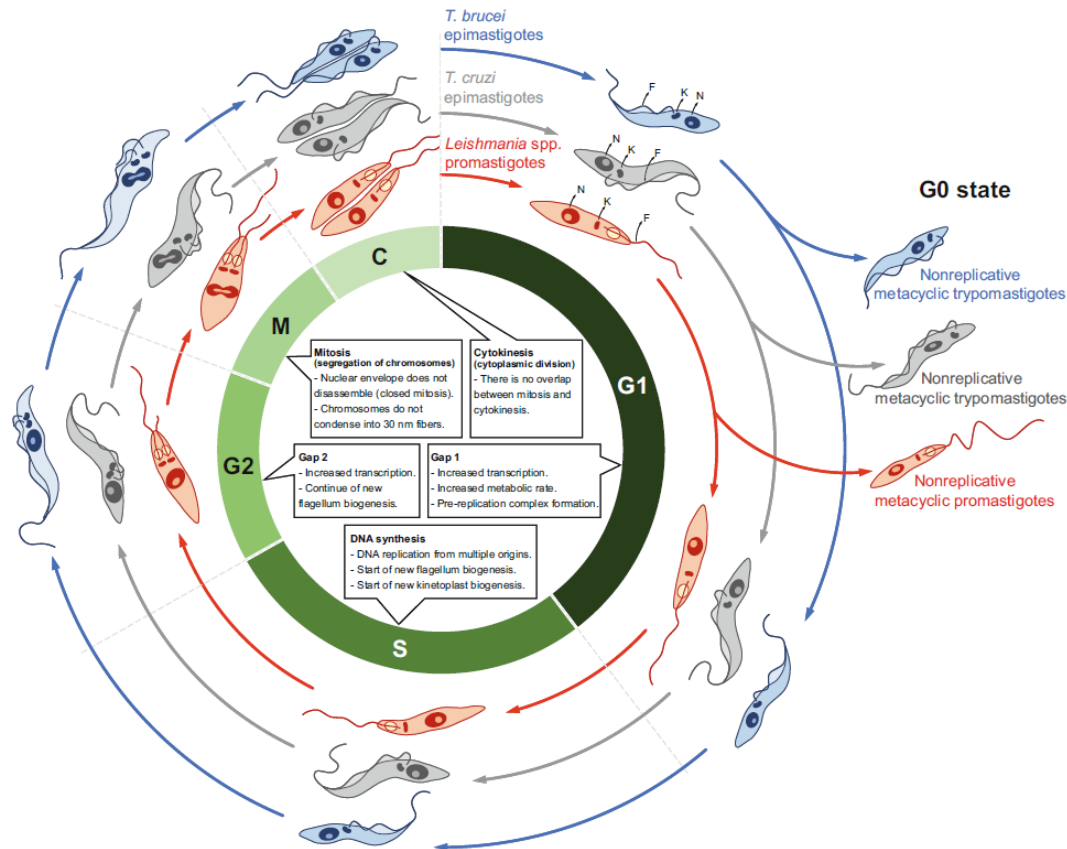


Figura 2. Ciclo celular de tripanosomatídeos.

Diagrama demonstrando as diferenciações morfológicas que ocorrem através das passagens entre as diferentes fases do ciclo celular, em destaque para este trabalho, observa-se em vermelho a passagem do ciclo celular em espécies de *Leishmania*. Imagem retirada de ⁸.

1.2.1 Fases G0 e G1

As formas infectantes de *Leishmania* (promastigotas metacíclicas) permanecem na fase G0 (quiescente), e este comportamento sugere que os eventos de proliferação e infecção são exclusivos ^{11,12}. Em diversos tripanosomatídeos, a maior parte do ciclo celular ocorre na fase G1, que se caracteriza por uma alta taxa de transcrição e síntese proteica de fatores transcricionais, além do estabelecimento de um complexo pré-replicativo divergente em locais cromossômicos específicos ¹³.

1.2.2 Fase S

Ainda não foi descrito a existência de um *checkpoint* entre as fases G1 e S em tripanossomatídeos, como ocorre com outros eucariotos ⁸. A fase S é a segunda maior etapa do ciclo celular, demonstrando sua importância para os parasitas ¹². Nela ocorre o recrutamento de complexos proteicos pré-replicação nas origens de replicação, caracterizando o início da fase S, na qual deve ocorrer a replicação das moléculas de DNA ¹³. Um evento marcante da fase S é o início da duplicação flagelar nas *Leishmania* ⁸.

1.3.3 Fase G2

Proteínas homólogas envolvidas com a biogênese de centríolos descritos em modelos eucariotos estão associados ao corpo basal e a biogênese do flagelo ^{14,15}. Baseando-se em estudos entre organismos distintos ¹⁶, observou-se que durante a fase G2 a maioria dos tripanossomatídeos controla o aumento da taxa de transcrição, retomando a intensa síntese de proteínas, que será necessária para a conclusão da divisão celular. Todo esse processo infere no aumento do volume e tamanho celular destes parasitas ¹⁷.

Uma característica divergente do ciclo celular dos tripanossomatídeos quando comparado a outros modelos eucariotos é que a fase G2 normalmente é a mais curta do ciclo celular, podendo variar em termos de duração. Por exemplo, em *L. amazonensis*, as fases G2 e M têm a mesma duração e são as mais curtas do ciclo celular ¹². Se, ao final da fase G2, a célula não apresentar anomalias relacionadas ao DNA e exibir um ambiente intracelular e tamanho favoráveis à divisão, ela prosseguirá para a mitose ⁸.

1.2.4 Fase M

Durante a mitose, os tripanossomatídeos não desintegram seu envelope nuclear e realizam um processo de mitose fechada, organizado por estruturas semelhantes a corpos polares do fuso. Estudos demonstram que espécies de *Leishmania*, compartilham essencialmente todos os componentes citocinéticos identificados, mas apresentam uma gama ainda mais ampla de eventos divergentes que merecem investigação ¹⁸. Além disso, os tripanossomatídeos não conseguem condensar seus cromossomos em fibras de 30 nm devido à ausência da porção N-terminal e do domínio globular da histona H1, além da falta de fosforilação na serina 10 da histona H3 (H3S10) ^{19,20}. Em mamíferos, as fases do ciclo celular, mitose e citocinese se sobrepõem, uma vez que a citocinese começa antes que a segregação dos cromossomos mitóticos esteja completa. Curiosamente, os tripanossomatídeos parecem não seguir estritamente essa premissa. Por exemplo, em *Leishmania spp.*, uma vez que a mitose

termina, a célula passa por uma rápida remodelação em forma, primeiro crescendo em comprimento e, em seguida, em largura antes da citocinese, que finaliza a divisão celular, gerando duas células filhas^{8,10,18}. Embora desafiadoras, todas essas peculiaridades relacionadas às fases do ciclo celular podem fornecer novas rotas para a busca de alvos adequados para intervenções no ciclo celular de parasitas visando sua eliminação.

1.3 Sistema Ubiquitina Proteassoma e enzimas E3 do tipo Cullin-RING Ligases (CRLs)

O sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) é o principal mecanismo responsável pela proteólise intracelular em eucariotos, atuando na degradação seletiva de muitas proteínas de vida curta. Essa degradação dependente de ubiquitinação desempenha papéis cruciais no controle de diversos processos celulares, como a morte celular, o ciclo celular, o crescimento e a proliferação celular, a endocitose, a transdução de sinais, a internalização de receptores, dentre outros²¹⁻²³. A ubiquitinação é um processo enzimático multipasso e altamente ordenado, no qual uma molécula de ubiquitina (Ub), composta por 76 resíduos de aminoácidos, é conjugada ao grupo ϵ -amino de um resíduo de lisina interno ou ao N-terminal do substrato **(Figura 3)**²¹.

O processo de ubiquitinação ocorre através ação de três enzimas: E1 (UAE -*Ubiquitin Activating Enzyme*), responsável pela ativação da ubiquitina utilizando ATP; as E2 (*Ubiquitin Conjugating Enzyme*), que recebem a Ubiquitina das E1 e as transferem até às E3 ubiquitina-ligases, que reconhecem o substrato e promovem a sua ubiquitinação^{22,24,25}. Essa modificação pós-traducional no substrato pode resultar em mono ou poliubiquitinação, direcionando a proteína-alvo para a degradação via proteassoma ou modulando sua função celular. O processo de ubiquitinação é reversível, sendo as enzimas deubiquitinases (DUBs) responsáveis por removerem as ubiquitinas, reciclando-as^{22,24,25}. **(Figura 3)**.

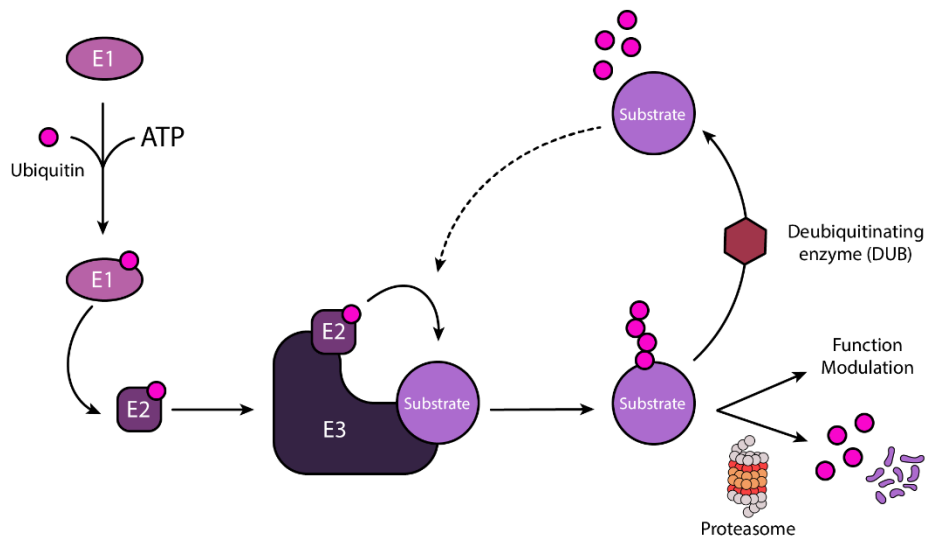


Figura 3. Sistema ubiquitina-proteassoma.

As enzimas E1, E2 e as E3 ubiquitina-ligases catalisam a ubiquitinação do substrato-alvo. Esta modificação pós-traducional ocasiona a degradação pelo proteassoma ou modulação de função do substrato. Esse processo é reversível pela atividade enzimática das DUBs, as quais removem as ubiquitinas dos substratos. Adaptada de ²⁴.

O proteassoma é um complexo proteolítico multi-subunidade, cuja atividade é responsável pela maior parte da proteólise intracelular ²⁶. Ele é constituído por uma subunidade 20S que apresenta forma semelhante a um β -barril possuindo 4 anéis com 7 proteases cada, sendo 2 externos e os outros 2 internos ²⁶. Esse β -barril pode interagir com diferentes “tampas” como proteassoma constitutivo que possui as porções 19S formando o proteassoma 26S e o imunoproteassoma contendo as porções 19S e PA28 (**Figura 4**). O proteassoma 26S realiza a degradação de proteínas ubiquitinadas e, posteriormente libera os aminoácidos correspondentes ^{27,28}.

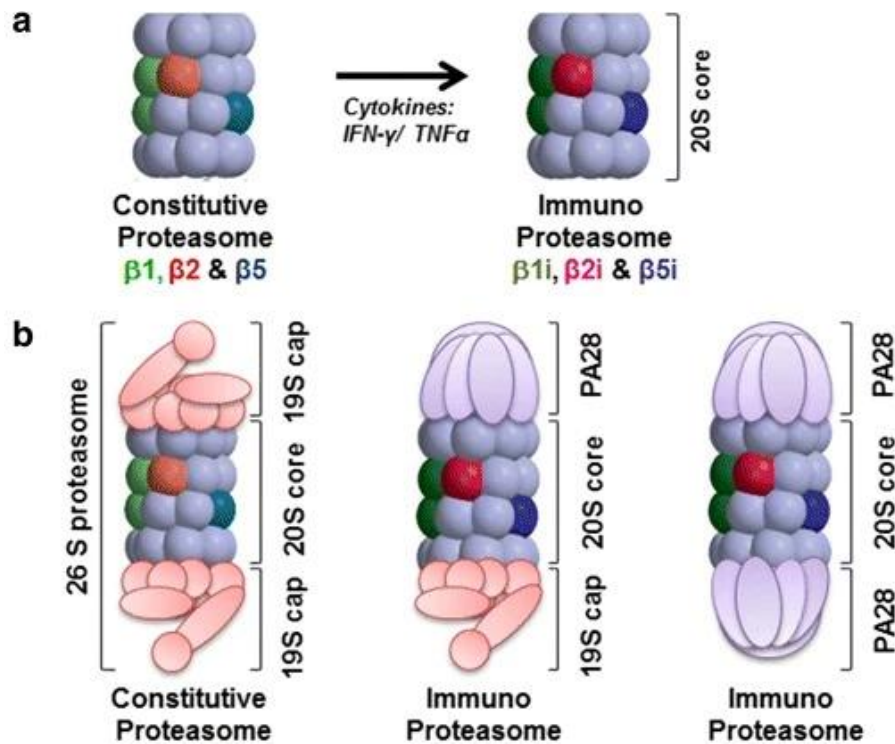


Figura 4. Representação esquemática do proteassoma 20S e unidades 26S catalíticas constitutivas e imunoproteassoma.

Esquema geral do proteassoma 20S e das unidades 26S catalíticas constitutivas imunoproteassoma. A) Proteassoma central 20S. B) Proteassoma constitutivo ou imunoproteassoma 26S com diversas proteínas de tampa. Adaptada de²⁹.

A especificidade da ubiquitinação de proteínas é determinada pela ação das E3 ubiquitina ligases. Com base nos domínios de interação dessas ligases com as enzimas E2, elas podem ser classificadas em dois tipos principais: HECT (*Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus*) e RING (*Really Interesting New Gene*). No genoma humano, há mais de 30 E3 ligases do tipo HECT e aproximadamente 600 do tipo RING. O número de genes responsáveis pela codificação de E3 ligases é maior do que o número de genes humanos que codificam proteínas quinases demonstrando sua complexidade e importância para as células^{27,30}.

As enzimas E3 do tipo RING podem ser monoméricas, diméricas ou multiméricas, contendo diferentes subunidades. As E3 multiméricas mais estudadas são as baseadas em Cullin (utilizando Cullin como um *scaffold* molecular), que inclui as Cullin RING-Ligases (CRLs)³¹ (**Figura 5**). As CRLs interagem no C-terminal com uma proteína RING-box, denominada RBX1 e no N-terminal interage com diferentes proteínas adaptadoras (**Figura 5**).

Dentre essas, a mais bem explorada classe de CRLs são as CRL1, também conhecidas como SCF1 (SKP1, Cullin 1, F-box) que possuem a proteína SKP1 como proteína adaptadora para interação com proteínas com domínio F-box (F-box proteins ou FBP) que recrutam os substratos que serão ubiquitinados (**Figura 5A**)³¹. Existem 69 proteínas F-box em *H. sapiens* que funcionam como fatores de especificidade dos complexos CRL1 (SCF) por interagirem com seus substratos através de diferentes domínios como por exemplo: LRR (Leucine Rich Repeat) para as Fbxl, WD (tryptophan/aspartic acid) para Fbxw e Other para as Fbxo.^{28,30}

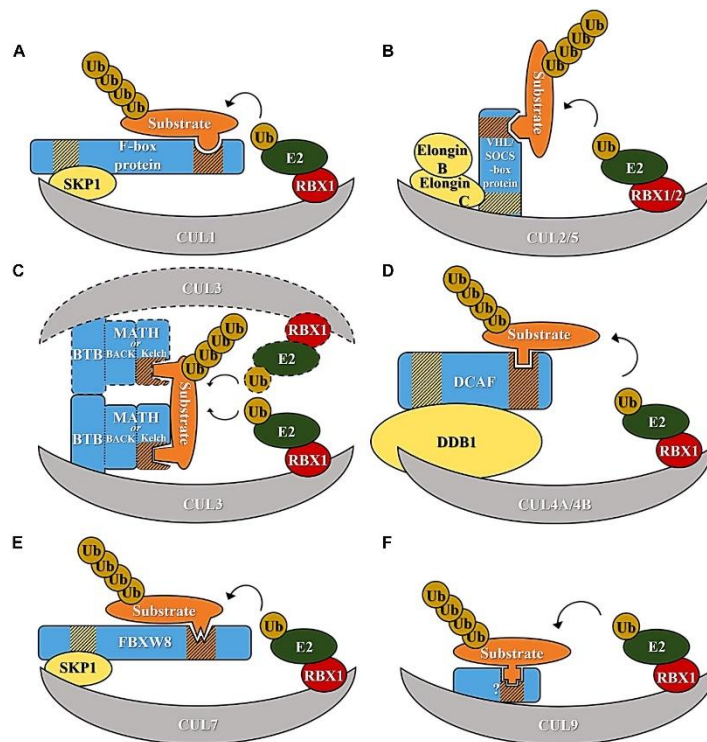


Figura 5. Classes de Cullin-RING ligases de eucariotos.

Diagramas dos diferentes tipos de E3 ubiquitina ligases do tipo CRL. A) Esquema demonstra uma E3 ubiquitina ligase do tipo SCF (CRL1). B) Ligase E3 baseada em Cul2/5. C) Ligase E3 baseada em Cul3. D) Ligase E3 baseada em Cul4. E) Ligase E3 baseada em Cul7. F) Ligase E3 baseada em Cul9. Figura adaptada de³².

Dentre as várias funções das CRL1 em células de mamíferos, destaca-se sua participação na regulação do ciclo celular através da degradação de proteínas envolvidas na regulação deste processo. Os complexos CRL1(Fbx11) ou CRL1(SK2), CRL1(Fbxw7) e

CRL1(Fbxw1a) ou CRL1(β TRCP) são responsáveis pela degradação de proteínas reguladoras do final da fase G1 até final da fase G2 (**Figuras 6A e B**). Além disso, as CRL1 são essenciais em diferentes vias de sinalização intracelular, como NF- κ B (β -catenin), desenvolvimento (Notch 1/4), metabolismo (FOXO1), resposta imune antiviral (Viral E7, Viral Vpu), e diferenciação, entre outras funções ³³. (**Figura 6 A e B**).

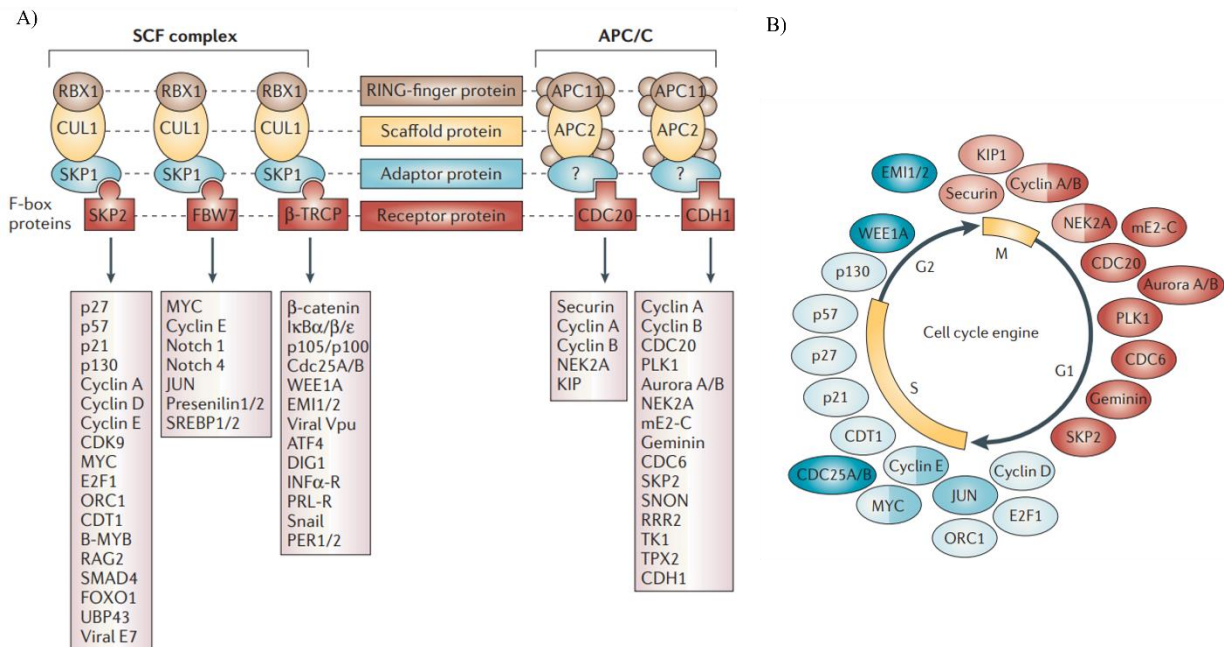


Figura 6. Regulação do ciclo celular por E3 ubiquitina-ligases CRL1 e APC (Anaphase Promoting Complex).

A) Em destaque estão as proteínas E3 ligases APC e as CRL1 com suas diversas proteínas F-box e seus substratos já descritos na literatura. **B)** Em azul e vermelho estão as proteínas do ciclo celular que são degradadas, respectivamente, pelo CRL1 e APCs durante as fases do ciclo celular. Adaptada de ³³.

1.4 Sistema ubiquitina proteassoma em *Leishmania spp.*

Análises bioquímicas demonstraram que o proteassoma de *L. mexicana* apresenta uma complexidade muito similar à dos eucariotos, sendo solúvel e possuindo uma massa molecular da subunidade 20S com 670 kDa e o proteassoma 26S com 1200 kDa ³⁴. Além disso, outros trabalhos demonstraram que a *lactacystin*, ou sua forma ativa *clasto-lactacystin beta-lactona*,

inibe o crescimento *in vitro* de promastigotas de *L. chagasi*, além de afetar negativamente a sobrevivência das formas amastigotas na célula hospedeira infectada, em que estas foram anteriormente tratadas com o inibidor durante o seu estágio como promastigotas. Assim, sugerindo uma possível interferência no crescimento do parasita ocasionado pela inibição da atividade do proteassoma. Esses resultados evidenciam que a função do proteassoma do parasita é necessária para replicação das formas promastigotas e amastigotas. Por isso, testes com inibidores seletivos do proteassoma de parasitas estão sendo realizados a fim de encontrar candidatos possíveis para o tratamento das leishmanioses ³⁵. O desenvolvimento do GSK3494245/DDD01305143/composto 8, uma pequena molécula que vem demonstrando um potencial e seletiva inibição da atividade do proteassoma do parasita em um sítio impressado entre as subunidades $\beta 4$ e $\beta 5$. Ensaios em modelos murinos para LV demonstraram a eficácia desta molécula e o composto 8 está progredindo para ensaios clínicos em humanos ³⁶. Outro composto, LXE408, está progredindo para fase dois do estudo clínico da droga, após 28 dias de uso não foi detectado parasitas no baço ou na medula óssea por microscopia ³⁷.

Em *L. major*, os níveis endógenos da proteína LmjKIN13-1, codificada pelo gene *LmjF01.0030* (MCAK-like), são modulados pelas fases do ciclo celular, apresentando abundância na fase G2+M seguindo de uma diminuição dos níveis após a mitose, sendo o SUP o responsável pela sua degradação no parasita ³⁸. Em *L. donovani*, os níveis da proteína pteridina redutase 1 (PTR1), que é crucial para o metabolismo da pteridina e do folato, aparentam ser também regulados pelo SUP ³⁹. No genoma de *L. mexicana*, 2 enzimas E1, 13 enzimas E2, 79 enzimas E3 e 20 enzimas deubiquitinases DUBs foram identificadas com várias delas sendo fundamentais para os processos de transição de promastigota metacíclica para amastigota e proliferação celular ⁴⁰. Para que ocorra a transição entre as principais formas morfológicas do parasita *Leishmania*, ou seja, de promastigota metacíclica para amastigotas, as enzimas E2 UBC1/CDC34, UBC2 e UEV1 e a E3 do tipo HECT HECT2 foram essenciais. Enquanto a enzima E1 UBA1b, as E2 UBC9, UBC14 e as E3 HECT7 e HECT11 foram requeridas para o processo de proliferação e infecção de camundongos. Além disso, estudos recentes demonstraram que, para que o processo de regulação de sua atividade de conjugação de ubiquitina ocorra ao decorrer da diferenciação do parasito, é vital que exista a interação entre as E2 UBC2 e UEV1 ⁴¹.

As proteínas E1 do tripanossomatídeo *Trypanosoma brucei* possuem alto grau de identidade quando comparadas com as E1 de *Leishmania spp.* Além disso, demonstrou-se que o TAK-243 (inibidor da E1 em humanos), não foi capaz de inibir sua atividade. Logo, a

detecção de inibidores seletivos para as proteínas E1 deste grupo de parasitos através das diferenças estruturais entre a E1 humana e dos tripanossomatídeos pode ser explorada para desenho de fármacos para combate a leishmanioses ^{40,41}.

A AdoMet (*S*-adenosylmethionine) é fundamental para que ocorra adequadamente os processos de transmetilação, transulfuração e síntese de poliaminas em *Leishmania spp.* Sua produção ocorre através da proteína *metionina adenosiltransferase* (MAT). Quando na presença dos inibidores de proteossoma MG-132 (lactacystin) e MG-115 (epoxomicin), aplicados no meio de cultura impedem a degradação desta proteína, assim consequentemente, seu acúmulo no interior do parasito ^{39,42}.

Como descrito, o SUP é essencial para a homeostase e infectividade dos parasitas *Leishmania*, sendo alvo para intervenção farmacológica para o tratamento de leishmanioses. No entanto, nosso conhecimento é limitado sobre a função do SUP nestes parasitas e visando entender seu papel na homeostasia de *L. infantum*, desenvolvemos este trabalho de caracterização funcional da E3 ubiquitina ligase LinfCRL1, que é ortóloga à principal classe de E3 ligases reguladoras do ciclo celular em *H. sapiens*. A maior parte dos resultados apresentados nesta dissertação foram publicados na revista PlosPathogens ⁴³, em trabalho intitulado “Functional characterization of Cullin-1-RING ubiquitin ligase (CRL1) complex in *Leishmania infantum*”, no qual configurei como segunda autora.

2 OBJETIVOS e HIPÓTESES TESTADAS

2.1. Objetivo geral

Construção e caracterização de linhagens nocaute para os genes *LinfSKP1* (LINF_110018100), *LinfCUL1* (LINF_240029100) e *LinfRBX1* (LINF_210005300) em *L. infantum*.

2.2. Objetivos específicos

Construção de linhagens nocauteadas por CRISPR-Cas9 T7 para os genes *LinfSKP1* (LINF_110018100) ou *LinfCUL1* (LINF_240029100) ou *LinfRBX1* (LINF_210005300);

Caracterização funcional dos mutantes nulos;

Caracterização fenotípica das linhagens nocauteadas (ex: curva de crescimento, análise de ciclo celular, infecção *in vitro*, análise morfológica, etc)

2.3. Hipótese

O nocaute dos genes *LinfSKP1* (LINF_110018100), *LinfCUL1* (LINF_240029100), *LinfRBX1* (LINF_210005300) afetam a proliferação, ciclo celular e infectividade dos parasitas *L. infantum*.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo de promastigotas de *L. infantum*

A cepa selvagem utilizada neste projeto (HUUFS14) é referente amostras de isolados clínicos de *L. infantum* HUUFS14 obtido de um garoto de 15 anos, diagnosticado com leishmaniose visceral (LV) no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe em 2009. Este isolado foi inicialmente caracterizado através de infecções experimentais em 2015 pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e desde então tem sido utilizado em modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* em diferentes estudos. Além disso, a linhagem HUUFS14 possui genoma sequenciado e anotado ⁴⁴. As culturas de parasitas de *L. infantum* promastigotas foram repassados semanalmente e cultivados em M199 (Sigma) suplementado com 20% de soro fetal de bovino inativado pelo calor e filtrado (Gibco), solução de penicilina/estreptomicina/L-glutamina a 1% (Gibco) em 27°C.

3.1.1 Obtenção de clones a partir das culturas promastigotas

O meio de cultura utilizado para a seleção de clones consistiu em uma concentração de 1,25% de ágar bacteriológico autoclavado em meio M199 completo (metodologia 3.1). Uma quantidade aproximada de 15 mL desse meio foi adicionada em placas de Petri. Após a solidificação, as placas foram lacradas e incubadas a 27 °C durante a noite para confirmar a esterilidade do meio. O plaqueamento dos isolados foi conduzido com a utilização de $\sim 2 \times 10^6$ da cultura, utilizando uma alça de inoculação microbiológica estéril descartável. Em seguida, a placa foi lacrada novamente e mantida em uma estufa microbiológica a 27 °C. Observações diárias foram realizadas para monitorar a formação de colônias. O isolamento dos clones foi efetuado utilizando palitos esterilizados, os quais foram homogeneizados diretamente em uma garrafa de cultivo contendo 5 mL de meio M199 completo. As culturas de parasitos clonais obtidas e utilizadas neste trabalho foram: $\Delta cul1 C1$; $\Delta cul1 C2$ e $\Delta cul1 C3$.

3.2 Nocaute gênico por CRISPR-Cas9

A linhagem *LinCas9* T7 foi produzida através da transfecção de promastigotas com o vetor de expressão episomal pTB007 (<http://www.leishgedit.net/Home.html>) ⁴⁵ contendo os genes da nuclease Cas9 com sinalização nuclear e 3 epítotos da tag FLAG, da RNA polimerase T7 com sequência de sinalização nuclear, e o gene de resistência a higromicina, permitindo o reparo do DNA com a inserção do DNA doador e a transcrição *in vivo* do sgRNA a partir do produto de PCR dupla fita (sgDNA).

A transfecção foi efetuada em tampão 1× Tb-BSF buffer (90 mM de fosfato de sódio, 5 mM de KCl, 0,15 mM de CaCl₂, 50 mM de HEPES) utilizando um pulso do programa X-001 do equipamento Amaxa Nucleofector Iib (Lonza). Após 5 dias de transfecção foi possível verificar que as formas promastigotas transfectadas apresentaram resistência ao antibiótico e a produção da linhagem Cas9T7 foi confirmada através de PCR com primers específicos para o gene da nuclease Cas9, sendo o forward: CATCGTGGACGAGGTGGCCT, e reverse: GAGGGCCACGTAGTAGGGG. Através da metodologia descrita em Beneke et al (2017) ⁴⁵, com utilização da cepa *LinCas9* T7, as cepas nocautes foram estabelecidas. As sequências de primers para amplificação por PCR dos sgDNAs (single guide DNAs) e os cassetes de reparo para os genes deletados foram desenhados através da ferramenta online LesihGEdit (<http://www.leishgedit.net/Home.html>) ⁴⁵ inserindo de entrada os identificadores dos genes *LinSKP1* (LinJ.11.1200) (SKP1-like protein), *LinRBX1* (LinJ.21.0040) (ring-box protein 1 – putative) e *LinCUL1* (LinJ.24.2380) (cullin-like protein-like protein). Para obtenção e amplificação dos cassetes de reparo (doadores) dos genes nocauteados, os primers 1 e 5

representados na **Figura 7** foram utilizados juntamente com os *templates* pTBlast_v1, pTPuro_v1 (<http://www.leishgedit.net/Home.html>) . Este produto de PCR determina o DNA doador entregue à célula nocauteada.

Para amplificação do sgDNA, utilizamos os primers 5' sgRNA e 3' sgRNA (**Tabela 2**) usando como *template* a sequência de gRNA (AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC). Os produtos derivados de PCR foram transfectados na linhagem *L. infantum* Cas9-T7RNAP e o sgRNA produzido *in vivo* pela linhagem.

Para obtenção das linhagens nocautes, $1,2 \times 10^7$ células de *L. infantum* Cas9T7 foram transfectadas, utilizando 2 µg do produto de PCR do cassete de reparo (DNA doador) e 2 µg dos sgDNA 3' e 5' amplificados por PCR referente a cada um dos genes nocauteados. Após transfecção, as linhagens foram condicionadas em meio sem antibiótico de seleção ao cassete de reparo inserido por cerca de 24 h (tempo de integração do cassete de reparo ao genoma), seguidamente o antibiótico correspondente ao gene de resistência contido no cassete de reparo foi adicionado. Adição ao meio de cultivo: higromicina 60 µg/mL ; puromicina à 120 µg/mL ou blasticidina à 60 µg/mL. Deste modo, as linhagens que receberam o cassete de reparo, obtiveram seus respectivos genes nocauteados e sobreviveram à exposição aos antibióticos, foram selecionadas. Como os genes de *Leishmania infantum* estão apresentados no genoma em uma cópia por cromossomo diploide, dois cassetes de reparo diferentes contendo os genes para crescimento em diferentes antibióticos foram entregues às células. Portanto, a linhagem selecionada foi ou é resistente aos dois antibióticos dos cassetes de reparo utilizados, podendo ser o cassete de resistência confirmado por PCR (**Tabela 3 e 4**).

Para a linhagem de *L. infantum* utilizada (HUUFS14), os genes de interesse são de cópia única situadas nos cromossomos 11 (*LinfSKP1*), 21 (*LinfRBX1*) e 24 (*LinfCUL1*). A linhagem $\Delta cul1$, a única viável seguiu para as etapas de caracterização fenotípica e morfológica. O DNA genômico (DNAg) da linhagem nocaute selecionada foi extraído pelo kit Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System. As alterações em nível genômico pelo sistema CRISPR-Cas9 foram avaliadas por PCR dirigidos aos respectivos *locus* dos genes pelos primers:

Tabela 1- Primers utilizados para inserção do cassete de reparo com gene de resistência para nocaute dos genes da *LinfSKP1* e *LinfCUL1* e *LinfRBX1*, disponíveis no sítio: <http://www.leishgedit.net/Home.html> .

Primer	Sequence (5' - 3')
SKP-UFP-1	CCTCTCCCCTTACTCGCTTACTCGTTGCCAgataatgcagacctgtgc
SKP-DRP-5	CAGCGGAAAAAGCACGCACACTACTCAGccaatttgagacctgtgc
CUL-DFP-1	AGCGCGAAAAGGGCGTTCTTTCTTCTCCTgtataatgcagacctgtgc
CUL-URP-5	CGAGAGAGAGGCACCACGCTTCTGGCTCCGccaatttgagacctgtgc
RBX-UFP-1	TGGTTGAACTGTCTCCGTAACGGATTTCCCTgtataatgcagacctgtgc
RBX-DRP-5	CAAATCAAAGCATCAAAGCGAACTCTGccaatttgagacctgtgc

Tabela 2 - Primers utilizados para amplificação dos sgDNAs para os genes *LinfSKP1* e *LinfCUL1* e *LinfRBX1*, disponíveis no sítio: <http://www.leishgedit.net/Home.html> .

Primer	Sequence (5' - 3')
SKP-5'sgRNA	gaaattaatacagactcactataggAAAAGTGTCAACAGCAAAGAgtttagagctaga aatagc
SKP-3'sgRNA	gaaattaatacagactcactataggATAGACACTAAAGTGCATGCgtttagagctagaa atagc
CUL-5'sgRNA	gaaattaatacagactcactataggCAGCATAGAAGAAGGGAGAAgtttagagctaga aatagc
CUL-3'sgRNA	gaaattaatacagactcactataggATACAAGCAGACGGGAGACAgtttagagctaga aatagc
RBX-5'sgRNA	gaaattaatacagactcactataggGTCCTTTCTTCCGCTTCGACgtttagagctagaaat agc
RBX-3'sRNA	gaaattaatacagactcactataggAATATCACTTCGTCTGCAAGgtttagagctagaa atagc

Tabela 3 - Primers utilizados para avaliação da construção das linhagens de *Leishmania infantum* nocaute para os genes *LinfSKP1* e *LinfCUL1* e *LinfRBX1* por PCR.

Primer	Sequence (5' - 3')
SKP1 Forward (<i>EcoRI</i>)	ttatGAATTCatgccggtggagat
SKP1 Reverse (<i>XhoI</i>)	taatCTCGAGcgactcctcgacc
CUL1 Forward (<i>HindIII</i>)	taatAAGCTTatggtggaagaggatcg
CUL1 Reverse (<i>BamHI</i>)	tataGGATCCggcaatataatggtagacg

RBX Forward (EcoRI)	tataGAATTCatgcagacgaaagacg
RBX Reverse (XhoI)	ttaaCTCGAGagcgccatcgaag

Tabela 4 - Primers utilizados para verificação da inserção dos genes de resistência nas linhagens nocaute de *L. infantum* Cas9T7 por PCR.

Primer	Sequence (5' - 3')
Puromicina F	atgactgaatacaagccaacgggtc
Puromicina R	ttaggctcccggcttacgtg
Blasticidina F	atgcctttgtctcaagaagaatcca
Blasticidina R	gccctccacacataaccag

Tabela 5- Reação e ciclagem de PCR para amplificação dos cassetes de reparo.

Reação			Ciclagem	
H ₂ O	p/50 µL	° C	Tempo	Ciclos
Buffer CG (5x)	10 µL	98	30 s	1
dNTPs (10 mM)	1 µL	98	10 s	
Primer F (10 µM)	2,5 µL	60	30 s	40x
Primer R (10 µM)	2,5 µL	72	2 min 15 s	
DNA	50-100 ng	72	7 min	1
Phusion HF	0,5 µL	4	∞	1

Tabela 6 - Reação e ciclagem de PCR para amplificação dos sgRNAs.

Reação			Ciclagem	
H ₂ O	p/50 µL	° C	Tempo	Ciclos
Buffer CG (5x)	10 µL	98	30 s	1
dNTPs (10 mM)	1 µL	98	10 s	

3' ou 5' sgRNA	2,5 μ L	60	30 s	35x
G00 (10 μ M)	2,5 μ L	72	30 s	
Phusion HF	0,5 μ L	72	5 min	1
		4	∞	

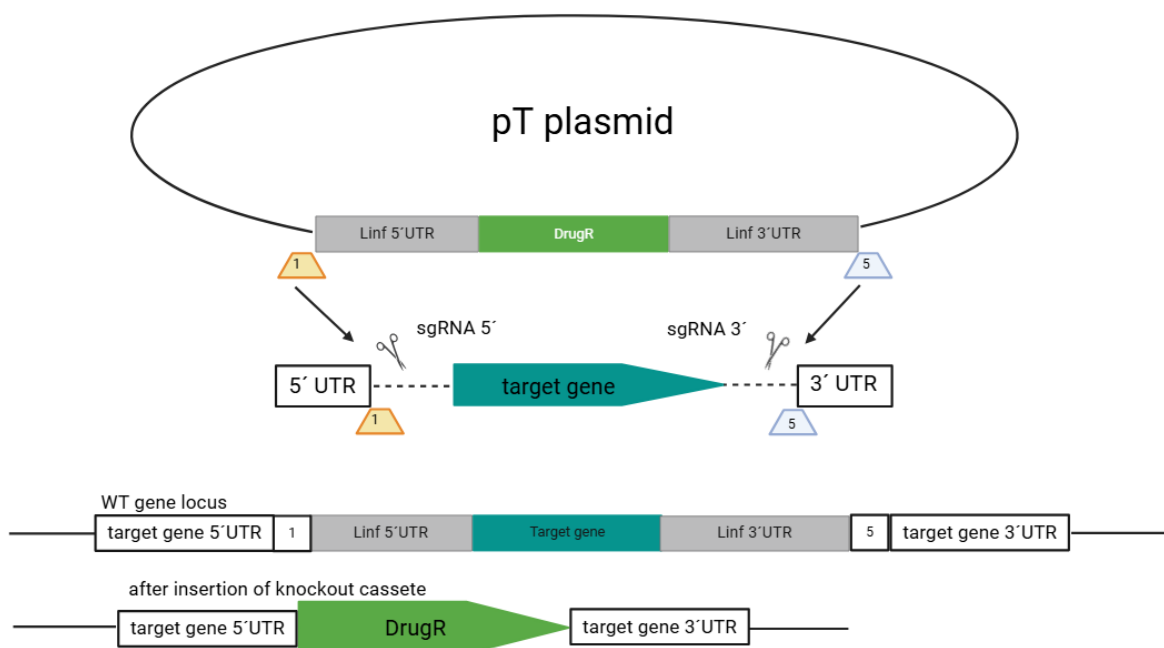


Figura 7. Sistema para amplificação por PCR de fragmentos direcionados.

Estratégia de utilização do ptPLOT para geração de DNA de doador (cassete de reparo) de quebras de fita dupla induzidas por Cas9, permitindo a modificação precisa de um *locus* alvo. Para deletar um gene alvo, dois *sgRNAs* irão direcionar os cortes em locais imediatamente a montante 5' e a jusante 3' do gene alvo. Os cassetes de reparo possuem genes marcadores selecionáveis através de antibióticos (*DrugR*) e possuem uma região de homologia com 30nt HF específico para o *locus* alvo. Esse conjunto pode ser então amplificado por PCR a partir de plasmídeos pT com primers 1 e 5. O mesmo par de primers pode ser utilizado para amplificação de cassetes com genes de resistência a antibióticos diferentes.

3.3 Curva de crescimento de promastigotas

As linhagens HUUFS14, *L. infantum* Cas9 T7 e $\Delta cul1$ foram plaqueadas em triplicata em placas de 12 poços. Cada poço contendo 2×10^5 cells/mL em 2 mL de meio M199 completo (20% SBF, 1% Penicilina-Estreptomicina). Para a linhagem celular *Linf*Cas9 T7 e a linhagem $\Delta cul1$ foram adicionados ao meio de cultivo seus respectivos antibióticos de seleção (descritos em 3.2). A contagem de promastigotas foi realizada através da diluição 1:100 das amostras em PBS 1X + formaldeído 2%, onde 10 μ dessa mistura foi colocada na câmara de Neubauer para a contagem dos cinco quadrantes da diagonal localizados no quadrante central. O número total de células foi obtido através da fórmula:

$$(Q1+Q2+Q3+Q4+Q5) \times 5 \times 10^2 \times 10^4$$

As placas foram mantidas em estufas a 27°C em atmosfera de 5% de CO₂. A contagem celular foi realizada a cada 24 h durante 8 dias consecutivos. A geração do gráfico e análise dos valores obtidos foram produzidos através do teste estatístico two-way ANOVA pelo programa GraphPad Prism v5.0.

3.3.1 Taxa de proliferação celular por *Population Doubling* (PD)

O ensaio PD foi realizado como ⁴⁶ onde 2×10^5 células/mL foram cultivadas em 2 mL de meio M199 completo com os antibióticos correspondentes para cada cepa em placa de 12 poços. O número de células foi determinado diariamente, e o mesmo número de células foram semeadas por poço durante 8 dias consecutivos. PD foi determinada como $\text{Log}_2 [\text{TCN} / (2 \times 10^5 \text{ cada dia})] = \text{GR}$ (taxa de crescimento) (TCN= Número Total de Células). Assim, o GR do dia 2 (GRD2) foi GRD1+GRD2, GRD3=GRD2+GRD3 e assim por diante. Os valores plotados no gráfico são as médias das triplicatas para cada ponto de tempo para cada dia e ANOVA bidirecional foi usado no GraphPad Prism v5.0.

3.4 Análise do Ciclo Celular

Promastigotas de *L. infantum* (HUUFS14), *L. infantum* Cas9 T7 e $\Delta cul1$ foram cultivadas a uma concentração de 2×10^7 /ml. Em horários específicos, as células foram centrifugadas a 1000 x g a 4 °C por 5 minutos e lavado em PBS 1x frio. Subsequentemente, as células foram ressuspensas em PBS 1X frio contendo metanol a 70% e incubados durante a noite a 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1X frio e o sedimento foi ressuspensão em PBS 1X contendo iodeto de propídio (PI) (10 μ g/ml) e RNase A (10 μ g/ml) e incubado por 30 minutos a 37 °C. As células foram então analisadas através do citômetro

Attune Acoustic Focusing Flow Cytometer – Thermo Scientific). Para cada amostra foram analisados 50 mil eventos. Imagens foram elaboradas utilizando o software FlowJo v.7.6.5 (FlowJo, LLC, Ashland, OU).

3.5 Análise de Formação de Rosetas

Para obtenção dos dados de formação de rosetas foi elaborada uma metodologia própria. As linhagens celulares foram semeadas em triplicatas dentro de frascos de cultivo de 25 cm², contendo 2 x 10⁵ cells/mL em 5mL de M199 completo, adicionando os respectivos antibióticos de seleção. As garrafas em triplicata para cada linhagem foram observadas, fotografadas e filmadas por campo (quatro cantos da garrafa e sua porção central, totalizando cinco campos) a cada 24hrs, por 7 dias, utilizando software OPTIKA PROVIEW v4.11 através da câmera C–B5 OPTIKA Microscopes ITALY, com objetiva de 20x. A contagem do número total de rosetas foi dividida pelos cinco campos fotografados para cada garrafa e esse valor disposto em gráfico. Diferença estatística e obtenção do gráfico avaliados por teste two-way ANOVA através do software GraphPad Prism v5.0. Para analisar a estrutura da formação de roseta com maior ampliação, um esfregaço de lâmina foi preparado usando a cepa *Δcull1*. As amostras foram coradas através da técnica de Romanowsky (Panótico Laborclin) e deixada secar por 24 horas. Após esse período, as lâminas foram analisadas usando um microscópio óptico Olympus BX50 com objetiva de 20X ou 100X, imagens foram geradas pelo software DP2-BSW v.2.2 usando o software da câmera Olympus DP72.

3.6 Análise de ciclo celular e incorporação de Edu

Promastigotas em fase de crescimento exponencial foram fixadas em formaldeído e coradas com DAPI, posteriormente estas células foram examinadas através de microscópio de epifluorescência (Axiovert 200M – Zeiss), (objetiva 100x com óleo de imersão) a fim de observar o perfil das organelas que contêm DNA (núcleo e cinetoplasto). O perfil 2K2N foi utilizado para estimar a porcentagem de células em citocinese (C). Utilizando este parâmetro para as amostras analisadas, estimamos a duração da citocinese de acordo com a Equação de Williams ⁴⁷:

X= tempo acumulado dentro do ciclo até o final do estágio em questão;

Y= % cumulativa de células, incluindo o estágio em questão (expresso como uma fração de uma unidade);

α = taxa de crescimento específica.

Para estimar o comprimento da fase G2 + M, adicionamos EdU (10 mM diluído em PBS, e utilizado em uma concentração final de 100 μ M) ao meio de cultivo contendo os promastigotas parasitas em fase de crescimento exponencial. A cada 15 min as células foram coletadas, procedendo com reação química de clique até a observação de um promastigota parasita contendo dois núcleos marcados com EdU (2N2K) (correspondendo ao comprimento das fases G2 + M). Para determinar a duração da fase S, medimos a proporção de células marcadas com EdU após pulso de EdU de 1h. A duração da fase S foi estimada de acordo com a equação de Stanners e Till (Stanners e Till 1960) ⁴⁸ :

L = proporção de células que exibem núcleos marcados com EdU;

α = Onde $2.T^{-1}$ (T = tempo de duplicação, expresso em h);

Z = G2 + M + citocinese;

t = duração do pulso EdU em horas (h).

Por fim, a duração da fase G1 foi estimada pela diferença entre o tempo de duplicação (dt) e a soma das demais fases (S+G2+M+C). Vale ressaltar que todos esses cálculos foram feitos através do software CeCyD, disponível no endereço <https://cecyd.vital.butantan.gov.br/> ⁴⁹.

3.7 Obtenção de linhagens add-back de LinfCul1 selvagem e dominante negativo

3.7.1 Construção dos cassetes para add-back

Para gerar as linhagens recombinantes de *L. infantum* foi feita a clonagem/subclonagem dos genes de *LinfCUL1* em vetor pLEXSY-Neo. Este plasmídeo contém uma série de sítios de clonagem múltipla (MCS) que permitem a inserção de fragmentos de DNA de interesse por meio de diferentes enzimas de restrição (**Figura 8**). Esse vetor permite a expressão constitutiva da proteína de interesse integrando-se ao genoma no *locus* ssu (18S) por recombinação homóloga e a seleção é feita com neomicina (G418). Além disso, a presença do gene beta-lactamase (bla) permite que a propagação e clonagens sejam feitas em *Escherichia coli* antes do preparo para transfecção em *Leishmania spp.*

```

BglII   NotI   SmaI                               SmaI                               XbaI
AGA TCT GGC ATG GGC TCG AGG CTC GGT GTG CTG GGC GGC GGC ATG CTG GTT GCA GCG GGC GTG TCG GTC GAC GCT GGC GGC TCT CTA GAC nnnnn
TCT AGA CCG TAG CCG AGC TCC GAG CAG GCA CAC GAC CCG CCG CCG TAC GAC CAA GGT CCG CCG CAC AGC CAG CTG CGA CCG CCG AGA GAT CTG nnnnn
Met Ala Ser Arg Leu Val Arg Val Leu Ala Ala Met Leu Val Ala Ala Ala Val Ser Val Asp Ala Gly Ala Ser Leu Asp
                                     ▲ SPCS

NheI   MspCI   KpnI                               NotI
GCT AGC CTT AAG GGT ACC CAC CAC CAT CAC CAC CAC TAG GCGGCCG
CGA TCG GAA TTC CCA TGG GTG GTG GTA GTG GTG GTG ATC CCCCAGC
Ala Ser Leu Lys Gly Thr His His His His His ...

```

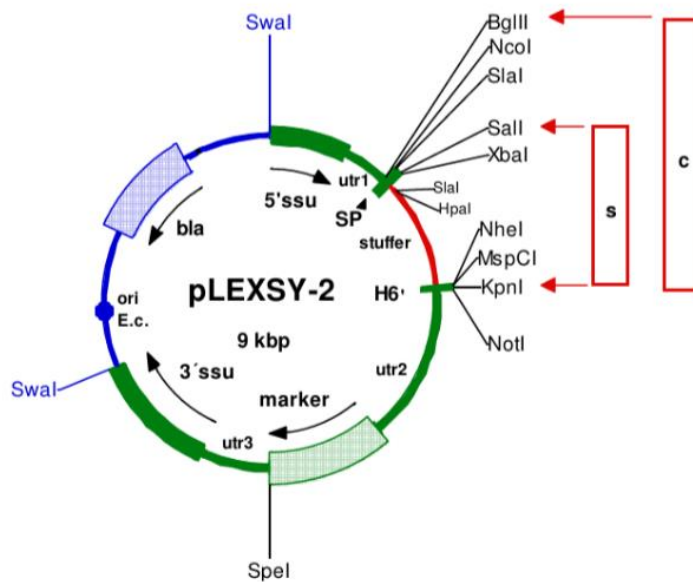


Figura 8. Mapa do plasmídeo pLEXSY-Neo.

Diagrama ilustrando os principais elementos do vetor, destacando os locais de reconhecimento para as enzimas de restrição, os promotores e o gene de resistência, essenciais para a clonagem eficiente e a expressão estável do gene de interesse.

3.7.2 Construção da sequência de *LinfCUL1* dominante negativo

A fim de avaliarmos se a função de LinfCul1 está relacionada ao complexo CRL1, desenhamos uma sequência truncada, retirando seus resíduos de interação com a proteína LinfSkp1 e solicitamos a síntese deste gene pela empresa Genescript (**Figura 9A-C**).

Os resíduos de interação entre LinfCul1 e LinfSKP1 específicos para *L. infantum* foram alinhados com as sequências de aminoácidos dessas mesmas proteínas em humanos e outras espécies de leishmania. Como demonstrado no estudo de Correia CRSTB, et al.⁴³, O alinhamento permitiu identificar a região específica de interação entre essas proteínas, nos auxiliando na decisão de qual região truncar em LinfCul1 DN.

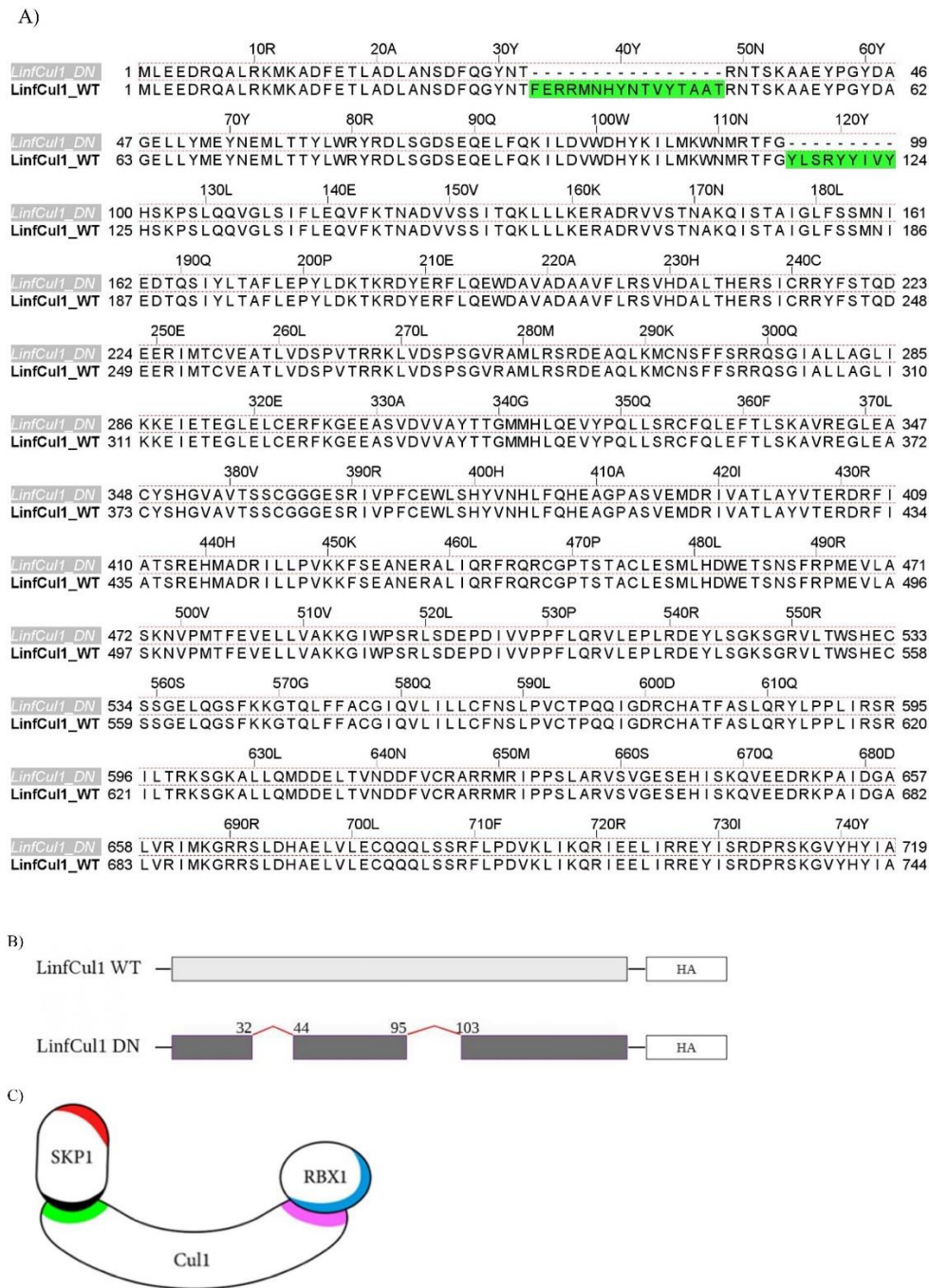


Figura 9. Desenho da sequência LinfCul1 DN (dominante negativo).

A) Alinhamento de sequências realizado com o algoritmo MUSCLE no software MEGA 11 ⁵⁰, indicando os resíduos removidos em LinfCul1 DN. As regiões retiradas da sequência correspondem aos resíduos de interação entre LinfSkp1 e LinfCul1. B) Diagrama demonstrando as regiões que foram truncadas em comparação com a sequência de aminoácidos de LinfCul1 WT com LinfCul1 DN, os números correspondem às posições dos aminoácidos. C) Diagrama demonstrando o complexo CRL1, (resíduos em verde correspondem também ao item A).

3.7.3 Subclonagem de LinfCul1-dominante negativo (LinfCul1DN)

O gene de *LinfCUL1 DN* foi sintetizado comercialmente (Genescript) e entregue em vetor puc57 fusionado com peptídeo HA na extremidade C-terminal. A subclonagem foi feita pela digestão de 1 µg do plasmídeo com as enzimas *NcoI* e *NotI* (Thermo) durante 3 h a 37 °C. Decorrido esse tempo a amostra seguiu para eletroforese em gel de agarose 0,8% (100 V, 90 minutos) e o inserto foi cortado do gel, purificado por kit (Quiagen) (**Figura 10**).

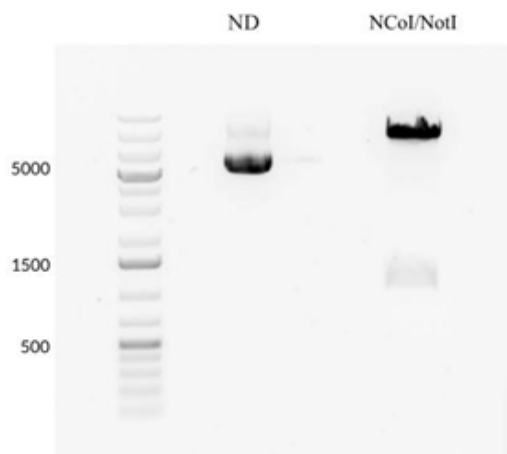


Figura 10. Digestão do vetor pLexy-Neo com as enzimas *NcoI* e *NotI*.

O produto da digestão foi resolvido em gel de agarose 0,8% (100 V, 90 minutos) revelado com SyberSafe(Thermo).

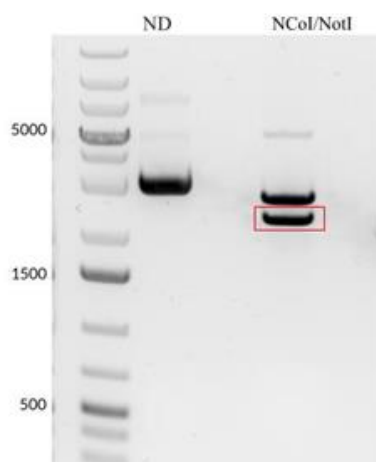


Figura 11. Digestão puc 57 LinfCul1 DN.

Produto da digestão do vetor com as enzimas *NcoI* e *NotI* resolvidos em gel de agarose 0,8% (100 V, 90 minutos). Retângulo vermelho destacando fragmento utilizado para purificação.

O vetor pLEXY-Neo foi digerido com as mesmas enzimas de restrição e purificado sob as mesmas condições (**Figura 11**). Após quantificação das amostras no sistema Nanodrop (Thermo), foi feita a ligação nas proporções 1:1 e 3:1 (vetor:inserto) com enzima T4- ligase (Invitrogen) por 1h a 22°C. As reações de ligação foram transformadas em *E. coli* DH5 α e uma transformação com o vetor pLexy-Neo digerido foi feita como controle. Os clones positivos foram confirmados por digestão e sequenciamento.

3.7.4 Clonagem de *LinfCUL1-HA*

A clonagem de *LinfCUL1* foi feita através da amplificação do gene por PCR (FastPol HF Cellco). O DNA genômico da linhagem HUUFS14 de *L. infantum* foi utilizado como molde (50 ng) e foram sintetizados primers específicos para inserção dos sítios de restrição *NcoI* e *NotI* nas extremidades N-terminal e C-terminal respectivamente (**Tabela 7 e 8**). O peptídeo HA também foi inserido para posterior imunoprecipitação e validação por *western blotting*.

Tabela 7 - Primers utilizados para inserção dos sítios de restrição *NcoI* e *NotI* nas extremidades N-terminal e C-terminal, respectivamente.

Primer	Sequence (5'-3')
Foward	TAATCCATGGACCATGTTGGAAGAGGATCG
Reverse	TATAGCGGCCGCCTACGCGTAGTCCGGCACGTCGTACGGGTAGGCAA TATAATGGTAGACGCCTTTGCTGC

Tabela 8 - Ciclagem utilizada para amplificação do gene *LinfcUL1*.

Ciclagem da reação de PCR (35 ciclos)	
Temperatura	Tempo
98° C	30 s
98° C	10 s
63° C	30 s
72° C	0 s
72° C	7 min

Na sequência, foram feitas digestão do vetor e do inserto, ligação e confirmação da clonagem conforme descrito **3.7.3** (protocolo subclonagem).

3.7.5 Linearização e preparação dos cassetes para transfecção

Depois de confirmados os clones, foi feita a linearização do vetor com enzima de restrição *SwaI*. Foram digeridos 12 µg do plasmídeo com 1 µL da enzima de restrição a 30 °C *overnight*. A confirmação foi feita por eletroforese em gel de agarose 0,8% de 1 µL. Nessa digestão é liberado um fragmento menor de aproximadamente 3 Kb que corresponde a parte de *E. coli* e um outro fragmento maior que corresponde ao cassete com as extremidades 3' *ssu* e 5' *ssu* livres para recombinação no genoma. A amostra foi purificada com kit de purificação de PCR (Qiagen) e quantificada em Nanodrop. Para transfecção da *L. infantum* foram utilizados 7-10 µg do cassete purificado (**Figura 12**).

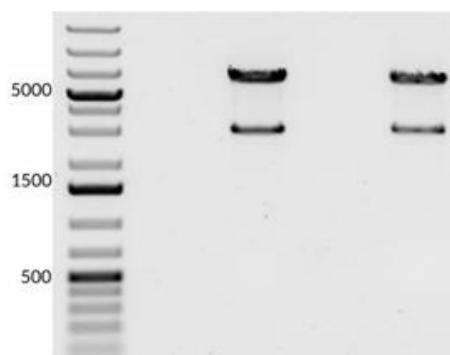


Figura 12. Linearização com *SwaI*.

Produto de digestão em gel de agarose 0,8% (100 V, 90 minutos). Os produtos de ~7000 pb demonstram os cassetes que foram recombinados. Logo abaixo destas bandas, com ~3000 pb representam o gene de resistência a ampicilina.

3.8- Co-imunoprecipitação

Foram realizadas duas replicatas independentes dos ensaios de co-imunoprecipitação. Em ambas as réplicas, os parasitas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em garrafas médias (75 cm²) até atingirem sua fase exponencial. Linhagens contendo 3x myc-mCherry::SKP1 foram transfectadas (metodologia 3.2) com os cassetes contendo os genes codificantes linearizados de *LinfCUL1* e *LinfCUL1 DN* (dominante negativo), descritos anteriormente, além da utilização da cepa de *L. infantum* Cas9T7 como controle. Para imunoprecipitação, 2 x 10⁹ parasitas foram lavados duas vezes com PBS e lisados com tampão de lise NP-40 frio (50 mM Tris-HCl pH 7,2, 225 mM KCl e 1% NP-40), suplementado com coquetel de inibidores de protease SIGMAFAST e inibidores de fosfatase (10 mM NaF e 1 mM Na₃VO₄). Foram realizados três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento à temperatura ambiente. Posteriormente, os lisados foram mantidos no gelo por 30 minutos e, em seguida, centrifugados por 20 minutos a 14.000 x g a 4 °C. A concentração de proteína do sobrenadante foi determinada utilizando o ensaio de Bradford (Sigma Aldrich). Para cada imunoprecipitação, 8 mg de proteína total foram incubadas com 30 µL de *bead* anti-myc (Sigma Aldrich, #E6654) por 3 h a 4 °C com rotação. As *beads* foram lavadas com 4 x 500 µL de tampão de lise gelado e fervidas em tampão de amostra Laemmli 2x por 5 min. Os eluatos e 100 µg do *input* foram resolvidos em 10 % SDS-PAGE para análise por *western blotting* com os anticorpos anti-Myc e anti-HA .

3.9 Ensaio de infecção *in vitro* com cultura celular primária

3.9.1 Extração e cultivo de macrófagos

Camundongos BALB/c foram obtidos através do CEMIB (Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório), UNICAMP. Todos os procedimentos realizados com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP número 4797-1/2018 em colaboração com o Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho. Macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) foram obtidos de camundongos BALB/c com idades entre 4 e 6 semanas, conforme descrito em ⁵¹. Após 7 dias de diferenciação, BMDMs foram plaqueados na concentração de 3 x 10⁵ células em meio RPMI completo em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro. Posteriormente, as células foram mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C com atmosfera de 5% CO₂ para subsequente infecção. Células BMDM foram infectadas com formas promastigotas de *L. infantum* (HUUFS14), Δ *cull1* (população), Δ *cull1 C1* (clone de Δ *cull1*), AB *LinfCul1* e *LinfCul1 DN*, em fase estacionária de crescimento em uma proporção de MOI 20:1 por 24, 48 e 72 horas a 27 °C. Para

confirmar a infecção, as lamínulas presentes no fundo dos poços foram lavadas com PBS aquecido e coradas com panótico rápido e visualizadas em microscópio óptico sob objetiva de 40X e 100X. A porcentagem de infecção foi calculada contando o número de macrófagos infectados e não infectados, bem como o número de parasitas por 200 macrófagos e o índice de infecção. O índice de infecção foi calculado através do número da média de amastigotas multiplicado pela porcentagem de macrófagos infectados, e posteriormente o valor final dividido por 100 para obtermos um número absoluto.

3.10 Análise estrutural de LinfCul1 DN por AlphaFold

As estruturas das proteínas LinfCul DN e LinfCul1 foram comparadas utilizando AlphaFold2^{52,53}. O AlphaFold determina a estrutura tridimensional de proteínas *ab initio* partir de sua sequência de aminoácidos. Como *input*, foi oferecido ao programa a sequência de aminoácidos de LinfCul1-DN (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Sequência de aminoácidos (sequência primária). Apenas a sequência de LinfCul1 DN foi entregue ao AlphaFold2 para sua predição estrutural.

Sequência de aminoácidos de LinfCul1 e LinfCul1 DN	
LinfCul1	MLEEDRQALRKMKADEFETLADLANSDFQGYNTFERRMNHYN TV YTAATRNTSKAAEYPGYDAGELLYMEYNEMLTTYLWRYRDLSG DSEQELFQKILDVWDHYKILMKWNMRTFGYLSRYIYVYHSKPSL QQVGLSIFLEQVFKTNADVSSITQKLLLKERADR VVSTNAKQIST AIGLFSSMNIEDTQSIYLTAFLEPYLDKTKRDYERFLQEWDAVAD AAVFLRSVHDALTHE SICRRYFSTQDEERIMTCVEATLVDSPVT RRKLVDSPSGVRAMLRSRDEAQLKMCNSFFSRRQSGIALLAGLIK KEIETEGLELCERFKGEEASVDVVA YTTGMMHLQEVYPQLLSRC FQLEFTLSKAVREGLEACYSHGVA VTSSCGGGESRIVPFCEWLSH YVNHLFQHEAGPASVEMDRIVATLAYVTERDRFIATSREHMADRI LLPVKKFSEANERALIQRFRQRCGPTSTACLESMLHDWETSNSFR PMEVLASKNVPMTFEVELL VAKKGIWPSRLSDEPDIVVPPFLQRV LEPLRDEYLSGKSGRVL TWSHECSSGELQGSFKKGTQLFFACGIQ VLILLCFNSLPVCTPQQIGDRCHATFASLQR YLPPLIRSRLTRKSG KALLQMDELTVNDDFVCRARRMRIPPSLARVSVGESEHISKQVE EDRKPAIDGALVRIMKGRSLDHAELVLECQQQLSSRFLPDVKLI KQRIEELIRREYISRDPRSKGVYHYIA
LinfCul1 DN	MLEEDRQALRKMKADEFETLADLANSDFQGYNTRNTSKAAEYPG YDAGELLYMEYNEMLTTYLWRYRDLSGDSEQELFQKILDVWDH

YKILMKWNMRTFGHSPSLQQVGLSIFLEQVFKTNADVSSITQK
LLKERADR VVSTNAKQISTAIGLFSSMNIEDTQSIYLTAFLPEYLD
KTKRDYERFLQEWDVAADAAVFLRSVHDALTHEERSICRRYFSTQ
DEERIMTCVEATLVDSPVTRRKLVDSPSGVRAMLRSRDEAQLKM
CNSFFSRRQSGIALLAGLIKKEIETEGLELCERFKGEEASVDVVAY
TTGMMHLQEVYPQLLSRCFQLEFTLSKAVREGLEACYSHGVAVT
SSCGGGESRIVPFCEWLSHYVNHLFQHEAGPASVEMDRIVATLAY
VTERDRFIATSREHMADRILLPVKKFSEANERALIQRFRQRCGPTS
TACLESMLHDWETSNSFRPMEVLASKNVPMTFEVELLVAKKGIW
PSRLSDEPDIVVPPFLQRVLEPLRDEYLSGKSGRVLTSWHECSSGE
LQGSFKKGTQLFFACGIQVLILLCFNSLPVCTPQQIGDRCHATFAS
LQRYLPPLIRSRILTRKSGKALLQMDDELTVNDDFVCRARRMRIP
PSLARVSVGESEHISKQVEEDRKPAIDGALVRIMKGRRLDHAEL
VLECQQQLSSRFLPDVKLIKQRIEELIRREYISRDPRSKGVYHYIAG
GGYPYDVPDYA

Como *output*, o AlphaFold2 oferece um arquivo PDB (Protein Data Bank), o qual oferece dados estruturais tridimensionais de macromoléculas biológicas, dispondo de coordenadas atômicas, tipos de átomos, resíduos e cadeias, além de dados sobre fatores de ocupação e temperatura. De forma geral, arquivos PDB podem ser utilizados para análise e visualização de estruturas proteicas tridimensionais. Estes arquivos podem ser visualizados através de softwares de bioinformática, como o ChimeraX ⁵⁴. Neste trabalho, visualizamos as estruturas obtidas pelo AlphaFold2 através do software UCSF Chimera (versão 1.17.3) ⁵⁴. Os arquivos PDB gerados pelo AlphaFold2 contém uma escala de confiança para cada região da estrutura predita de uma proteína. Ele indica o quão confiável é a predição de cada resíduo ou trecho da proteína com relação à sua posição estrutural local, em uma escala de 0 a 100.

Assim, os resíduos de aminoácidos foram coloridos de acordo com a confiabilidade de sua estrutura, sendo > 90 indicando alta confiança, entre 70 e 90 boa confiança e entre 50 e 70, baixa confiança. Há uma maior chance de erro na predição dessas regiões, que podem estar mais flexíveis ou desordenadas e valores < 50 indicando muito baixa confiança. Essas regiões são estruturalmente incertas e geralmente correspondem a regiões desordenadas ou flexíveis. A predição do complexo ubiquitina ligase E3 do tipo CRL1 (sendo neste caso, montado apenas com LinfCul1 DN e LinsSkp1) foi realizada utilizando a ferramenta online, AlphaFold2 (AF2) (versão online AlphaFold v2.3.2) ^{52,53}. Os modelos obtidos foram visualizados e analisados através de seus valores de pLDDT usando o software UCSF Chimera (versão 1.17.3) ⁵⁴.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Nocaute por CRISPR-Cas9 dos genes *LinfSKP1*, *LinfCUL1* e *LinfRBX1*.

Produzimos linhagens nocautes para os genes *LinfSKP1* (LINF_110018100 - SKP1-like protein), *LinfRBX1* (LINF_210005300 - Ring-box protein 1 – putative) e *LinfCUL1* (LINF_240029100 - Cullin-like protein-like protein), com o objetivo de analisar suas funções na *L. infantum*. Apenas o nocaute do gene *LinfCUL1* (LINF_240029100) gerou linhagens viáveis, indicando que *LinfSKP1* (LINF_110018100) e *LinfRBX1* (LINF_210005300) são potencialmente essenciais para *L. infantum*. Para estes genes será necessário o uso da metodologia de nocaute induzido (nocaute condicional) para certificar a essencialidade dos mesmos⁵⁵. A observação de que o nocaute de dois genes responsáveis pela síntese de proteínas do complexo LinfCRL1 não gerarem linhagens viáveis demonstra a importância deste complexo para a homeostase do parasita.

A confirmação da excisão do gene de *LinfCUL1* foi obtida através de PCR utilizando primers específicos para o *locus* do gene alvo e dos codificadores de genes que conferem resistência aos antibióticos puromicina e blasticidina nas linhagens selecionadas (**Figura 13**). É possível observar a ausência do gene *LinfCUL1* no primeiro gel e sua presença nas linhagens parental e controle. Por outro lado, os cassetes de resistência foram observados apenas na linhagem nocaute, o que confirma a edição realizada (**Figura 13**).

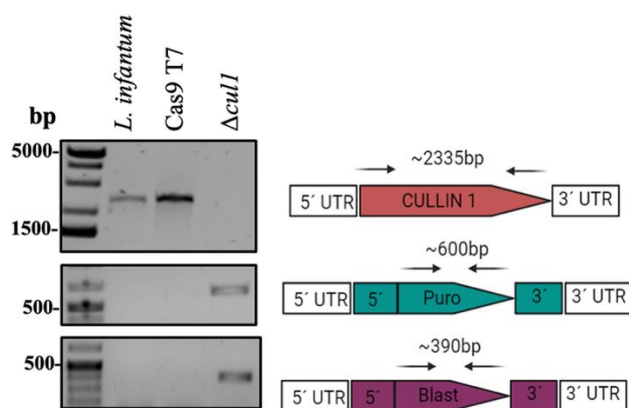


Figura 13. Confirmação nocaute de *LinfCUL1*.

Produtos de PCR, demonstrando a excisão do gene *LinfCUL1* na linhagem nocaute $\Delta cul1$, e sua presença na linhagem *L. infantum* selvagem HUUF14 e na *LinfCas9T7*. Abaixo, os produtos de PCR exibem a introdução dos genes de resistência à puromicina e blasticidina, permitindo a seleção da linhagem $\Delta cul1$. À direita os diagramas demonstram a localização dos primers utilizados.

4.2 Seleção de clones da linhagem $\Delta cull1$

Para obtenção de uma linhagem homogênea a partir da população nocaute $\Delta cull1$, realizamos a seleção clonal em placa. Foram obtidos 3 clones que tiveram seu DNAg extraído e validamos a excisão do gene *LinfcULL1* e a presença dos cassetes de resistência, indicando que eles representam a população $\Delta cull1$ (**Figura 14**).

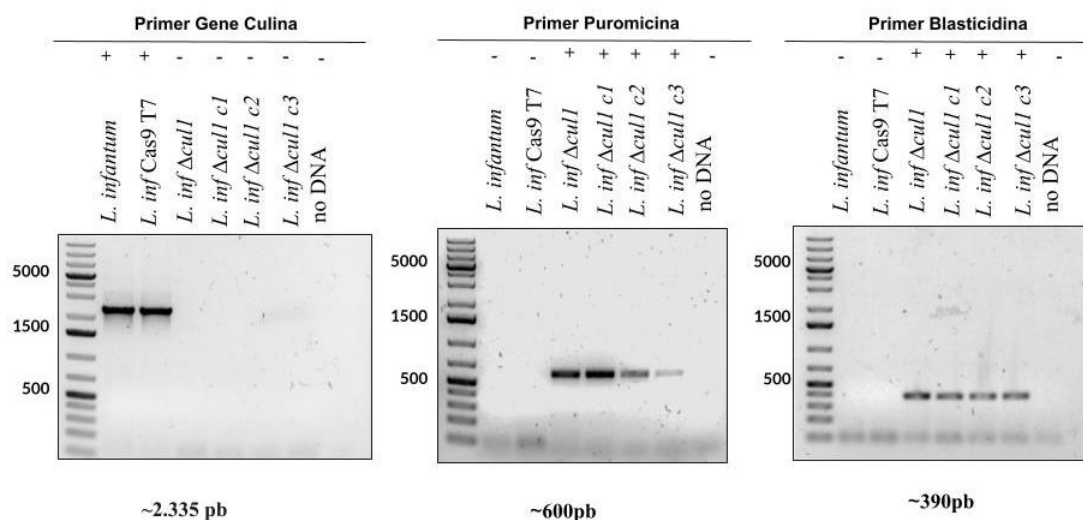


Figura 14. Confirmação dos clones de $\Delta cull1$.

Produtos de PCR demonstrando que os clones obtidos possuem a excisão do gene *LinfcULL1* e a introdução dos cassetes de resistência à puromicina e blasticidina. Os primers utilizados foram os mesmos representados no diagrama da **Figura 13**.

4.3 Caracterização da linhagem $\Delta cull1$

4.3.1 Proliferação celular

A avaliação da proliferação celular dos promastigotas da linhagem populacional $\Delta cull1$ em comparação às linhagens controle demonstrou que o nocaute do gene *LinfcULL1* afetou o crescimento da linhagem a partir do quarto dia (**Figura 15A**). Para analisar a taxa de crescimento destas linhagens, realizamos o ensaio de *Population Doubling* (PD), medindo a capacidade da linhagem celular dobrar-se ao longo dos dias de cultura ⁴⁶. Observamos novamente que a partir do quarto dia a linhagem $\Delta cull1$ apresentou reduzida capacidade de duplicação em comparação a linhagem selvagem, confirmando o papel do gene *LinfcULL1* na proliferação de *L. infantum* (**Figura 15B**). Além disso, em análises dos clones obtidos a partir

da linhagem $\Delta cul1$, foi observado o mesmo comportamento da linhagem populacional com efeito negativo de sua proliferação celular (**Figura 15C**).

Em outras espécies de tripanosomatídeos, como *T. brucei*, SKP1 (*TbSKP1*) está relacionado com a progressão da transição da fase G1/S do ciclo celular, enquanto RBX1 (*TbRBX1*) influencia a duplicação do kDNA. Em *T. brucei* o *knockdown* de *TbSkp1* e *TbRbx1* por RNAi reduziu a taxa de proliferação do parasita, mas ambas as cepas permaneceram viáveis. Por outro lado, o nocaute de *TbCull1* não apresentou diferenças significativas na taxa de crescimento tanto na forma pró-cíclica, quanto em formas de parasitas presentes corrente sanguínea, sugerindo que outras Cullinas podem desempenhar sua função no parasita ⁵⁶. Estes resultados sugerem que o complexo CRL1 pode desempenhar funções diferentes em *T. brucei* e *Leishmania*.

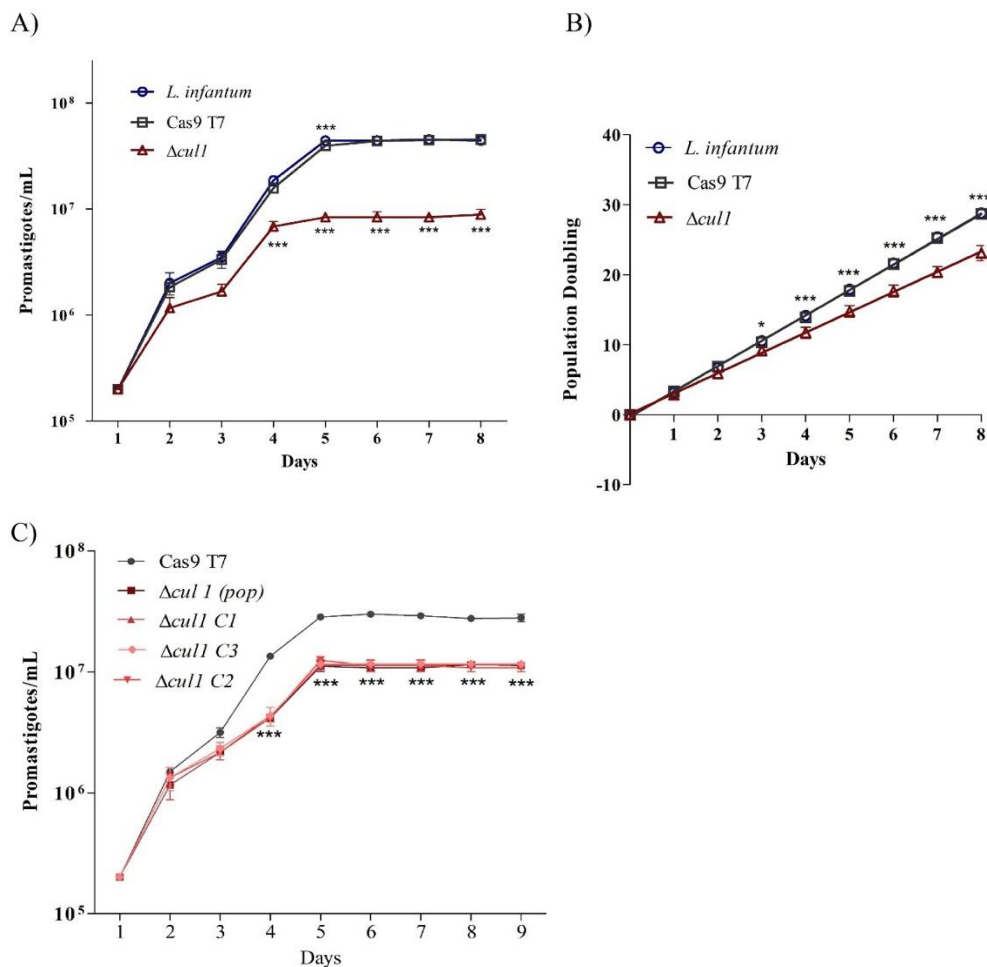


Figura 15. Efeitos do nocaute de *LinfCUL1* em promastigotas de *L. infantum*.

A) Curvas de crescimento das linhagens controle *L. infantum* (parental) e Cas9T7 com relação a $\Delta cul1$. **B)** Análise da taxa de proliferação celular por duplicação populacional ao longo de 8

dias de cultura entre as linhagens controle e $\Delta cul1$. C) Curva de crescimento entre a linhagem celular controle Cas9T7 e $\Delta cul1$, com suas linhagens clonais ($\Delta cul1$ C1, C2 e C3). As contagens de células foram realizadas a cada 24 h por 8 dias (até obtenção da fase estacionária). Ambos os gráficos tiveram a avaliados pelo teste estatístico TWO-WAY ANOVA onde: * = $p < 0.05$ *** = $p < 0.001$. Gráficos gerados através do software GraphPad Prism v5.

4.3.2 Expressão do gene *LinFCUL1* selvagem ou mutante (add-back) na linhagem $\Delta cul1$

Para comprovar que os efeitos sobre o crescimento e duplicação celular são decorrentes do nocaute do gene *LinFCUL1* e não por ação *off target* do sistema de CRISPR-Cas9, realizamos a expressão do gene selvagem clonado em vetor pLEXSY. Para comprovação de que os efeitos observados na população $\Delta cul1$ eram pela função de LinfCul1 associada ao complexo LinfCRL1 e não por uma função não canônica, construímos um gene *LinFCUL1 DN* (dominante negativo) com truncamento nas regiões de interação com LinfSkp1 e clonado no pLEXSY (**Figura 16**). É importante destacar que tanto LinfCul1 quanto LinfCul1 DN foram clonados em fusão com o peptídeo HA para permitir sua detecção com anticorpos anti-HA (**Figura 16**). Ambos os genes foram transfectados separadamente na linhagem $\Delta cul1$ para avaliarmos seus efeitos chamaremos estas linhagens de *add-back* (AB).

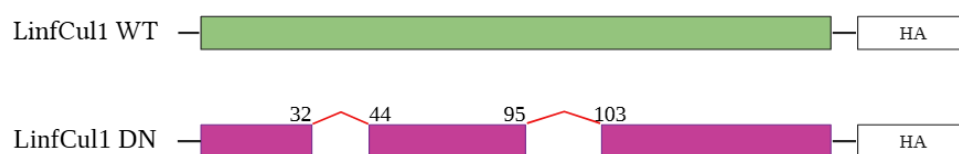


Figura 16. Demonstração esquemática da sequência de LinfCul1 selvagem (WT) e LinfCul1 DN.

Representação da sequência selvagem da proteína LinfCul1 (verde claro) que foi fusionada ao peptídeo HA em sua porção C-terminal. Logo abaixo uma representação da sequência truncada de LinfCul1 DN (roxo claro), os números representam as posições dos aminoácidos das sequências que foram retirados da proteína, referentes aos dois sítios de interação entre LinfCul1 e LinfSkp1, assim como o peptídeo HA em sua porção C-terminal.

Para avaliar as consequências estruturais dos truncamentos em LinfCul1 DN das regiões de interação com LinfSkp1, realizamos a determinação estrutural utilizando AlphaFold2^{52,53}. Os resultados estruturais são expressos de maneira quantitativa através de uma escala de 0 a 100 indicando a confiabilidade da estrutura, sendo quanto mais escuro mais confiável. Nossos resultados demonstraram que a LinfCul1 DN apresenta a região de interação com LinfSkp1 de baixa confiabilidade se comparado a LinfCul1 (**Figuras 17A e B**). Desta forma, reforça que este truncamento prejudica a interação entre estas proteínas.

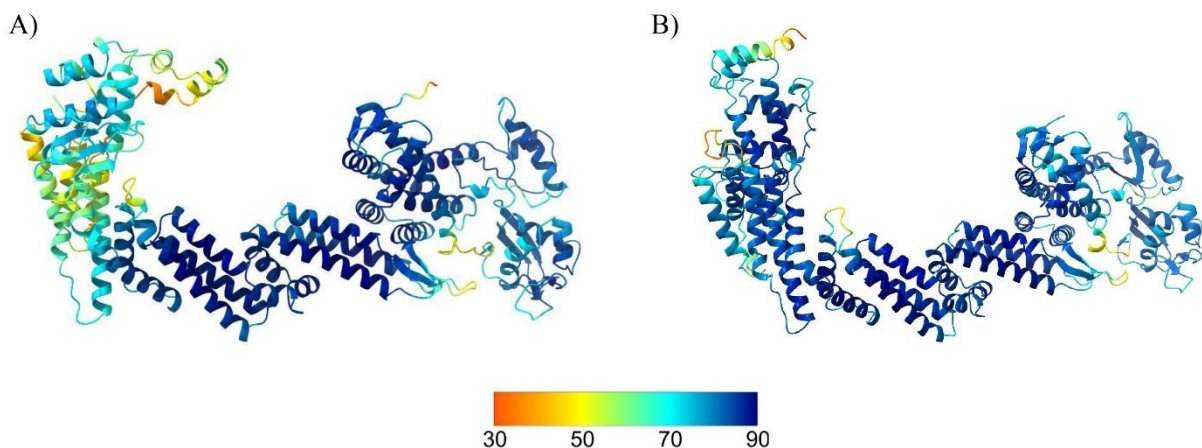


Figura 17. Determinação estrutural de LinfCul1 DN ou LinfCul1 com LinfSkp1 pelo AlphaFold2.

A) Estrutura entre LinfCul1 DN e LinfSkp1. **B)** Estrutura LinfSkp1 + LinfCul1 anteriormente demonstrada em⁴³. A escala de cores demonstra a confiabilidade da estrutura obtida.

Para confirmar a capacidade de interação entre LinfCul1 DN e LinfSkp1, foi realizado um ensaio de co-immunoprecipitação em *L. infantum* expressando estavelmente LinfSKP1 em fusão com mCherry e 3xmyc. Esta linhagem foi transfectada com LinfCul1-HA ou LinfCul1 DN-HA clonados em pLEXSY e submetido a imunoprecipitação com anti-myc. Os resultados demonstraram que LinfCul1 interage com LinfSkp1, mas LinfCul1 DN apresenta uma drástica redução desta interação, comprovando que as regiões removidas de fato são importantes pontos de interação entre estas proteínas, validando esta construção como um dominante negativo (**Figura 18**).

A)

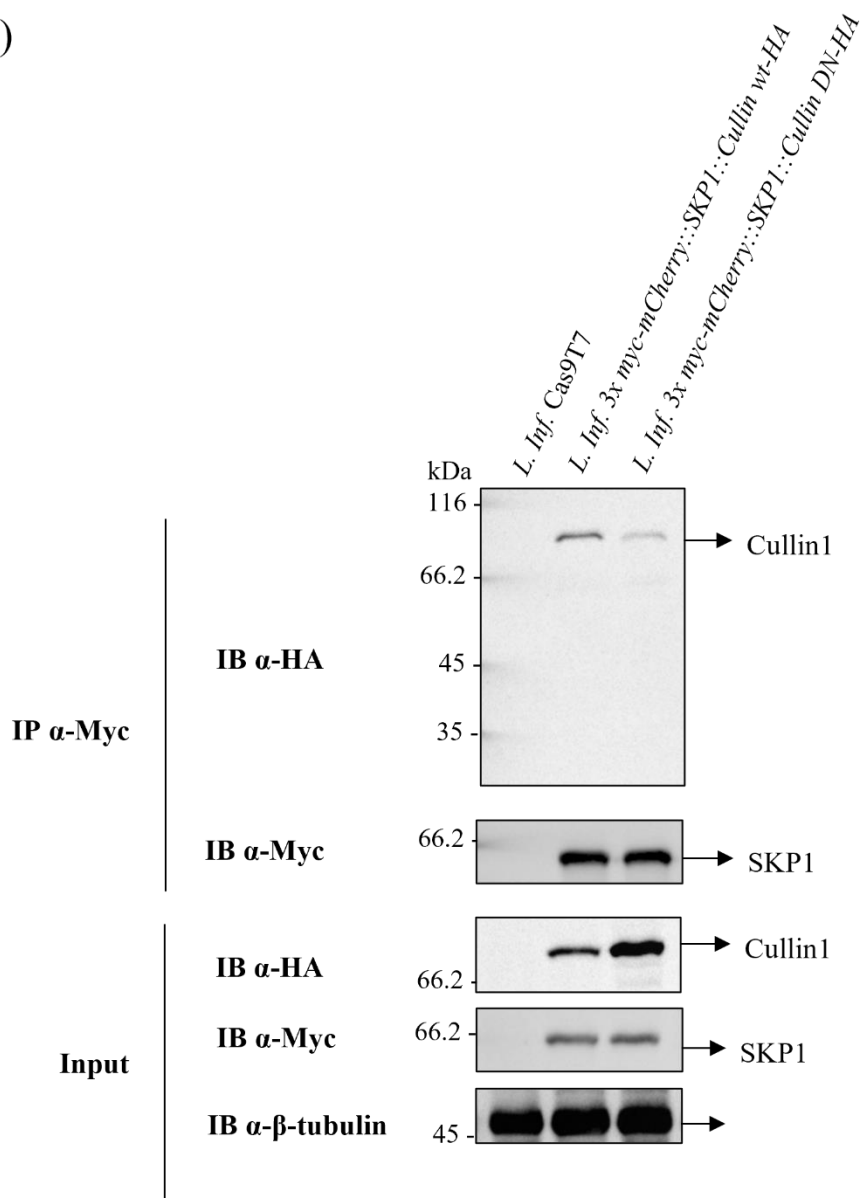


Figura 18. Ensaio de co-imunoprecipitação entre *3xmyc-mCherry-LinfSkp1* com *LinfCul1-HA* ou *LinfCul1 DN-HA* em *L. infantum*.

A) Linhagem *L. infantum 3xmyc mCherry::LinfSKP1* foi transfectada com pLEXY-*LinfCUL1-HA* ou pLEXY-*LinfCUL1 DN-HA* e os extratos celulares submetidos a imunoprecipitação com *beads* anti-myc. Após lavagem, o eluato foi obtido pela adição de laemmli buffer. Os eluatos ou input (extrato total) foram resolvidos por SDS-PAGE e analisados por *western blotting* com os anticorpos indicados.

Como primeira etapa de análise, foi realizado um ensaio de curva de crescimento de promastigotas comparando a linhagem controle *L. infantum Cas9T7* as linhagens add-back

LinfCul1 ou LinfCul1 DN e a linhagem $\Delta cul1$ (**Figura 19**). Notamos que, AB LinfCul1 WT conseguiu recuperar o fenótipo de duplicação celular quando comparado ao seu controle (*L. infantum* Cas9 T7). Porém, interessante, o AB LinfCul1 DN demonstrou um crescimento estatisticamente inferior a partir do 4º dia de cultivo em diante, quando comparado ao seu controle ou AB LinfCul1 (**Figura 19**). Assim, confirmamos que os efeitos no crescimento observados em $\Delta cul1$ são relacionados especificamente ao gene *LinfCUL1* e que estão relacionados ao papel da E3 ubiquitina ligase LinfCRL1.

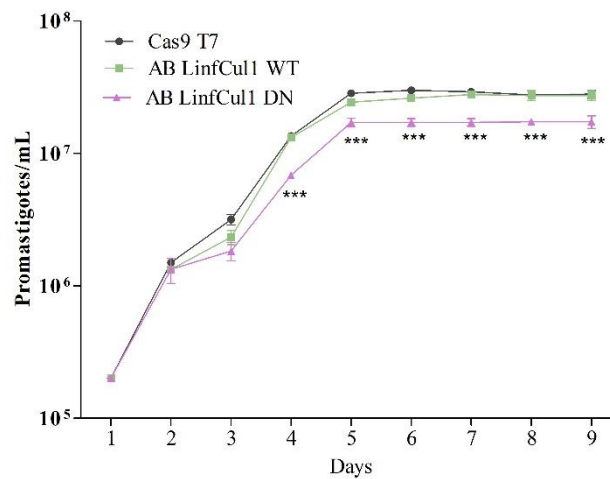


Figura 19. Efeitos da expressão de LinfCul1 ou LinfCul1 DN na proliferação de promastigotas da linhagem $\Delta cul1$.

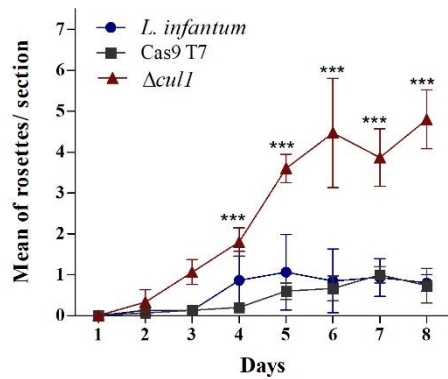
Curva de crescimento entre a linhagem celular controle (*L. infantum* Cas9 T7) e $\Delta cul1$, com suas linhagens add-backs (*AB LinfCUL1* ou *AB LinfCUL1 DN*). As células foram contadas a cada 24hrs por 9 dias. Gráficos avaliados pelo teste estatístico TWO-WAY ANOVA onde: * = $P < 0.05$ *** = $P < 0.001$. Gráficos gerados através do software GraphPad Prism v5.

4.3.3 Formação de Rosetas

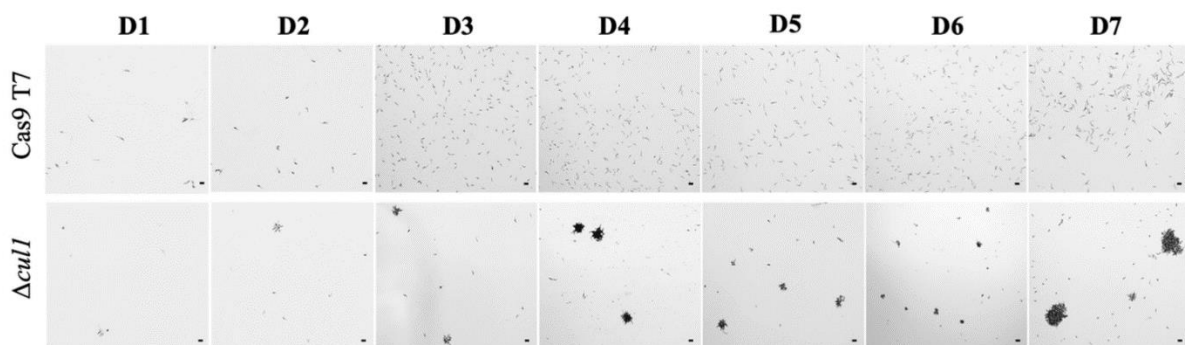
Adicionalmente a interferência na proliferação e duplicação de promastigotas, a linhagem $\Delta cul1$ apresentou formação exacerbada de agregados celulares em formato de rosetas (**Figura 20**). As primeiras observações destas agregações *in vitro*, foram descritas por Shortt, Barraud e Craighead em 1926⁵⁷ e também demonstradas no trabalho de R. J. V. Pulvertaft e G. V. Hoyle em 1960⁵⁸. Utilizando a técnica cinemicrográfica, os autores registraram macrófagos parasitados com *Leishmania donovani* cultivados a partir de amostras de baço e

polpa de baço de hamster infectados, em que se observou parasitas em estágios de exflagelação, formação de rosetas em culturas exflagelantes. A linhagem *L. infantum* $\Delta cul1$ apresentou uma aglomeração de parasitas promastigotas, lembrando a formação de rosetas que foram aumentando em quantidade e número com o passar dos dias em cultura (**Figuras 20A-C**). Essas estruturas já foram anteriormente descritas em *L. major* expressando ácido polissíalico (PSA) na superfície celular, bem como ácido neuramínico acetilado (NeuPSA) contido no PSA. A frequência de formação de rosetas e a expressão de PSA/NeuPSA na superfície celular foram dependentes da temperatura. As rosetas formam estruturas semelhantes a corpos de fusão celular que são então liberados. É hipotetizado que as rosetas representam uma fase não reconhecida no ciclo de vida de *Leishmania spp.*, iniciando o processo de acasalamento, durante o qual a expressão de PSA/NeuPSA desempenha um papel crucial em *L. major* ⁵⁹. Também já foi observado que além do estresse de temperatura, o movimento rotacional da cultura de células também influencia a formação de agregados celulares, semelhantes às rosetas ⁶⁰. As estruturas observadas na linhagem $\Delta cul1$ assemelham-se às observadas em *L. major*, com flagelos entrelaçados no centro. A observação inicial de potencial reprodução sexual em *Leishmania* foi derivada da microespectrofotometria quantitativa, sugerindo a ocorrência de fusão nuclear ou reprodução sexual dentro da forma amastigota intracelular ⁶¹. A identificação de genótipos híbridos em isolados naturais de *Leishmania* apoiou ainda mais essa hipótese, e métodos computacionais foram empregados para investigar a dinâmica do genoma aneuplóide ⁶². A troca genética em *Leishmania* pode ser facilitada por anticorpos IgM, que induzem a formação de aglomerados esféricos de parasitas, promovendo assim a fusão de parasitas e a formação de híbridos ⁶³. HOP1 e um parálogo HAP2 (HAP2-2) demonstraram ser componentes essenciais da maquinaria de meiose de *Leishmania* e do mecanismo de fusão célula a célula associado à reprodução sexual nesses parasitas ⁶⁴.

A)



B)



C)

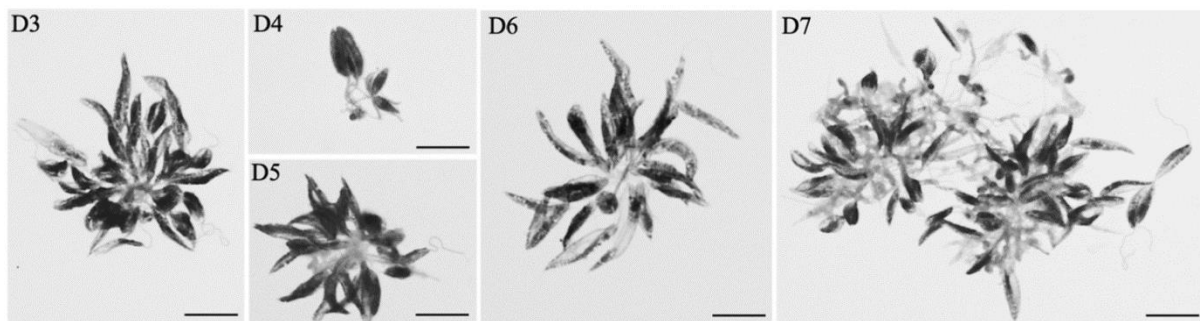
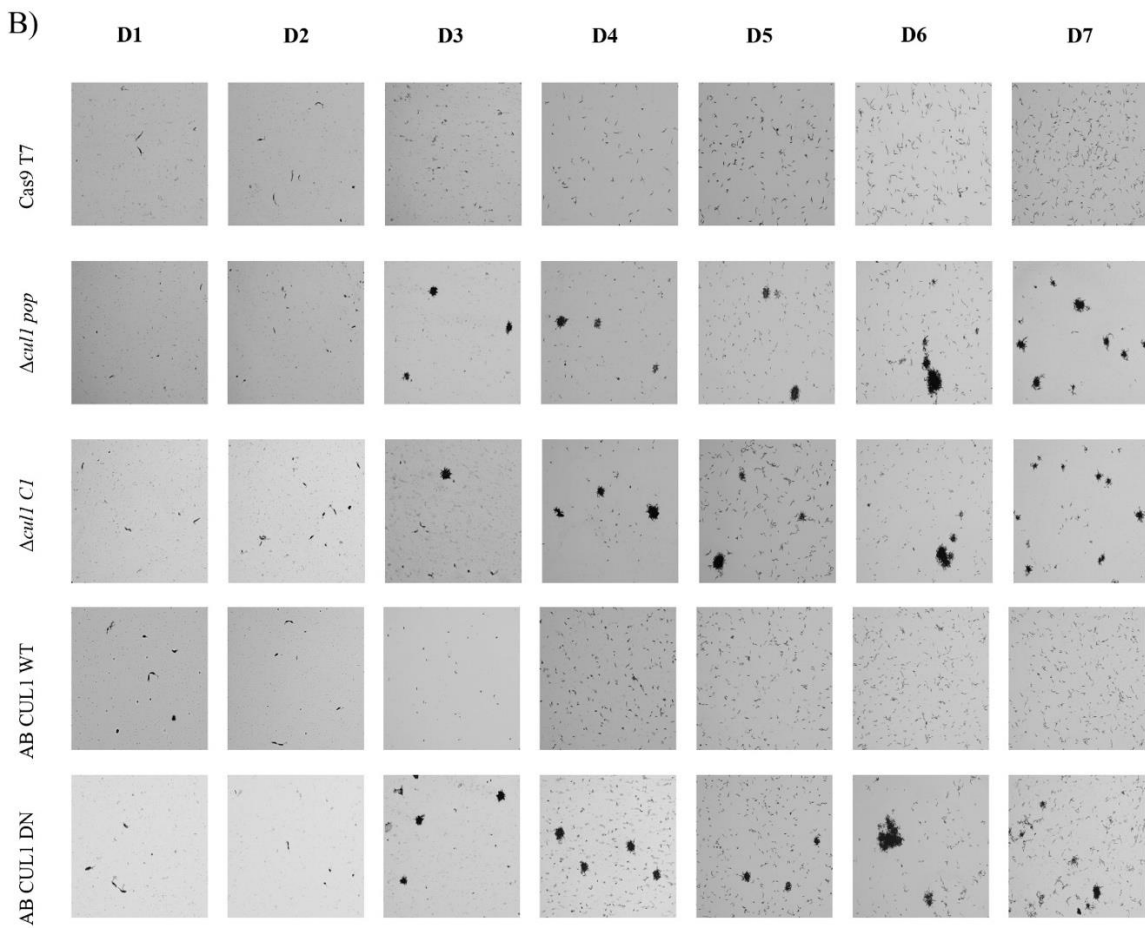
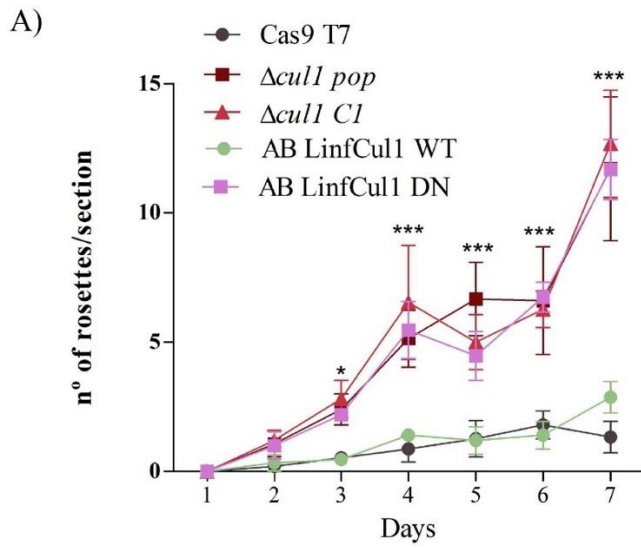


Figura 20. Formação de rosetas *in vitro*.

Os dados foram obtidos a partir da análise de cinco regiões, (quatro extremidades e a porção central do frasco de cultura). A contagem de rosetas foi normalizada pelo número de campos fotografados por frasco de cultura entre $\Delta cull1$ em comparação ao controle *LinfCas9 T7*, durante um período 7 dias de cultivo (metodologia própria). A) Significância estatística determinada através do teste estatístico TWO-WAY ANOVA (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Gráficos produzidos pelo software GraphPad Prism v5.0. B) Imagens de cultura de promastigotas da cepa parental (Cas9 T7) e $\Delta cull1$ evidenciando a formação e crescimento de rosetas ao longo dos dias de

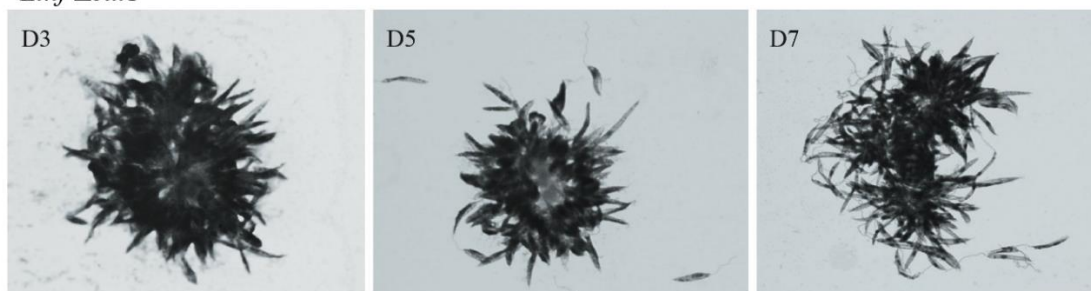
cultivo. Imagens capturadas através de uma objetiva de 20X. C) Esfregaço de células promastigotas de $\Delta cull1$, coradas através da técnica de Romanowsky (Panótico Labclin). Rosetas representativas de cada período foram observadas através de microscópio óptico com objetiva de 100X.

Nossos resultados demonstram que o nocaute de *LinfCUL1* estimula a formação de rosetas, indicando que a expressão desse gene reprime ou reduz a formação dessas estruturas. Para confirmar a especificidade deste efeito, o gene de *LinfCUL1* selvagem ou *LinfCUL1 DN* foram expressos separadamente na linhagem $\Delta cull1$ e avaliamos a proliferação celular em comparação às linhagens controle (**Figura 21A-E**). Observamos que a expressão de *LinfCul1* mas não *LinfCul1 DN* restaurou o fenótipo selvagem, reduzindo o número de rosetas, confirmando o papel desta proteína em associação ao complexo *LinfCRL1* na regulação da formação de rosetas em *L. infantum* (**Figura 21A**). A família de proteínas Cullin está associada à regulação da meiose e segregação cromossômica em diferentes organismos. Cullin9 protege os óvulos de camundongos da aneuploidia controlando a dinâmica dos microtúbulos durante a meiose do oócito ⁶⁵. Cullin 4A regula a progressão meiótica na espermatogênese do camundongo ⁶⁶. SCF/Skp1 juntamente com Fbh1 asseguram a segregação cromossômica adequada na levedura de fissão ⁶⁷. Em *Caenorhabditis elegans*, CUL-2 controla vários processos cruciais na divisão celular e desenvolvimento embrionário, incluindo progressão meiótica, polaridade anterior-posterior e condensação da cromatina mitótica ⁶⁸. Se *LinfCul1* associada ao complexo *LinfCRL1* é responsável pela divisão de parasitas *Leishmania* durante a reprodução sexual ainda precisa ser explorado.



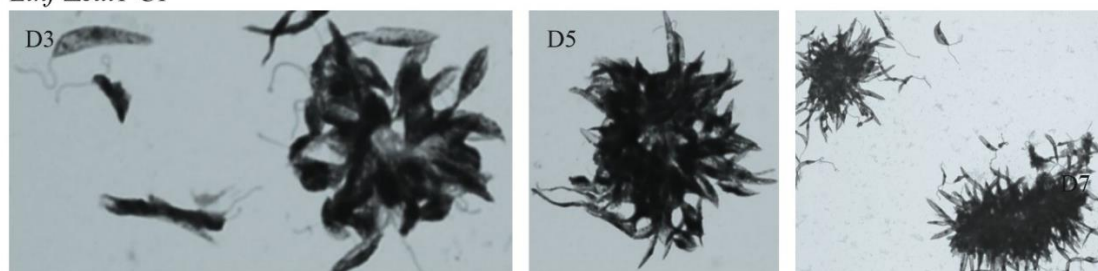
C)

Linf Δ *cull1*



D)

Linf Δ *cull1 C1*



E)

AB *LinfCul1* DN

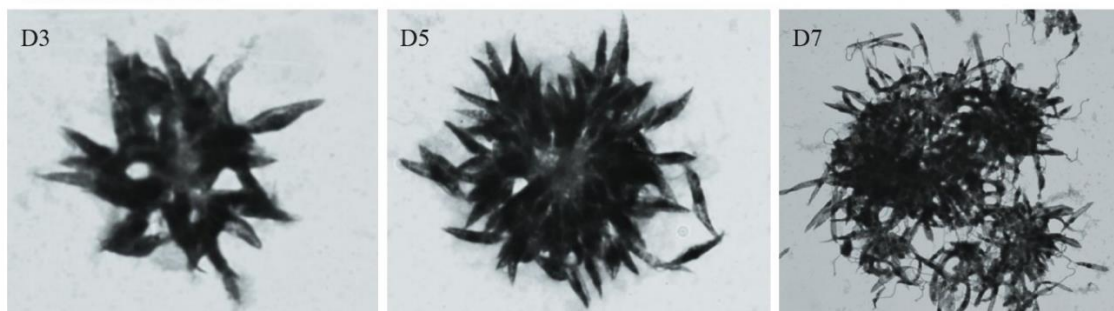


Figura 21. Análise de formação de rosetas.

Os dados foram obtidos a partir da análise de cinco regiões, (quatro extremidades e a porção central do frasco de cultura). A contagem de rosetas foi normalizada pelo número de campos fotografados por frasco de cultura entre Δ *cull1*, Δ *cull1 C1*, AB *LinfCul1* WT e AB *LinfCul1* DN em comparação a controle *LinfCas9 T7*, durante um período 7 dias de cultivo. A) Significância estatística determinada através do teste estatístico TWO-WAY ANOVA (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Gráficos produzidos pelo software GraphPad Prism v5.0. B) Imagens de cultura de promastigotas da cepa controle *LinfCas9 T7*, Δ *cull1*, Δ *cull1 C1*, AB *LinfCul1* WT e AB *LinfCul1* DN evidenciando a formação e crescimento de rosetas ao longo dos dias de cultivo. Imagens capturadas através de uma objetiva de 20X. C), D) e E) Esfregaços de células

promastigotas de $\Delta cul1$, $\Delta cul1 C1$, *AB LinfCul1 WT* e *AB LinfCul1 DN*, coradas através da técnica de Romanowsky (Panótico Labclin). Rosetas representativas de cada período foram observadas através de microscópio óptico com objetiva de 100X.

4.3.4 Papel de LinfCul1 no ciclo celular de *L. infantum*

Após as análises de curva de crescimento e duplicação populacional, consideramos avaliar o ciclo celular de $\Delta cul1$. Para isso, utilizamos a metodologia de citometria de fluxo com marcação de iodeto de propídeo, para acessarmos e compararmos o conteúdo de DNA da célula parental contra a linhagem nocaute. Conforme descrito na literatura, um dos principais mecanismos de progressão do ciclo celular em células eucarióticas envolve a sucessiva ativação de quinases dependentes de ciclina (CDKs), desencadeada principalmente pela degradação via proteassoma de suas ciclinas e inibidores de quinase (CKI). Duas ligases de ubiquitina E3 eucarióticas, o complexo promotor de anáfase (APC) e CRL1, são responsáveis pela ubiquitinação destes reguladores, controlando assim a progressão do ciclo celular^{33,69}. Cull1 é uma proteína atua como plataforma molecular para o complexo CRL1, onde interage com quatro proteínas F-box diferentes (FBXW7, β TrCP, SKP2 e Cyclin F), mediando a ubiquitinação e degradação dos principais reguladores do ciclo celular, como Myc, Cyclin F, inibidores de CDK (p21, p27 e p57), claspin, WEE1, EMI1 e REST⁷⁰.

Através da análise do conteúdo de DNA de parasitas promastigotas por citometria de fluxo, revelou-se um perfil semelhante entre $\Delta cul1$ e sua linhagem celular parental (**Figura 22A**). Porém, quando realizamos a sobreposição destes mesmos histogramas, foi possível observar um acúmulo de células nas fases S tardia e G2/M em $\Delta cul1$ (**Figura 22A, meio**). Ao analisarmos a sua distribuição celular, uma significativa redução no conteúdo 2n (fase G1/G0) e aumento no conteúdo 4n (fases tardias S ou G2/M/C) nas células nocauteadas foram reveladas (**Figura 22A, direita**). Esses resultados sugerem que LinfCul1 possui alguma influência sobre a progressão do ciclo celular. Para investigarmos a progressão da fase S e conseqüentemente a interferência de LinfCul1 na duração das fases posteriores do ciclo celular, utilizamos um análogo a timidina para monitorar a replicação do DNA. Para ambas as linhagens, parasitas promastigotas que possuíam o conteúdo 2K2N marcados com EdU foram detectados pela primeira vez 0,75 h (45 min) após a adição de EdU no meio de cultivo, indicando que para estas células a final da fase S exigiu 45 min para poder prosseguir através das demais fases G2 e M (**Figura 22B**). Após esta etapa, quantificamos a proporção de parasitas promastigotas

marcados com EdU após 1 h de pulso. Intrigantemente, $\Delta cull1$ apresentou um número ligeiramente maior de células marcadas com Edu do que a sua linhagem celular parental (**Figura 22C**). Além disso, ambas as linhagens se mostraram com uma proporção semelhante de células em citocinese (2N2K) (**Figura 22D**). Após todas essas quantificações, os dados foram inseridos no software online CeCyD⁴⁹, e observamos um aumento significativo na duração da fase S para a linhagem $\Delta cull1$ (fase S foi estimada em 2,751h, ou 0,24 ccu, para a linhagem $\Delta cull1$, enquanto sua linhagem parental apresentou fase S igual a 0,78h, ou 0,1 ccu) (**Figura 22E**). Assim, esses resultados indicam que o aumento no conteúdo de 4n observado na linhagem $\Delta cull1$ (**Figura 22C**) seria na realidade células que ficaram acumuladas no final da fase S, dado que o final desta fase inclui duplicados (2N2K). O conteúdo de DNA (4n) e a transição do final da fase S (tardia) para G2 não são facilmente identificados e devidamente separados por citometria de fluxo. Os dados apontam, que LinfCul1 pode regular a progressão da fase S e possivelmente a sua transição entre a fase S tardia para G2 em *L. infantum* através de um mecanismo desconhecido, pois não há descrição de ponto de controle S/G2 em tripanossomatídeos.

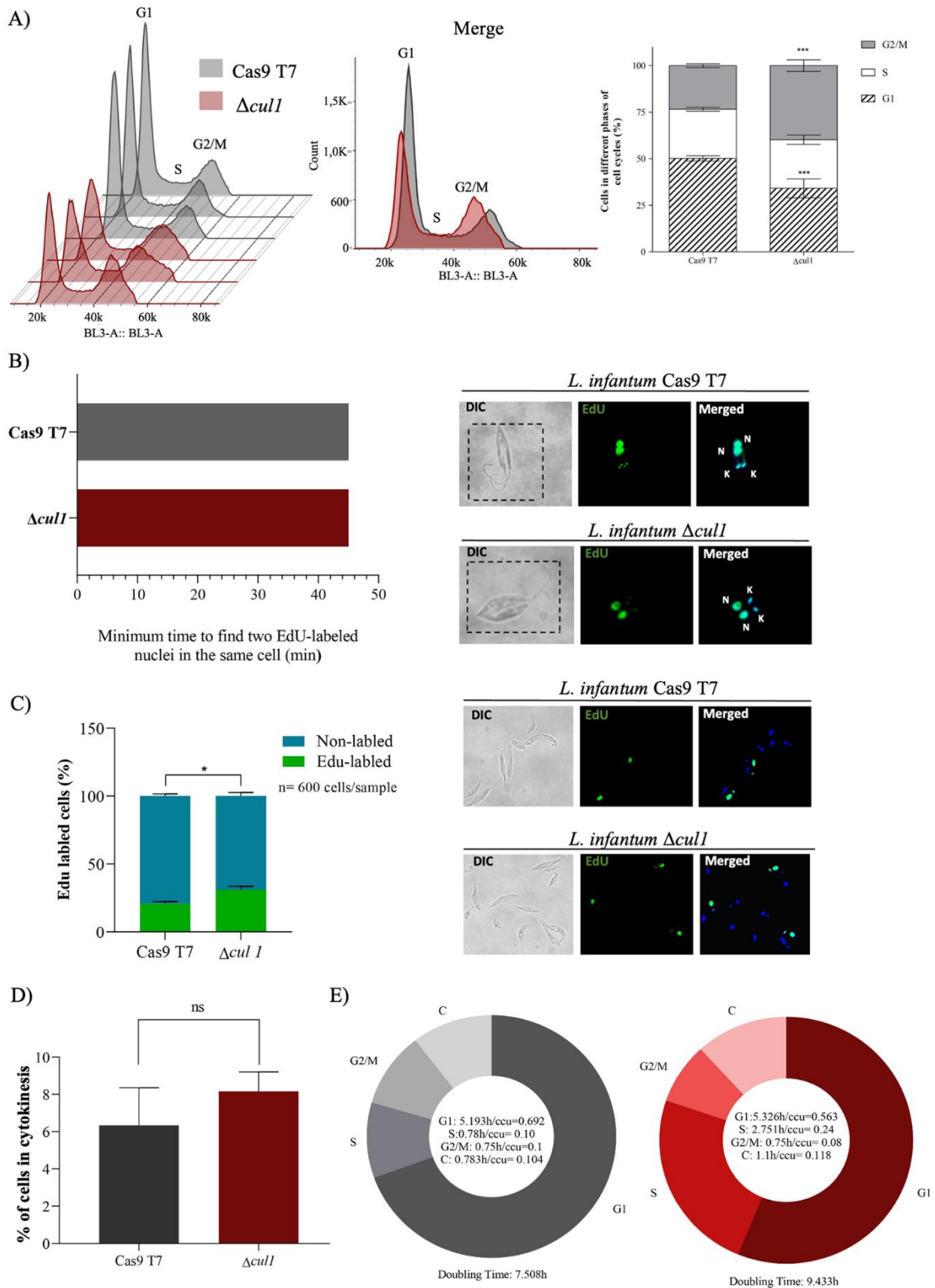


Figura 22. Análise do ciclo celular de $\Delta cull1$ e da linhagem celular parental.

A) Análise de citometria de fluxo e quantificação do conteúdo de DNA. **B)** Estimativa da duração das fases G2+M através do tempo mínimo para encontrar dois núcleos marcados com

EdU na mesma célula. C) Porcentagem de células marcadas com EdU após pulso de EdU de 1 h. D) Parasitas marcados com DAPI com configurações 2K2N foram usados para estimar a porcentagem de células realizando citocinese. E) O software CeCyD⁴⁹ foi usado para estimar a duração da fase do ciclo celular. Imagens representativas foram obtidas com objetiva de óleo 100X. Células marcadas com EdU foram reveladas usando azida conjugada com Alexafluor 488 (verde). DAPI (azul) foi usado para corar organelas contendo DNA: cinetoplasto (K) e núcleo (N). Para A, três réplicas biológicas foram realizadas, e a significância estatística foi determinada usando o teste TWO-WAY ANOVA (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Para C e D, foi usado o teste t não pareado ($n = 3$). Os gráficos foram gerados usando o software GraphPad Prism v5.0.

4.4 Infecção *in vitro*

Para avaliarmos o papel do gene *LinfCUL1* na infectividade de *L. infantum*, realizamos infecção *in vitro* de macrófagos da medula óssea de camundongos (BMDM- Bone-marrow-derived macrophage) nos tempos de 24, 48 e 72 h. Foram utilizadas como controles as linhagens parentais (*L. infantum*) e Cas9T7 e as variantes $\Delta cul1$ população ou $\Delta cul1$ clone C1, para avaliar o comportamento do clone em comparação à população. Também foram testadas as linhagens AB LinfCul1 ou AB LinfCul1 DN para avaliar a especificidade do efeito do gene *LinfCUL1* ou seu papel como integrante do complexo LinfCRL1, respectivamente.

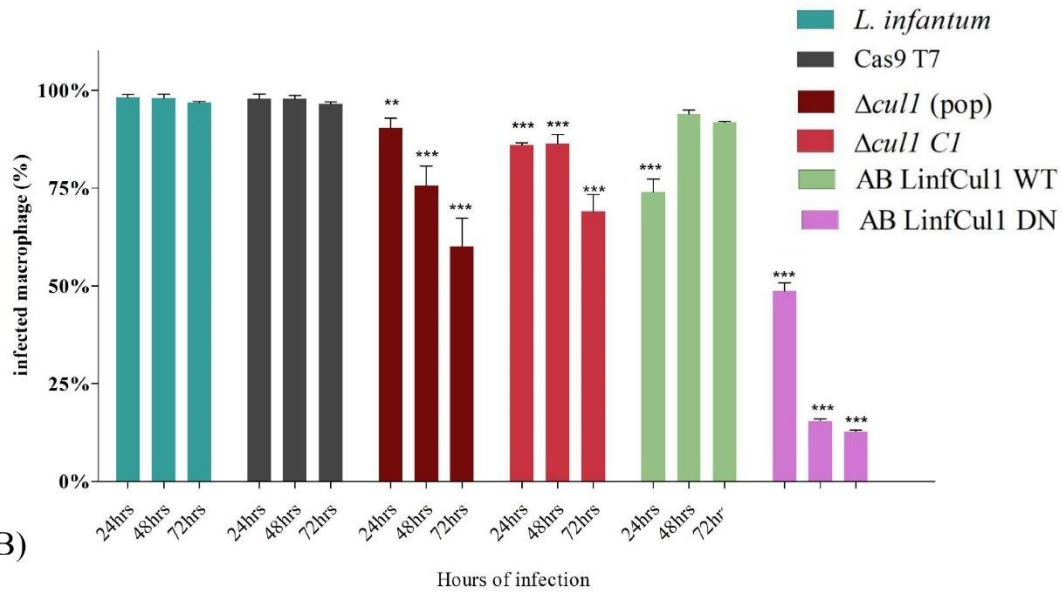
Inicialmente, avaliamos a porcentagem de macrófagos infectados em cada linhagem. Observamos que as linhagens controles apresentaram perfil semelhante, indicando que a inserção de Cas9T7 por CRISPR-Cas 9 não interferiu na capacidade de infectar os macrófagos (**Figura 23A**, dois primeiros conjuntos de barras). Ao compararmos a população $\Delta cul1$ com o clone C1 de $\Delta cul1$, não observamos diferenças significativas, indicando que o clone C1 representa a população $\Delta cul1$ (**Figura 23**, barras do meio). Finalmente, observamos que a linhagem AB LinfCul1 se comportou de forma similar às demais amostras, ao passo que AB LinfCul1 DN houve uma redução significativa da capacidade infectiva dos parasitas a partir de 24 h (**Figura 23**, conjunto de barras do lado direito). Nós hipotetizamos que LinfCul1 DN, um mutante que não se liga em LinfSkp1, mas que interage com LinfRbx1, pode estar sequestrando LinfRbx1 e impedindo a formação de complexos LinfCRL1 essenciais para a infectividade dos parasitas. Uma outra observação interessante é que o nocaute de *LinfCUL1* ($\Delta cul1$ e clone C1 $\Delta cul1$) reduz a sustentação da infectividade após 24 h em relação aos

controles, o que não foi observado no AB LinfCul1, confirmando que este efeito é especificamente dependente desta proteína (**Figura 23**).

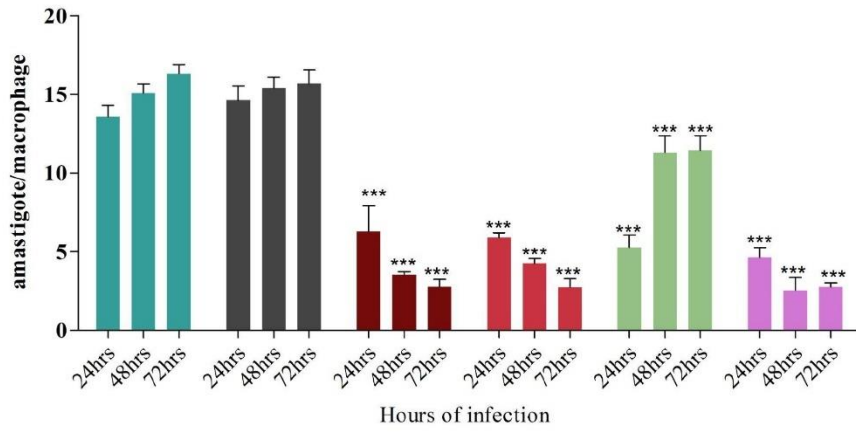
Ao avaliarmos o número de amastigotas por macrófago, observamos nos controles que não houve aumento significativo deste número após 24 h, indicando que pode ter havido uma saturação de amastigotas por vacúolo parasitóforo (VP) (**Figura 23B**, barras da esquerda). Por outro lado, observamos uma redução de aproximadamente 60 % no número de amastigotas após 24 h de infecção na população $\Delta cull1$, clone C1 $\Delta cull1$, AB LinfCul1 e AB LinfCul1 DN (**Figura 23B**). Curiosamente, a linhagem AB LinfCul1 restaurou a capacidade proliferativa dos amastigotas após 48h de infecção se comparado a $\Delta cull1$, clone C1 $\Delta cull1$, AB LinfCul1, indicando que *LinfCUL1* modula a replicação dos parasitas no interior dos VP (**Figura 23B**, barras da direita). Após 48 h de infecção a redução dos amastigotas é ainda mais dramática no $\Delta cull1$, clone C1 $\Delta cull1$, AB LinfCul1, corroborando o papel de *LinfCUL1* neste processo.

Finalmente, o índice de infecção que relaciona o número de macrófagos infectados e amastigotas por VP, demonstra a exacerbação do efeito de AB LinfCul1 DN na infectividade dos macrófagos e na capacidade proliferativa dos amastigotas no VP (**Figura 23C**). As imagens representativas das infecções nos diferentes tempos podem ser visualizadas na **Figura 24A-F**. Interessante notar que após 72 h, para a linhagem AB LinfCUL1 DN, é possível visualizar macrófagos sem nenhum amastigota em seu interior, indicando que esse parasita não foi capaz de se proliferar dentro das células hospedeiras de mamíferos.

A)



B)



C)

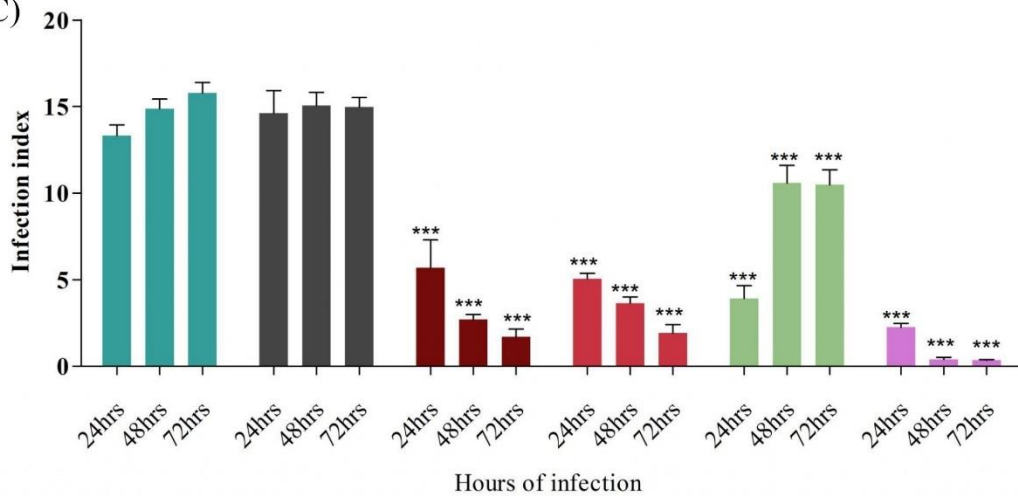
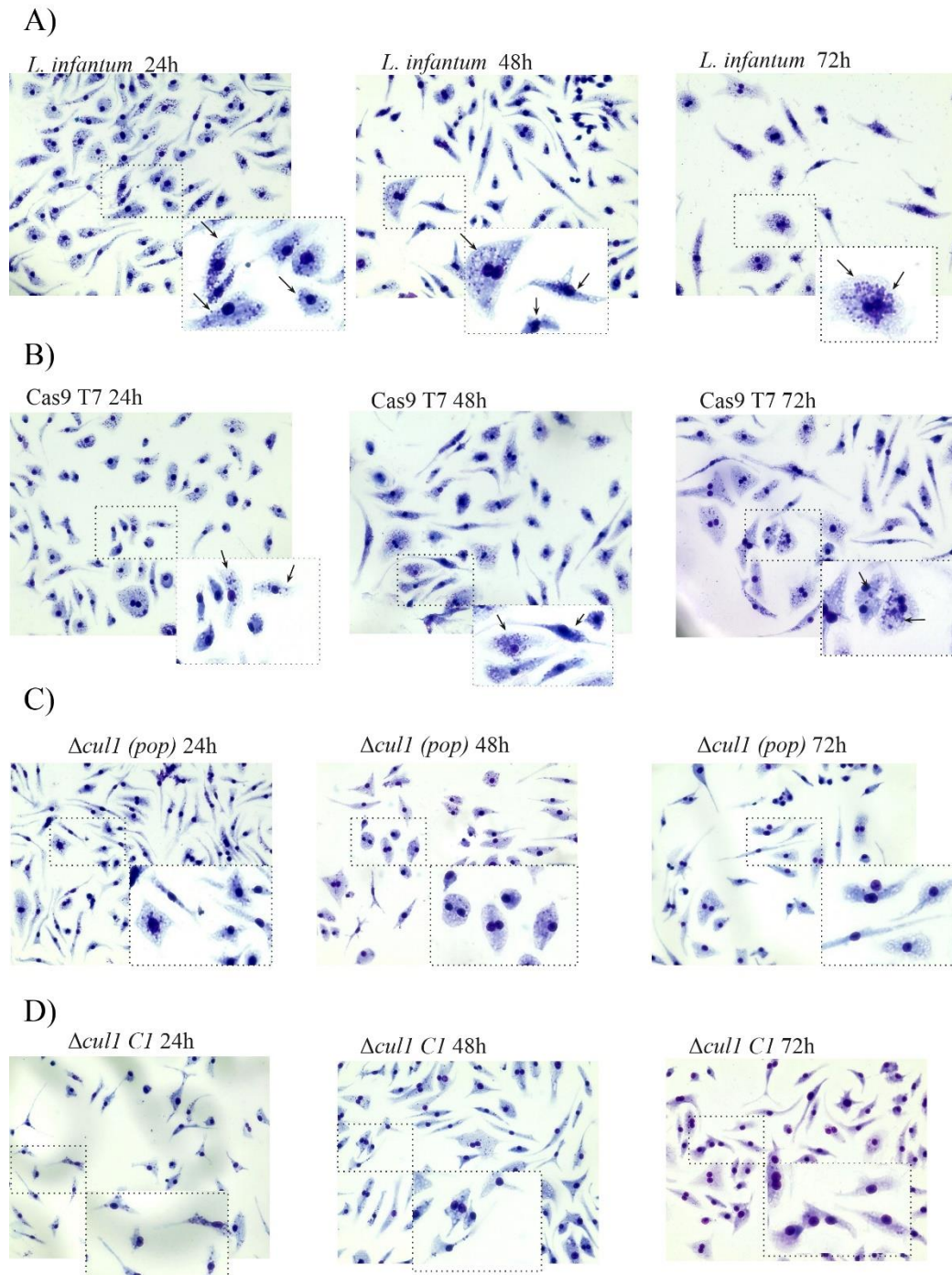


Figura 23. Análises dos dados de infecção *in vitro*.

A) Porcentagem de macrófagos infectados (contendo a média do valor das triplicatas). **B)** Número de amastigotas por macrófago contado, valor absoluto. **C)** Valor adquirido através do número da porcentagem de macrófagos infectados multiplicando a média de amastigotas, dividido por 100. Gráficos gerados utilizando GraphPad Prism v5.0, significância estatística determinada usando um teste Two-Way ANOVA (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



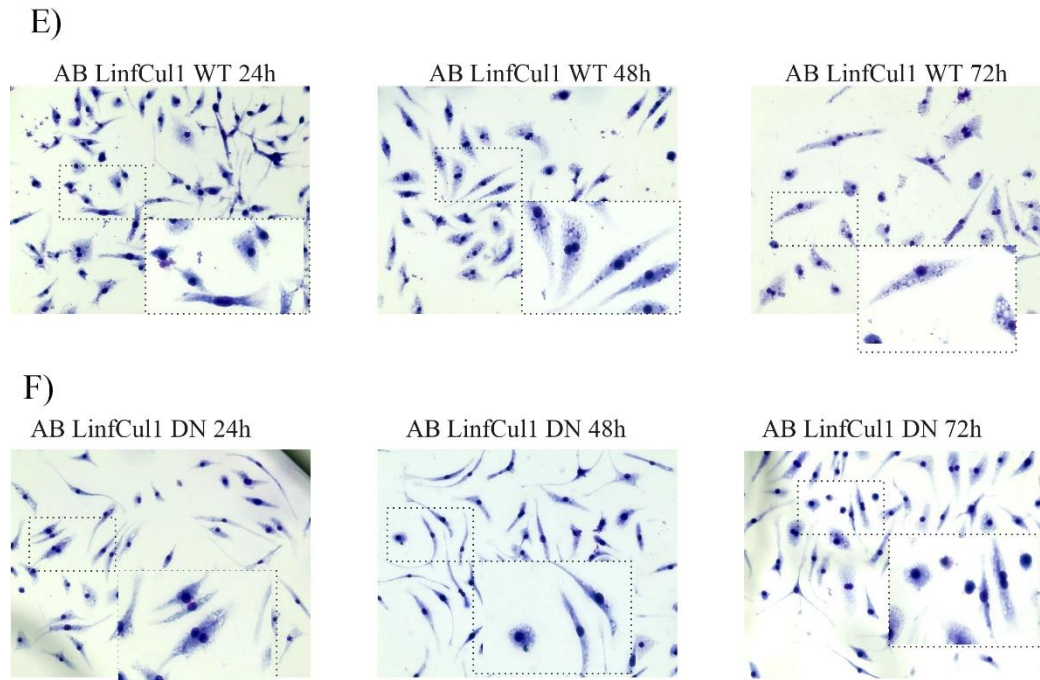


Figura 24. Infecção *in vitro*.

Imagens representativas dos tempos de infecção 24, 48 e 72h para as linhagens. **A)** *L. infantum* (HUUFS14). **B)** *L. infantum* Cas9 T7. **C)** $\Delta cul1$. **D)** $\Delta cul1 Cl$. **E)** *AB LinfCul1* WT. **F)** *AB LinfCul1* DN. Imagens fotografadas utilizando Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System, em uma objetiva de 40X.

O pré-tratamento de células promastigotas de *L. chagasi* com lactacistina (um inibidor do proteassoma que age através de sua forma ativa, α -clasto-lactacistina β -lactona) não impediu a entrada do parasita nas células hospedeiras, mas interferiu significativamente em sua sobrevivência e proliferação intracelular. A interferência foi especialmente acentuada após 96 h, com uma redução na porcentagem de macrófagos infectados, de aproximadamente 75% para 4%, nos parasitas previamente tratados com lactacistina, em comparação com uma taxa de 60% nos controles não tratados ⁷¹. Outros estudos demonstraram que a ação de inibidores de seletivos do proteassoma do parasita podem ser novas apostas para abordagens terapêuticas contra leishmaniose ⁷². Além disso, proteínas essenciais ao ciclo celular de *L. major* como Lmj KIN13-1 foram identificadas como substratos do proteassoma nesses parasitas, algo que pode ser relacionado à importância demonstrada neste estudo sobre *LinfCUL1* na progressão do ciclo celular. Assim, é inequívoca a função do Sistema Ubiquitina Proteassoma (SUP) na

infectividade e proliferação dos amastigotas, sendo este o primeiro trabalho demonstrando o papel das LinfCRL1 nestes processos.

5 PROSPECÇÃO DE ARTIGO(S) CIENTÍFICO(S) **(ANEXOS)**

5.1. Publicação de Artigos

1- Camila Rolemberg Santana Travaglini Berti de Correia, Caroline Torres*, **Ellen Gomes***, Giovana Maffei Rodriguez, Wesley Klaysson Pereira Regatieri, Nayore Tamie Takamiya, Luana Aparecida Rogerio, Iran Malavazi, Marcelo Damário Gomes, Jeziel Dener Damasceno, Vitor Luiz da Silva, Marcos Antonio Fernandes de Oliveira, Marcelo Santos da Silva, Alessandro Silva Nascimento, Adriano Cappellazzo Coelho, Sandra Regina Maruyama, Felipe Roberti Teixeira. *Estes autores contribuíram igualmente para este trabalho. “Functional characterization of Cullin-1-RING ubiquitin ligase (CRL1) complex in *Leishmania infantum*”. PLOS Pathogens 20(7): e1012336. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012336>⁴³. Julho 2024.

2- Ellen Gomes, Luana Aparecida Rogerio, Nayore Tamie Takamiya, Caroline Torres, João Santana da Silva, Roque Pacheco Almeida, Sandra Regina Maruyama. “Dataset of dual RNA-seq mapping in visceral leishmaniasis: Inquiry on parasite transcripts in human blood transcriptome upon *Leishmania infantum* infection” doi.org/10.1016/j.dib.2022.108811 . Data in Brief, Volume 46, fevereiro 2023, ISSN 2352-3409⁷³.

REFERÊNCIAS

1. Leishmaniasis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
2. Leishmaniose Visceral — Ministério da Saúde. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>.
3. Burza, S., Croft, S. L. & Boelaert, M. Leishmaniasis. *The Lancet* **392**, 951–970 (2018).
4. De Pablos, L. M., Ferreira, T. R. & Walrad, P. B. Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. *Curr Opin Microbiol* **34**, 82–89 (2016).
5. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. Núm. 12 (Dezembro de 2023). <https://iris.paho.org/handle/10665.2/59170>.
6. Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* **9**, 604–615 (2011).
7. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity | Nature Microbiology. <https://www.nature.com/articles/s41564-018-0125-7>.
8. The Trypanosomatids Cell Cycle: A Brief Report - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36045195/>.
9. Burza, S., Croft, S. L. & Boelaert, M. Leishmaniasis. *Lancet* **392**, 951–970 (2018).
10. Wheeler, R. J., Gluenz, E. & Gull, K. The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. *PLOS ONE* **8**, e79581 (2013).
11. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751903001425?via%3Dihub>.
12. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids - Silva - 2017 - Journal of

Eukaryotic Microbiology - Wiley Online Library.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jeu.12408>.

13. Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems: Trends in Parasitology.
[https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922\(17\)30190-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492217301903%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/parasitology/fulltext/S1471-4922(17)30190-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS1471492217301903%3Fshowall%3Dtrue).
14. The Centriole Cartwheel Protein SAS-6 in *Trypanosoma brucei* Is Required for Probasal Body Biogenesis and Flagellum Assembly | Eukaryotic Cell.
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/ec.00083-15>.
15. Flagellar pocket restructuring through the *Leishmania* life cycle involves a discrete flagellum attachment zone - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26746239/>.
16. Alberts, B. *et al.* An Overview of the Cell Cycle. in *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition (Garland Science, 2002).
17. Wheeler, R. J., Gluenz, E. & Gull, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology* **79**, 647–662 (2011).
18. Alternate histories of cytokinesis: lessons from the trypanosomatids | Molecular Biology of the Cell. <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.E19-12-0696>.
19. The chromatin of trypanosomes - ScienceDirect.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020751994900078?via%3Dihub>.
20. The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes - Hecker - 1985 - Biology of the Cell - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1768-322X.1985.tb00368.x>.
21. Hershko, A. & Ciechanover, A. THE UBIQUITIN SYSTEM. 57 (1998).

22. Herskho, A., Heller, H., Elias, S. & Ciechanover, A. Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem* **258**, 8206–14 (1983).
23. Wilkinson, K. D., Urban, M. K. & Haas, A. L. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem* **255**, 7529–7532 (1980).
24. Bedford, L., Lowe, J., Dick, L. R., Mayer, R. J. & Brownell, J. E. Ubiquitin-like protein conjugation and the ubiquitin–proteasome system as drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 29–46 (2011).
25. Rock, K. L. *et al.* Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**, 761–771 (1994).
26. Löwe, J. *et al.* Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* **268**, 533–539 (1995).
27. Li, W. *et al.* Genome-Wide and Functional Annotation of Human E3 Ubiquitin Ligases Identifies MULAN, a Mitochondrial E3 that Regulates the Organelle’s Dynamics and Signaling. *PLOS ONE* **3**, e1487 (2008).
28. Zheng, N. *et al.* Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**, 703–9 (2002).
29. Cloos, J. *et al.* (Immuno)proteasomes as therapeutic target in acute leukemia. *Cancer and Metastasis Reviews* (2017) doi:10.1007/s10555-017-9699-4.
30. Schulman, B. A. *et al.* Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1±Skp2 complex. **408**, 6 (2000).
31. Metzger, M. B., Hristova, V. A. & Weissman, A. M. HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. *J Cell Sci* **125**, 531–537 (2012).

32. Fouad, S., Wells, O. S., Hill, M. A. & D'Angiolella, V. Cullin Ring Ubiquitin Ligases (CRLs) in Cancer: Responses to Ionizing Radiation (IR) Treatment. *Front. Physiol.* **10**, (2019).
33. Nakayama, K. I. & Nakayama, K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 369–381 (2006).
34. Robertson, C. D. The *Leishmania mexicana* proteasome. *Mol Biochem Parasitol* **103**, 49–60 (1999).
35. Khare, S. *et al.* Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. *Nature* **537**, 229–233 (2016).
36. Wyllie, S. *et al.* Preclinical candidate for the treatment of visceral leishmaniasis that acts through proteasome inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 9318–9323 (2019).
37. CLINICAL TRIAL SYNOPSIS A phase II, multicentre, randomized, two-arm blinded study to assess the efficacy and safety of two LXE408 regimens for treatment of patients with primary visceral leishmaniasis - Pesquisa Google.
https://www.google.com/search?q=CLINICAL+TRIAL+SYNOPSIS+A+phase+II%2C+multicentre%2C+randomized%2C+two-arm+blinded+study+to+assess+the+efficacy+and+safety+of+two+LXE408+regimens+for+treatment+of+patients+with+primary+visceral+leishmaniasis&rlz=1C1FCXM_pt-PTBR989BR989&oq=CLINICAL+TRIAL+SYNOPSIS++A+phase+II%2C+multicentre%2C+randomized%2C+two-arm+blinded+study+to+assess+the+efficacy+and+safety+of+two+LXE408+regimens+for+treatment+of+patients+with+primary+visceral+leishmaniasis&gs_lcrp=EgZjaHJvbWUyBggAEEUYOdIBBzMwM2owajeoAgCwAgA&sourceid=chrome&ie=UTF-

8#vhid=zephyr:0&vssid=atritem-<https://dndi.org/wp-content/uploads/2023/10/DNDi-LXE408-01-VL-Clinical-Trial-Protocol-Synopsis.pdf>.

38. Dubessay, P. *et al.* Cell cycle-dependent expression regulation by the proteasome pathway and characterization of the nuclear targeting signal of a *Leishmania major* Kin-13 kinesin. *Mol Microbiol* **59**, 1162–1174 (2006).
39. Kumar, P., Sundar, S. & Singh, N. Degradation of pteridine reductase 1 (PTR1) enzyme during growth phase in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol* **116**, 182–189 (2007).
40. Burge, R. J., Damianou, A., Wilkinson, A. J., Rodenko, B. & Mottram, J. C. *Leishmania* differentiation requires ubiquitin conjugation mediated by a UBC2-UEV1 E2 complex. *PLOS Pathogens* **16**, e1008784 (2020).
41. Damianou, A. *et al.* Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. *PLoS Pathog* **16**, e1008455 (2020).
42. Pérez-Pertejo, Y., Alvarez-Velilla, R., Estrada, C. G., Balaña-Fouce, R. & Reguera, R. M. *Leishmania donovani*: proteasome-mediated down-regulation of methionine adenosyltransferase. *Parasitology* **138**, 1082–1092 (2011).
43. Functional characterization of Cullin-1-RING ubiquitin ligase (CRL1) complex in *Leishmania infantum* | PLOS Pathogens.
<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1012336#sec012>].
44. José M. Ribeiro and João S. Silva, S. R. M. Non-*Leishmania* Parasite in Fatal Visceral Leishmaniasis–Like Disease, Brazil.
45. Beneke, T. *et al.* A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci* **4**, 170095 (2017).
46. Teixeira, F. R. *et al.* FBXO25 regulates MAPK signaling pathway through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* **621**, 38–45 (2017).

47. Systems Analysis and Simulation in Ecology - 1st Edition | Elsevier Shop.
<https://shop.elsevier.com/books/systems-analysis-and-simulation-in-ecology/patten/978-0-12-547201-2>.
48. Stanners, C. P. & Till, J. E. DNA synthesis in individual L-strain mouse cells.
Biochim Biophys Acta **37**, 406–419 (1960).
49. Comparative Analysis of the Minimum Number of Replication Origins in Trypanosomatids and Yeasts - PMC.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7288466/>.
50. Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol* **38**, 3022–3027 (2021).
51. Nitric Oxide Partially Controls *Coxiella burnetii* Phase II Infection in Mouse Primary Macrophages | Infection and Immunity. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.71.3.1225-1233.2003>.
52. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
53. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* **50**, D439–D444 (2022).
54. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
55. Yagoubat, A. *et al.* Universal highly efficient conditional knockout system in *Leishmania*, with a focus on untranscribed region preservation. *Cell Microbiol* **22**, e13159 (2020).

56. Rojas, F. *et al.* The ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 is essential for cytokinesis in contrast to putative subunits of a SCF complex in *Trypanosoma brucei*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **11**, e0005626 (2017).
57. Shortt, H., Barraud, P. & Craighead, A. The Life-history and Morphology of *Herpetomonas donovani* in the Sandfly *Phlebotomus argentipes*. *Indian Journal of Medical Research*.
58. Pulvertaft, R. J. & Hoyle, G. F. Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **54**, 191–196 (1960).
59. Iovannisci, D. M., Plested, C. P. & Moe, G. R. Evidence for Rosettes as an Unrecognized Stage in the Life Cycle of *Leishmania* Parasites. *J Eukaryot Microbiol* **57**, 405–414 (2010).
60. Surprising Effects of Rocking Motion on *Leishmania tarentolae* Behavior in Culture and Implications for Cell Stress. <https://www.mdpi.com/2673-7140/3/3/42>.
61. Kreutzer, R. D., Yemma, J. J., Grogl, M., Tesh, R. B. & Martin, T. I. Evidence of sexual reproduction in the protozoan parasite *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Am J Trop Med Hyg* **51**, 301–307 (1994).
62. *Leishmania* Sexual Reproductive Strategies as Resolved through Computational Methods Designed for Aneuploid Genomes. <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/2/167>.
63. Serafim, T. D. *et al.* *Leishmania* genetic exchange is mediated by IgM natural antibodies. *Nature* **623**, 149–156 (2023).
64. Catta-Preta, C. M. C., Ferreira, T. R., Ghosh, K., Paun, A. & Sacks, D. HOP1 and HAP2 are conserved components of the meiosis-related machinery required for successful mating in *Leishmania*. *Nat Commun* **14**, 7159 (2023).
65. Dai, X. *et al.* Cullin9 protects mouse eggs from aneuploidy by controlling microtubule dynamics via Survivin. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 2934–2941 (2016).

66. Yin, Y. *et al.* The E3 ubiquitin ligase Cullin 4A regulates meiotic progression in mouse spermatogenesis. *Developmental Biology* **356**, 51–62 (2011).
67. Okamoto, S., Sato, M., Toda, T. & Yamamoto, M. SCF Ensures Meiotic Chromosome Segregation Through a Resolution of Meiotic Recombination Intermediates. *PLOS ONE* **7**, e30622 (2012).
68. Vasudevan, S., Starostina, N. G. & Kipreos, E. T. The *Caenorhabditis elegans* cell-cycle regulator ZYG-11 defines a conserved family of CUL-2 complex components. *EMBO Rep* **8**, 279–286 (2007).
69. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis | Cell Death & Differentiation. <https://www.nature.com/articles/s41418-020-00648-0>.
70. Dang, F., Nie, L. & Wei, W. Ubiquitin signaling in cell cycle control and tumorigenesis. *Cell Death Differ* **28**, 427–438 (2021).
71. Silva-Jardim, I., Horta, M. F. & Ramalho-Pinto, F. J. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. *Acta Trop* **91**, 121–130 (2004).
72. Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease - Bibo-Verdugo - 2017 - The FEBS Journal - Wiley Online Library. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/febs.14029>.
73. Gomes, E. *et al.* Dataset of dual RNA-seq mapping in visceral leishmaniasis: Inquiry on parasite transcripts in human blood transcriptome upon *Leishmania infantum* infection. *Data in Brief* **46**, 108811 (2023).