

Romário Lopes Boy

Identificação e caracterização de genes candidatos a transportadores de ferro para o glicossomo de *Leishmania amazonensis*

Identification and characterization of candidate genes for iron transporters for the *Leishmania amazonensis* glycosome

São Paulo

2022

Romário Lopes Boy

Identificação e caracterização de genes candidatos a transportadores de ferro para o glicosomo de *Leishmania amazonensis*

Identification and characterization of candidate genes for iron transporters for the *Leishmania amazonensis* glycosome

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Geral do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Geral

Orientadora: Dra. Maria Fernanda Laranjeira da Silva

São Paulo

2022

Lopes-Boy, Romário

Identificação e caracterização de genes candidatos a transportadores de ferro para o glicosomo de *Leishmania amazonensis*/ Romário Lopes Boy; Orientadora: Maria Fernanda Laranjeira da Silva –

São Paulo, 2022.

Número de páginas: 64

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de pós-graduação em Fisiologia.

1. Transfecção 2. Imunofluorescência 3. Expressão Gênica.

I. Laranjeira da Silva, Maria Fernanda, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:

Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).



Prof(a). Dr.(a). Orientador(a)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Maria Fernanda Laranjeira-Silva pela oportunidade de ingressar na pós-graduação da USP, pela confiança depositada em mim para realizar parte tão importante do projeto. Pela excelente orientação e por todos ensinamentos, tão importantes para minha formação. Serei sempre grato, obrigado por tudo.

À Profa. Dra. Lucile Maria Floeter-Winter, por ter aberto as portas do seu laboratório para mim e por tantos ensinamentos.

À Dra. Juliana Ide Aoki pelas inúmeras ajudas, por dedicar parte do seu tempo a me ajudar na realização de experimentos do projeto, pelos cafés e conversas quase diárias, e por sempre ter uma palavra positiva, mesmo quando as coisas não davam certo.

Ao Dr. Ricardo Andrade Zampieri por toda ajuda, sempre com todo suporte técnico necessário para a realização dos experimentos. Obrigado por ter compartilhado comigo sua expertise em qPCR, você é sensacional irmão. Agradeço também pelas inúmeras conversas, por ser um grande amigo aqui em São Paulo.

Aos amigos de Bat-Lab, pela convivência, ajuda e troca de experiências.

Ao Dr. Mário Costa Cruz pela ajuda na obtenção das imagens de microscopia confocal e pelas inúmeras dicas.

Aos professores Dr. Petter Franco Entringer e Dr. José Luciano Nepomuceno da Silva meus orientadores da iniciação científica, responsáveis em boa parte pelo meu gosto em estudar os Protozoários e Biologia Molecular. Grandes professores e amigos.

À banca de qualificação composta pelos professores Dr. Adriano Cappellazzo Coelho, Dr. Mauro Javier Cortez Véliz e Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes pelas considerações.

Aos meus pais Nilzete e Eledir pela vida, pelos valores que não se aprendem na escola e pela dedicação em minha formação, vocês me deram tudo que eu precisava para chegar até aqui. Amo vocês.

À minhas Irmãs Fernanda e Mirian e a minha família por constituírem a minha verdadeira felicidade, onde encontro força e inspiração para prosseguir.

Aos meus que já se foram, em especial ao meu tio Edilmar. Vocês deixaram tantas saudades.

À minha companheira da vida Cíntia, por ser essa fortaleza, por ter aceito embarcar nessa aventura de viver em São Paulo. Quando estive fraco você me fez forte, e me deu o ânimo que precisava para encarar os desafios. Obrigado pela compreensão, dedicação e cuidado, que o amor sempre transborde em nós. Eu amo você.

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro deste trabalho através do Auxílio FAPESP 2017/23933-3, bolsa de mestrado FAPESP 2019/21185-5.

A Deus por ter me dado força para prosseguir e superar todos obstáculos que surgiram, gratidão.

Resumo

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos responsáveis pelas doenças conhecidas como leishmanioses que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Esses organismos são parasitos que alternam entre hospedeiro invertebrado e vertebrado, onde são capazes de sobreviver e replicar nos macrófagos. Uma das condições críticas encontrada pela *Leishmania* no macrófago é a carência de nutrientes, entre estes o ferro, que é fundamental como cofator para diversas enzimas essenciais ao parasito. A identificação e estudo de genes essenciais para a tomada de ferro por esses parasitos revelaram que a disponibilidade de ferro tem um papel central na infectividade. Estes estudos também demonstraram que privação de ferro induz a expressão de uma série de genes cuja função ainda é desconhecida gerando uma excelente oportunidade para a identificação de componentes adicionais da maquinaria molecular envolvida no metabolismo de ferro desses parasitos. Os tripanossomatídeos possuem organelas únicas chamadas glicossomos, que representam uma das principais diferenças entre parasito e hospedeiro. Os glicossomos compartimentalizam enzimas envolvidas na via glicolítica, na β -oxidação de ácidos graxos, e também participam em processos celulares antioxidantes. As superóxido dismutases dependentes de ferro (FeSOD) são enzimas particularmente importantes pelo papel na proteção do parasito contra radicais livres resultantes da ativação da NADPH oxidase, e os glicossomos de *Leishmania* compartimentalizam as isoformas B das superóxido dismutases (SODB1/2) que utilizam exclusivamente o ferro como cofator. Diversas tentativas frustradas de gerar nocautes de FeSODB mostraram que essa isoforma é essencial para a sobrevivência de *Leishmania* indicando que o transporte de ferro para o glicossomo, não explorado até o momento, também é um alvo interessante para identificação e estudo. Portanto, o objetivo desse trabalho é identificar e iniciar a caracterização de genes potencialmente envolvidos no transporte de ferro para o glicossomo de *Leishmania*. A partir da análise *in silico* de 576 transcritos de *L. amazonensis* significativamente modulados pela privação de ferro, buscamos os genes que continham domínios transmembrana e sinais de endereçamento para os glicossomos (PTS1 e/ou PTS2) preditos. Dentre 11 genes encontrados, começamos a caracterização dos 5 que possuem 3 ou mais domínios transmembrana preditos, são eles: LmxM.04.1030, LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020. Para isso, clonamos as ORFs desses 5 genes nos vetores de expressão de *Leishmania* pXG-GFP+ e pXG-GFP2+, para fusão dos genes alvo à sequência codificadora da proteína fluorescente EGFP. As construções obtidas foram transfectadas em promastigotas de *L. amazonensis*. Selecionamos diversos clones e confirmamos a superexpressão dos genes alvo por qPCR. Avaliamos a localização das proteínas alvo fundidas a EGFP em ensaios de imunofluorescência e com isso mostramos a colocalização das proteínas codificadas por LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020 fundidas a EGFP

com a proteína glicossomal arginase. Realizamos ensaios para avaliar a replicação *in vitro* de promastigotas superexpressores selecionados, e os resultados obtidos indicam que as linhagens superexpressoras de LmxM.04.1030, LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020 crescem mais lentamente que a linhagem selvagem. Além disso, investigamos se a superexpressão dos genes alvo modula diferencialmente a expressão de genes previamente relacionados ao transporte e metabolismo de ferro, e à outras vias metabólicas glicossomais. Nossos resultados revelaram a indução da expressão gênica de arginase e do transportador de arginina AAP3 5.1 nas linhagens superexpressoras de LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020. Assim, nossos resultados indicam que os genes LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020 estão potencialmente envolvidos no metabolismo de ferro glicossomal. A construção e caracterização de parasitos nocaute destes genes permitirá caracterizar suas funções moleculares contribuindo na elucidação dos mecanismos envolvidos no transporte e metabolismo de ferro no glicossomo de *Leishmania*.

Abstract

Protozoa of the genus *Leishmania* are the etiological agents responsible for the diseases known as leishmaniasis that affect millions of people worldwide. These organisms are parasites that alternate between the invertebrate and vertebrate host where they are able to survive and replicate in macrophages. One of the critical conditions found by *Leishmania* in the macrophage is the lack of nutrients, including iron, which is fundamental as a cofactor for several enzymes essential to the parasite. The identification and study of genes essential for iron uptake by these parasites revealed that iron availability plays a central role in infectivity. These studies also demonstrated that iron deprivation induces the expression of a series of genes whose function is still unknown, providing an excellent opportunity for the identification of additional components of the molecular machinery involved in the iron metabolism of these parasites. Trypanosomatids have unique organelles called glycosomes, which represent one of the main differences between parasite and host. Glycosomes compartmentalize enzymes involved in the glycolytic pathway, in the β -oxidation of fatty acids, and also participate in cellular antioxidant processes. Iron-dependent superoxide dismutases (FeSOD) are particularly important enzymes due to their role in protecting the parasite against free radicals resulting from NADPH oxidase activation, and *Leishmania* glycosomes compartmentalize the B isoforms of superoxide dismutases (SODB1/2) that use exclusively iron as a cofactor. Several failed attempts to generate FeSODB knockouts showed that this isoform is essential for the survival of *Leishmania*, indicating that the transport of iron to the glycosome, not explored so far, is also an interesting target for identification and study. Therefore, the objective of this work is to identify and begin the characterization of genes potentially involved in iron

transport to the *Leishmania* glycosome. From the *in silico* analysis of 576 *L. amazonensis* transcripts significantly modulated by iron deprivation, we searched for genes that contained predicted transmembrane domains and glycosomal targeting signals (PTS1 and/or PTS2). Among 11 genes found, we started the characterization of the 5 that have 3 or more predicted transmembrane domains, they are: LmxM.04.1030, LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 and LmxM.30.0020. For this, we cloned the ORFs of these 5 genes in the *Leishmania* expression vectors pXG-GFP+ and pXG-GFP2+, for fusion of the target genes to the coding sequence of the fluorescent protein EGFP. The obtained constructs were transfected into *L. amazonensis* promastigotes. We selected several clones and confirmed the overexpression of target genes by qPCR. We evaluated the localization of the target proteins fused to EGFP in immunofluorescence assays and with that we showed the colocalization of the proteins encoded by LmxM.24.1090 and LmxM.30.0020 fused to EGFP with the glycosomal arginase protein. We performed assays to evaluate the *in vitro* replication of selected overexpressing promastigotes, and our results indicate that the lines overexpressing LmxM.04.1030, LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 and LmxM.30.0020 grow slower than the wild type. Furthermore, we investigated whether the overexpression of target genes differentially modulates the expression of genes previously related to iron transport and metabolism, and to other glycosomal metabolic pathways. Our results revealed the gene expression induction of arginase and arginine transporter AAP3 5.1 in the overexpressing strains of LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 and LmxM.30.0020. Thus, our results indicate that the genes LmxM.24.1090 and LmxM.30.0020 are potentially involved in glycosomal iron metabolism. The construction and characterization of knockout parasites of these genes will allow the characterization of their molecular functions, contributing to the elucidation of the mechanisms involved in the transport and metabolism of iron in the *Leishmania* glycosome.

1. Introdução

1.1. Leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania*, classificados na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, são os agentes etiológicos das doenças conhecidas como leishmanioses. Essas patologias são consideradas antropozoonoses muito importantes na saúde pública por apresentar um amplo espectro clínico e epidemiologia diversa (Hong, Zampieri et al. 2020).

Os sintomas da doença variam de pequenas lesões cutâneas de cura espontânea, passando por lesões destrutivas nos casos de leishmaniose mucocutânea, até casos de leishmaniose visceral que, quando não tratados, podem levar a morte. Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 12 milhões de pessoas são acometidas pela patologia em 98 países da África, Ásia, América e Europa. Anualmente são reportados de 700.000 a 1 milhão de novos casos e cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas, propensas a serem infectadas (WHO 2021). Esse cenário tem se agravado pelo desmatamento e aproximação de humanos a áreas florestais, que leva à adaptação dos vetores a áreas domiciliares e a urbanização da doença (Shaw 2007).

O controle epidemiológico das leishmanioses possui muitas problemáticas. Os medicamentos atualmente disponíveis para tratamento da doença apresentam diversas limitações, tais como toxicidade, alto custo e desenvolvimento de resistência dos parasitos. Além disso, o alto número de casos de coinfeção com o HIV, e principalmente a ausência de uma vacina eficaz, torna o controle da doença extremamente complexo (Inceboz 2019).

1.2. O ciclo evolutivo de *Leishmania* spp.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos obrigatórios que apresentam ciclo de vida heteroxênico, ou seja, se desenvolvem em dois hospedeiros, um inseto hematófago díptero da família Psychodidae, e um hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado encontra-se a forma amastigota do parasito, que é obrigatoriamente intracelular e reside em células do sistema imune como: neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, seus

hospedeiros celulares preferenciais (Liu and Uzonna 2012). Esses parasitos também podem infectar células não fagocíticas como fibroblastos (Cavalcante-Costa, Costa-Reginaldo et al. 2019). As formas amastigotas possuem morfologia arredondada ou oval, e podem variar o tamanho de 2 a 6 μm de extensão e 1,5 a 3 μm de largura, com um flagelo bastante reduzido. As amastigotas encontram-se nos fagolisossomos dos macrófagos que as fagocitam, onde se multiplicam por divisão binária. Durante o repasto sanguíneo, o inseto suga junto com o sangue macrófagos periféricos infectados com amastigotas, que quando chegam ao tubo digestivo do inseto liberam as amastigotas que se diferenciam em promastigotas. As formas promastigotas apresentam forma delgada medindo aproximadamente 1,4 μm de largura e 20 μm de comprimento, com um flagelo proeminente bem característico. Essas formas rapidamente se propagam por fissão binária, e quando atingem um grande número, diferenciam-se em formas metacíclicas infectivas, de rápido movimento, corpo pequeno e flagelo alongado. As promastigotas então invadem as porções anteriores do estômago e proventrículo do inseto, e em um próximo repasto sanguíneo, a regurgitação do material aspirado garante a propagação das formas infectivas para um novo hospedeiro vertebrado (Teixeira, Benchimol et al. 2013). As células destruídas pela probóscide do inseto e a saliva inoculada atraem células fagocíticas, entre essas os macrófagos, que fagocitam os parasitos que então se diferenciam em formas amastigotas (Neves 2016, Serafim, Coutinho-Abreu et al. 2021).

1.3. Relação *Leishmania*-hospedeiro

A forma amastigota de *Leishmania* possui a extraordinária capacidade de sobrevivência e replicação dentro dos fagolisossomos de macrófagos, onde conseguem se evadir da resposta humoral, e por isso a resposta imunológica contra *Leishmania* é principalmente celular (Tripathi, Singh et al. 2007). Em geral, a infecção por *Leishmania* leva a uma ativação específica da resposta imunológica, caracterizada pelo aumento de células TCD4⁺ e produção de citocinas específicas. A resistência do hospedeiro ao patógeno é associada com a resposta do tipo Th1, com produção de citocinas como IL-2, IL-12, TNF- α e IFN γ que induzem a ativação dos macrófagos e combate aos parasitos

(Carneiro, Lopes et al. 2020). Já a susceptibilidade do hospedeiro a *Leishmania* é caracterizada por uma resposta do tipo Th2, com produção das citocinas IL-4 e IL-13, e indução da arginase I, resultando na persistência da infecção e manifestação dos sintomas clínicos. Nem sempre essa dicotomia é clara, durante a resposta do tipo Th1, IFN γ induz a produção de óxido nítrico e eliminação do patógeno. Entretanto, no início da infecção, IFN γ é responsável pelo recrutamento de monócitos permissivos que contribuem com a replicação do parasito no hospedeiro (Carneiro, Lopes et al. 2020). Além disso, *Leishmania* desenvolveu diversos mecanismos de evasão às repostas imunes do hospedeiro vertebrado, tais como o “burst oxidativo” induzido pela ativação da NADPH oxidase e a acidificação de vesículas pela ativação de próton-ATPases (Rossi and Fasel 2018).

Recentemente a ativação de um complexo multiproteico de sinalização, denominado inflamassoma, foi descrita como um fator crítico na defesa do hospedeiro contra *Leishmania* (Lima-Junior, Costa et al. 2013). Neste estudo foi demonstrado que Nlrp3, um receptor associado com a ativação do inflamassoma e produção de IL-1 β , está relacionado com a restrição da replicação de *Leishmania* (Lima-Junior, Costa et al. 2013). Em contrapartida, *Leishmania* desenvolveu mecanismos para inibir a maturação de IL-1 β , limitando a ativação do complexo e silenciando a resposta inflamatória (de Carvalho and Zamboni 2020).

1.4. A importância do ferro para a infecção por *Leishmania*

O interior dos fagolisossomos é um ambiente hostil a diversos patógenos. Além do pH ácido, uma das condições críticas encontrada por *Leishmania* no macrófago é a carência de nutrientes. Entretanto o parasito é capaz de capturar do hospedeiro diversos nutrientes essenciais para replicação, como o ferro, que pode ser tomado na forma inorgânica ou associado ao heme (Laranjeira-Silva, Hamza et al. 2020).

Uma das primeiras evidências de que os protozoários do gênero *Leishmania* dependem de ferro para sobrevivência e replicação no meio intracelular foi a identificação do transportador Nramp1 (Vidal, Tremblay et al. 1995). Nramp1 está localizado na membrana de endossomos e lisossomos de

macrófagos, e é responsável por transferir Fe^{+2} para o citoplasma da célula hospedeira, com isso os parasitos precisam competir com o hospedeiro pelo ferro endocitado (Banerjee and Datta 2020). O nocaute de *Nramp1* aumenta a susceptibilidade de camundongos a patógenos intracelulares como *Salmonella* spp., *Mycobacterium* spp. e *Leishmania* spp. (Vidal, Tremblay et al. 1995, Blackwell, Goswami et al. 2001).

Em *Leishmania*, foi demonstrado que a enzima redutase férrica LFR1 (*Leishmania* ferric reductase 1) é responsável por converter a forma insolúvel do ferro (Fe^{3+}) na forma solúvel (Fe^{2+}), que pode ser translocada para o citoplasma pelo transportador de ferro LIT1 (*Leishmania* iron transporter 1) (Huynh, Sacks et al. 2006, Flannery, Huynh et al. 2011). Paralelamente, outros estudos identificaram a proteína LABCG5, responsável pelo transporte de heme derivado da degradação da hemoglobina do lisossomo para o citosol, e a proteína transmembrana LHR1 (*Leishmania* Heme Response 1), responsável pela captação de heme pelos parasitos (Campos-Salinas, Cabello-Donayre et al. 2011, Huynh, Yuan et al. 2012). Recentemente, também foi identificado o transportador de heme LFLVCRb, localizado na membrana plasmática de *Leishmania*, e assim como LHR1, associado à tomada de heme pelo parasito (Cabello-Donayre, Orrego et al. 2020).

Apesar da importância do ferro como cofator em diversos processos celulares, o acúmulo de ferro no citoplasma pode ser tóxico em concentrações elevadas, por isso a absorção de ferro deve ser muito bem regulada com o armazenamento e/ou exportação, evitando a geração de radicais hidroxila na presença de oxigênio pela reação de Fenton (Dixon and Stockwell 2014). Nesse sentido, a identificação do transportador de ferro LIR1 (*Leishmania* Iron Regulator 1) revelou um mecanismo relacionado com a exportação de ferro pela membrana plasmática, protegendo os parasitos contra concentrações elevadas do metal (Laranjeira-Silva, Wang et al. 2018). Por outro lado, a escassez de ferro intracelular também é prejudicial aos parasitos, com implicações importantes na atividade das superóxidos dismutases dependentes de ferro (FeSODs), responsáveis pela conversão de O^{2-} em H_2O_2 . As isoformas B, glicosomais, das FeSODs (SODB1 e SODB2) e a isoforma A, mitocondrial, das FeSODs (SODA) estão relacionadas à diferenciação de promastigotas em

amastigotas, sendo essenciais na manutenção do ciclo de vida do parasito (Mitra and Andrews 2013, Davenport, Martin et al. 2018). Além da SODA, a mitocôndria compartimentaliza diversas outras enzimas dependentes de ferro (Fidalgo and Gille 2011, Mitra, Laranjeira-Silva et al. 2017). Logo, a importância do ferro para atividade mitocondrial levou à identificação e caracterização da proteína transmembrana LMIT1 (*Leishmania* Mitochondrial Iron Transporter 1), responsável pelo transporte de ferro para o interior da organela (Mitra, Laranjeira-Silva et al. 2016) (Fig.1). Notavelmente, todas essas proteínas associadas ao transporte e metabolismo de ferro e heme em *Leishmania* podem ser consideradas fatores de virulência, dada a importância delas no estabelecimento e progressão da infecção (Laranjeira-Silva, Hamza et al. 2020).

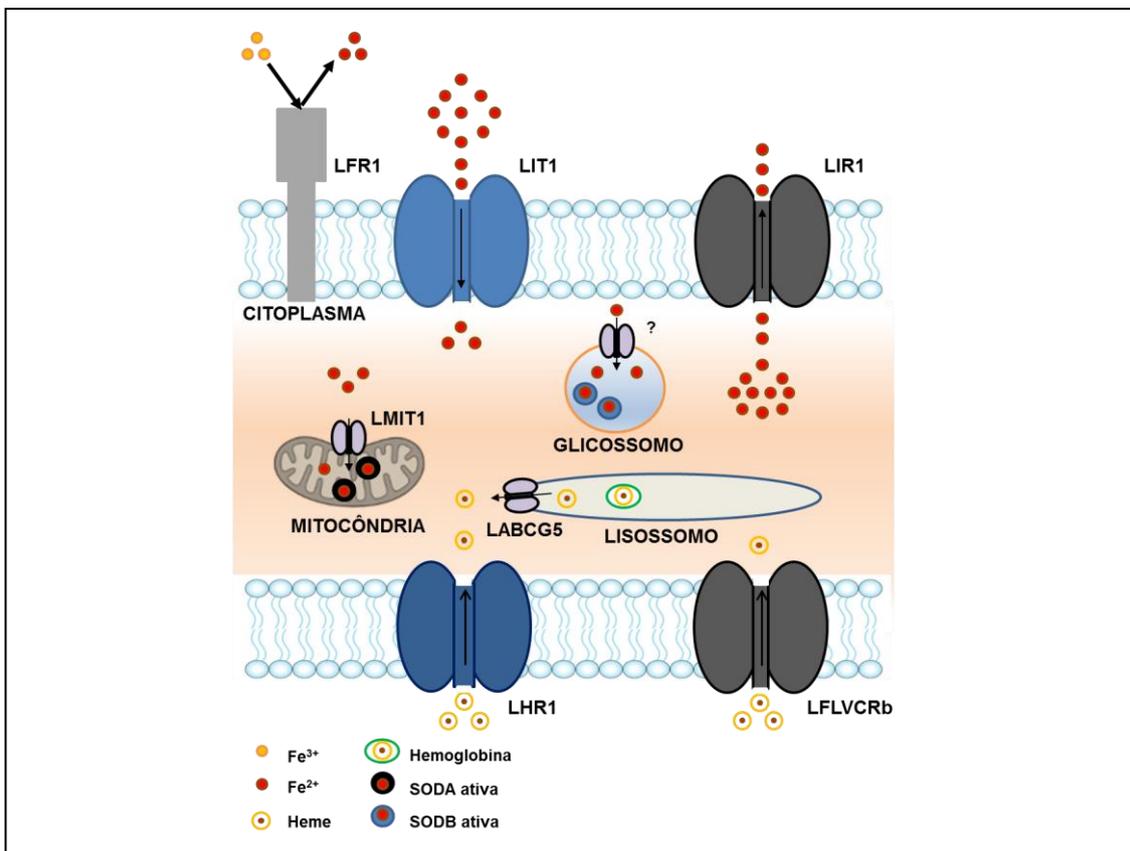


Figura 1. Representação esquemática das principais vias de aquisição e metabolismo de ferro em *Leishmania*. A enzima LFR1 reduz Fe^{3+} a Fe^{2+} e o transportador LIT1 transloca o Fe^{2+} para o citosol. Na mitocôndria o transportador LMIT1 transporta o Fe^{2+} para o interior da organela. O ferro associado à heme pode ser obtido através de duas formas distintas. A hemoglobina nos lisossomos é degradada liberando heme que é então translocado para o citosol através do transportador LABCG5. O heme também pode ser internalizado diretamente através dos transportadores LHR1 e LFLVCRb. No interior da mitocôndria e dos glicosomos as SODs utilizam Fe^{2+} como cofator. O equilíbrio intracelular da concentração de ferro é mantido pelo transportador LIR1 que retira o excesso de ferro do citoplasma evitando a toxicidade pela reação de Fenton.

1.5. Glicossomos: evolução, estrutura e mecanismos envolvidos na importação de proteínas

Os glicossomos são organelas exclusivas dos organismos pertencentes a classe dos kinetoplastídeos que inclui parasitos obrigatórios, como: *Leishmania* spp., *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Essas organelas representam uma das principais diferenças entre parasito e hospedeiro, e portanto são importantes alvo para estudo (Crowe and Morris 2021). Antes de terem suas funções atribuídas, os glicossomos foram denominados microcorpos, nome que era dado a qualquer estrutura desprovida de ácido nucleico com função desconhecida. Essas estruturas foram descritas pela primeira vez em *Trypanosoma brucei* (Opperdoes and Borst 1977), e anos depois em *Leishmania* (Hart and Opperdoes 1984). Os glicossomos são organelas globulares, delimitadas por uma bicamada fosfolipídica e apresentam morfologia semelhante aos peroxissomos de outros organismos. A relação entre as duas organelas foi confirmada em estudos sobre a origem evolutiva dos glicossomos, que estabeleceram a relação com uma organela ancestral relacionada aos peroxissomos. Esse estudo também demonstrou que as vias de biogênese dessas estruturas compartilham proteínas ortólogas (Moyersoen, Choe et al. 2004).

O estudo que identificou os glicossomos em *T. brucei* inicialmente descreveu o “sequestro” de enzimas envolvidas nos primeiros passos da glicólise para essas organelas, e mais tarde também foi confirmado o envolvimento dos glicossomos no metabolismo de ácidos graxos e em outras importantes vias metabólicas (Haanstra, González-Marciano et al. 2016). Estudos de evolução molecular confirmaram que o tráfego de proteínas com os sinais peroxissomais (peroxisome targeting signal - PTS), do tipo PTS1 ou PTS2 (Hasan, Platta et al. 2013), é conservado nas proteínas glicossomais (Smith and Parsons 1996, Gualdrón-López, Brennand et al. 2012). A maior parte das proteínas peroxissomais já caracterizadas apresentam o sinal de endereçamento PTS1 na terminação carboxi, e esse sinal consiste em 3 aminoácidos – SKL – ou uma variação conservada. Algumas proteínas apresentam o sinal PTS2 na terminação amino, um sinal bipartido com a

sequência consenso [RK]-[LVI]-x5-[HQ]-[LA], mas também existem proteínas que não possuem esses peptídeos sinais (Oppendoes and Szikora 2006).

A composição proteica dos glicossomos varia bastante entre os kinetoplastídeos, e também em resposta às mudanças ambientais (Bauer, Morris et al. 2013, Bauer, Conlon et al. 2014). Proteínas chamadas peroxinas (PEX) são responsáveis por regular a homeostase dos glicossomos e estão envolvidas em diversos processos, desde a formação da organela e importação de proteínas, até a proliferação por fissão e autofagia dessas estruturas quando perdem a função (Crowe and Morris 2021). Os kinetoplastídeos possuem um complexo de importação de proteínas glicossomais com algumas características exclusivas, como a perda do domínio SH3, responsável pela interação entre PEX13 e PEX14 em outros organismos. Além disso, esses organismos possuem duas peroxinas 13, PEX13.1 e PEX13.2, ambas localizadas na membrana dos glicossomos (Verplaetse, Rigden et al. 2009). Essas isoformas de PEX13 interagem entre si e com PEX14 formando complexos essenciais para a importação das proteínas glicossomais (Schell-Steven, Stein et al. 2005). A duplicação de PEX13 parece ter ocorrido por eventos de divergência, mas estudos em *T. brucei* mostraram que ambas isoformas são essenciais para o direcionamento correto de proteínas glicossomais nesses parasitos (Verplaetse, Rigden et al. 2009, Crowe, Wilkinson et al. 2020).

A importação de proteínas glicossomais com os peptídeos sinais PTS1 ou PTS2 se inicia com a ligação das proteínas aos receptores PEX5 e PEX7, respectivamente. Os complexos formados transportam essas proteínas até a membrana glicossomal onde interagem com os domínios ricos em Tirosina e Glicina (YG) das proteínas PEX13.1 e PEX13.2 (Fig. 2). Esta interação forma um poro transitório na membrana da organela e permite a importação dessas proteínas para o lúmen do glicossomo (Crowe and Morris 2021).

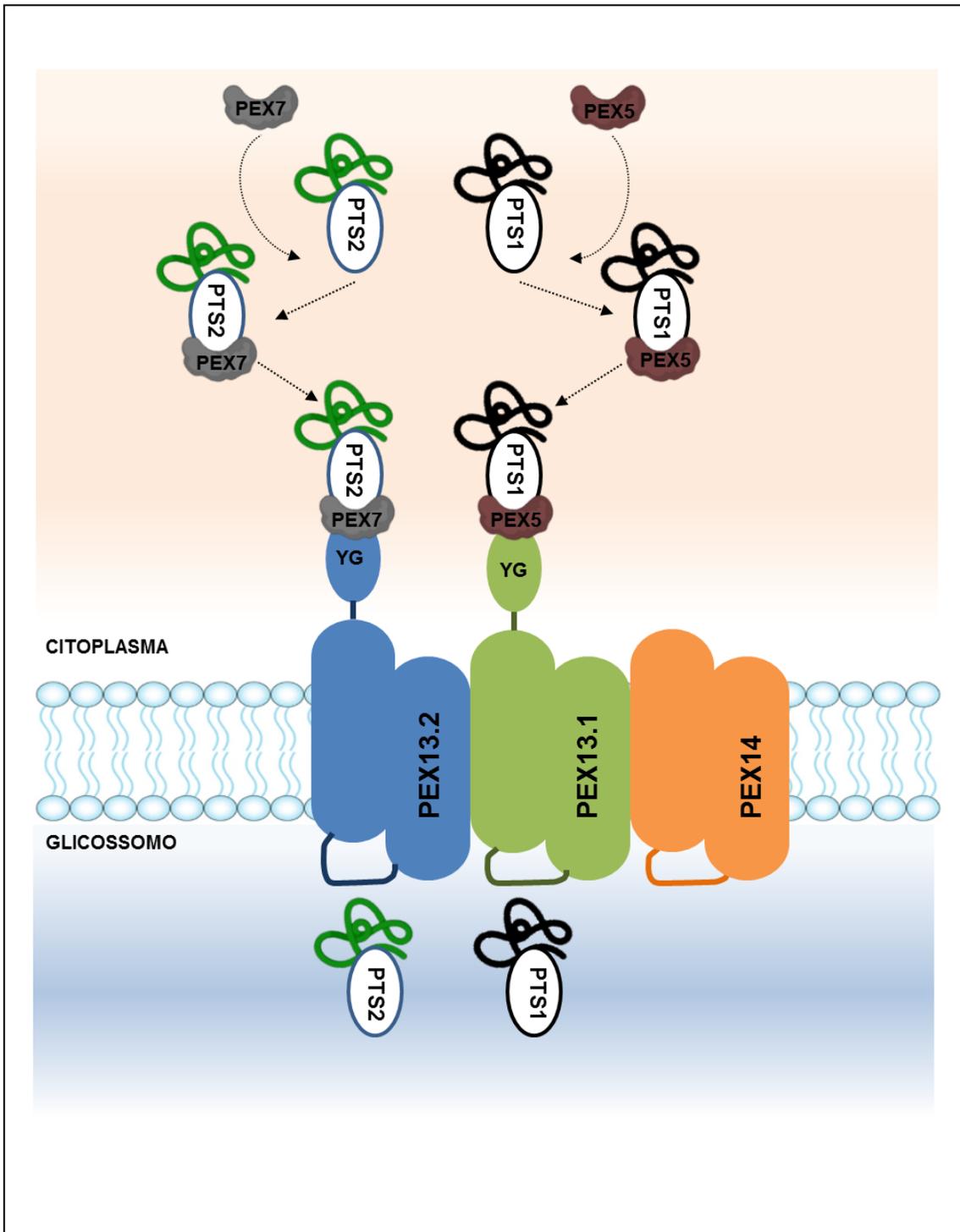


Figura 2. Representação esquemática da importação de proteínas com sinais PTS1 ou PTS2. No citosol as proteínas glicossomais contendo sinais de endereçamento PTS1 ou PTS2 são reconhecidas pelos seus receptores respectivos, as peroxinas PEX5 e PEX7. Essas peroxinas transportam suas “cargas” até a membrana dos glicossomos onde interagem com PEX13.1, PEX13.2 e PEX14, ligando-se a domínios ricos em YG. A interação faz com que se formem poros transientes pelos quais as proteínas alcançam o interior dos glicossomos.

5. Conclusões

- Identificamos 11 genes modulados pela depleção de ferro, contendo domínios transmembrana e sinais de endereçamento para o glicosomo preditos. Dentre esses, selecionamos e iniciamos a caracterização em *L. amazonensis* dos 5 genes que continham 3 ou mais domínios transmembrana, são eles: LmxM.04.1030, LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020.
- Construímos vetores para superexpressão dos genes LmxM.04.1030, LmxM.14.0540, LmxM.22.0580, LmxM.24.1090 e LmxM.30.0020 fundidos à EGFP nas terminações amino e carboxi.
- Obtivemos linhagens de *L. amazonensis* superexpressoras dos genes selecionados, que foram analisadas fenotipicamente quanto à: expressão gênica, endereçamento proteico, replicação *in vitro*:
 - ❖ Superexpressores de LmxM.04.1030 (proteína hipotética COPI):
 - replicação *in vitro* inibida – concentração de células menor na fase logarítmica (fusão N- e C-terminal) e estacionária (fusão N-terminal);
 - localização proteica difusa no citoplasma;
 - indução da expressão de *AAP3 5.1* (fusão C-terminal).
 - ❖ Superexpressores de LmxM.14.0540 (proteína hipotética transpotadora de íons):
 - replicação *in vitro* inibida – concentração de células menor na fase logarítmica (fusão N- e C-terminal);
 - localização proteica compartimentalizada, possivelmente mitocondrial;
 - indução da expressão de *AAP3* e de *arginase* (fusão N- e C-terminal), e inibição da expressão de *LIT1* (fusão C-terminal).
 - ❖ Superexpressores de LmxM.22.0580 (proteína hipotética Rer1):

- replicação *in vitro* induzida – concentração de células maior na fase estacionária (fusão C-terminal);
 - replicação *in vitro* inibida – concentração de células menor nas fases logarítmica e estacionária (fusão N-terminal);
 - localização proteica difusa no citoplasma dos promastigotas superexpressores (fusão N-terminal)
 - localização proteica compartimentalizada, provavelmente no aparelho de golgi (fusão C-terminal);
 - indução da expressão de *AAP3* e de *arginase* (fusão C- terminal).
- ❖ Superexpressores de LmxM.24.1090 (proteína hipotética multipasso):
- replicação *in vitro* inibida – concentração de células menor na fase logarítmica (fusão N- e C-terminal) e estacionária (fusão C-terminal);
 - localização proteica compartimentalizada glicossomal;
 - indução da expressão de *AAP3* e de *arginase*, e inibição da expressão de *LIT1* (fusão N- terminal).
- ❖ Superexpressores de LmxM.30.0020 (aquaglicerolporina 1):
- só conseguimos selecionar superexpressores com EGFP fundida a terminação amino (fusão N- terminal);
 - replicação *in vitro* inibida – concentração de células menor na fase logarítmica;
 - localização proteica compartimentalizada glicossomal;
 - indução da expressão de *AAP3* e de *arginase*.

7. Referências

- Altschul, S. F., et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-410.
- Aoki, J. I., et al. (2017). "L-arginine availability and arginase activity: Characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*." PLoS Negl Trop Dis **11**(10): e0006025.
- Arppe, R., et al. (2017). "Investigating dye performance and crosstalk in fluorescence enabled bioimaging using a model system." PLoS One **12**(11): e0188359.
- Aslett, M., et al. (2010). "TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D457-462.
- Banerjee, S. and R. Datta (2020). "Leishmania infection triggers hepcidin-mediated proteasomal degradation of Nramp1 to increase phagolysosomal iron availability." Cell Microbiol **22**(12): e13253.
- Bauer, S., et al. (2014). "Using fluorescent proteins to monitor glycosome dynamics in the African trypanosome." J Vis Exp(90): e51647.
- Bauer, S., et al. (2013). "Environmentally regulated glycosome protein composition in the African trypanosome." Eukaryot Cell **12**(8): 1072-1079.
- Beck, R., et al. (2009). "The COPI system: molecular mechanisms and function." FEBS Lett **583**(17): 2701-2709.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Blackwell, J. M., et al. (2001). "SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance." Cell Microbiol **3**(12): 773-784.
- Cabello-Donayre, M., et al. (2020). "Leishmania heme uptake involves LmFLVCRb, a novel porphyrin transporter essential for the parasite." Cell Mol Life Sci **77**(9): 1827-1845.

Campos-Salinas, J., et al. (2011). "A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*." Mol Microbiol **79**(6): 1430-1444.

Carneiro, M. B., et al. (2020). "Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir." Cell Host Microbe **27**(5): 752-768.e757.

Castilho-Martins, E. A., et al. (2011). "Axenic *Leishmania amazonensis* promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes." PLoS One **6**(11): e27818.

Cavalcante-Costa, V. S., et al. (2019). "hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts." J Cell Sci **132**(6).

Chadha, S., et al. (2018). "Genetic manipulation of *Leishmania donovani* threonyl tRNA synthetase facilitates its exploration as a potential therapeutic target." PLoS Negl Trop Dis **12**(6): e0006575.

Chalfie, M., et al. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.

Choe, S. (2002). "Potassium channel structures." Nat Rev Neurosci **3**(2): 115-121.

Crowe, L. P. and M. T. Morris (2021). "Glycosome heterogeneity in kinetoplastids." Biochem Soc Trans **49**(1): 29-39.

Crowe, L. P., et al. (2020). "*Trypanosoma brucei* Pex13.2 Is an Accessory Peroxin That Functions in the Import of Peroxisome Targeting Sequence Type 2 Proteins and Localizes to Subdomains of the Glycosome." mSphere **5**(1).

da Silva, E. R., et al. (2008). "Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and subcellular localization of native enzyme." Mol Biochem Parasitol **159**(2): 104-111.

da Silva, M. F., et al. (2012). "*Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity." PLoS One **7**(3): e34022.

Davenport, B. J., et al. (2018). "SODB1 is essential for Leishmania major infection of macrophages and pathogenesis in mice." PLoS Negl Trop Dis **12**(10): e0006921.

de Carvalho, R. V. H. and D. S. Zamboni (2020). "Inflammasome Activation in Response to Intracellular Protozoan Parasites." Trends Parasitol **36**(5): 459-472.

de Castro, E., et al. (2006). "ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins." Nucleic Acids Res **34**(Web Server issue): W362-365.

Dixon, S. J. and B. R. Stockwell (2014). "The role of iron and reactive oxygen species in cell death." Nat Chem Biol **10**(1): 9-17.

Dower, W. J., et al. (1988). "High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-6145.

Fidalgo, L. M. and L. Gille (2011). "Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs." Pharm Res **28**(11): 2758-2770.

Figarella, K., et al. (2007). "Biochemical characterization of Leishmania major aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis." Mol Microbiol **65**(4): 1006-1017.

Flannery, A. R., et al. (2011). "LFR1 ferric iron reductase of Leishmania amazonensis is essential for the generation of infective parasite forms." J Biol Chem **286**(26): 23266-23279.

Forsberg, A. J., et al. (1994). "Use of transcriptional fusions to monitor gene expression: a cautionary tale." J Bacteriol **176**(7): 2128-2132.

Gualdrón-López, M., et al. (2012). "When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle." Int J Parasitol **42**(1): 1-20.

Ha, D. S., et al. (1996). "Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania." Mol Biochem Parasitol **77**(1): 57-64.

Haanstra, J. R., et al. (2016). "Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites." Biochim Biophys Acta **1863**(5): 1038-1048.

Hart, D. T. and F. R. Opperdoes (1984). "The occurrence of glycosomes (microbodies) in the promastigote stage of four major Leishmania species." Mol Biochem Parasitol **13**(2): 159-172.

Hasan, S., et al. (2013). "Import of proteins into the peroxisomal matrix." Front Physiol **4**: 261.

Hong, A., et al. (2020). "One Health Approach to Leishmaniases: Understanding the Disease Dynamics through Diagnostic Tools." Pathogens **9**(10).

Huynh, C., et al. (2006). "A Leishmania amazonensis ZIP family iron transporter is essential for parasite replication within macrophage phagolysosomes." J Exp Med **203**(10): 2363-2375.

Huynh, C., et al. (2012). "Heme uptake by Leishmania amazonensis is mediated by the transmembrane protein LHR1." PLoS Pathog **8**(7): e1002795.

Inceboz, T. (2019). Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis, IntechOpen.

Jack, D. L., et al. (2001). "The drug/metabolite transporter superfamily." Eur J Biochem **268**(13): 3620-3639.

Kearse, M., et al. (2012). "Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data." Bioinformatics **28**(12): 1647-1649.

Kelley, L. A., et al. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis." Nat Protoc **10**(6): 845-858.

Laranjeira-Silva, M. F., et al. (2020). "Iron and Heme Metabolism at the Leishmania-Host Interface." Trends Parasitol **36**(3): 279-289.

Laranjeira-Silva, M. F., et al. (2018). "A MFS-like plasma membrane transporter required for Leishmania virulence protects the parasites from iron toxicity." PLoS Pathog **14**(6): e1007140.

Lima-Junior, D. S., et al. (2013). "Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania." Nat Med **19**(7): 909-915.

- Liu, D. and J. E. Uzonna (2012). "The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response." Front Cell Infect Microbiol **2**: 83.
- Lu, S., et al. (2020). "CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020." Nucleic Acids Res **48**(D1): D265-D268.
- Marquis, N., et al. (2005). "Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania." Mol Microbiol **57**(6): 1690-1699.
- Meyer, T., et al. (2007). "Green fluorescent protein-tagging reduces the nucleocytoplasmic shuttling specifically of unphosphorylated STAT1." FEBS J **274**(3): 815-826.
- Miller, S. A., et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
- Mitra, B. and N. W. Andrews (2013). "IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in Leishmania differentiation." Trends Parasitol **29**(10): 489-496.
- Mitra, B., et al. (2013). "Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels." J Exp Med **210**(2): 401-416.
- Mitra, B., et al. (2017). "The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes." J Biol Chem **292**(29): 12324-12338.
- Mitra, B., et al. (2016). "A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for Leishmania amazonensis Virulence." PLoS Pathog **12**(1): e1005340.
- Moyersoen, J., et al. (2004). "Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target." FEMS Microbiol Rev **28**(5): 603-643.
- Mullis, K., et al. (1992). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986." Biotechnology **24**: 17-27.
- Neves, D. P. (2016). Parasitologia humana. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu.
- Opperdoes, F. R. and P. Borst (1977). "Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in Trypanosoma brucei: the glycosome." FEBS Lett **80**(2): 360-364.

Opperdoes, F. R. and J. P. Szikora (2006). "In silico prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes." Mol Biochem Parasitol **147**(2): 193-206.

Owczarzy, R., et al. (2008). "IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers." Nucleic Acids Res **36**(Web Server issue): W163-169.

Paramchuk, W. J., et al. (1997). "Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis." Mol Biochem Parasitol **90**(1): 203-221.

Robinson, K. A. and S. M. Beverley (2003). "Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*." Mol Biochem Parasitol **128**(2): 217-228.

Rossi, M. and N. Fasel (2018). "How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!" Int Immunol **30**(3): 103-111.

Sahin, A., et al. (2008). "The *Leishmania* ARL-1 and Golgi traffic." PLoS One **3**(2): e1620.

Sansom, F. M., et al. (2014). "Golgi-located NTPDase1 of *Leishmania major* is required for lipophosphoglycan elongation and normal lesion development whereas secreted NTPDase2 is dispensable for virulence." PLoS Negl Trop Dis **8**(12): e3402.

Sato, K., et al. (1997). "Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9693-9698.

Sato, M., et al. (2004). "Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi." Mol Biol Cell **15**(3): 1417-1424.

Schell-Steven, A., et al. (2005). "Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import." Mol Cell Biol **25**(8): 3007-3018.

Serafim, T. D., et al. (2021). "Leishmaniasis: the act of transmission." Trends Parasitol **37**(11): 976-987.

Shaw, J. (2007). "The leishmaniases--survival and expansion in a changing world. A mini-review." Mem Inst Oswaldo Cruz **102**(5): 541-547.

Singh, A., et al. (2006). "Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **281**(19): 13355-13364.

Smith, D. F. and M. Parsons (1996). Molecular biology of parasitic protozoa. Oxford, IRL Press at Oxford University Press.

Teixeira, D. E., et al. (2013). "The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations." PLoS Pathog **9**(10): e1003594.

Tripathi, P., et al. (2007). "Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm." FEMS Immunol Med Microbiol **51**(2): 229-242.

Verplaetse, E., et al. (2009). "Identification, characterization and essentiality of the unusual peroxin 13 from *Trypanosoma brucei*." Biochim Biophys Acta **1793**(3): 516-527.

Vidal, S., et al. (1995). "The *lty/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene." J Exp Med **182**(3): 655-666.

WHO (2021). "Leishmaniasis fact sheet." Retrieved 13 Nov, 2021.

Zhang, K., et al. (2003). "Limitation in use of heterologous reporter genes for gene promoter analysis. Silencer activity associated with the cloramphenicol acetyltransferase reporter gene." J Biol Chem **278**(7): 4826-4830.