

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE POLIFOSFATOS E INOSITOL
POLIFOSFATOS DURANTE A PROLIFERAÇÃO CELULAR
CARCINOGENICA E EM LEVEDURAS-MODELO**

SELY DANIELI DE ALMEIDA AZEVEDO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2023**

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE POLIFOSFATOS E INOSITOL
POLIFOSFATOS DURANTE A PROLIFERAÇÃO CELULAR
CARCINOGENICA E EM LEVEDURAS-MODELO**

SELY DANIELI DE ALMEIDA AZEVEDO

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”.

Orientadora: Dra. Anna Lvovna Okorokova-Façanha
Coorientador: Dr. Arnaldo Rocha Façanha

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
ABRIL – 2023

**REPROGRAMAÇÃO METABÓLICA DE POLIFOSFATOS E INOSITOL
POLIFOSFATOS DURANTE A PROLIFERAÇÃO CELULAR
CARCINOGENÉTICA E EM LEVEDURAS-MODELO**

SELY DANIELI DE ALMEIDA AZEVEDO

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 28 de abril de 2023

Comissão Examinadora:

Dr. Andre Lacerda de Abreu Oliveira
(D.Sc., Medicina- Cirurgia Geral) - CCTA-UENF

Dra. Arícia Leone Evangelista Monteiro de Assis
(D.Sc. Biotecnologia) –CBB - UENF

Dra. Giovana Costa
(D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – CBB - UENF

Dra. Anna Lvovna Okorokova-Façanha
(D.Sc., Química Biológica) - CBB-UENF
Orientadora

Dr. Arnaldo Rocha Façanha
(D.Sc., Química Biológica) –CBB – UENF
Coorientador

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”.

(Leonardo da Vinci)

Dedico este trabalho a toda minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida que me concedeste e por me sustentar a cada dia, me dando forças para que eu não desistisse desse sonho em me tornar mestre.

Agradeço aos meus pais Ana *in memoriam* e Moacyr *in memoriam* porque, mesmo não estando mais entre nós, sei que estavam sempre olhando por mim com olhar de cuidado e amor, me fortificando, me levando a acreditar que eu conseguiria.

A minha irmã Simone e meus sobrinhos Ana Caroline, Rafael e Gabriel por estarem sempre comigo nas horas que sempre precisei.

Ao meu esposo Márcio pela paciência, compreensão e parceira em todos os momentos.

A doutoranda Lívia, que teve um papel muito importante na minha caminhada, me ajudando muito.

Aos doutores Antônio, Arícia e Gil pelos ensinamentos.

A minha orientadora, professora doutora Anna e meu coorientador, professor doutor Arnoldo pela oportunidade, por todos os ensinamentos e orientação.

Aos meus colegas de grupo tanto do LFBM como do LBCT, que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho.

A todos os professores e funcionários do LFBM que contribuíram com auxílio, apoio e colaboração e pelo ótimo convívio.

Aos membros da banca.

A todos os funcionários do CBB e da UENF por todo suporte.

A UENF/FAPERJ pela concessão da bolsa de mestrado, tornando possível a realização dessa dissertação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Polifosfato inorgânico.....	13
1.2 Síntese de polifosfato.....	15
1.3 V-ATPase.....	18
1.4 Polifosfato de inositol e pirofosfato de inositol.....	20
1.5 Calcineurina.....	25
1.6 Proliferação de células tumorais.....	27
1.7 Leveduras-modelo.....	30
2. OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3.MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Microorganismos.....	33
3.2 Cultivo das células.....	33
3.3 Preparo das células e extração de polifosfatos.....	33
3.4 Determinação de fosfato inorgânico (Pi).....	34
3.5 Identificação de genes e análise de expressão gênica.....	34
3.6 Análise de redes de interação gênica e proteína-proteína.....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Genes codificantes para enzimas da biossíntese de polifosfatos de inositol.....	37
4.2 Localização intracelular das enzimas da biossíntese de polifosfatos de inositol...37	
4.3 Análise da expressão tecidual dos genes envolvidos no metabolismo de polifosfatos de inositol.....	39
4.4 Análise da expressão dos genes envolvidos na biossíntese do polifosfato e pirofosfato de inositol em diferentes tipos tumorais.....	50
4.5 Expressão diferencial dos genes do metabolismo de inositol fosfatos em glioblastoma multiforme e carcinoma cromóforo de células renais.....	70
4.6 Rede de interação entre a V-ATPase enzimas e metabolismo de inositol polifosfatos.....	71
4.7 Rede de interação entre os genes da V-ATPase com os genes do metabolismo de inositol fosfatos e os genes da família de calcineurina.....	72
4.8 Determinação dos níveis de polifosfato em células selvagens e mutantes deficientes de calcineurina em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
5. CONCLUSÕES	76
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACC	carcinoma adrenocortical
AKT	gene codificante para proteína quinase Akt
ATP6V0A3	gene codificante da subunidade a3 da V-ATPase
ATP6V0B	gene codificante da subunidade b da V-ATPase
ATP6V0C	gene codificante da subunidade c da V-ATPase
ATP6V0D1	gene codificante da subunidade d1 da V-ATPase
ATP6V0E2	gene codificante da subunidade e2 da V-ATPase
ATP6V1A	gene codificante da subunidade A da V-ATPase
ATP6V1B1	gene codificante da subunidade B1 da V-ATPase
ATP6V1C2	gene codificante da subunidade C2 da V-ATPase
ATP6V1D	gene codificante subunidade D da V-ATPase
ATP6V1E2	gene codificante subunidade E2 da V-ATPase
ATP6V1F	gene codificante subunidade F da V-ATPase
ATP6V1G1	gene codificante da subunidade G1 da V-ATPase
ATP6V1H	gene codificante da subunidade H da V-ATPase
BLCA	câncer de bexiga, carcinoma urotelial
CABIN1	proteína 1 de ligação à calcineurina (inibidor)
CALM1	calmodulina 1
CALM2	calmodulina 2
CECSC	carcinoma de células escamosas cervicais, câncer do colo de utero
CHOL	colangiocarcinoma, câncer do duto biliar
COAD	adenocarcinoma de cólon
DLBC	linfoma difuso de grandes células B
ESCA	carcinoma esofágico
FKBP1A	proteína de ligação FK506 1A
GBM	glioblastoma multiforme (um tipo de tumor cerebral)
INPP5J	inositol polifosfato-5-fosfatase J
IP6K1	inositol hexaquisfosfato 1-quinase
IP6K2	inositol hexaquisfosfato 2-quinase
IP6K3	inositol hexaquisfosfato 3-quinase
IPMK	inositol fosfato multiquinase
IPPK	inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinas

ITPK1	inositol-tetraquisfosfato 1-quinase
ITPKA	inositol-trifosfato-3- quinase A
ITPKB	inositol trifosfato 3 quinase B
ITPKC	inositol trifosfato 3 quinase C
KICH	carcinoma cromóforo de células renais
KIRC	carcinoma de células renais claras
KIRP	carcinoma papilar de células renais
LAML	leucemia mielóide aguda
LAMTOR2	adaptador de endossomo/lisossomo tardio, ativador 2 de MAPK e MTOR
LGG	glioma de baixo grau, câncer de cérebro
LIHC	carcinoma hepatocelular
LUAD	adenocarcinoma de pulmão
MTOR	kinase alvo de rapamicina, mammalian target of rapamycin
NFATC1	fator nuclear 1 de células T ativadas
OV	carcinoma de ovário
PAAD	adenocarcinoma pancreático
PCPG	feocromocitoma e paraganglioma
Pi	fosfato inorgânico
PolyP, poliP	polifosfatos
PPIA	proteína de ligação à ciclosporina A
PPIP5K1	difosfoinositol pentaquisfosfato 1-quinase
PPIP5K2	difosfoinositol pentaquisfosfato 2-quinase
PPP3CA	proteína fosfatase 3 subunidade catalítica alfa
PPP3R1	proteína fosfatase 3 subunidade regulatória B, alfa
PPP3R2	proteína fosfatase 3 subunidade regulatória B, beta
PRAD	adenocarcinoma de próstata
RCAN1	regulador de calcineurina 1
RCAN2	regulador de calcineurina 2
READ	adenocarcinoma de reto
SKCM	melanoma cutâneo, câncer de pele
STAD	adenocarcinoma de estômago
TGCT	câncer testicular de células germinativas

THCA	carcinoma de tireoide
THYM	timoma
TP53	gene codificante para proteína supressora de tumor p53
TPM	transcritos por milhão
V-ATPase	H ⁺ -ATPase do tipo vacuolar
UCEC	carcinoma endometrióide uterino
UCS	carcinossarcoma uterino

RESUMO

Os polifosfatos são moléculas armazenadoras de energia e fosfato presentes em todas as células vivas. Células com alta demanda energética e poder proliferativo, como as neuronais, cardíacas, hepáticas, imunológicas e tumorais, são ricas em polifosfatos. O metabolismo de polifosfatos em células eucarióticas é pouco compreendido, e as enzimas e/ou genes responsáveis pela síntese de polifosfatos não foram identificadas até o presente momento em células de mamíferos, diferentemente das células de levedura onde a síntese de polifosfatos depende da H⁺-V-ATPase, e onde *sensing* de fosfato envolve a sinalização mediada por polifosfatos de inositol. Os polifosfatos de inositol participam de diversos processos celulares incluindo transdução de sinal, regulação de canais de membrana, resposta inflamatória e ativação imune. Em particular, os pirofosfatos de inositol representam eixo adicional entre redes metabólicas e de sinalização. O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão de genes que codificam para as enzimas envolvidas no metabolismo de inositol polifosfatos, em diferentes tipos teciduais e tumorais de humanos, além de identificar a rede de interações genéticas para inositol kinases (IPMK, ITPKA, ITPKB, ITPKC, INPP5J, ITPK1, IP6K1, IP6K2, IP6K3, PPIP5K1, PPIP5K2, IPPK e NUDT3) usando os bancos de dados GEPIA 2, UALCAN, STRING, GENEMANIA, GeneCards e GTEX. Identificamos expressão diferenciada em diversos tumores, como glioblastoma, carcinoma hepatocelular e carcinoma de células escamosas, com destaque para colangiosarcoma. Os dados revelaram co-expressão com algumas subunidades de V-ATPase e interconexão com sinalização mTOR. Os dados estabelecem um eixo integrador da reprogramação bioenergética induzida na tumorigênese associando a expressão dos genes do metabolismo de fosfoinosítídeos com V-ATPase.

ABSTRACT

Polyphosphates are energy and phosphate storage molecules present in all living cells. Polyphosphate metabolism in eukaryotic cells is poorly understood, and the enzymes and/or genes responsible for polyphosphate synthesis have not been identified so far in mammalian cells, unlike yeast cells where polyphosphate synthesis depends on H⁺-V-ATPase, and where phosphate sensing involves phosphoinositide-mediated signaling. Phosphoinositides also participate in several cellular processes including signal transduction, regulation of membrane channels, inflammatory response and immune activation. Inositol pyrophosphates (PP-IPs) are derived from the phosphorylation of myo-inositol, and the most studied PP-IPs in mammals are diphosphoinositol pentakisphosphate (IP7) and bis-diphosphoinositol tetrakisphosphate (IP8), which are synthesized by inositol kinases. The vacuolar chaperone complex (VTC) is responsible for the synthesis and storage of polyP and depends on a proton gradient that is generated thanks to the active transport of type V pumps in the membranes of the vacuoles to V-ATPases. A possible regulator of these transporters is the calcineurin-mediated signaling, which is a phosphatase/threonine protein. The aim of this work was to compare the expression of genes that code for the enzymes involved in the metabolism of inositol polyphosphates and inositol pyrophosphates, in different tissue and tumor types, and identifying the network of genetic interactions for IPMK, ITPKA, ITPKB, ITPKC, INPP5J, ITPK1, IP6K1, IP6K2, IP6K3, PPIP5K1, PPIP5K2, IPPK e NUDT3. Platforms and databases were used GEPIA 2, UALCAN, STRING, GENEMANIA, GeneCards e GTEx. We found differential expression in several tumors, such as glioblastoma, hepatocellular carcinoma and squamous cell carcinoma, with emphasis on cholangiosarcoma. This study contributes to a better understanding of the metabolic interconnection of polyphosphates, phosphoinositides and V-ATPase during reprogramming of energy metabolism in cancer. The data establish an integrative axis of the bioenergetic reprogramming induced in tumorigenesis, associating the expression of genes of phosphoinositide metabolism with V-ATPase.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Polifosfatos inorgânicos

O fosfato inorgânico (Pi) é um nutriente essencial para todos os organismos, sendo usado na biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, além de servir como moeda energética da célula em forma de ATP (Ogawa, *et al.*, 2000; Dick *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2010;). O fosfato pode ser encontrado dentro da célula de três formas diferentes: fosfato livre, conjugados de fosfato de moléculas orgânicas e polímeros de fosfato (Lonetti *et al.*, 2011). Esses polímeros são classificados em dois grupos: os pirofosfatos que são moléculas simples constituídas por dois átomos de fósforo e os polifosfatos com três ou mais fosfatos (Kornberg, *et al.*, 1999).

O controle da homeostase de Pi a nível celular ainda é pouco compreendido. Num situação de escassez de fosfato, a célula pode adquiri-lo do ambiente através de importadores localizados na membrana plasmática, retirá-lo de organelas de armazenamento (acidocalcissomos e vacúolos) ou reciclá-lo de fontes internas, como nucleotídeos e fosfolipídeos. Porém em situação de abundância é necessária uma regulação coordenada e rápida dos sistemas de influxo, efluxo e armazenamento de Pi para que não haja um aumento do mesmo que venha prejudicar a célula (Conrad *et al.*, 2014; Puga *et al.*, 2017; Austin e Mayer, 2020).

Embora o processo de proliferação celular apresente alta demanda de Pi para a replicação de DNA, ele também é produto de todas as hidrólises de nucleotídeos, o que também pode gerar o seu acúmulo no citosol. Este acúmulo pode mudar o equilíbrio das reações e reduzir a energia livre para conduzir as reações metabólicas, por isso as células devem se proteger contra o seu excesso no citosol e manter a sua homeostase (Austin e Mayer, 2020).

Para que esse acúmulo não ocorra, o Pi em excesso é armazenado na forma de polifosfato (polyP) no lúmen de compartimentos de armazenamento (onde as polifosfatases também estão localizadas) como em vacúolos em células fúngicas ou vegetais e em acidocalcissomas em protozoários. Nos fungos e plantas essas organelas têm funções similares as dos lisossomos em células animais. Elas são organelas dinâmicas, que apresentam pH ácido e seu funcionamento é induzido durante autofagia e carência nutricional, participando do controle da homeostase de

pH celular, do armazenamento de cátions/metais e de aminoácidos básicos (arginina, lisina) (Wang *et al.*, 2003; Austin e Mayer, 2020).

Os polyP são polímeros lineares aniônicos de centenas de resíduos de fosfato, unidos pelas ligações fosfoanídrido de alta energia (Austin e Mayer, 2020), onde cada átomo de fósforo é ligado ao vizinho através de dois átomos de oxigênio (Fig. 1) (Harold, 1966). Eles são ubíquos e abundantes na natureza, sendo encontrados em todas as células de bactérias, fungos, protozoários, vegetais e animais (Austin e Mayer, 2020).

Os polyP, são divididos em dois grupos: os de cadeia curta que são formados por até três resíduos de ortofosfatos (Fig. 2A) e os de cadeia longa formados com mais de três resíduos de ortofosfatos (Fig. 2B) (Kornberg, *et al.*, 1999), e devido a sua carga negativa podem quelar íons como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (Austin e Mayer, 2020).

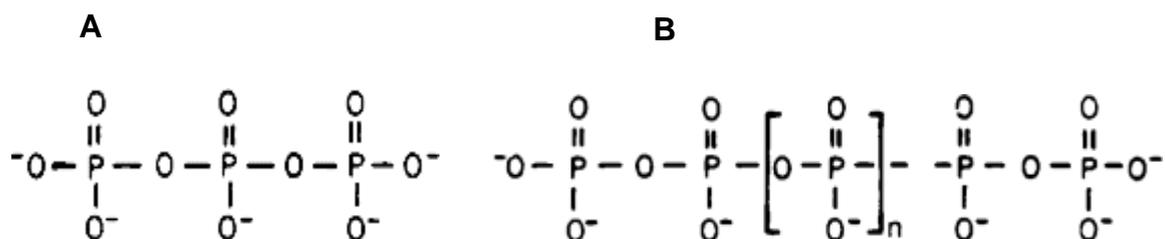


Figura 1: Estrutura química do polyP. (A) cadeia curta de polifosfato contendo 3 resíduos; (B) cadeia longa de polifosfato onde $n = 10$ a 1000 (Harold, 1966).

O primeiro relato de PolyP ocorreu em 1888 por Liebermann, que observou em leveduras uma biomassa conhecida como grânulos de volutina (forma de armazenamento de polifosfatos inorgânicos complexos) ou metacromático, porém só ficou conhecido no meio científico na década de 1940 quando Jeener e Brachet observaram que a adição de fosfato inorgânico em células de levedura privada de fosfato, induziu o acúmulo de uma substância basofílica dentro das células (Harold, 1966). No entanto, por muitos anos esse polímero ficou “esquecido” sem conhecimento sobre seu papel fisiológico em bactérias ou qualquer outro organismo.

Anos mais tarde, o polyP chamou a atenção de Arthur Kornberg cujas pesquisas levaram a identificação de uma enzima altamente conservada em bactérias

gram-positivas e gram-negativas chamada polyP quinase (PPK) que é responsável pela síntese de polyP em bactérias (Xie e Jakob, 2019), onde essa enzima polimeriza o fosfato terminal do ATP em uma cadeia de polyP (Rashid *et al.*, 2000). Sua descoberta permitiu manipular geneticamente a síntese desse polímero em células procariontes e eucariontes e avaliar seu papel fisiológico (Xie e Jakob, 2019). Assim, foi demonstrado que em células bacterianas o polyP está envolvido na resposta ao estresse, aumento da resistência ao calor, oxidantes, choque osmótico, pH ácido, metais pesados, transcrição, tradução, motilidade e formação de biofilme, bem como contribui para a esporulação, estabelecimento da fase estacionária, quórum sensing e virulência (Xie e Jakob, 2018; Rao *et al.*, 2009).

Em humanos, as pesquisas mostraram envolvimento de polyP no desenvolvimento do tecido ósseo, coagulação do sangue através da ativação do fator XII da cascata de coagulação, funções cerebrais e neuronais, ativação de canais iônicos, sinalização de mtor, fator de crescimento de fibroblasto básico (FGF2), integrina $\beta 1$ (receptor de superfície celular), proteínas receptoras de ADP (P2Y1) e funções nucleares como: transcrição de rRNA, síntese e reparo de DNA, dentre outras (Andreeva *et al.*, 2015; Xie e Jakob, 2019).

Recentemente foi mostrado que os polyP inorgânicos de cadeia longa apresentam atividades antivirais no combate à SARS-CoV-2 em cultura de células *in vitro*, interagindo com a proteína S, sugerindo o seu possível uso terapêutico na prevenção de infecções por coronavírus (Ferrucci *et al.*, 2021). Outra descoberta recente por Sawada e colaboradores (2021) é que PolyP também está envolvido na proteólise dependente de autofagia.

Diversos estudos demonstraram a importância de PolyP na regulação das funções atividades mitocondriais como: abertura de mPTP (proteína de transição da permeabilidade mitocondrial formada na membrana interna das mitocôndrias), regulação da captação de Ca^{2+} e no metabolismo energético (Xie e Jakob, 2018). Foi sugerido que polyP estaria relacionado com disfunções mitocondriais presentes em doenças neurodegenerativas (Borden *et al.*, 2021)

1.2 Síntese de polifosfatos

Em organismos eucarióticos unicelulares como leveduras, polyP participa na síntese e reparo de DNA, modificação pós-traducional, homeostase de fosfato,

sequestro de arginina e resistência ao estresse causado por metais pesados (Xie e Jakob, 2019). Além disso funciona como um reservatório de fosfato, uma vez que seus níveis caem quando as células precisam de Pi. Também desempenham uma função protetora celular, quelando cátions como Ca^{2+} , no vacúolo (Neef e Kladde, 2003). As células de levedura possuem uma rede complexa de cascatas de sinalização que lhes permite fazer ajustes apropriados no metabolismo em resposta às mudanças ambientais.

Para obter Pi do meio extracelular, as células de levedura fazem uso das fosfatases ácidas, transportadores de alta (Pho84 e Pho89) e baixa (Pho87 e Pho90) afinidade e um possível transportador de Pi na membrana plasmática Syg1 (Oshima, 1997; Persson *et al.*, 2003). Além de utilizar-se de reciclagem interna de nucleotídeos ou fosfolípidos celulares (Patton-Vogt, 2007).

Em fungos polyP é armazenado em vacúolos. O complexo enzimático Transportador Vacuolar Chaperona (VTC) é responsável pela síntese de polyP na membrana vacuolar (Christ *et al.*, 2020), onde acopla a síntese de polyP à sua translocação através da membrana, sequestrando o polyP para o lúmen vacuolar (Fig. 2). O VTC funciona como complexo composto pela polimerase Vtc4 e três subunidades regulatórias: Vtc1, Vtc2 e Vtc3, cada subunidade contém três hélices transmembrana de sequência relacionada. Há ainda presença de outra subunidade, Vtc5.

Vtc1 é uma proteína de membrana sem domínio hidrofílico diferentemente de Vtc2, Vtc3 e Vtc4 que têm dois domínios N-terminais hidrofílicos voltados para o citosol, sendo eles: domínio SPX e domínio central. A maioria das proteínas que contém o domínio SPX está envolvida no metabolismo de fosfato, como transportadores de fosfato, o que levou a descoberta de que esse domínio pode regular a homeostase de fosfato em eucariotos (Gerasimaité e Mayer, 2016). Vtc4 usa ATP para gerar PolyP e, simultaneamente, transportar o poliânion para o vacúolo (Xie e Jacob, 2019; Bru *et al.*, 2016).

Existem dois diferentes complexos VTC: o complexo formado pelas subunidades Vtc4, Vtc3 e Vtc1, que está localizado principalmente na membrana vacuolar, e o complexo formado pelas subunidades Vtc4, Vtc2 e Vtc1 encontrado no retículo endoplasmático e envelope nuclear (Fig. 2). Numa situação de carência de fosfato esse complexo também se localiza no vacúolo (Gerasimaité e Mayer, 2016; Gerasimaité *et al.*, 2014; Desfougères *et al.*, 2016).

A síntese de polyP pelo complexo VTC depende de uma força motriz, proveniente de um gradiente eletroquímico de prótons, através da membrana vacuolar, que é estabelecido pela ação do sistema primário de transporte de prótons, a V-ATPase (Austin e Mayer, 2020; Desfougères *et al.*, 2016; Gerasimaité e Mayer, 2016; Nelson & Harvey, 1999).

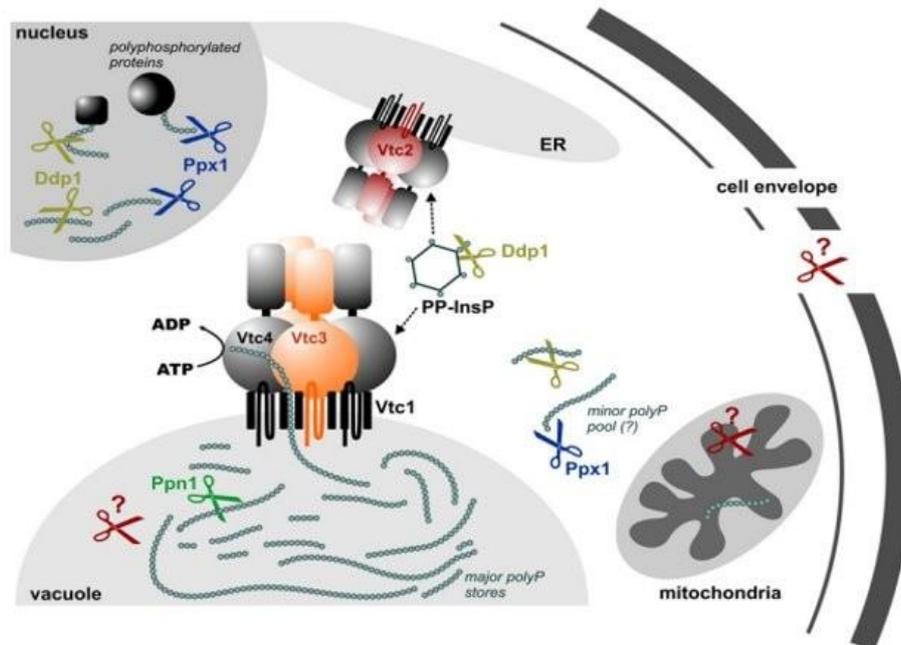


Figura 2: Localização do complexo VTC. Subunidades VTC1, VTC3 e VTC4 estão localizadas no vacúolo e VTC1, VTC2 e VTC4 estão localizadas no retículo endoplasmático. Figura adaptada de Gerasimaité e Mayer (2016).

A homeostase do fosfato celular envolve a interconexão metabólica entre ATP, polifosfatos e inositol polifosfatos. Os níveis de PP-InsPs aumentam de acordo com o nível de Pi disponível. As células regulam os níveis de fosfato orquestrando aquisição e estocagem de fosfato através de inositol pirofosfatos e o domínio proteico SPX que atua como um sensor para PP-IPs presente nos transportadores e no complexo VTC em células fúngicas. O metabolismo dos polifosfatos em leveduras, demonstrou ser modulado por polifosfatos de inositol, especificamente por pirofosfatos como IP8, que ativam a polimerase Vtc4 via ligação com domínio SPX (Secco *et al.*, 2012a, b; Auesukaree *et al.*, 2005; Wild *et al.*, 2016; Azevedo e Saiardi, 2017).

1.3 V-ATPase

A V-ATPase é um sistema primário de transporte que funciona como um nano-motor rotativo de bombeamento de prótons usando a energia de hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) em membras de células fúngicas, vegetais e animais. Tanto as V-ATPases de leveduras quanto de mamíferos apresentam homologia em sequência e composições das subunidades e semelhanças no mecanismo enzimático (Marshansky e Futai, 2008). A V-ATPase é constituída por 13 subunidades, distribuídas em dois complexos: o complexo de membrana hidrofóbico (V₀) composto por seis subunidades diferentes (a, d, e, c, c' e c'') de aproximadamente 260 kDa, que funciona na translocação de prótons e o complexo catalítico hidrofílico (V₁) composto por oito subunidades diferentes (A, B, C, D, E, F, G, H) de aproximadamente 650 kDa, que é responsável pela hidrólise de ATP (Fig. 3) (Forgac, 2007; Tomashevsky, 2010).

As V-ATPases foram caracterizadas inicialmente em membranas vacuolares de células fúngicas, e posteriormente foram encontradas em vários compartimentos intracelulares, como: lisossomos, endossomos, complexo de Golgi, retículo endoplasmático, vesículas secretórias e membrana nuclear (Forgac, 2007; Samarão *et al.*, 2009).

As V-ATPases acoplam a hidrólise de ATP ao transporte de H⁺ através de membranas biológicas, fazendo com que a força próton motriz gerada por essas enzimas seja usada para impulsionar e realizar transporte membranar secundário de íons, aminoácidos, açúcares em organelas de células eucarióticas na célula (Nelson & Harvey, 1999). As V-ATPases apresentam um papel importante na acidificação de organelas e no controle de pH celular (Banerjee e Kane, 2020), são essenciais na regulação do balanço osmótico e no correto endereçamento de proteínas (Harvey, 1992).

A regulação da atividade da V-ATPase ocorre em resposta a disponibilidade de glicose (Beyenbach e Wieczorek, 2006). Também foi sugerido que sua regulação está relacionada com um código de reconhecimento dos lipídeos de fosfatidilinositol (Li *et al.*, 2014). Essa regulação possui como um dos seus principais mecanismos a modulação dos níveis de montagem dos complexos V₁-V₀ (Kane, 2006; Forgac, 2007). O fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (PI(3,5)P₂) atua como um dos importantes reguladores da atividade e montagem da V-ATPase, ligando-se em um domínio N-terminal citosólico da subunidade a (Vph1), estabilizando as interações entre

complexo V1-V0 e aumentando a atividade da V-ATPase (Li *et al.*, 2014). Outro fosfatidilinositol enriquecido no Golgi, fosfatidilinositol 4-fosfato, interage diretamente com outra isoforma da subunidade *a* em levedura, Stv1 (Levine e Munro, 2002).

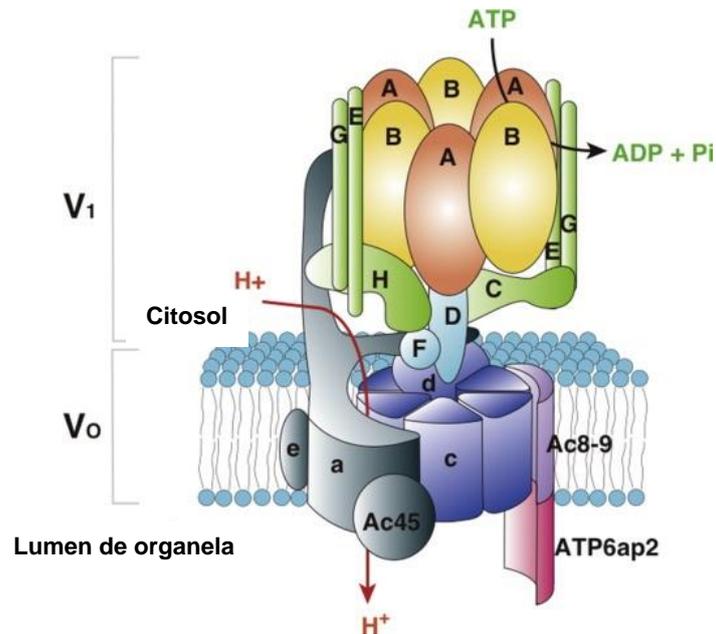


Figura 3: Modelo da V-ATPase e suas respectivas subunidades (adaptado de Sun-Wada e Wada, 2015).

Estudos com levedura *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que a deleção do gene *vma2*, que codifica subunidade B do complexo V1, resulta em diminuição da atividade de hidrólise de ATP e translocação de prótons da V-ATPase, além de uma diminuição do acúmulo/conteúdo de polyP nas fases de crescimento exponencial e estacionária (Tomascheysky, 2010; Trilisenko, 2013). Esses dados sugerem que a subunidade B e/ou a V-ATPase têm um importante papel na energização da membrana vacuolar e na biossíntese de polyP, e que a síntese desses polímeros e o gradiente eletroquímico de prótons na membrana vacuolar possuem uma relação importante (Tomascheysky, 2010; Trilisenko, 2013). Foi demonstrado também que algumas mutações na subunidade α (*vph1*) do complexo V0 afetam o transporte intracelular de fosfato (Li *et al.*, 2014).

Atividade de V-ATPase e energização de membrana são essenciais para síntese e transporte de polyP no vacúolo (Austin e Mayer, 2020). Foi demonstrado que as células com mutações em genes que codificam para as subunidades de V-ATPase apresentam níveis alterados de polifosfatos. Ao mesmo tempo, foi mostrado

a presença das proteínas Vtc1, Vtc2 e Vtc3, esta relacionada com o número de subunidades V1 periféricas associadas aos vacúolos sugerindo a interação física das proteínas Vtc com a V-ATPase que afetam a conformação de V0, influenciando a estabilidade da V-ATPase e função de seu setor V0 na fusão da membrana vacuolar (Müller *et al.*, 2002).

1.4 Polifosfatos de inositol e pirofosfatos de inositol

O inositol, chamado primeiramente de “inosita” por causa do seu sabor adocicado foi isolado e purificado (de vegetais e urina de cavalo) pela primeira vez no século XIX, através dos trabalhos de Scherer em 1850 e Maquenne em 1887. Esse poliálcool cíclico contém um anel de seis átomos de carbono (C) e seis grupos OH (ciclohexanopoliol), eles sofrem rápidos ciclos de fosforilação e desfosforilação nas posições 3', 4' e 5' e formam várias espécies de fosfoinosítídeos. No passado eram considerados integrantes da família da vitamina B, porém atualmente sabe-se que eles são sintetizados no organismo a partir de D-glicose (Vucenik, 2019).

O *myo*-inositol, produzido a partir da glicose é um dos seus isômeros mais abundantes na natureza (York, 2006), é precursor para formação de polifosfatos de inositois compostos por múltiplas combinações dos grupos monofosfato e pirofosfato (Alcázar-Román e Wenthe, 2008).

Os inositois podem ser encontrados ligados a fosfolipídios, também como ácido fítico, ou ainda em sua forma livre, tanto em células animais quanto vegetais. Praticamente todas as células vegetais e grande parte das de mamíferos apresentam inositol e polifosfatos de inositol em grande quantidade (Croze e Soulage, 2013).

Os polifosfatos de inositol desempenham funções importantes e vitais para a célula incluindo regulação da proliferação e diferenciação celular, transdução de sinal, transdução de energia e geração de ATP, transcrição de RNA e reparo de DNA (Thomas *et al.*, 2016). Várias doenças metabólicas têm sido associadas à desregulação do seu metabolismo, além de câncer, síndrome dos ovários policísticos e distúrbios neurológicos (Croze e Soulage, 2013; Thomas *et al.*, 2016; Unfer *et al.*, 2017; Vucenik e Shamsuddin, 2003).

Os polifosfatos de inositol ou fosfoinosítídeos (IPs ou InsPs) são derivados fosforilados do fosfatidilinositol (Staiano e Matteis, 2019). Eles constituem apenas uma pequena fração dos fosfolipídeos celulares, mas controlam inúmeros aspectos da vida

e morte celular (Weinberg, 2021), incluindo sinalização e comunicação celular, tráfego vesicular, regulação de canais de membrana e transportadores, resposta inflamatória, ativação imunológica, modulam a distribuição e o metabolismo de lipídeos além de controlar processos endocíticos e exocíticos (Almeida et. al, 2003; York, 2006; Balla, 2013; Weinberg, 2021).

Os polifosfatos de inositol altamente fosforilados fornecem interconexões adicionais entre as redes metabólicas e de sinalização. Através de uma cascata de reações de fosforilação convertendo inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3 ou IP3) em inositol hexakisfosfato (InsP6 ou IP6). E a partir de IP6 ocorre a produção de pirofosfatos de inositol (PP-IPs), seguindo uma cascata de fosforilação e desfosforilação, executadas pelas quinases inositol hexakisfosfato (IP6Ks) e difosfoinositol pentaquisfosfato (PPIP5Ks).

Os difosfoinositol polifosfatos, também conhecidos como pirofosfatos de inositol (PP-InsPs ou PP-IPs) formam uma classe única de moléculas contendo até duas ligações fosfoanidrido de alta energia. Sua biossíntese começa com a hidrólise do fosfoinosítideo fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PI(4,5)P2) pela enzima fosfolipase C (PLC) (Fig. 4). Essa hidrólise resulta na geração de diacilglicerol (DAG) ligado a membrana e liberação do inositol trifosfato (IP3) para o citosol (Azevedo e Saiardi, 2017), onde IP3 serve como mediador da liberação de Ca^{2+} através de sua ligação a canais de Ca^{2+} IP3-sensíveis no retículo endoplasmático, e também como precursor para formação de polifostatos e pirofosfatos de Inositol (Fig. 4) (Miller *et al.*, 2008).

O IP3 é essencial na sinalização de Ca^{2+} em muitos metazoários, todavia um papel semelhante não foi tão bem estabelecido em células de euocariontes unicelulares como levedura.

Uma cascata de reações de fosforilação catalisadas pelas enzimas IP quinases Arg82p e Ipk1p em levedura ou IMPK e IPTKA/B e ITPK em humano converte mensageiro secundário InsP3 em inositol hexakisfosfato IP6. IP3 é fosforilado pela enzima inositol polifosfato multiquinase (IPMK) e pela enzima inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinase (IP3-3K) gerando o inositol 1,3,4,5 tetraquisfosfato (IP4), que é novamente fosforilado pela IPMK formando o inositol 1,3,4,5,6 pentacisfosfato (IP5). A molécula de IP5 é fosforilada pelo inositol 1,3,4,5,6 pentacisfosfato 2-quinase (IP5-2K) gerando IP6 (Azevedo e Saiardi, 2017).

uma enzima bifuncional com atividades de quinase e fosfatase (Norman *et al.*, 2018).

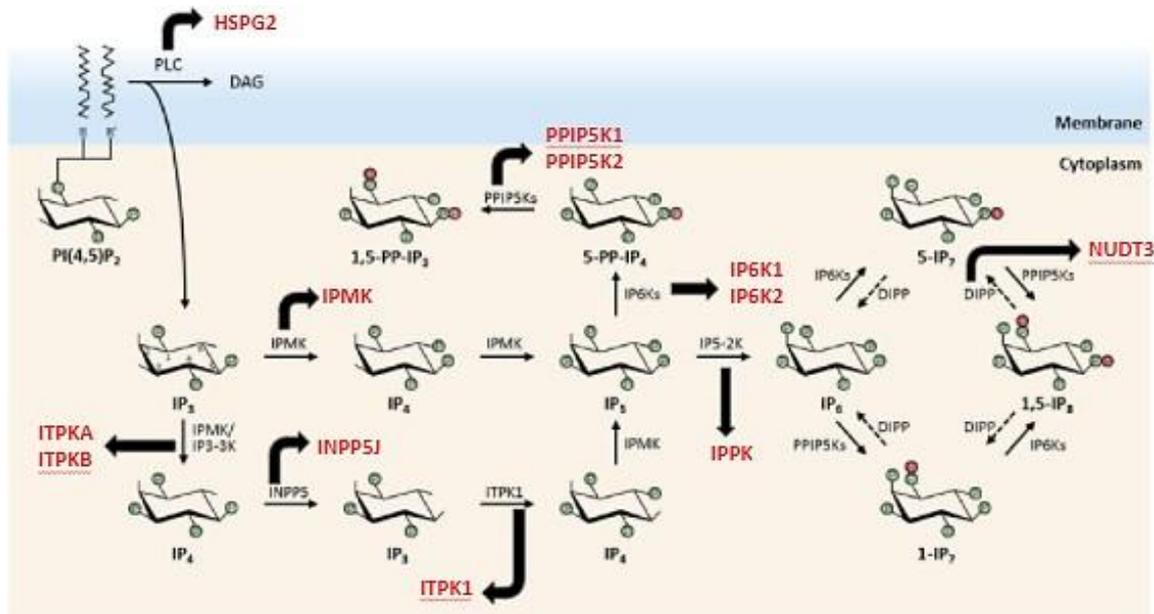


Figura 5: Via biossintética de polifosfatos de inositol em mamíferos. Os grupos de fosfato estão representados em forma de círculos verdes. Segundo grupo de fosfato formando pirofosfato está representado com círculo vermelho (modificado de Park *et al.*, 2017).

Os PP-InsPs possuem um papel importante na regulação de metabolismo energético, homeostase de fosfato, sendo apontados como os metabolitos regulatórios sinalizadores. Os mais estudados em mamíferos são difosfoinositol pentacisfosfato (IP7 ou InsP7) e bis-difosfoinositol tetraquisfosfato (IP8 ou InsP8) (Azevedo e Saiardi, 2017) por funcionar como importantes mensageiros sinalizadores. Foi proposto que a via para turnover de 1,5-IP8 compreende predominantemente a interconversão cíclica de IP6, 5-IP7, 1,5-IP8, e 1-IP7 mediada pelas quinases e fosfatases especificadas na Figura 6.

A quinase IP6Ks possui Km para ATP entre 1,0 e 1,4 mM, que são concentrações próximas aos níveis intracelulares de ATP, portanto foi sugerido que a biossíntese 5PP-InsP5 é reflexo direto da concentração celular de ATP (11–13) (Wu PNAS 2016).

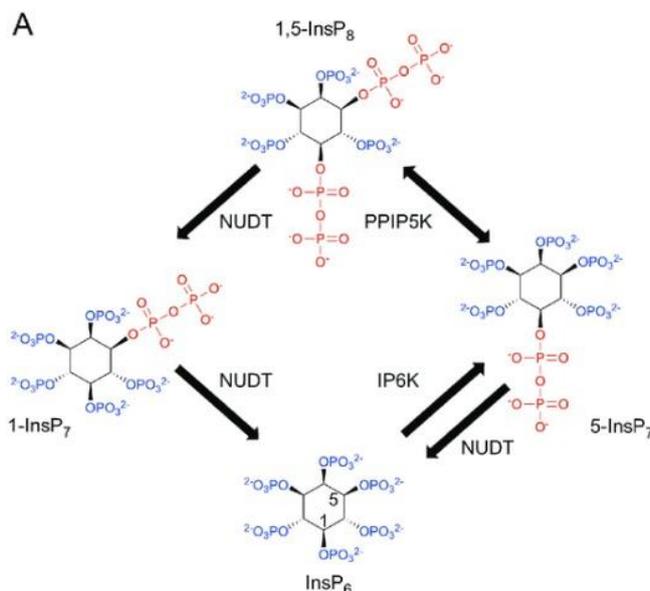


Figura 6: A interconversão cíclica de InsP6, 5-InsP7, 1,5-InsP8, e 1-InsP7. As enzimas quinases e fosfatases estão apresentadas junto com setas indicando direção da reação enzimática.

As enzimas IP6 quinases regulam a migração celular, sinalização de insulina, remodelamento de cromatina, metástase de câncer, metabolismo energético, as funções dos neutrófilos e pode regular a atividade de proteína supressora de tumor, p53 (Azevedo e Saiardi, 2017; Lopez-Sanchez *et al.*, 2020; Minini, 2020). O InsP6 tem sido usado em pesquisas de prevenção, progressão e tratamento do câncer. O seu potencial preventivo e terapêutico se relaciona ao seu papel antioxidante e por levar ao bloqueio de vários carcinógenos, além das atividades imunoestimulantes, anti-inflamatórias e supressoras do ciclo celular e proliferação. Conduzindo a célula à diferenciação e apoptose, além de suprimir a angiogênese (Zhu *et al.*, 2016), inibir processos metastáticos e progressão tumoral, apresentar sinergismo com drogas anticancerígenas e diminuir resistência à quimioterapia (Morton e Raison, 1963; Rajasekaran *et al.*, 2018; Vucenik, 2019; Mukherjee *et al.*, 2020).

Os mecanismos dependentes de PP-InsP e seus alvos celulares ainda não foram completamente elucidados, acredita-se inositol fosfatos exercem suas funções pleiotrópicas através de interação e ligação com proteínas-alvos. Ainda, polifosfatos de inositol participam de modificação pos-traducional de proteínas, onde transferem o grupo β -fosforil para as proteínas fosforiladas, processo denominado pirofosforilação protéica (Wu PNAS 2016).

1.5 Calcineurina

A calcineurina (CaN) é uma proteína fosfatase do tipo serina/treonina regulada por Ca^{2+} /calmodulina (Connolly *et al.*, 2018). CaN funciona como heterodímero (Fig. 7) constituída de uma subunidade A catalítica de 64 kDa contendo uma hélice de ligação à cadeia β , um domínio regulador, um domínio autoinibitório, um domínio C-terminal não estruturado de função desconhecida e uma subunidade B regulatória de ligação de Ca^{2+} de 19 kDa, que é estruturalmente homóloga à calmodulina (CaM). CaN pode ser expressa em três isoformas diferentes (αCaN , βCaN e γCaN) (Creamer, 2020; Cohen, 1989).

A CaN é ativada pelo aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Creamer, 2020). Os íons de Ca^{2+} representam os segundos mensageiros na sinalização celular, ademais se torna tóxico para a célula se a exposição for prolongada e se os seus níveis forem altos tanto no citosol como em organelas (Swulius e Waxham, 2008).

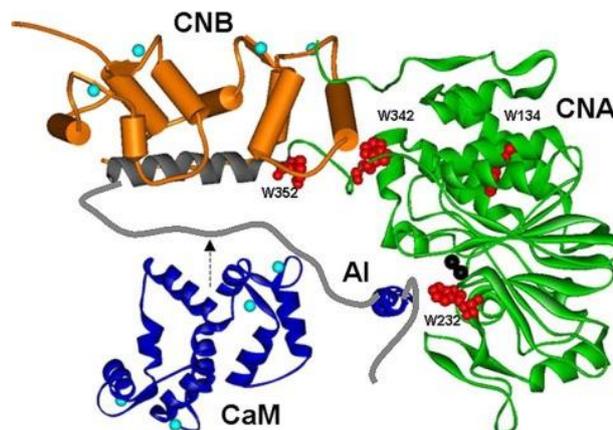


Figura 7: Estrutura tridimensional da calmodulina (CaM) ativada pelo Ca^{2+} se ligando à calcineurina. Subunidade A (CNA) em verde e subunidade B (CNB) em laranja. As esferas em azul claro representam o Ca^{2+} em seus sítios de ligação na CaM (em azul) e na CNB. As esferas pretas indicam os íons de ferro e zinco no sítio ativo da enzima, quatro resíduos de triptofano estão em vermelho (Shen, 2008).

Há alta concentração de cálcio no meio extracelular e baixa concentração intracelular. Os íons de cálcio ficam compartimentalizados em algumas organelas como o retículo endoplasmático/sarcoplasmático (em células musculares), lisossomos e vacúolos (Swulius e Waxham, 2008).

O Ca^{2+} é liberado do retículo endoplasmático através do estímulo de canais

de cálcio sensíveis a IP3 ou rianodina (Swulius e Waxham, 2008). A enzima participanteda via de biossíntese de polifosfatos de inositol, a inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinase ou IP3K, regula homeostase de Ca^{2+} através de controle do balanço entre IP3 e IP4. Além disso, o IP4 promove a entrada de Ca^{2+} na célula do meio extracelular (Park *et al.*, 2017). Isso estimula transportadores da membrana plasmática e de organelas de armazenamento de cálcio a promoverem sua liberação em ondas, num ciclo de feedback positivo, a partir de um determinado local para microdomínios celulares ou toda a célula, e eventualmente para algumas células vizinhas num mesmo tecido (Berridge *et al.*, 1999; Shamsuddin e Vcenik, 1997; Swulius e Waxham, 2008 e Vucenik, 2019).

A calmodulina (CaM) é uma proteína que constitui cerca de 1% do total de massa proteica nas células eucarióticas e auxilia na transmissão do sinal de Ca^{2+} , agindo como um receptor para o cátion, com quatro sítios de ligação e com o qual possui alta afinidade (Hudmon e Schulman, 2002). CaM está envolvida na regulação da proliferação celular e do ciclo celular através de eventos de fosforilação/desfosforilação dependentes de CaM. Quando Ca^{2+} se liga a CaM, o complexo Ca^{2+} /CaM pode interagir e controlar atividade de proteínas-alvo, como fosfatase calcineurina CaN e a família de proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} /CaM ou CaMK. A CaN é conhecida por ser a única proteína fosfatase ativada diretamente pelo cálcio e por complexo Ca^{2+} /calmodulina (Swulius e Waxham, 2008; Wigington *et al.*, 2021).

A CaN desempenha papéis essenciais em vários processos de sinalização tais como respostas adaptativas, ciclo celular, invasão de células hospedeiras e virulência de patógenos humanos (Connolly *et al.*, 2018; Creamer, 2020). Um dos seus substratos é o fator chave de transcrição NFAT (fator nuclear de células T ativadas), em mamíferos, onde a CaN controla a sua atividade, que é necessária para a ativação de células T e expressão de interleucina-2 (Park *et al.*, 2019). Por isso seus inibidores, ciclosporina A (CsA) e FK506 (tacrolimus), por exemplo, são muito usados como imunossupressores, entretanto ao inibir a CaN em células não imunes esses medicamentos causam diversos efeitos colaterais (Azzi *et al.*, 2013; Roy e Cyert, 2020). Isso acontece porque além de promover o desenvolvimento de funções do sistema imunológico e proliferação de células imunes, a CaN também tem papel importante nos sistemas cardiovascular, nervoso e músculo-esquelético, e alterações na sua atividade foram relatadas em doenças humanas como hipertrofia cardíaca,

câncer, neurodegeneração e doenças mentais (Connolly, 2018).

Recentemente foram descobertos novos substratos da CaN em células humanas (Wigington *et al.*, 2021). Um desses substratos pode estar envolvido na regulação da morfologia celular, e é membro de uma subfamília de proteínas ativadoras de Rho GTPase, codificado pelo gene STARD8, podendo também funcionar como um supressor de tumor, além de estimular a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato PIP2 por fosfolipase C delta 1 (Baylei *et al.*, 2010; Wigington *et al.*, 2021).

A CaN está envolvida em regulação da expressão gênica (O'Keefe *et al.*, 1992) através de defosforilacao de fator de transcrição NFAT em mamíferos e Crz1. Em leveduras foi demonstrado seu papel no controle do ciclo celular, homeostase iônica, resposta ao feromônio de acasalamento, *sensing* nutricional, respostas aos estresses de metais e pH alcalino e manutenção da integridade da parede celular. Por ser uma fosfatase, faz parte da dinâmica do metabolismo e homeostase do fosfato na célula (Cyert *et al.*, 1991; Matsumoto *et al.*, 2002; Thewes, 2014; Park, *et al.*, 2019).

A cascata de sinalização de CaM-Crz1 pode ser ativada por diferentes estímulos externos, como: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Li^+ , K^+ , Na^+ , etanol, cafeína, temperatura, pH, luz azul e antifúngicos. Todos estes sinais causam a elevação transitória de Ca^{2+} citosólico livre, que é regulada pela atividade coordenada de canais de Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase e trocadores de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (Thewes, 2014; Liu *et al.*, 2015).

1.6 Proliferação de células tumorais

As células tumorais apresentam alterações nos mecanismos de controles do ciclo celular como consequência de mutações e eventos epigenéticos e tem como uma das características a proliferação descontrolada e invasão de outros tecidos, além de uma reprogramação metabólica (Hanahan e Weinberg, 2011).

As mutações que levam a perda de expressão e/ou função de supressores de tumor e aumento da expressão/atividade dos oncogenes fazem com que os mecanismos de controle, que geralmente levam a indução de apoptose ou bloqueio da divisão celular diante de estresse ou acúmulo de danos no DNA, parem de funcionar. Com isso as vias de sinalização e transdução de sinal, envolvidas nos controles proliferativos, sofrem alterações relevantes, levando à significativas mudanças no metabolismo, a fim de suprir as demandas energéticas desse novo

quadro (Hoxhaj e Manning, 2020; Ge *et al.*, 2022). A reprogramação metabólica pode também participar na modulação de sinalização, controle de expressão gênica e atuar em mecanismos epigenéticos (Ge *et al.*, 2022; McDonald *et al.*, 2017). Um exemplo clássico de mudança metabólica é o efeito Warburg onde as células tumorais apresentam alto consumo de glicose e produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio (Warburg, 1956).

Uma das vias de sinalização comumente ativada no câncer, e que fomenta a captação da glicose é a via de quinases PI3K-AKT-mTOR (Lawrence *et al.*, 2014). Em condições normais essa via é ativada em respostas a citocinas, fatores de crescimento e insulina, e auxilia no crescimento e controle da homeostase metabólica do indivíduo com um importante papel no crescimento e na sobrevivência do organismo, regulando, por exemplo, o metabolismo de glicose, a manutenção do equilíbrio redox e a biossíntese de macromoléculas (Fruman *et al.*, 2017; Hoxhaj e Manning, 2020).

Essa via é crítica para o controle do crescimento celular, e conforme ilustrado na Figura 8, em condições fisiológicas normais, a partir de um sinal extracelular, fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) é recrutada para a membrana plasmática, onde fosforila fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) formando fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que recruta e ativa a proteína serina-treonina quinase AKT também para a membrana, porém a ativação de AKT é limitada pela ação da proteína fosfatase PTEN, que desfosforila PIP3 formando novamente PIP2. Na membrana, AKT ligada a PIP3 e ativada é fosforilada em dois sítios pelas proteínas PDK1 e mTORC2, garantindo o controle do metabolismo, proliferação, sobrevivência e crescimento celular (Plas e Thompson, 2005; Hoxhaj e Manning, 2020). Importante destacar que a molécula de PIP2 além de ser a fonte de PIP3, é fonte de IP3 (Fig. 5).

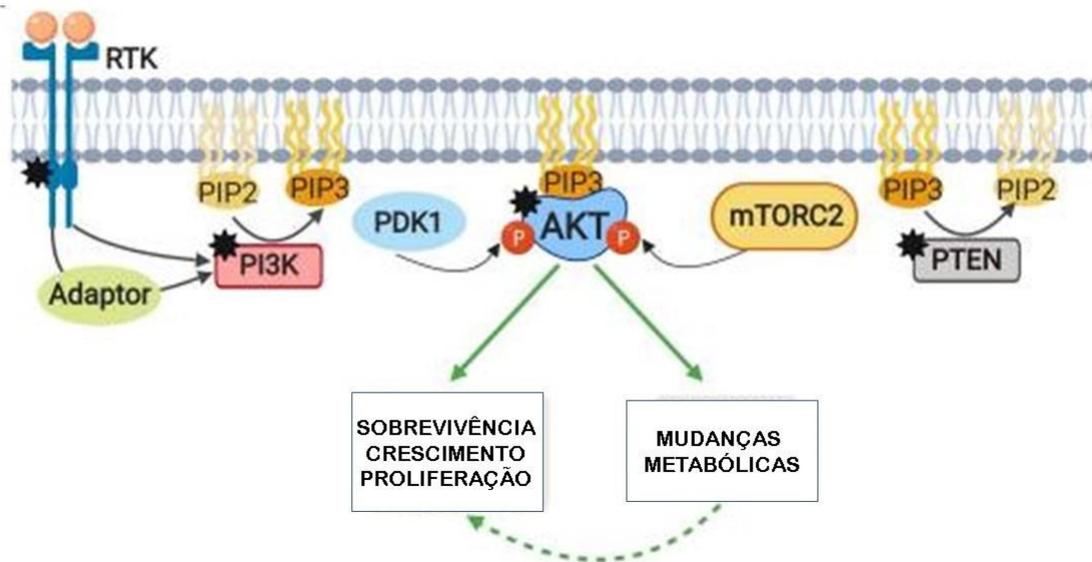


Figura 8: Ativação da via (PI3K)-AKT. Modificado de Hoxhaj e Manning (2020).

Em células tumorais ocorre uma reprogramação metabólica na qual a proteína AKT é desregulada e ativada positivamente de forma anormal, estimulando a síntese de proteínas e aumentando a incorporação da glicose pela sinalização da via mTOR, o que facilita o efeito Warburg e a captação de nutrientes para suprir a alta demanda de divisão celular (Lawrence *et al.*, 2014; Hoxhaj e Manning, 2020). Isso acontece devido às mutações que permitem o crescimento celular mesmo na ausência de sinais extracelulares de fatores de crescimento e citocinas, além de ocorrer também, muitas vezes, mutação na proteína PTEN, que atua como o segundo mais frequente supressor de tumor, depois da p53, e que desfosforila PIP3 em PIP2, interferindo com o controle da ativação da AKT (Plas e Thompson, 2005; Hoxhaj e Manning, 2020).

No câncer as principais mutações envolvendo essa via incluem: mutação no oncogene que codifica para uma das subunidades de PI3K tornando-a ativada, mutações em PTEN levando à perda de função ou deleção da proteína supressora de tumor, mutação que leva à ativação dos receptores tirosina-quinase específicos para PI3K e sua amplificação, e mutações envolvidas em ganho de função de uma das isoformas de AKT e sua amplificação. Todas essas principais mutações levam à ativação da via mTOR favorecendo assim a proliferação descontrolada (Zack *et al.*, 2013; Lawrence *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2017; Hoxhaj e Manning, 2020).

1.7 Leveduras-modelo

As leveduras são geralmente definidas como fungos unicelulares sem corpos de frutificação, com crescimento assexuado por brotamento ou por fissão como *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente, essas são classificadas como fungos ascomicetos do filo *Ascomycota* (Sipiczki, 2000).

As leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, evolutivamente distantes entre si (aproximadamente 10^9 anos de separação), são consideradas ótimos modelos para estudo de processos celulares e moleculares de organismos eucarióticos, cuja manipulação genética possibilita identificação de genes de uma determinada atividade biológica e isolamento de novos mutantes. As alterações das condições do meio de cultivo, como temperatura e composição nutricional, por exemplo, possibilitam pesquisas de respostas aos estresses ambientais. São muito usadas para estudar processos moleculares conservados em humanos, que são ausentes em bactérias, incluindo sinalização celular que envolve a comunicação entre organelas (Hoffman *et al.*, 2015).

A primeira levedura a ter seu genoma completamente sequenciado foi a levedura de brotamento *S. cerevisiae* em 1996, revelando aproximadamente 5.600 genes, porém após a remoção de alguns genes hipotéticos e pseudogenes houve uma redução desse número para 5.570 (Goffeau *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2001). Essa levedura também é amplamente usada na indústria alimentícia na produção de alimentos fermentativos como pão e algumas bebidas incluindo cervejas, vinhos, e também na indústria de biocombustíveis. Além disso, são também usadas para expressão e produção de produtos farmacêuticos e outros compostos de interesse (Belda *et al.*, 2019).

Já o sequenciamento do genoma da levedura de fissão *S. pombe* foi concluído em 2002 (Wood *et al.*, 2002). Das 5.054 proteínas conhecidas, 2.154 têm papel biológico caracterizado, estima-se que 2.050 são ortólogos geralmente de *S. cerevisiae* e 850 não tem o papel biológico conhecido (Hoffman *et al.*, 2015).

As leveduras vêm sendo utilizadas como ferramenta de estudo para os diversos processos celulares de eucariotos, buscando elucidar as vias intracelulares, facilitando a compreensão dos mecanismos complexos em células animais, como pesquisas das bases bioquímicas, celulares e moleculares de patologias humanas incluindo doenças neurodegenerativas, câncer e desordens metabólicas (Lei e

Klionsky, 2023). Além disso, o estudo de diferentes tipos de estresse (osmótico, térmico, oxidativo, nutricional e outros) tem sido acelerado pelo uso de levedura como sistema modelo para clonar e analisar genes que contribuem para a tolerância a condições adversas (Forsburg, 2005).

Diversos genes dessas leveduras mostram alto grau de similaridade com genes presentes no genoma humano, justificando a importância do uso das leveduras como modelo de estudo nos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares evolutivamente conservados e comuns a esses microrganismos eucarióticos e humanos (Wood *et al.*, 2002). As leveduras também são usadas com sucesso para entendimento de processos de senescência e envelhecimento.

No campo de pesquisas de metabolismo de polifosfatos de inositol foi demonstrado que a proteína Asp1 de *S. pombe* é uma enzima bifuncional com atividade de difosfoinositol pentakisfosfato quinase PPIP5K e de pirofosfatase, gerando IP7 e IP8. Esses dois pirofosfatos de inositol controlam diversos processos biológicos incluindo morfogênese celular, síntese de polyP e transmissão de cromossomos durante a divisão celular (Pascual-Ortiz *et al.*, 2021; Kunzel *et al.*, 2022). Atividade de Asp1 é necessária para a estabilidade do genoma e para evitar eventos de aneuploidia (perda ou ganho de cromossomos), que é uma característica das células cancerígenas, também encontrada em várias doenças neurodegenerativas (Kuenzel *et al.*, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Elucidar o papel de polifosfatos e polifosfatos de inositol na reprogramação metabólica durante proliferação celular tumorigênica e de leveduras.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar *in silico* a expressão de genes que codificam para as enzimas envolvidas em metabolismo de polifosfatos e pirofosfatos de inositol em diferentes tipos teciduais tumorais;
- Comparar níveis de polifosfatos em células de levedura do tipo selvagem e mutantes deficientes de calcineurina;
- Identificar a rede de interações de genes que codificam para as enzimas envolvidas em biossíntese de polifosfatos com genes que codificam para as subunidades da V-ATPase e de calcineurina, buscando revelar uma nova integração metabólico-sinalizadora para fenômenos proliferativos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microorganismos

No presente trabalho foi usada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepas K601 (genótipo MATa *ade2-1 can1-100 his3-11,14 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*) e K603 (mutante deficiente na subunidade regulatória da calcineurina) genótipo (W303-1A *cnb1::LEU2*).

3.2 Cultivo das células

O meio de cultura utilizado para as cepas de *S. cerevisiae* foi o YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose e 2% de ágar para meio sólido). O meio foi autoclavado a 1 atm por 15 min, o meio sólido foi vertido em placas de Petri no fluxo laminar e levadas a incubadora a 30°C por 24 hrs para controle de esterilidade. Logo após as cepas foram semeadas nas placas e incubadas a 30°C por 72 horas. O repique de manutenção das cepas foi realizado a cada 3 meses. Para obtenção das culturas, as células foram cultivadas em meio líquido elas foram mantidas em shakerna velocidade de 250 rpm a 30°C por 24hr.

3.3 Preparo das células e extração de polifosfatos

Algumas colônias de levedura foram tiradas das placas, colocadas em 5ml de meio líquido, e cultivadas sob agitação constante de 250 rpm a 30°C por 24 h. Inóculo: Após as 24h de agitação foi medido a densidade ótica (DO_{600nm}), logo após o cálculo de inoculação foi feito de acordo com tempo de geração das células, depois foi inoculada em 200 mL e 400 mL do meio líquido e mantidas a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 28h. As células foram coletadas usando centrifugação de 5000xg por 7min a 4°C, logo após foram lavadas com água destilada, ressuspensas e centrifugadas na mesma velocidade pelo mesmo tempo, esse processo foi feito 2x. Foi determinado o peso de tubos Falcon de 50 mL limpos e secos e após a lavagem das células os tubos foram pesados novamente a diferença foi o peso úmido das células. A extração do ácido solúvel foi feita em 2 partes: 1ª com 30 mL de 1N HClO₄ para cada 5g de células sedimentadas, as células foram mantidas em banho de gelo onde foram misturadas constantemente por 10 min, logo após esse tempo foram centrifugadas a ~5000xg por 10 min a 4°C e reservado o sobrenadante a 2ª foi feita com 15mL de 1N HClO₄ para cada 5g de células sedimentadas (essa parte não precisou de banho de

gelo) e centrifugada a $\sim 5000 \times g$ por 10 min a 4°C e reservado o sobrenadante. Os sobrenadantes da 1^a e 2^a extração foram unidos, determinado o volume, logo após foi dividido em duas partes com volumes iguais. A 1^a parte foi neutralizada com KOH 15% com pH 7,0 e seu volume final foi determinado e reservado em geladeira. A 2^a parte foi levado a banho-maria a 100°C por 20 min, e resfriado a 4°C e neutralizado com KOH 15% com pH 7,0 e seu volume final foi determinado e reservado em geladeira. A extração do ácido insolúvel foi feita com 15 mL de 0,5N HClO₄ para cada 5g de células sedimentadas, o sobrenadante foi levado ao banho-maria a 100°C por 30 minutos misturando constantemente, após esse tempo foi resfriado a $\sim 25^{\circ}\text{C}$ e centrifugado a $\sim 5000 \times g$ por 10 min a 4°C , e reservado em geladeira. Todas as vidrarias utilizadas foram lavadas com detergente, enxaguadas com água e mergulhadas na solução de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) a 2% por 15 min para tirar todo o resíduo de fosfato dessas vidrarias/materiais, e enxaguadas com água destilada.

3.4 Determinação de fosfato inorgânico (Pi)

Para a determinação de Pi, foi feita a leitura de todas as soluções das extrações. Para isso, consideramos os volumes das amostras necessárias para que suas leituras fiquem dentro da curva padrão de Pi. Para a curva padrão de Pi foi utilizada a solução estoque de KH₂SO₄ na concentração de 0,5 $\mu\text{mol/mL}$ onde foi usado como padrão do conteúdo de fosfato inorgânico (Pi). Volumes entre 50 e 1000 μL dessa solução foram utilizados para determinar a curva padrão. Os volumes abaixo de 1000 μL foram completados com quantidade suficiente de água destilada para completar o volume final de 1 mL, logo após foi adicionado 2 mL da solução C (mistura 100:1 da solução A (molibdato de amônio 0,5%; SDS 0,5%; H₂SO₄ 2%)) e a solução B (ácido ascórbico 10%), preparada no momento próximo a sua adição (com 20s de intervalo de um tubo de reação para outro). Em seguida foi realizada a leitura das amostras no espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm.

3.5 Identificação de genes e análise de expressão gênica

Para identificação de genes e informações relacionadas usamos o banco de dados GeneCards (<https://www.genecards.org/>), que é um banco de dados pesquisável e integrativo que fornece informações abrangentes e fáceis de usar sobre todos os genes humanos anotados e previstos, codificantes para proteínas e RNAs (Stelzer *et al.*, 2016). A base de conhecimento integra automaticamente dados

centrados em genes de cerca de 150 fontes da web, incluindo informações genômicas, transcriptômicas, proteômicas, genéticas, clínicas e funcionais. As análises de expressão dos genes que codificam para as enzimas via da biossíntese de polifosfatos de inositol foram realizadas usando as plataformas de dados de acesso gratuito disponíveis on-line, GEPIA2, GTEX, UALCAN.

A plataforma online GEPIA2 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) é uma plataforma online (<http://gepia2.cancer-pku.cn>) para análise de expressão gênica em tecidos tumorais e tecidos normais usando bancos de dados The Cancer Genome Atlas (TCGA) e Genotype-Tissue Expression (GTEx), fornecendo os dados como expressão gênica, estadiamento do tumor e período de sobrevivência de vários tipos de câncer, dentre outros (Tang et al., 2017).

As análises realizadas no portal GEPIA2 (também foram realizadas pela plataforma GTEx (Genotype-Tissue Expression Project; Lonsdale *et al.*, 2013).

O portal UALCAN (The University of Alabama at Birmingham Cancer data analysis Portal) é um portal on-line (<http://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>) para análise de dados ômicas de câncer (Chandrashekar *et al.*, 2022). O UALCAN foi projetado para: a) fornecer acesso fácil a dados OMICS de câncer disponíveis publicamente (TCGA, MET500, CPTAC e CBTTCC); b) permitir que os usuários identifiquem biomarcadores ou realizem validação *in silico* de potenciais genes de interesse; c) fornecer gráficos que descrevem o perfil de expressão e as informações de sobrevivência do paciente para genes codificadores de proteínas, codificadores de miRNA e codificadores de lincRNA; d) avaliar a regulação epigenética da expressão gênica por metilação do promotor; e) realizar análise de expressão gênica pan-câncer; f) fornecer informações adicionais sobre os genes/alvos selecionados por meio de links para HPRD, GeneCards, Pubmed, TargetScan, The Human Protein Atlas, DRUGBANK, Open Targets e GTEx. Esses recursos permitem que os pesquisadores coletem informações e dados valiosos sobre os genes/alvos de interesse; g) fornecer análises clínicas de dados do consórcio proteômico, incluindo totais/fosfoproteínas; h) fornecer expressão gênica de tumores cerebrais pediátricos e análise de expressão proteica.

3.6 Análise de redes de interação gênica e proteína-proteína

As análises da interação gênica e proteica foram realizadas usando as plataformas on-line STRING e GENEMania. A plataforma de dados STRING

(<https://string-db.org>) integra todas as associações conhecidas e previstas entre genes e proteínas, incluindo interações genicas, físicas e associações funcionais (Szkarczyk *et al.*, 2019). Para isso, o STRING coleta e pontua evidências de várias fontes como: mineração de texto automatizada da literatura científica, bancos de dados de experimentos de interação e complexos/vias anotados, previsões de interação computacional de co-expressão e do contexto genômico conservado e transferências sistemáticas de evidências de interação de um organismo para outro. O portal permite análise para uma única proteína/gene ou para múltiplos genes/proteínas. As análises foram realizadas usando o parâmetro de interação de confiança média (score 0,4).

A plataforma GeneMANIA (<https://genemania.org/>) permite análise de interações entre genes e proteínas e vias celulares e construção das redes interativas (Warde-Farley *et al.*, 2010). Para isso, os nomes de genes de interesse são inseridos na janela de busca escolhendo o organismo a ser pesquisado, que inclui *H. sapiens* e *S. cerevisiae*, dentre outros.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Genes codificantes para enzimas da biossíntese de inositol polifosfatos

Foi realizado uma busca no portal GeneCards com a finalidade de encontrar os genes envolvidos na biossíntese do pirofosfato e polifosfato de inositol em células de humanos. Os genes identificados e enzimas codificadas estão apresentados na Tabela 1, com destaque para genes IP6K1, IP6K2, IP6K3, PPIP5K1 e PPIP5K2, que codificam para enzimas pirofosfatases responsáveis por pirofosforilação dos polifosfatos de inositol produzindo os pirofosfatos de inositol IP7 e IP8. Seus respectivos homólogos em células de organismo eucariótico unicelular, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram identificados no portal do Alliance of Genome Resources.

A multiquinase IPMK é codificada por único gene, bem como a quinase ITPK1, ambas fosforilando IP3 e IP4 no início da via de biossíntese de polifosfatos de inositol. Três genes (ITPKA/B/C) codificam para isoenzimas inositol-trifosfato-3-quinase A/B/C, que têm papel essencial na sinalização de cálcio induzida por IP3.

As enzimas inositol hexaquisfosfato quinase 3 e difosfoinositol pentaquisfosfato 1-quinase, que levam a produção de IP7 e IP8 apresentam mais de um gene (IP6K1/2/3 e PPIP5K1/2), refletindo importância da regulação diferenciada da sua expressão e/ou atividade enzimática.

4.2 Localização intracelular das enzimas da biossíntese do polifosfatos de inositol

As localizações intracelulares das enzimas da via de produção de polifosfatos de inositol foram identificadas utilizando a plataforma UNIPROT. Como pode ser observado na Tabela 2, todas as enzimas para produção de polifosfatos de inositol estão presentes no núcleo e citosol, um terço das enzimas da via (IPMK, INPP5J, ITPK1 e PPIP5K1) se localizam na membrana plasmática, ITPKA, ITPKB e IP6K2 (23%) encontram-se no citoesqueleto, ITPKA, ITPKC e ITPK1 em mitocôndria, e apenas ITPKB no retículo endoplasmático. Localização diferenciada reflete contribuição e importância de cada organela na síntese de polifosfatos de inositol.

Tabela 1. Os genes e enzimas da via biossintética de inositol polifosfatos.

GENE <i>Hs</i>	ENZIMAS		GENE <i>Sc</i>
IPMK	IPMK	Inositol polifosfato multiquinase	ARG82 =IPK2
ITPKA	IP3-3K	Inositol-trifosfato-3- quinase A	
ITPKB		Inositol-trifosfato-3- quinase B	
ITPKC		Inositol-trifosfato-3- quinase C	
INPP5J	INPP5	Inositol polifosfato -5- fosfatase J	
ITPK1	ITPK1	Inositol- tetraquisfosfato 1 quinase	
IP6K1	IP6Ks	Inositol hexaquisfosfato quinase 1	KCS1
IP6K2		Inositol hexaquisfosfato quinase 2	KCS1
IP6K3		Inositol hexaquisfosfato quinase 3	KCS1
PPIP5K1	PPIP5Ks	Difosfoinositol pentaquisfosfato 1-quinase	VIP1
PPIP5K2		Difosfoinositol pentaquisfosfato 2-quinase	VIP1
IPPK	IP5-2K	Inositol pentaquisfosfato 2-quinase	IPK1
NUDT3	DIPP	Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase, Nudix hidrolase 3	DDP1

Os genes em negrito denotam os envolvidos na síntese de inositol polifosfatos como inositol pirofosfato IP7 e inositol pirofosfato IP8. *Hs*, *Homo sapiens*; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 2: Localização celular das enzimas da síntese do polifosfatos de inositol.

Enzimas	Localização celular					
	Núcleo	Citosol	Membrana plasmática	Cito esqueleto	Mitocôndria	Reticulo endo-plasmático
IPMK	x	x	x			
ITPKA	x	x		x	x	
ITPKB	x	x		x		x
ITPKC	x	x			x	
INPP5J	x	x	x			
ITPK1	x	x	x		x	
IP6K1	x	x				
IP6K2	x	x		x		
IP6K3	x	x				
PPIP5K1	x	x	x			
PPIP5K2	x	x				
IPPK	x	x				
NUDT3	x	x				

4.3 Análise da expressão tecidual dos genes envolvidos no metabolismo de polifosfatos de inositol

A plataforma GTEX foi usada para identificar padrão de expressão gênica das diferentes enzimas e suas isoformas em diversos tecidos humanos. Realizamos análise individual para cada gene da via de biossíntese de polifosfatos de inositol e análise multigênica. A Figura 9 mostra a expressão do gene IPMK em seis tecidos mais expressos e em dois tecidos com menor expressão (dos trinta tipos celulares e teciduais disponíveis para análise). Os mais expressos foram: células - linfócitos transformados por EBV, com 8.453 transcritos por milhão (TMP), seguido de células – fibroblastos cultivados, com 7.692 TPM, pele – não exposta ao sol (suprapúbica) com 6.742 TPM, mucosa esofágica com 6.600 TPM, cérebro – hemisfério cerebelar com 6.274 TPM e adiposo – subcutâneo com 6.214 TPM e os dois menos expressos foram coração – apêndiceatrial com 1.564 TPM e ventrículo esquerdo com 0.8436 TPM.

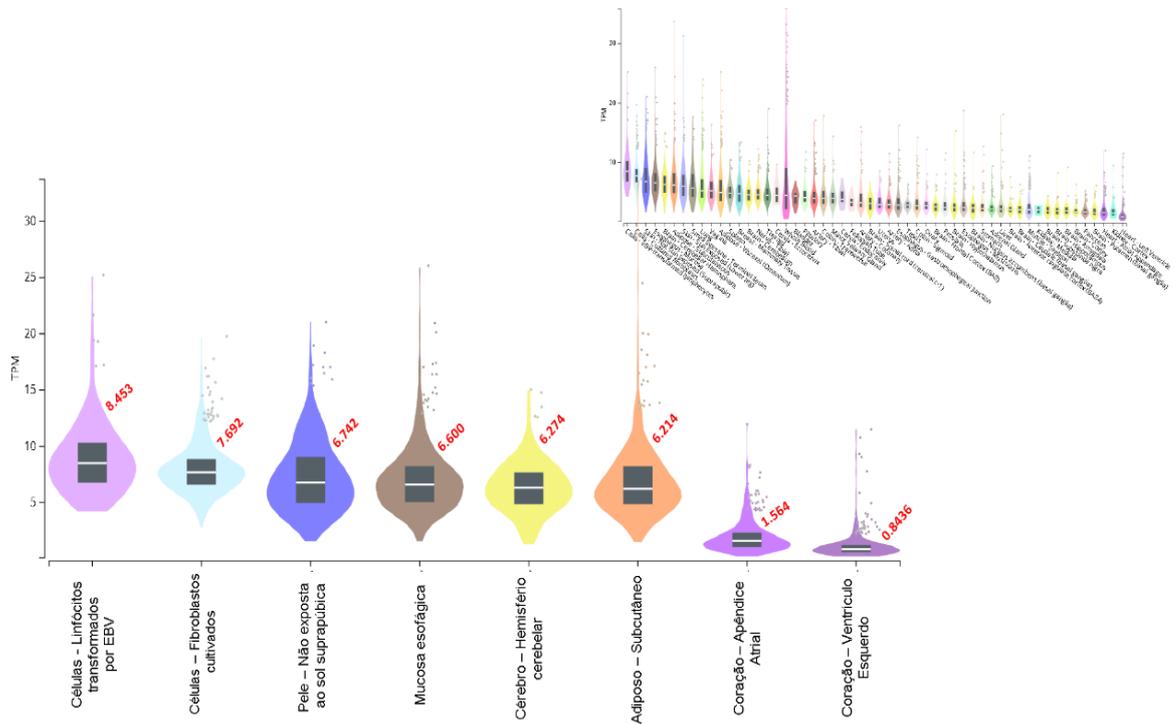


Figura 9: Distribuição da expressão gênica de IPMK em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

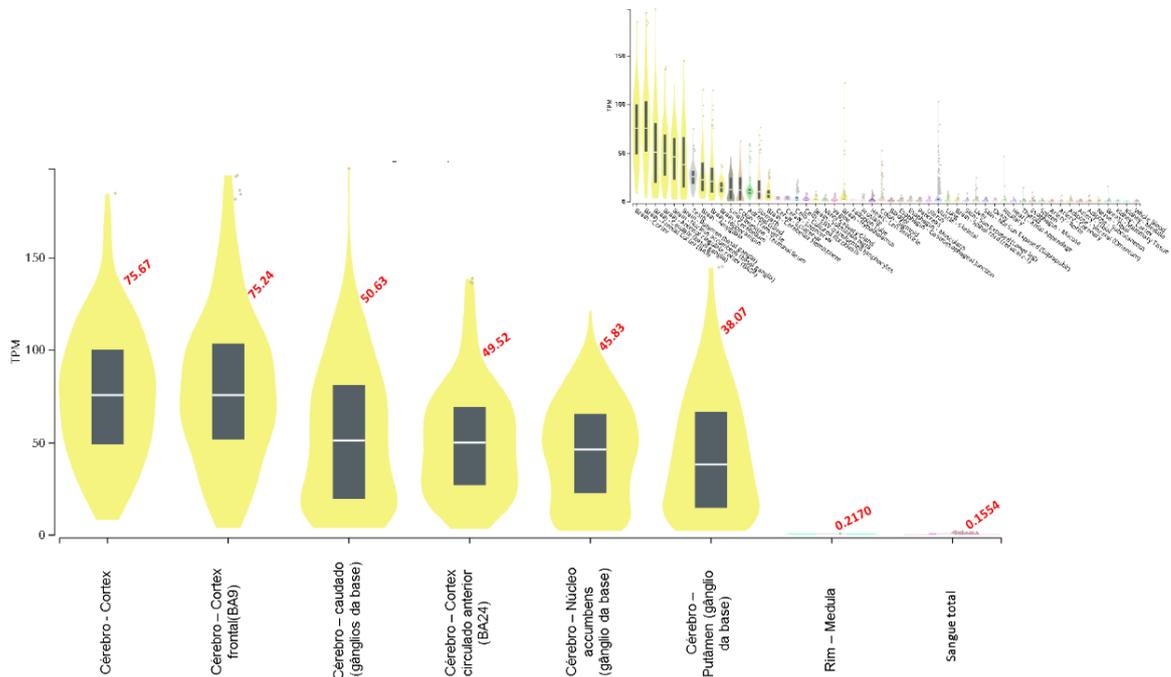


Figura 10: Distribuição da expressão gênica de ITPKA em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

A Figura 10 mostra análise para gene ITPKA com expressão tecido-específica no cérebro. Os seis mais expressos foram todos em tecidos cerebrais: córtex com 75.67 TPM, cortex frontal (BA9) com 75.24 TPM, caudado (gânglio da base) com 50.63 TPM, córtex circulado anterior (gânglio da base) com 45.83 TPM, putâmen

(gânglio da base) com 38.07 TPM. Os tecidos com baixíssima expressão desse gene foram medula de rim com 0.2170 TPM e sangue total com 0.1554 TPM.

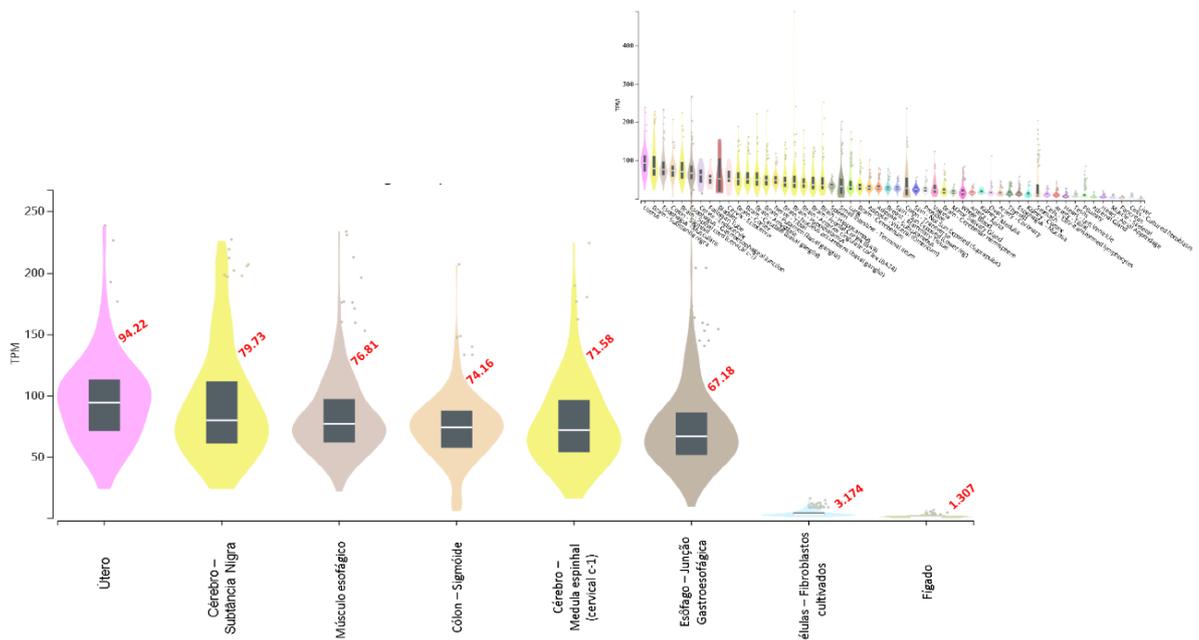


Figura 11: Distribuição da expressão gênica de ITPKB em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

A expressão do gene ITPKB parece ser ubíquota (Fig. 11), sendo os seis tecidos mais expressos para esse gene foram útero com 94.22 TPM, cérebro – substância nigra com 79.73 TPM, músculo esofágico com 76.81 TPM, cólon – sigmoide com 74.16 TPM, cérebro – medula espinhal (cervical c-1) com 71.58 TPM e esôfago – junção gastroesofágica com 67.18 TPM e dois menos expressos foram células de fibroblastos cultivados com 3.174 TPM e fígado com 1.307 TPM.

Diferentemente de ITPKA e ITPKB, o gene ITPKC (Fig. 12) não teve alta expressão em cérebro, os seis genes mais expressos em ITPKC foram mucosa esofágica com 124.9 TPM, pele exposta ao sol (parte inferior da perna) com 87.95 TPM, vagina com 78.28 TPM, pele não exposta ao sol (suprapúbica) com 78.09 TPM, pulmão com 72.24TPM e nervo tibial com 70.94 TPM, e os dois menos expresso foram no cérebro sendo amígdala com 5.378 TPM e cérebro putâmen (gânglio da base).

O gene INPP5J (Fig. 13) mostrou ser específico da tireoide com 357.2 TPM seguido do cérebro – cerebelo com 107.6 TPM, cérebro – hemisfério cerebelar com 88.57 TPM, rim – córtex com 20.73 TPM, intestino delgado - íleo terminal com 19.77 TPM e rim – medula com 19.44 os que tinham menos expressão foram fígado e

sangue total com 0.1907 e 0.08424 TPM respectivamente.

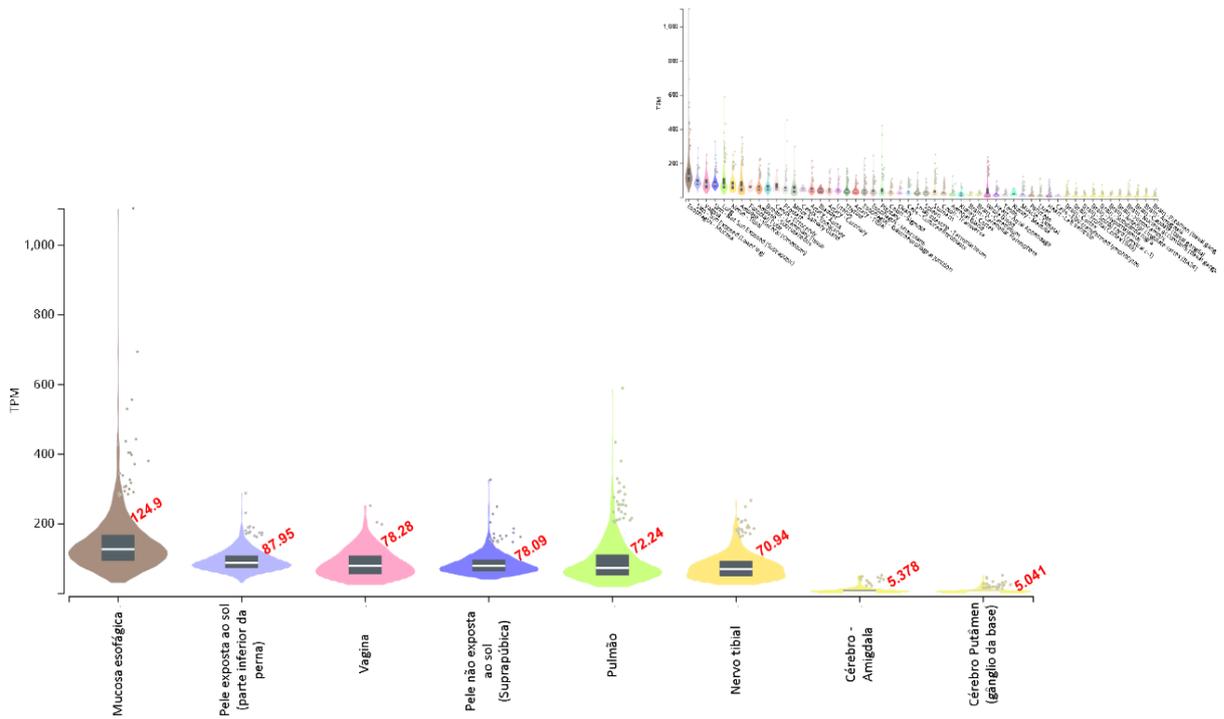


Figura 12: Distribuição da expressão gênica de ITPKC em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

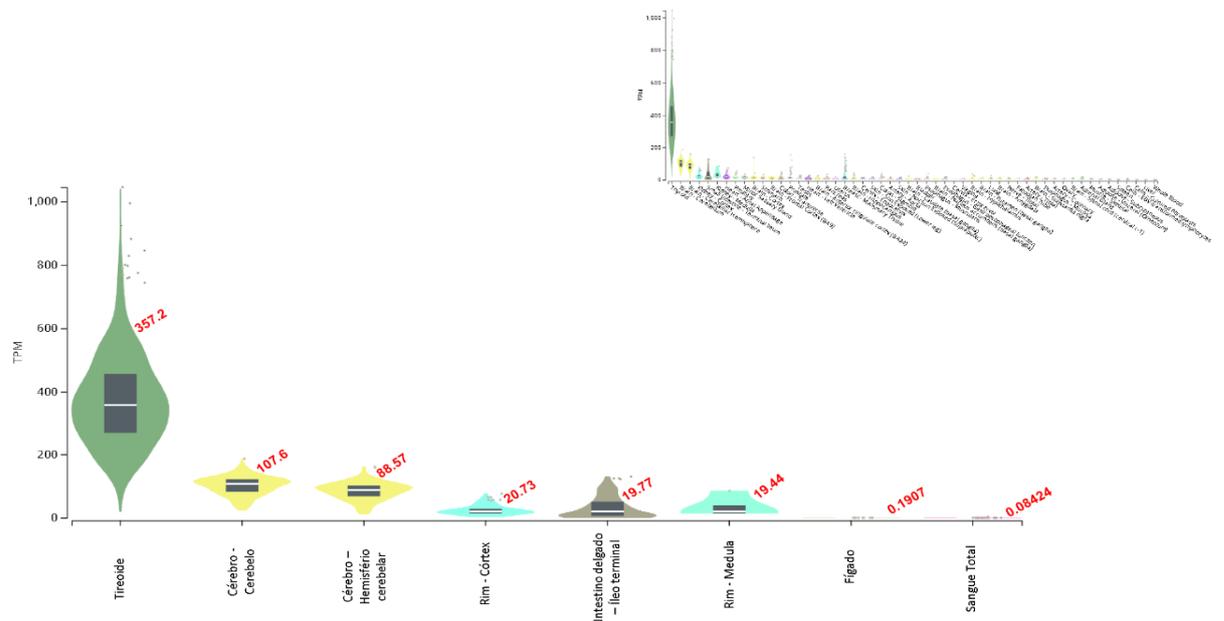


Figura 13: Distribuição da expressão gênica de INPP5J em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

O gene ITPK1 (Fig. 14) mostrou ser altamente expresso em cérebro com expressão no córtex frontal com 110.4 TPM, córtex com 104.5 TPM, medula espinhal(cervical c-1),

nervo tibial com 87.61 TPM, cérebro – córtex circulado anterior (BA24) e cérebro-hipocampo, enquanto no músculo esquelético e no pâncreas suas expressões foram baixas com 12.83 e 9.652 TPM, respectivamente.

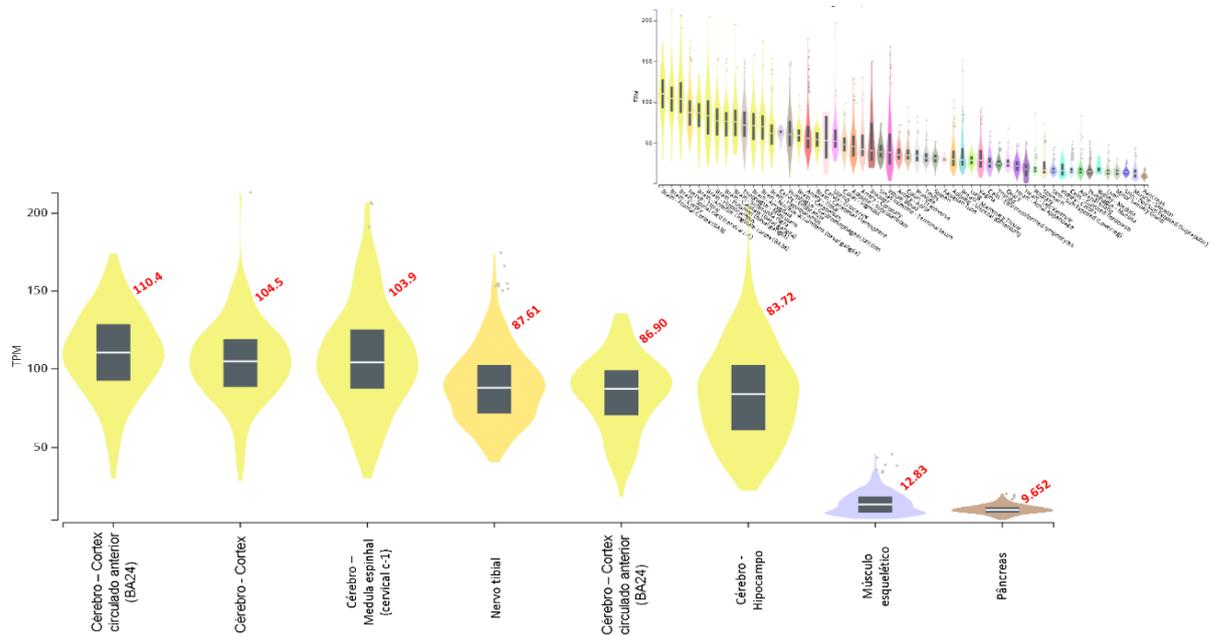


Figura 14: Distribuição da expressão gênica de ITPK1 em diversos tecidos.

Os seis tecidos mais expressos no gene IP6K1 (Fig. 15) foram cerebelo com 85.23 TPM e hemisfério cerebelar com 80.09 TPM, testículo com 61.54 TPM, córtex cerebral com 56.77 TPM, útero com 53.13 TPM e córtex frontal (BA9) com 49.55 TPM os dois menos expressos foram fígado com 8.635 TPM e coração – ventrículo esquerdo com 8.038 TPM.

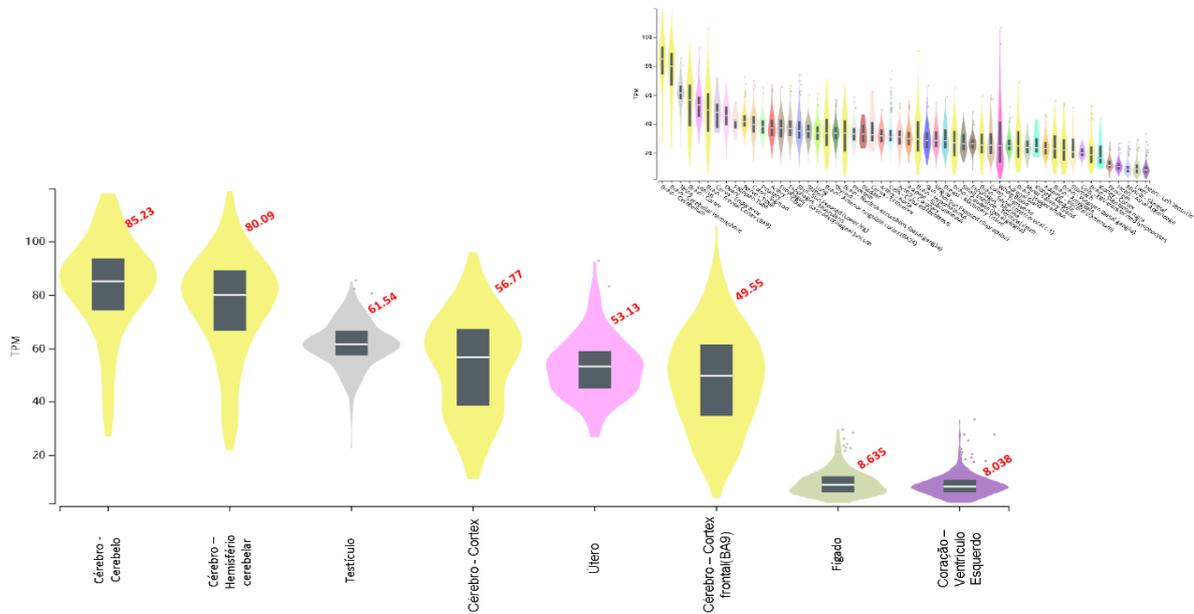


Figura 15: Distribuição da expressão gênica de IP6K1 em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

Os seis tecidos mais expressos no gene IP6K2 (Fig. 16) foram nervo tibial com 93.79 TPM, cerebelo e hemisfério cerebelar com ~92 TPM, colo do útero - endocérvice com 74.82 TPM, útero com 73.44 TPM e pituitária com 70.24 TPM, já no coração - ventrículo esquerdo e músculo esquelético suas expressões foram baixas com 9.930 e 8.504 TPM, respectivamente.

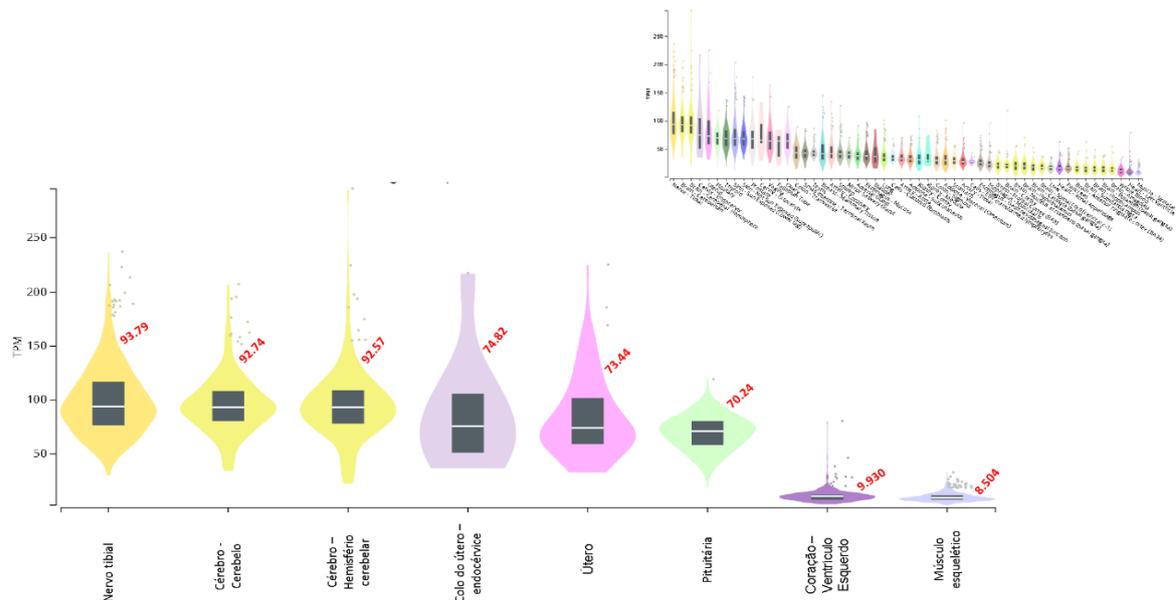


Figura 16: Distribuição da expressão gênica de IP6K2 em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

O gene IP6K3 (Fig. 17) mostrou ser específico no músculo esquelético com 218.6 TPM, seguido dos seguintes tecidos tireoide com 18.93 TPM, coração-

ventrículo esquerdo com 17.27 TPM, medula espinhal (cervical c-1), coração – apêndice atrial com 11.18 TPM e cólon sigmóide com 9.598 TPM, e os dois menos expressos para esse genes foram células- linfócitos transformados por EBV com 0.07786 TPM e sangue total com 0.03673 TPM.

Para o gene PPIP5K1 (Fig. 18) os tecidos mais expressos foram cerebelo com 56.69 TPM, hemisfério cerebelar com 52.93 TPM, pituitária com 19.85 TPM, testículo com 35.64 TPM, tireoide com 12.54 TPM e córtex cerebral com 10.97 TPM, e dois menos expressos foram coração – ventrículo esquerdo com 1.515 TPM e sangue total com 0.6672 TPM.

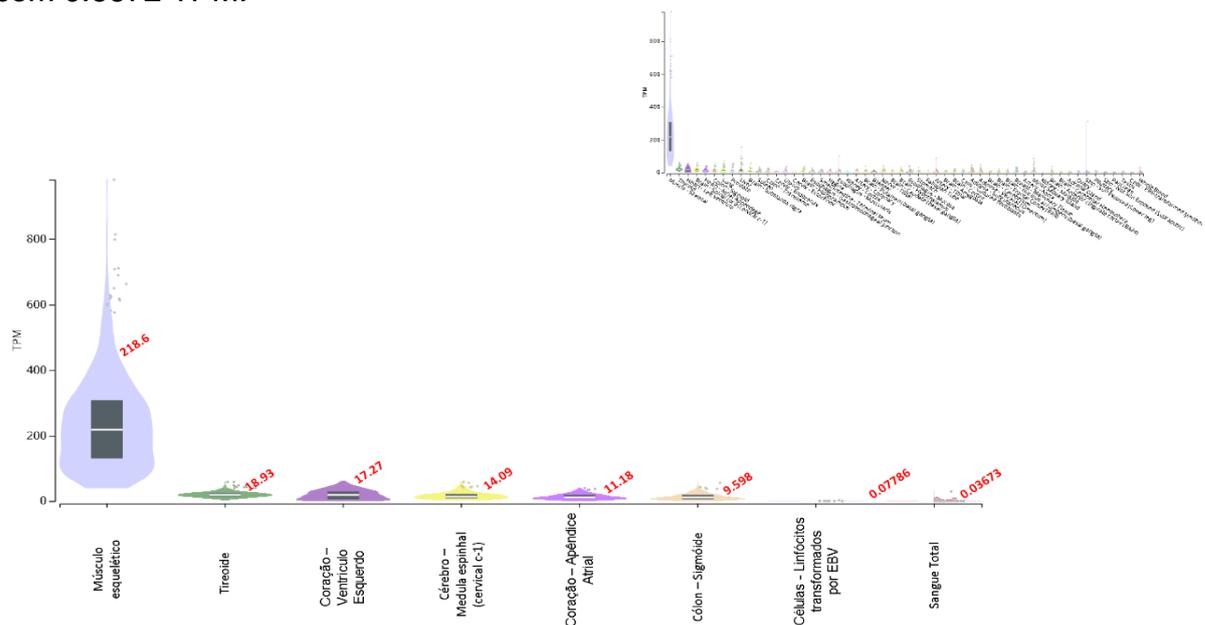


Figura 17: Distribuição da expressão gênica de IP6K3 em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

Para o gene PPIP5K2 (Fig. 19) os tecidos mais expressos foram nervo tibial com 11.54 TPM, células linfócitos transformados por EBV com 10.80 TPM, artéria coronária com 10.70 TPM, colo do útero – ectocérvice com 10.68 TPM, células fibroblastos cultivados com 10.48 TPM e ovário com 10.29 TPM e os dois menos expressos foram sangue total e músculo esquelético com 1.628 e 0.8997 TPM respectivamente.

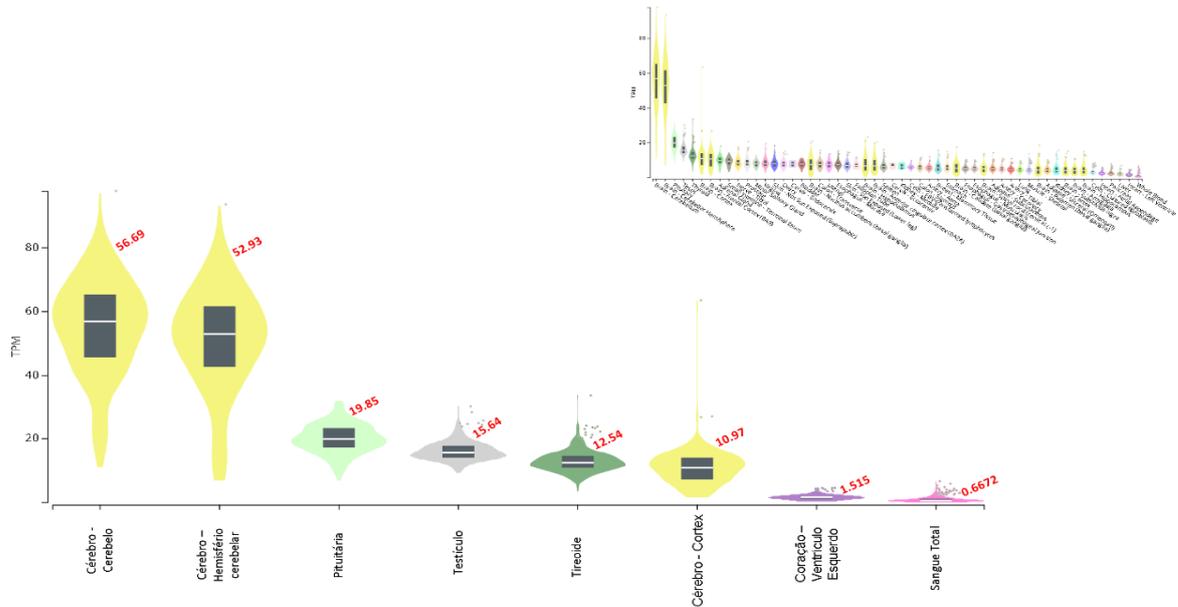


Figura 18: Distribuição da expressão gênica de PPIP5K1 em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

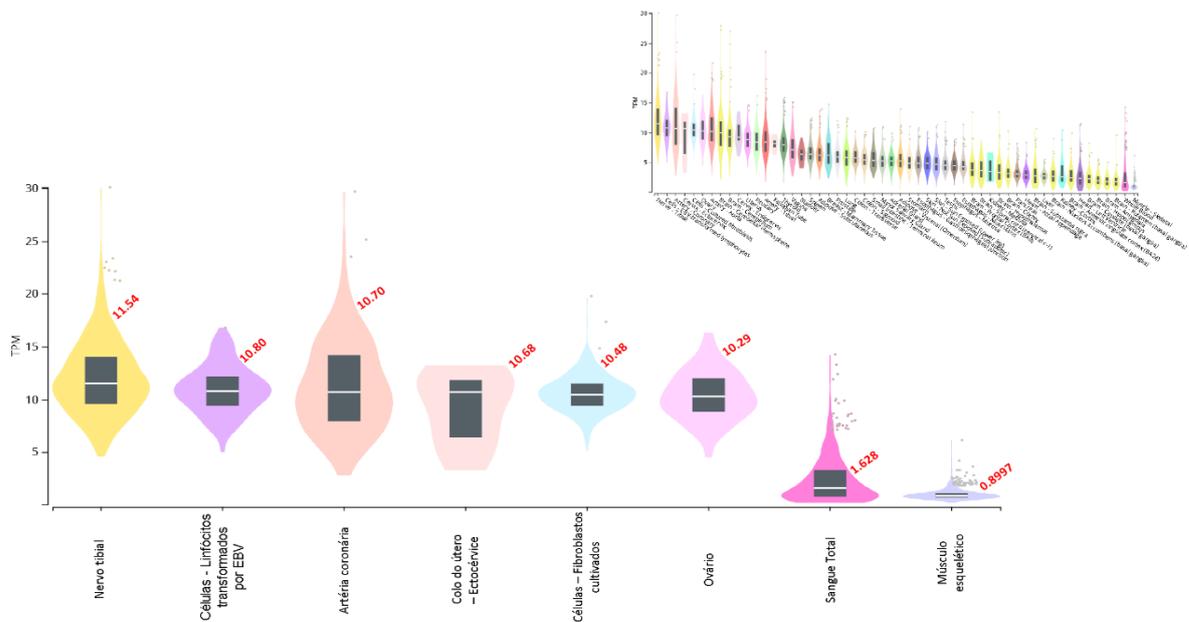


Figura 19: Distribuição da expressão gênica de PPIP5K2 em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

Dos seis tecidos mais expressos no gene IPPK (Fig. 20) foram a pele teve média de 40,09 TPM, mucosa esofágica com 35.49 TPM, testículo com 20.56 TPM, vagina com 19.85 TPM e cérebro – cerebello com 16.20 TPM e dois menos expressos foram fígado com 2.109 TPM e sangue total com 1.839 TPM.

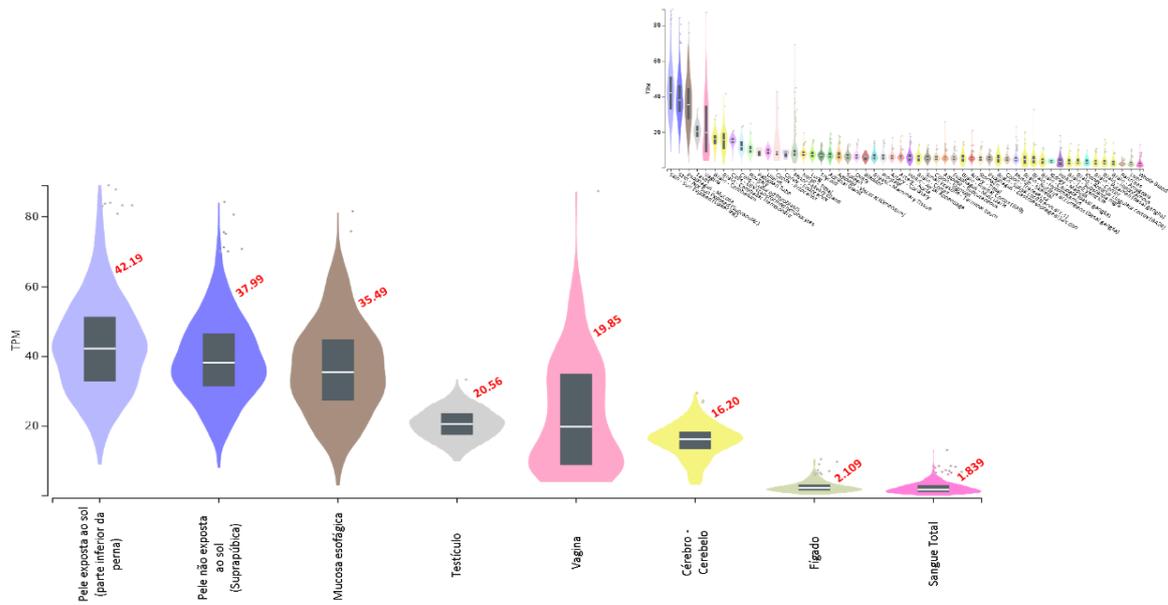


Figura 20: Distribuição da expressão gênica de IPPK em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

Os seis tecidos mais expressos no gene NUDT3 (Fig. 21) foram nervo tibial com 58.18 TPM, e em várias partes do cérebro com média de 47.54 TPM e os dois menos expressos foram sangue total com 6.598 TPM e fígado com 6.271 TPM.

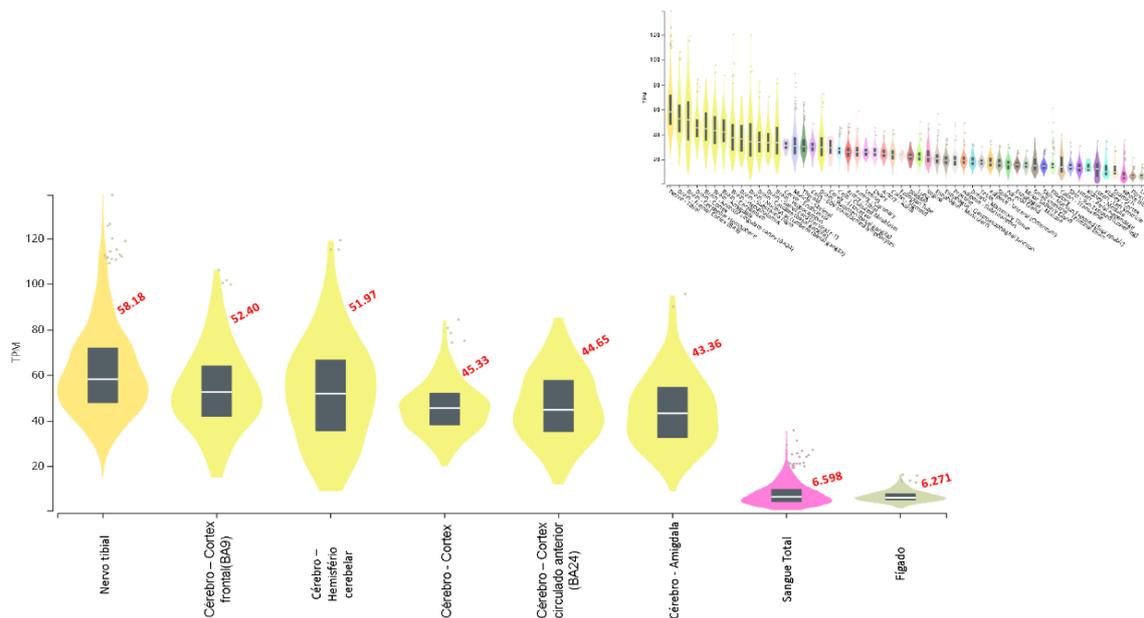


Figura 21: Distribuição da expressão gênica de NUDT3 em diversos tecidos (eixo x) em transcritos por milhão (eixo y).

Para comparar a expressão de todos os genes para biossíntese de polifosfatos de inositol, realizamos análise multigênica da expressão com uso de plataforma GTEx.

Figura 22 mostra o heat-map de expressão em 54 tipos celulares e teciduais, revelando os altos níveis de expressão para os genes INPP5J em tireoide (357 TPM), IP6K3 no musculo esquelético (218,6 TPM), ITPKC em mucosa esofágica (125 TPM). Os tecidos de pâncreas e de fígado se destacam por apresentar níveis baixos da maioria de genes.

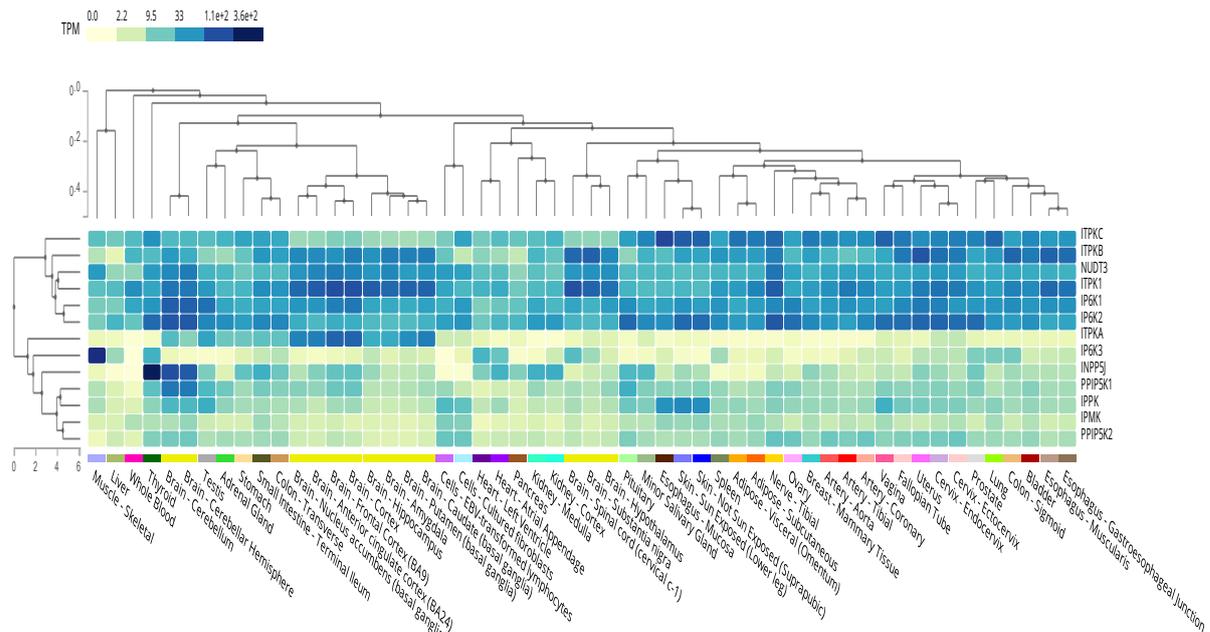


Figura 22: Heat map de expressão gênica em diferentes tipos teciduais e celulares.

A Tabela 3 mostra a distribuição da expressão dos genes que codificam as enzimas do metabolismo do polifosfato e polifosfato de Inositol por tipo de tecido. O cérebro foi tecido em que a maioria (69%) dos genes se mostraram mais expressos, seguido de nervo tibial, útero, testículos, tireoide e pele não exposta ao sol com 31% dos genes.

Figura 23 mostra heat-map de expressão no cérebro, revelando o conjunto de genes mais expressos e presentes praticamente em todo o cérebro foi constituído por ITPKA/B, IP6K1/2, ITPK1, NUOT3, cuja expressão garante a síntese de IP3 a IP6, precursores de pirofosfatos de inositol. Ainda, os dados indicam forte expressão específica de PPIP5K1 no cerebelo, sugerindo que esse tecido tem níveis elevados de IP7 e IP8, que pode indicar demanda elevada por pirofosforilação proteica e/ou modificação alostérica de proteínas-alvo. Por exemplo, o recrutamento de proteína Akt para fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfatos (PIP3) na membrana plasmática é necessário para que ocorra sua ativação completa. A interação do 5-IP7 com Akt resulta em

bloqueio a interação Akt-PIP3 (Chakraborty *et al.*, 2010).

Tabela 3: Expressão dos genes da biossíntese de polifosfatos de inositol em diferentes tecidos.

GENES	CÉREBRO	NERVO TIBIAL	ÚTERO	TESTÍCULOS	TIREOIDE	PELE - NÃO EXPOSTA AO SOL (SUPRAPÚBICA)	CÉLULAS - LINFÓCITOS TRANSFORMADOS POR EBV	CÉLULAS - FIBROBLASTOS CULTIVADOS	COLO DO ÚTERO - ENDOCÉRVIX	ESÔFAGO - MUCOSA	ESÔFAGO - MUSCULARIS	PELE - EXPOSTA AO SOL (PARTE INFERIOR DA PERNA)	VAGINA	CÓLON - SIGMÓIDE	MÚSCULO - ESQUELÉTICO	PITUITÁRIA	ARTÉRIA - CORONÁRIA	PULMÃO	
IPMK	6,274					6,742	8,453	7,692		6,600									
ITPKA	59,38																		
ITPKB	75,65		94,22								76,81			74,16					
ITPKC						78,09				124,9		87,95	78,28						72,24
INPP5J	98,08				357,2														
ITPK1	101,43	87,61																	
IP6K1	74,03		53,13	61,54															
IP6K2	92,65	93,79	73,44						74,82										
IP6K3					18,93										219				
PPIP5K1	54,81			15,64	12,54												19,85		
PPIP5K2		11,54					10,80	10,48	10,68										
IPPK			20,56			37,99				35,49		42,19	19,85				10,70		
NUDT3	48,58	58,18																	

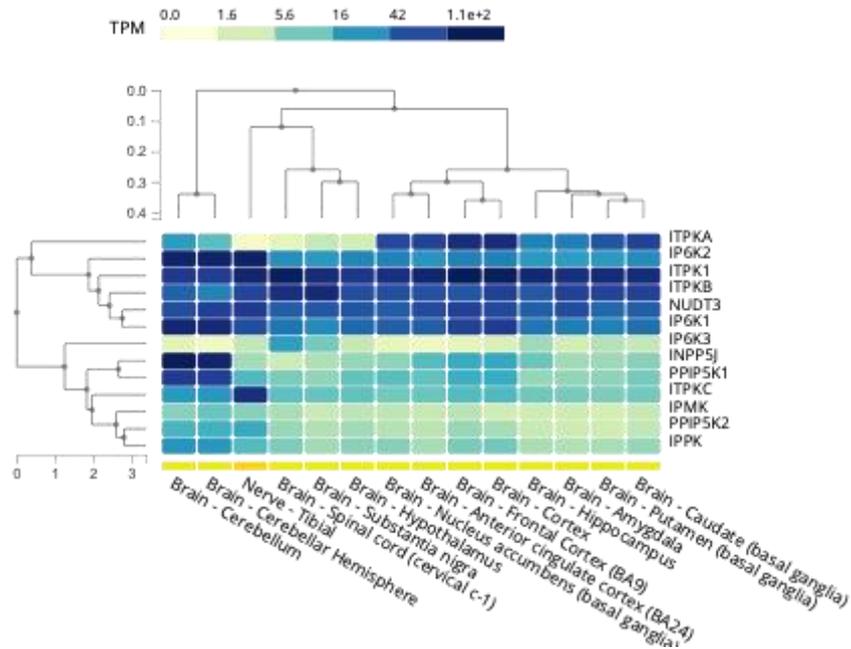


Figura 23: Heat map de expressão de genes de biossíntese de polifosfatos de inositol em tecidos do cérebro.

4.4 Análise da expressão dos genes envolvidos na biossíntese do polifosfato e pirofosfato de inositol em diferentes tipos tumorais.

O banco de dados GEPIA2 foi usado para realização de uma análise comparativa da expressão dos genes em tecidos normais e tumorais. A primeira enzima envolvida na via biossintética do polifosfato e pirofosfatos de inositol é codificado pelo IPMK. A análise comparativa entre tecido normal e tumoral mostrou que em leucemia mieloide aguda (LAML) e glioma de grau inferior do cérebro (LGG) tiveram expressão aumentada em duas vezes em relação ao controle. Já no adenocarcinoma de estômago (STAD) a expressão foi quatro vezes maior quando comparada com tecido normal (Fig. 24).

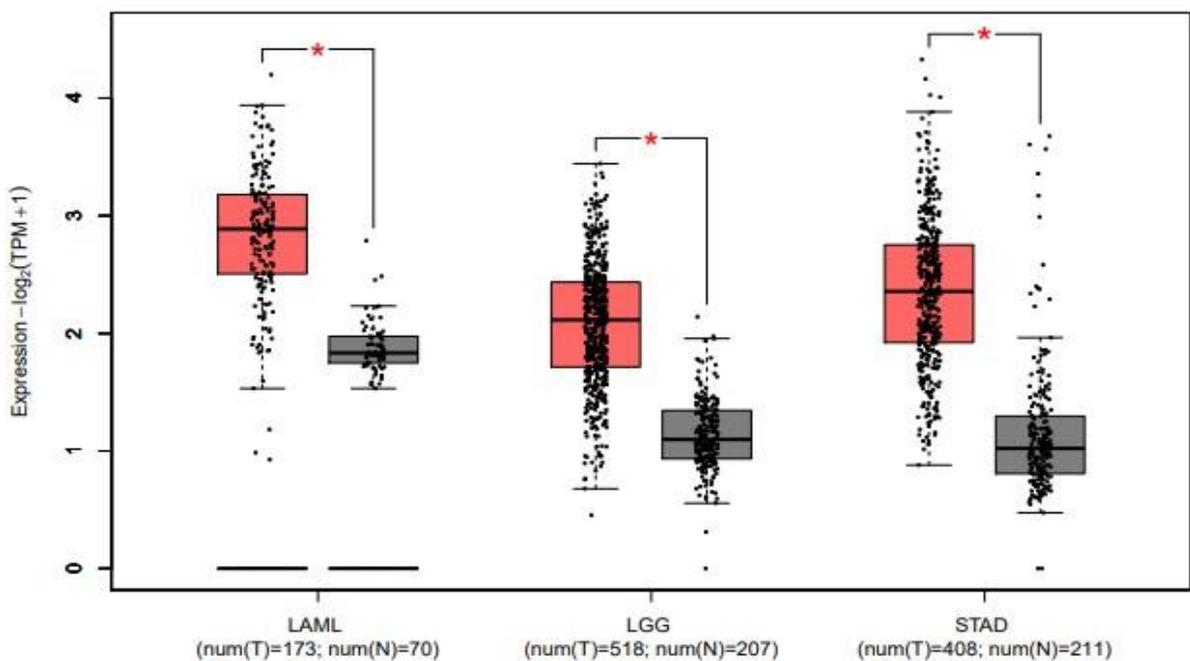
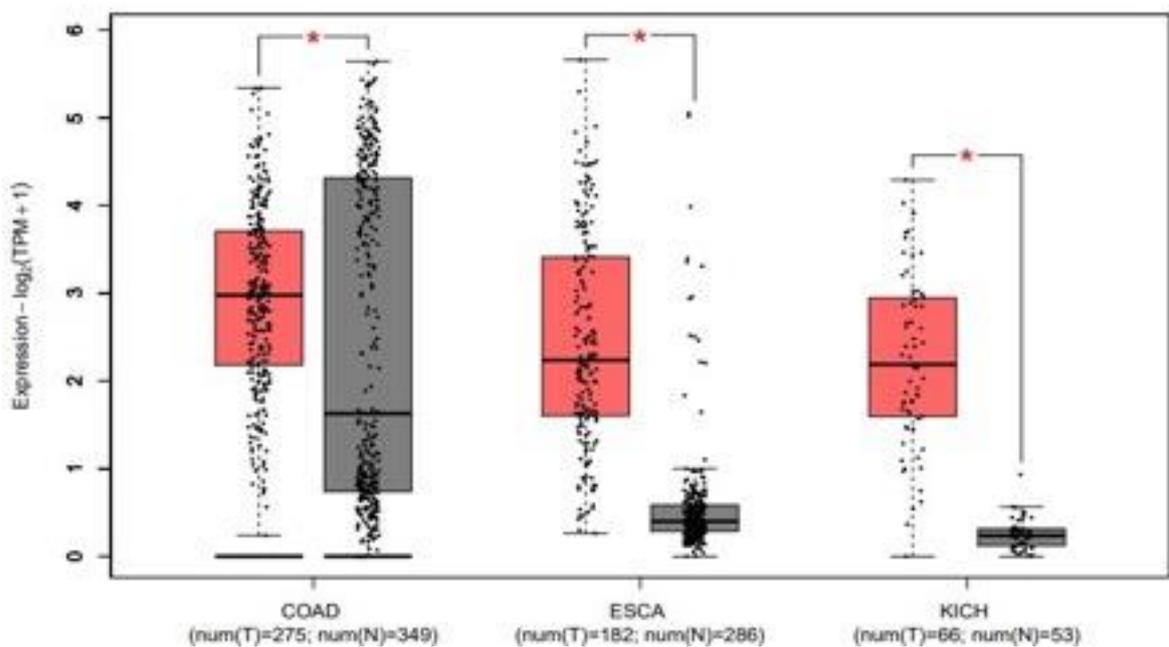


Figura 24: Expressão do gene IPMK em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho) de leucemia mieloide aguda, glioma de grau inferior do cérebro e adenocarcinoma de estômagos. Dados extraídos da plataforma GEPIA 2. *P < 0,01.

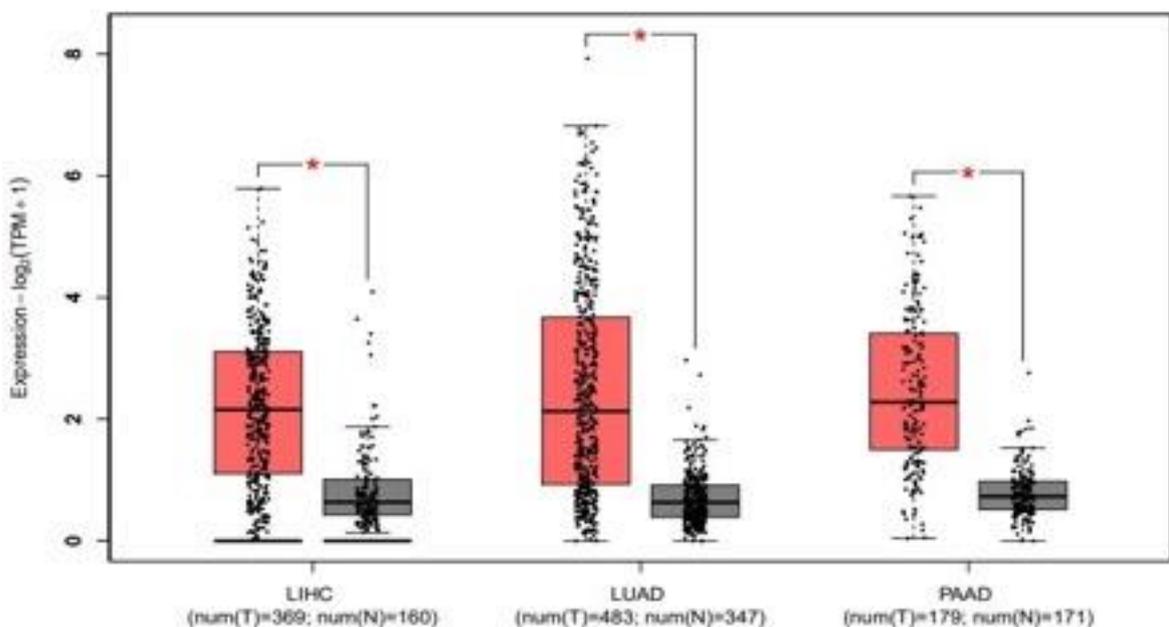
O segundo gene da via é o ITPKA. A Figura 25 mostra uma análise comparativa entre tecido normal e tumoral. Em alguns tipos de câncer, ITPKA teve aumento da expressão em diversos tumores em relação aos tecidos normais, enquanto em outros foi observado a diminuição. No adenocarcinoma de cólon (COAD) foi de duas vezes maior, enquanto no carcinoma esofágico (ESCA) foi de onze vezes maior, no carcinomacromófono de células renais (KICH) foi de dezenove vezes maior (Fig. 25A). Já no carcinoma hepatocelular (LIHC) e adenocarcinoma de pulmão (LUAD) tiveram

um aumento de seis vezes quando comparado com o normal, O adenocarcinoma pancreático (PAAD) teve um aumento de cinco vezes (Fig. 25B). Entretanto em outros tipos de câncer a expressão de ITPKA foi diminuída quando comparada com tecidos saudáveis. No glioblastoma multiforme (GBM) teve uma diminuição de doze vezes, na LAML a diferença foi de vinte e quatro vezes, no LGG foi de dez vezes menor (Fig. 25C), enquanto no feocromocitoma e paraganglioma (PCPG) a diminuição foi de sete vezes e em tumores de células germinativas testiculares (TGCT) a diferença foi de nove vezes (Fig. 25D).

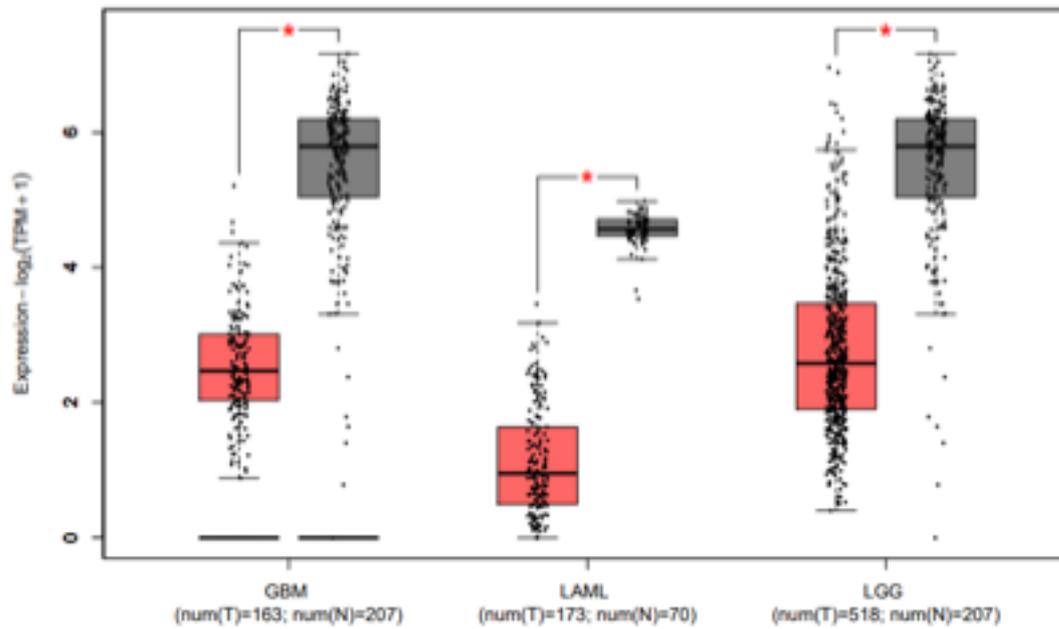
A



B



C



D

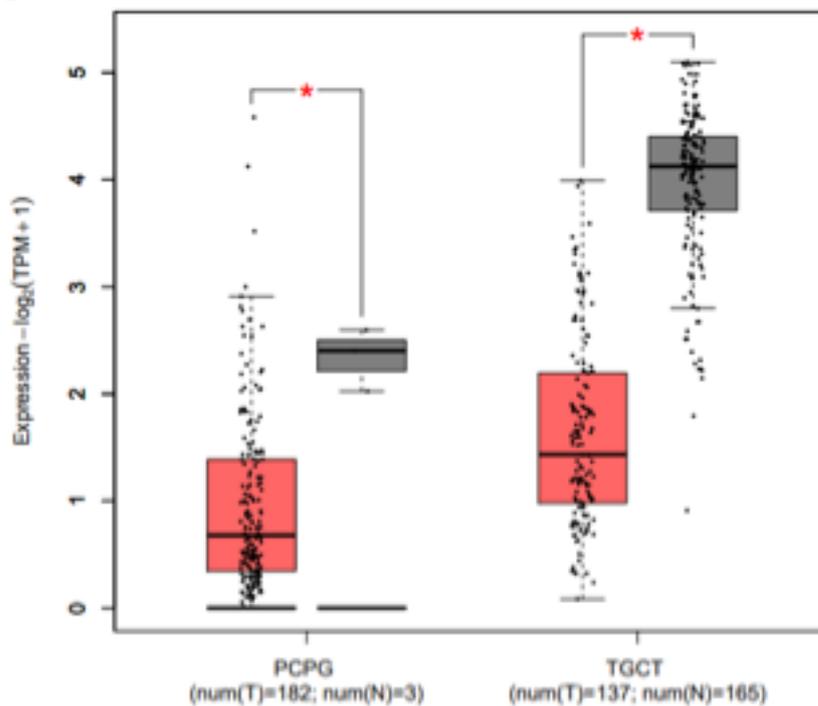
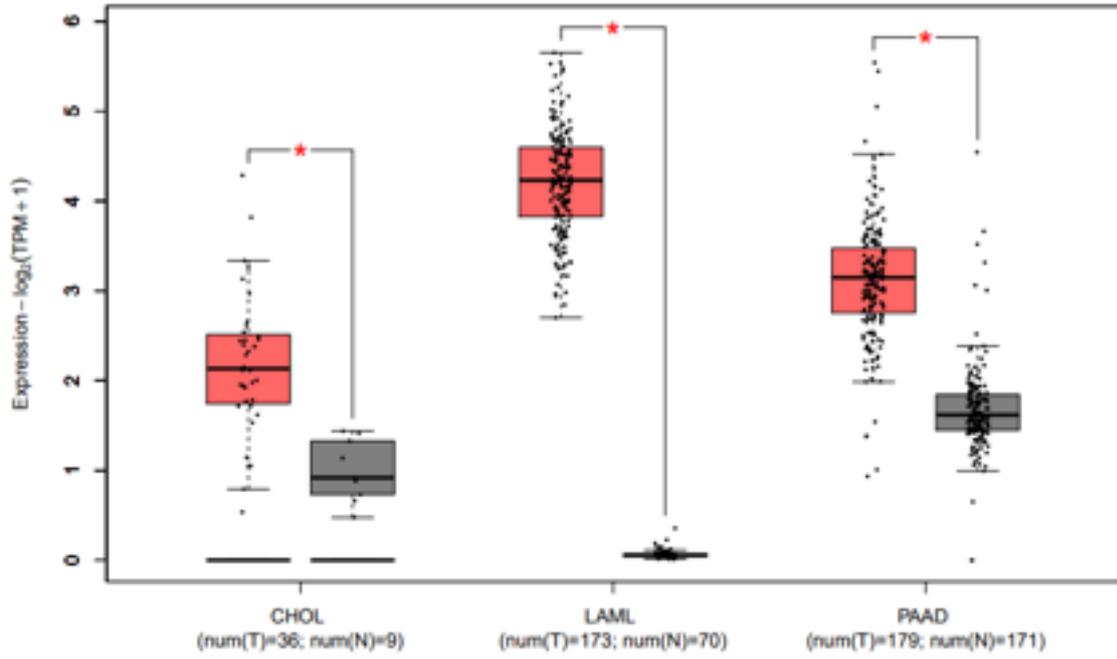


Figura 25: Expressão do gene ITPKA em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). (A) Aumento da expressão em adenocarcinoma de cólon, carcinoma esofágico, cromofóbico renal e em (B) carcinoma hepatocelular de fígado, adenocarcinoma de pulmão e adenocarcinoma pancreático. (C) Diminuição da expressão em glioblastoma multiforme, leucemia mieloide aguda, glioma de grau inferior do cérebro e em (D) feocromocitoma e paraganglioma e tumores de células germinativas testiculares. Dados extraídos da plataforma GEPIA 2. *P < 0,01.

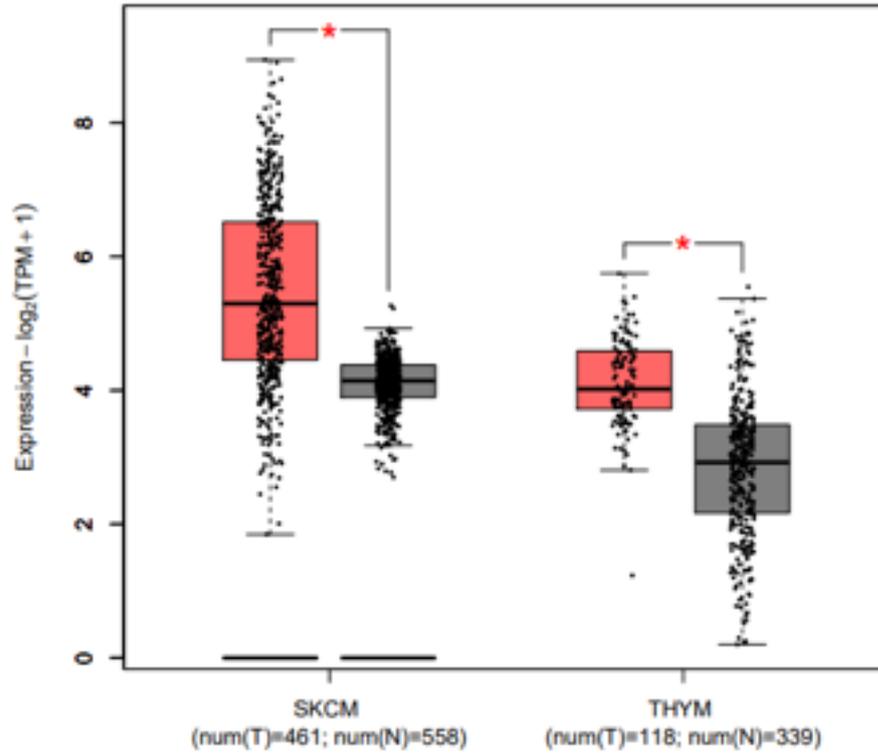
As análises comparativas entre tecido normal e tumoral para o gene ITPKB revelaram um aumento da sua expressão nos seguintes tecidos tumorais: colangiocarcinoma (CHOL) com aumento de três vezes; leucemia mieloide aguda, com quatrocentos e quarenta e quatro vezes mais; adenocarcinoma pancreático com três vezes mais (Fig. 26A); melanoma cutâneo de pele (SKCM) e timoma (THYM) tiveram aumento de duas vezes (Fig. 26B). Todavia em outros tipos de câncer as análises mostram uma diminuição da expressão do gene ITPKB. Dentre eles estão o carcinoma urotelial de bexiga (LBCA) e o carcinoma de células escamosas cervicais (CESC), com uma diminuição de três vezes, e de quatro vezes em adenocarcinoma de cólon (Fig. 26C). O carcinoma cromóforo de células renais o carcinoma de células papilares renais (KIRP) apresentaram a diminuição de duas vezes, enquanto em adenocarcinoma de reto (READ) a diferença foi de cinco vezes e nos tumores de carcinoma endometrial do corpo uterino (UCEC) e carcinossarcoma uterino (UCS) foi de seis vezes (Fig. 26D).

Nas análises comparativas entre tecidos normais e tumorais do gene INPP5J foi observado que alguns tipos de câncer apresentaram forte aumento da sua expressão, como no CHOL com vinte e três vezes mais, KICH com aumento de sete vezes e PCPG com aumento de vinte e seis vezes (Fig. 27A). Por outro lado, alguns outros tipos de câncer tiveram a diminuição da expressão de INPP5J, como no GBM com sete vezes menos, carcinoma renal de células claras de rim (KIRC) com diminuição de quarenta e duas vezes, KIRP de dez vezes menos, LAML de quarenta e nove vezes menos (Fig. 27 B). Em glioma de grau inferior do cérebro a diminuição foi de quatro vezes, em PAAD foi de três vezes, em SKCM oito vezes (Fig. 27C). Já em TGCT e carcinoma de tireoide (THCA) a diminuição da expressão desse gene foi de duas vezes (Fig. 27 D).

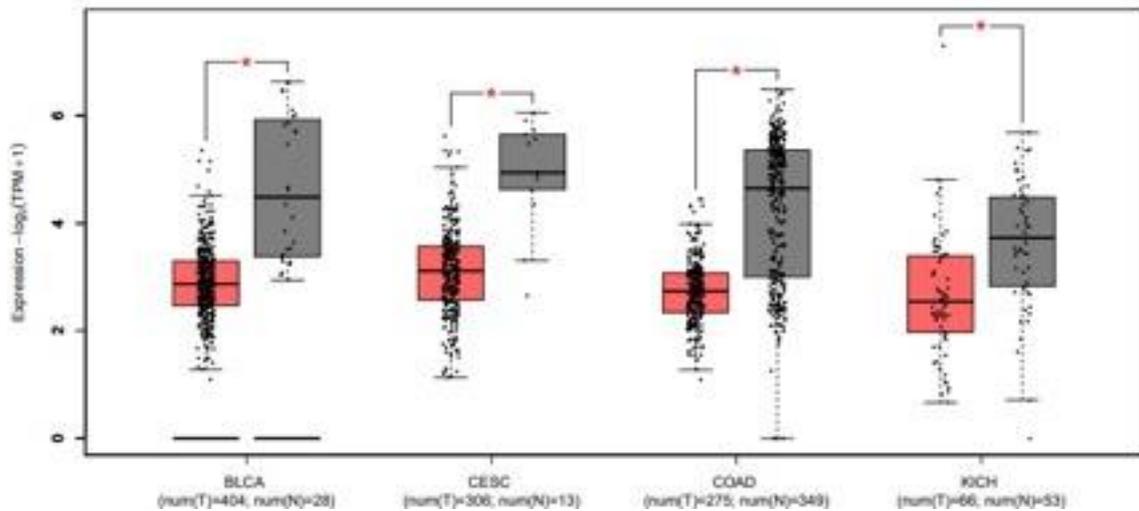
A



B



C



D

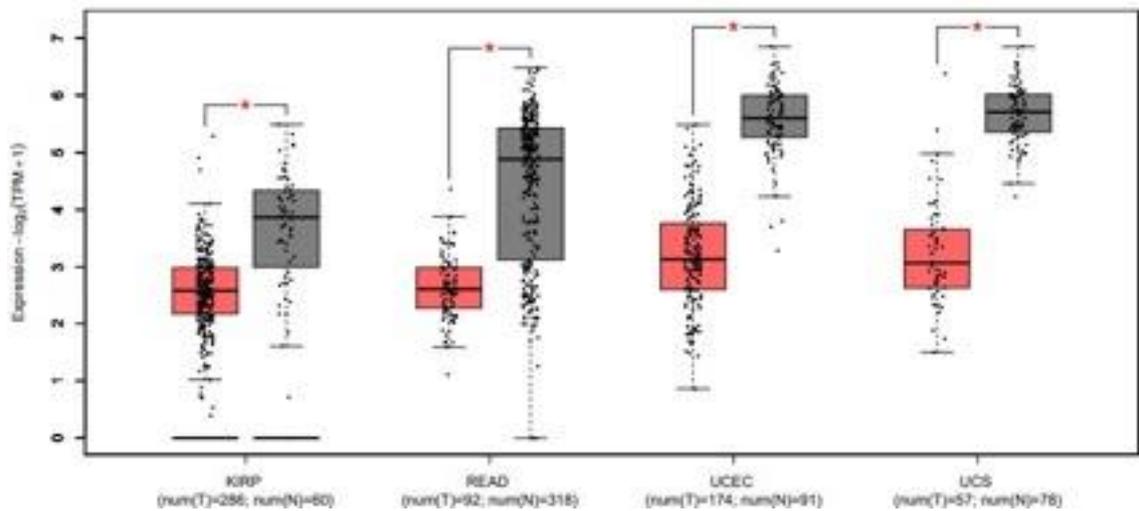
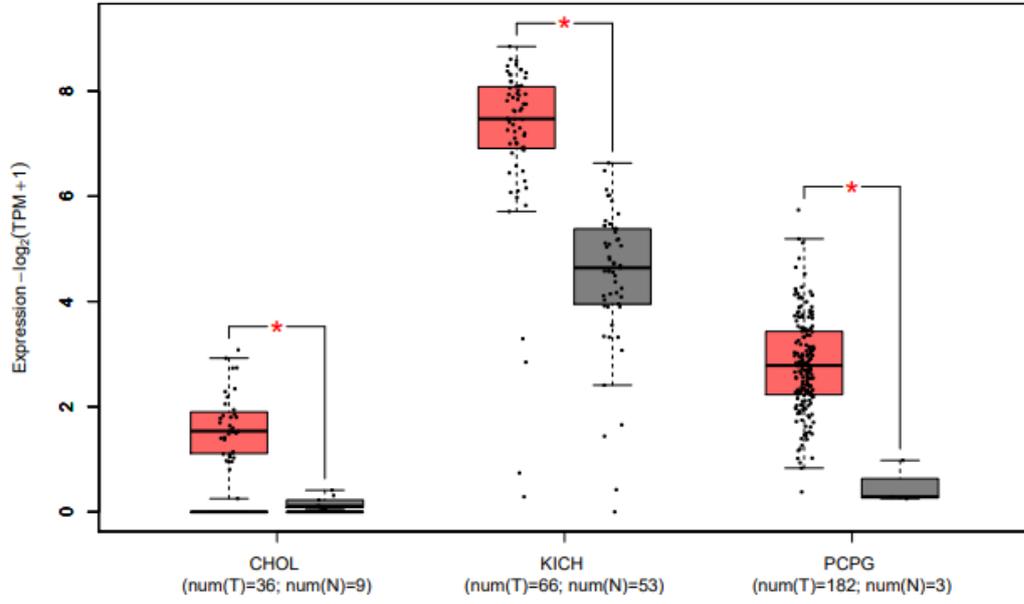
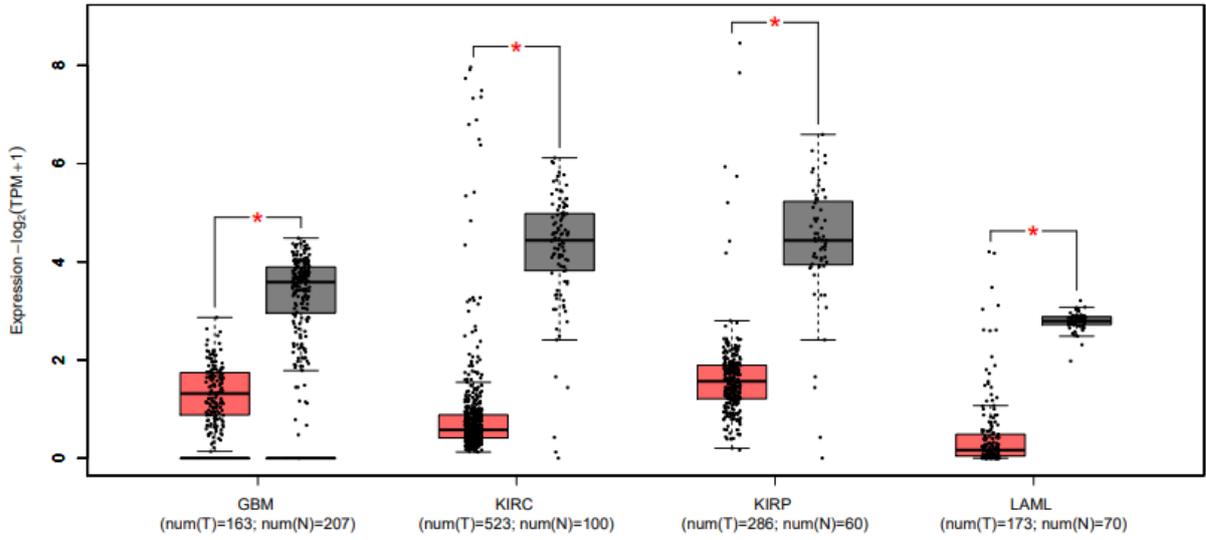
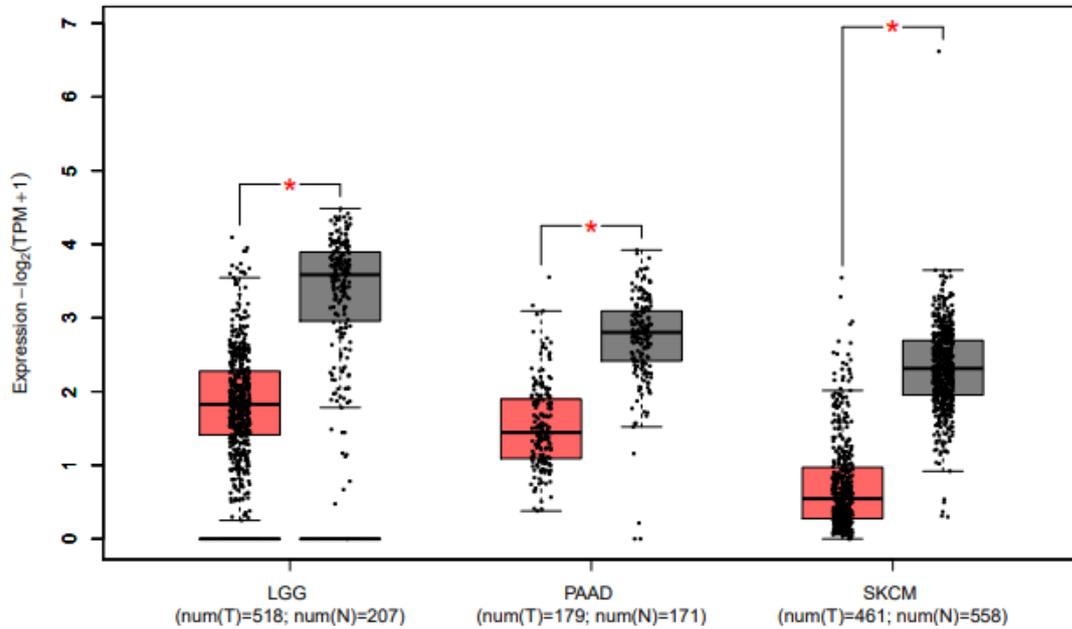


Figura 26: Expressão do gene ITPKB em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). (A) Aumento da expressão em colangiocarcinoma, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma pancreático e (B) em melanoma cutâneo de pele, timoma. (C) Diminuição da expressão em carcinoma urotelial de bexiga, carcinoma de células escamosas cervicais, adenocarcinoma de cólon, cromofóbico renal e (D) em carcinoma de células papilares renais, adenocarcinoma de reto, carcinoma endometrial do corpo uterino e carcinosarcoma uterino. Dados obtidos na plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$.

A**B**

C



D

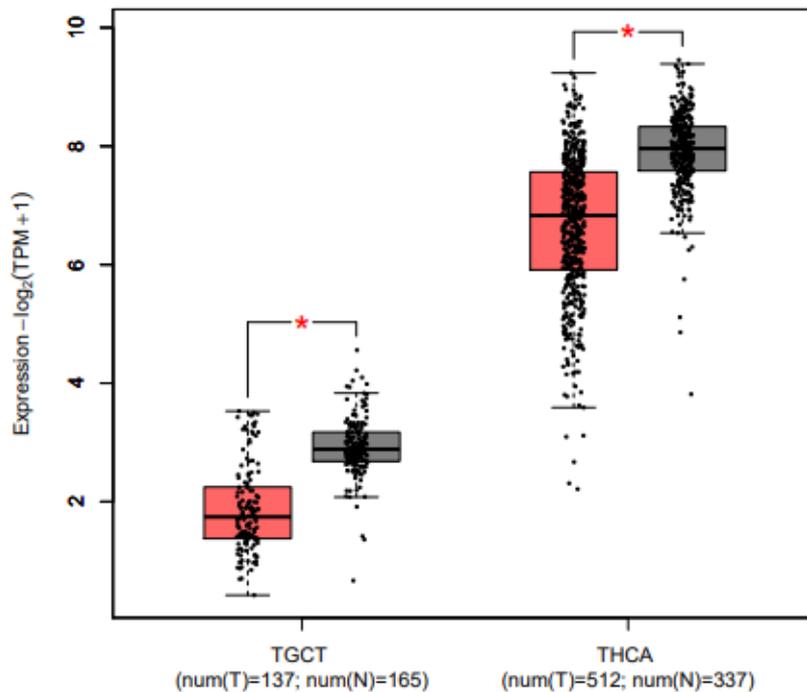


Figura 27: Expressão do gene INPP5J em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). (A) Aumento da expressão em colangiocarcinoma, carcinoma cromóforo de células renais e feocromocitoma e paraganglioma. (B) Diminuição da expressão em glioblastoma multiforme, carcinoma renal de células claras, carcinoma de células papilares renais, leucemia mieloide aguda e (C) em glioma de grau inferior do cérebro, adenocarcinoma pancreático, melanoma cutâneo de pele. D diminuição da expressão de tumores de células germinativas de testículos e carcinoma de tireoide. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$.

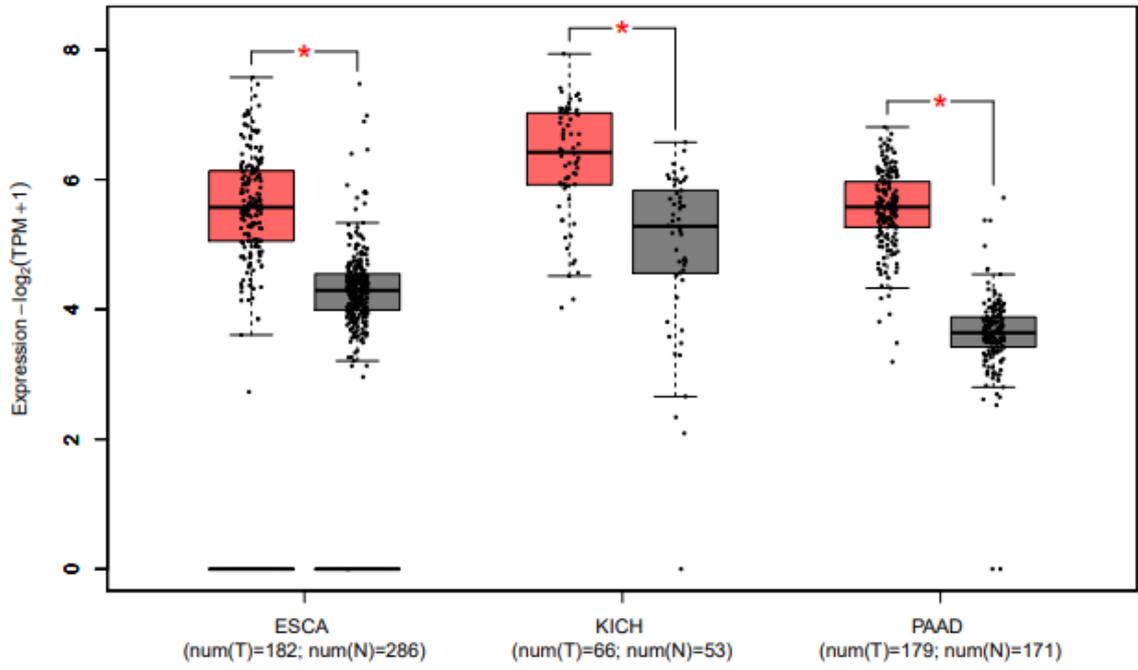
Nas análises comparativas entre tecido normal e tumoral para o gene ITPK1 foi novamente observado padrão de expressão diferenciado dependendo do tipo de tumor. No caso do carcinoma esofágico e carcinoma cromóforo de células renais, com aumento de duas vezes e adenocarcinoma pancreático com um aumento de quatro vezes (Fig. 28A). Também foi observado aumento em feocromocitoma e paraganglioma, de duas vezes, e em melanoma cutâneo de pele, de quatro vezes, além do adenocarcinoma de estômago, de duas vezes (Fig. 28 B). Já no carcinoma de células escamosas cervicais e glioblastoma multiforme, foi detectado uma queda da expressão de duas vezes, e no carcinossarcoma uterino de três vezes, em relação aos tecidos saudáveis (Fig. 28 C).

A Figura 29 mostra perfil de expressão do gene IP6K1 em tecidos normais e em tecidos tumorais revelando aumento da expressão do gene IP6K1 em dois tipos de câncer, em colangiocarcinoma, com aumento de três vezes e em leucemia mieloide aguda, com duas vezes mais (Fig. 29A). Já no tumor de testículo de células germinativas foi observado uma diminuição da sua expressão de duas vezes em relação aos tecidos saudáveis (Fig. 29B).

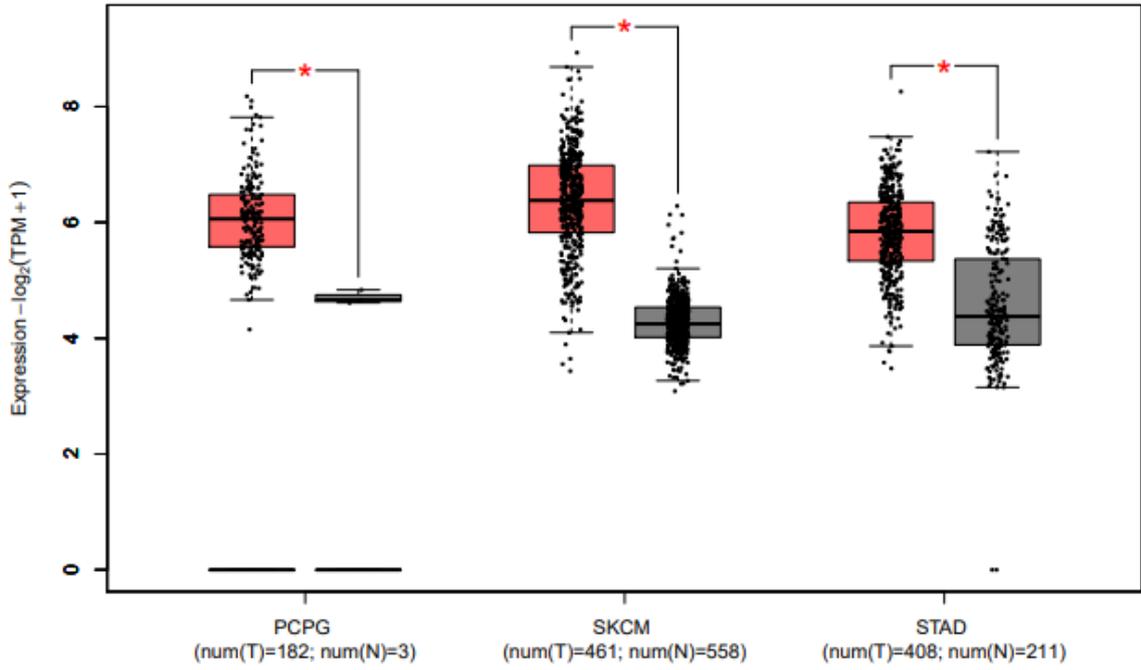
A comparação da expressão de IP6K2 em tecidos normais com tecidos tumorais revelou o aumento de duas vezes no colangiocarcinoma, semelhante ao gene IP6K1, no linfoma difuso de grandes células B (DLBC) de três vezes, no glioblastoma multiforme de duas vezes mais e no timoma o aumento foi de seis vezes (Fig. 30 A).

Além desses tipos de câncer, outros apresentaram padrão de uma diminuição da expressão de IP6K2. como no caso do carcinoma adenocortical (ACC) com duas vezes menos, melanoma cutâneo de pele, com diminuição de três vezes e no carcinossarcoma uterino como duas vezes de diferença, todos comparados com seus respectivos tecidos saudáveis (Fig. 30B).

A



B



C

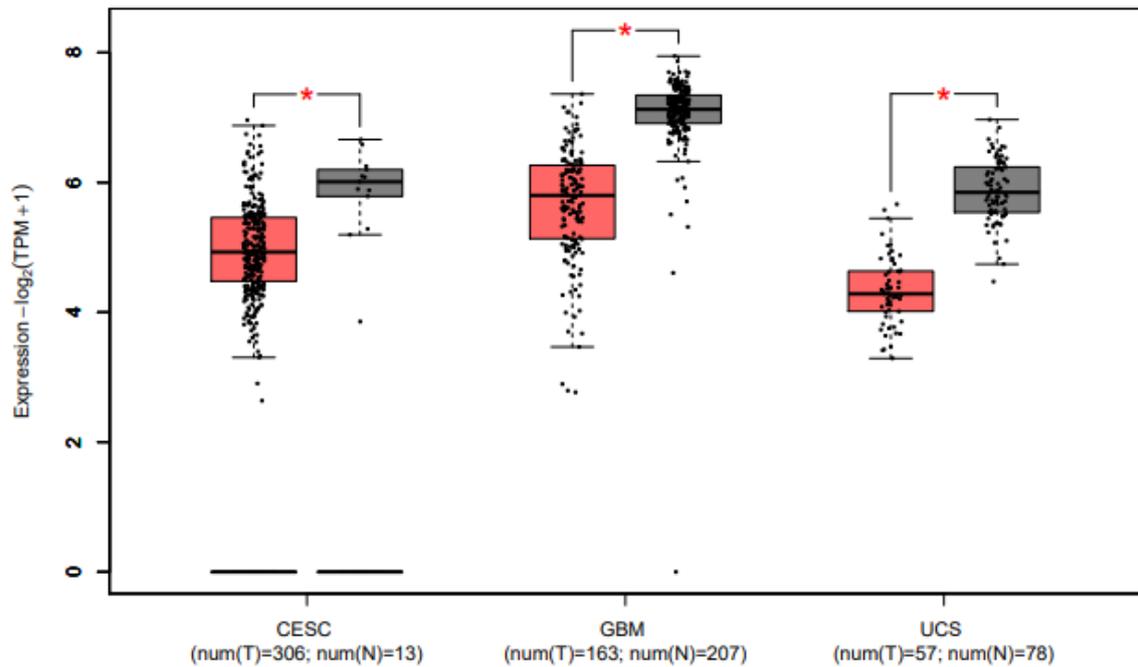
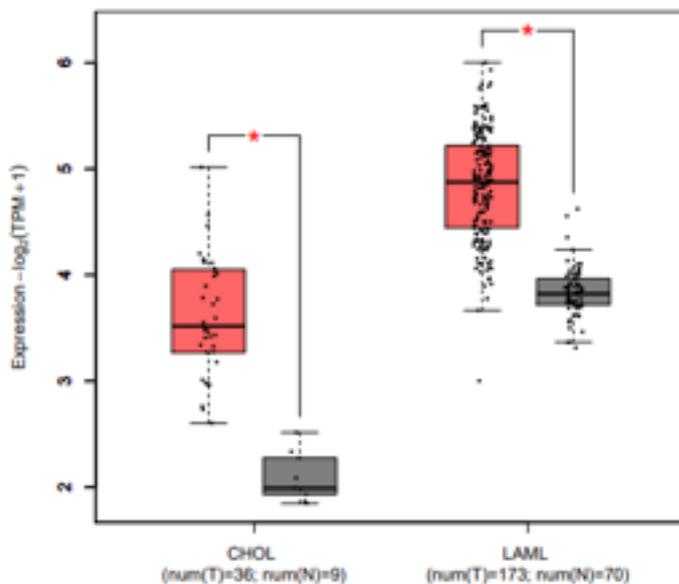


Figura 28: Expressão do gene ITPK1 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). (A) Aumento da expressão em carcinoma esofágico, cromofóbico renal, adenocarcinoma pancreático e (B) em feocromocitoma e paraganglioma, melanoma cutâneo de pele e adenocarcinoma de estômago. (C) Diminuição da expressão em carcinoma de células escamosas cervicais, glioblastoma multiforme e carcinosarcoma uterino. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$

A



B

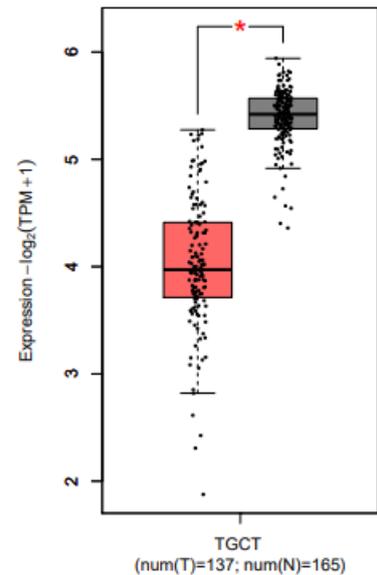
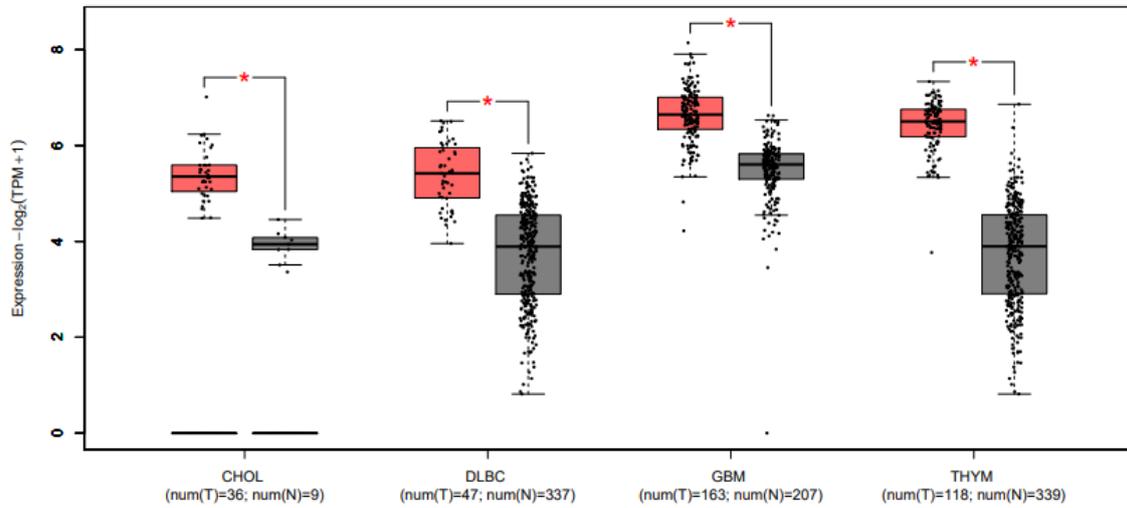


Figura 29: Expressão do gene IP6K1 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). (A) Aumento da expressão em colangiocarcinoma e leucemia mieloide aguda. (B) Diminuição da expressão em tumor de testículo de células germinativas. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$.

A



B

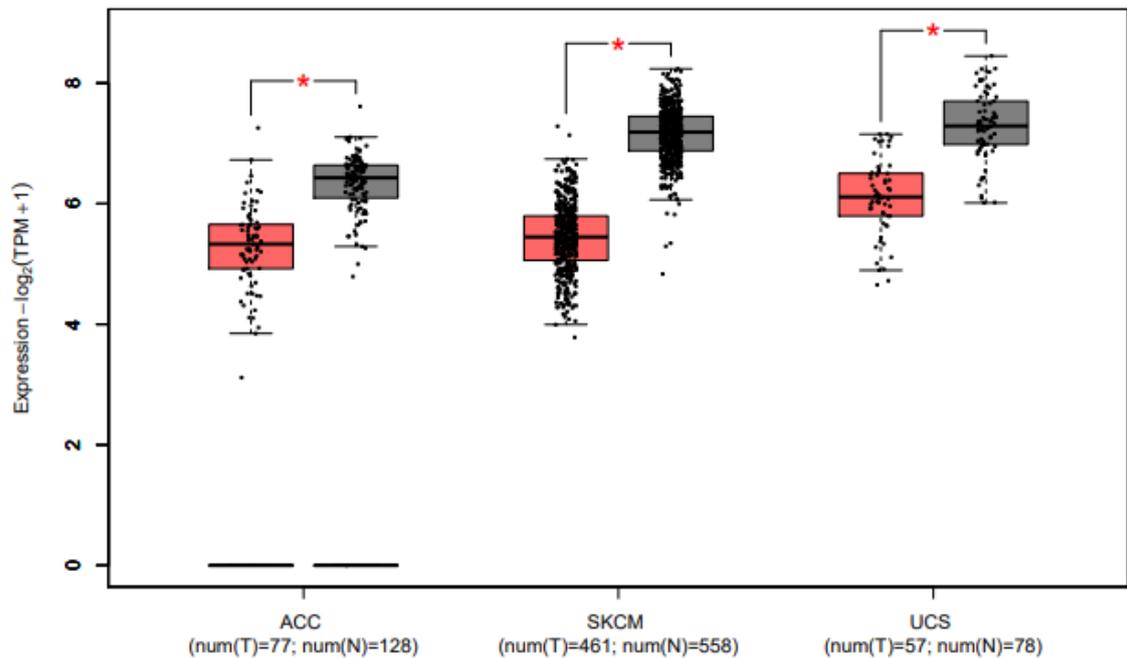
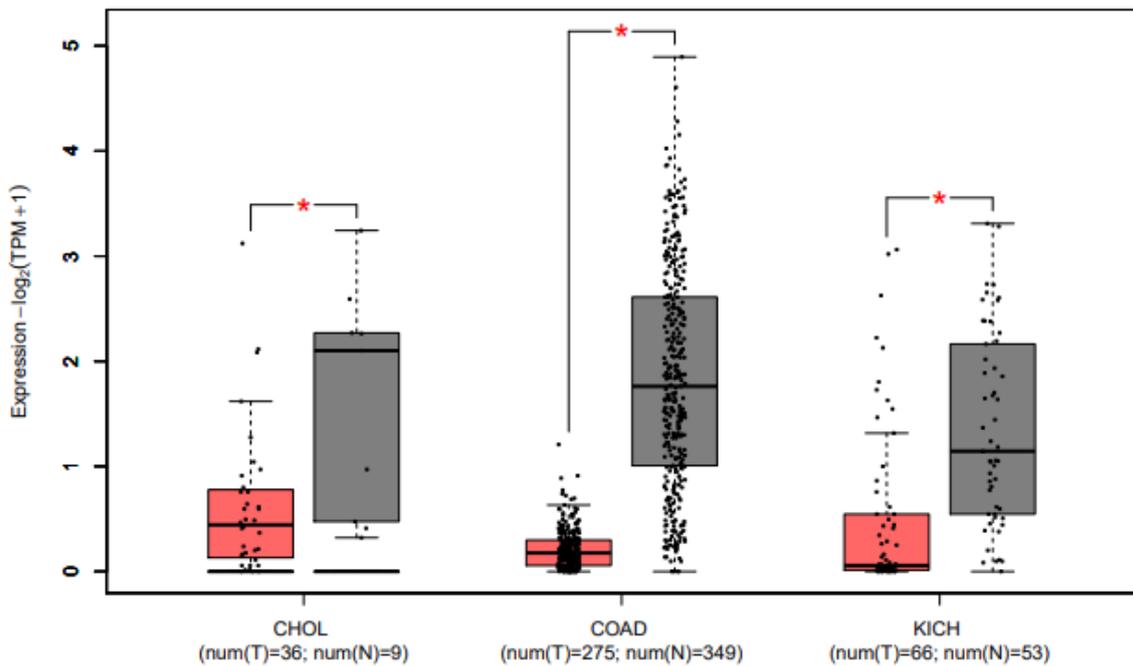


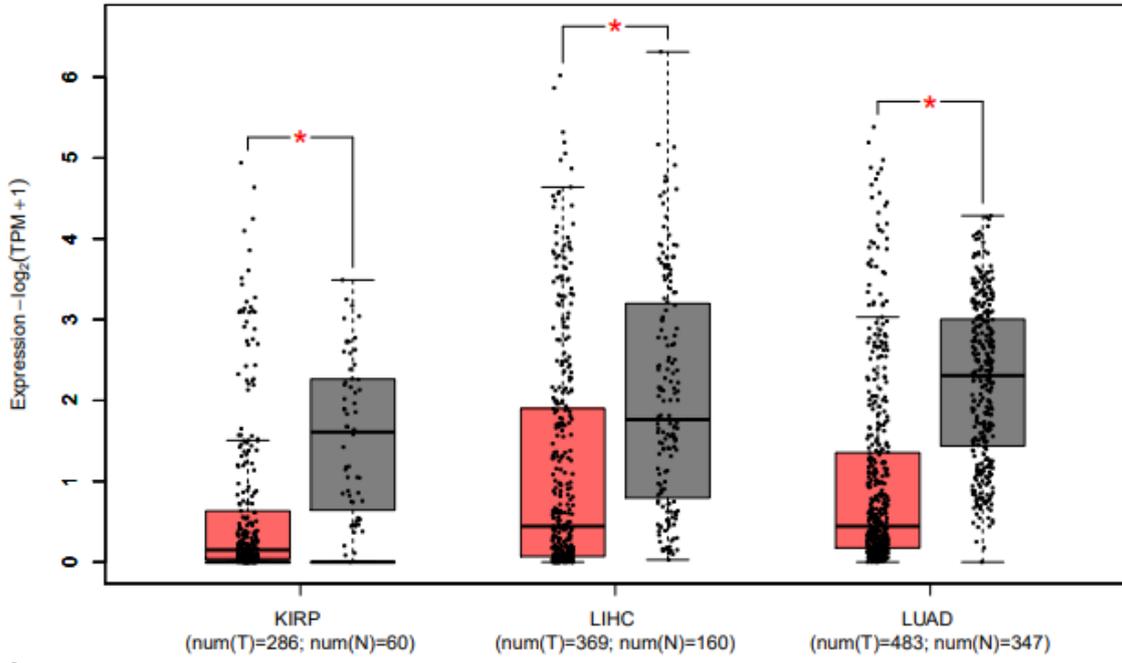
Figura 30: Expressão do gene IP6K2 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). A. aumento da expressão em colangiocarcinoma, linfomadifuso de grandes células B, glioblastoma multiforme e timoma. B. Diminuição da expressão em carcinoma adenocortical, melanoma cutâneo de pele e carcinosarcoma uterino. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. *P < 0,01.

A análise do gene IP6K3 não revelou aumento de expressão em nenhum tipo de câncer. Porém, foi observado que a expressão desse gene foi fortemente diminuída em doze tecidos tumorais, quando comparado com tecidos normais, sendo eles: colangiocarcinoma (nove vezes), adenocarcinoma de cólon (dezoito vezes), carcinoma cromóforo de células renais (trinta vezes) (Fig. 31A). Já no carcinoma de células papilares renais a diminuição foi de dezoito vezes, no carcinoma hepatocelular foi de seis vezes, no adenocarcinoma de pulmão foi de dez vezes (Fig. 31 B). No carcinoma de células escamosas de pulmão diminuiu vinte e uma vezes, no adenocarcinoma de próstata (PRAD) no adenocarcinoma de reto diminuiu sete e dezenove vezes, respectivamente (Fig. 31C). O carcinoma de tireoide apresentou diminuição de sete vezes, já no carcinoma endometrial a diferença foi de quinze vezes enquanto no carcinoma uterino foi de oito vezes (Fig. 31D).

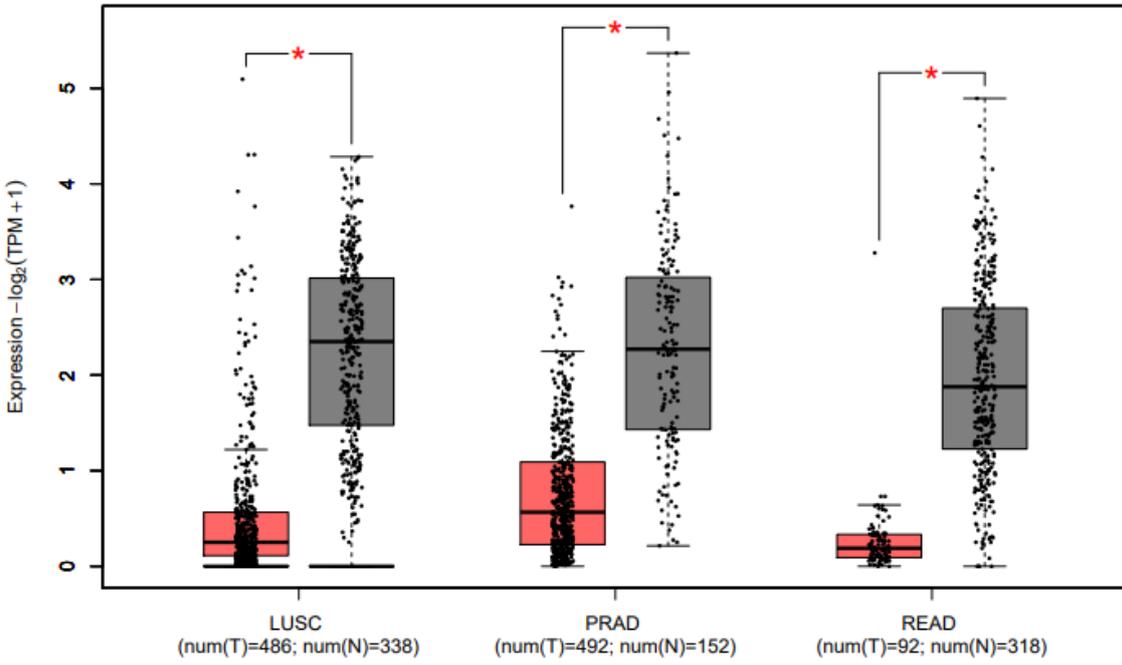
A



B



C



D

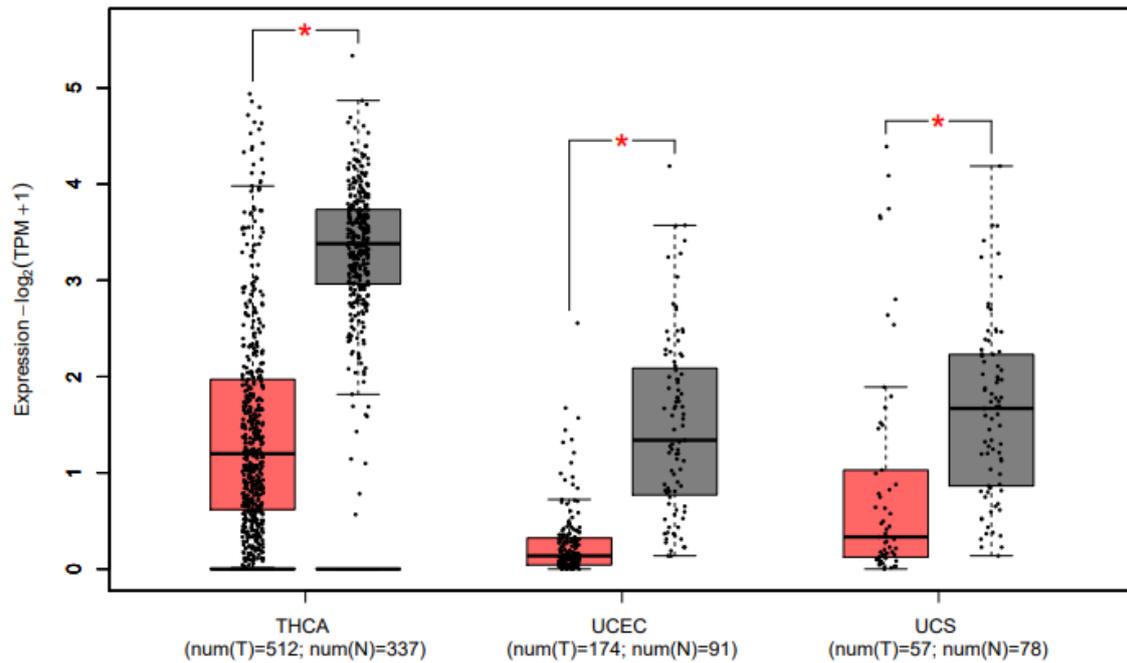
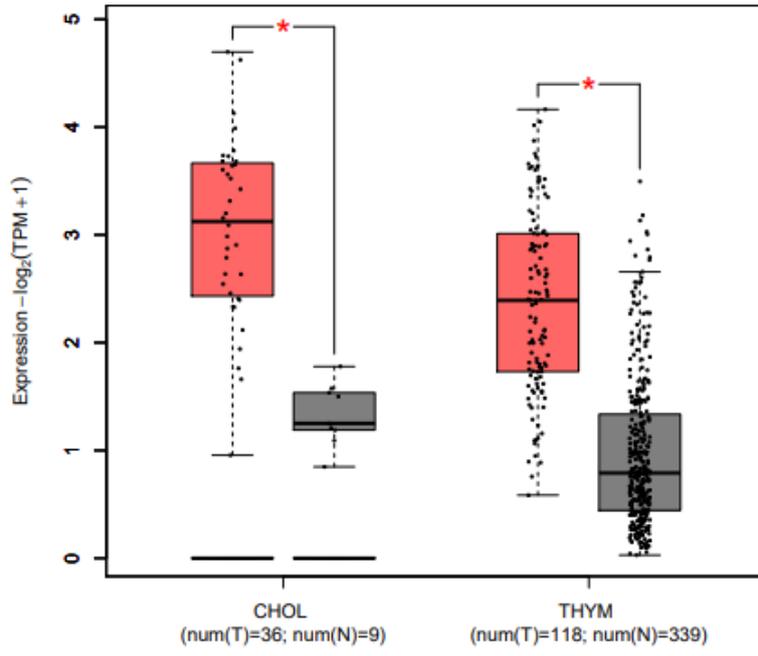


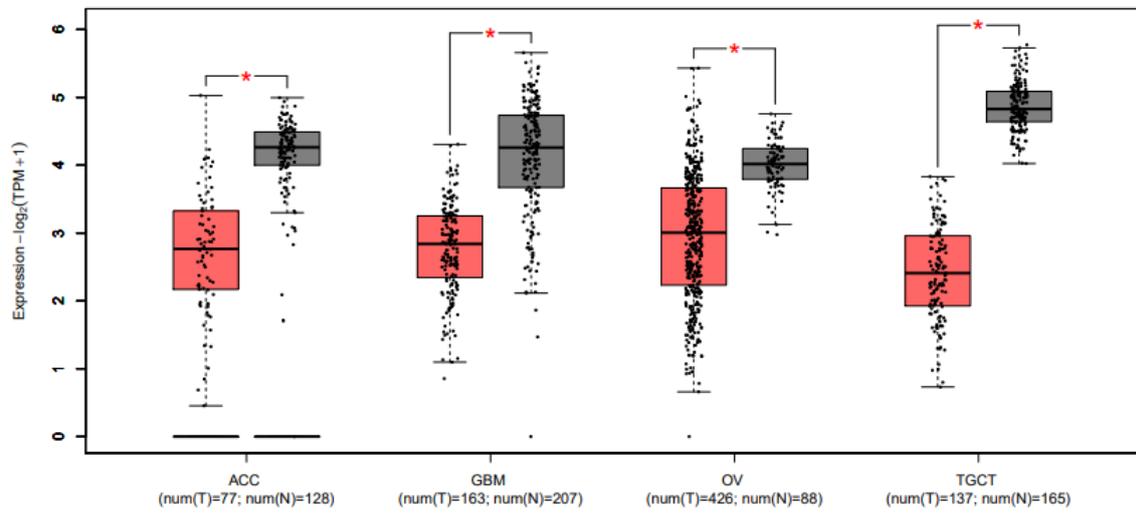
Figura 31: Expressão do gene IP6K3 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). A Diminuição em colangiocarcinoma, adenocarcinoma de cólon, carcinoma cromóforo de células renais. B Diminuição em carcinoma de células papilares renais, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de pulmão. C Diminuição em carcinoma de células escamosas de pulmão, adenocarcinoma de próstata, adenocarcinoma de reto. D Diminuição em carcinoma de tireoide, carcinoma endometrial e carcinoma uterino. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. *P < 0,01.

Os níveis de expressão de PPIP5K1 obtiveram um aumento de cinco vezes mais nos tumores colangiocarcinoma e timoma (Fig. 32A). Por outro lado, outros tipos de câncer tiveram a expressão diminuída como no carcinoma adenocortical, com duas vezes menos, glioblastoma multiforme e carcinoma de ovário que diminuíram duas vezes. Já no tumor de testículos de células germinativas a diminuição foi de seis vezes (Fig. 32B). O carcinoma de tireoide e o carcinoma endometrial apresentaram com duas vezes menos e o carcinoma uterino diminuiu seis vezes, como mostrado na Figura 32C.

A



B



C

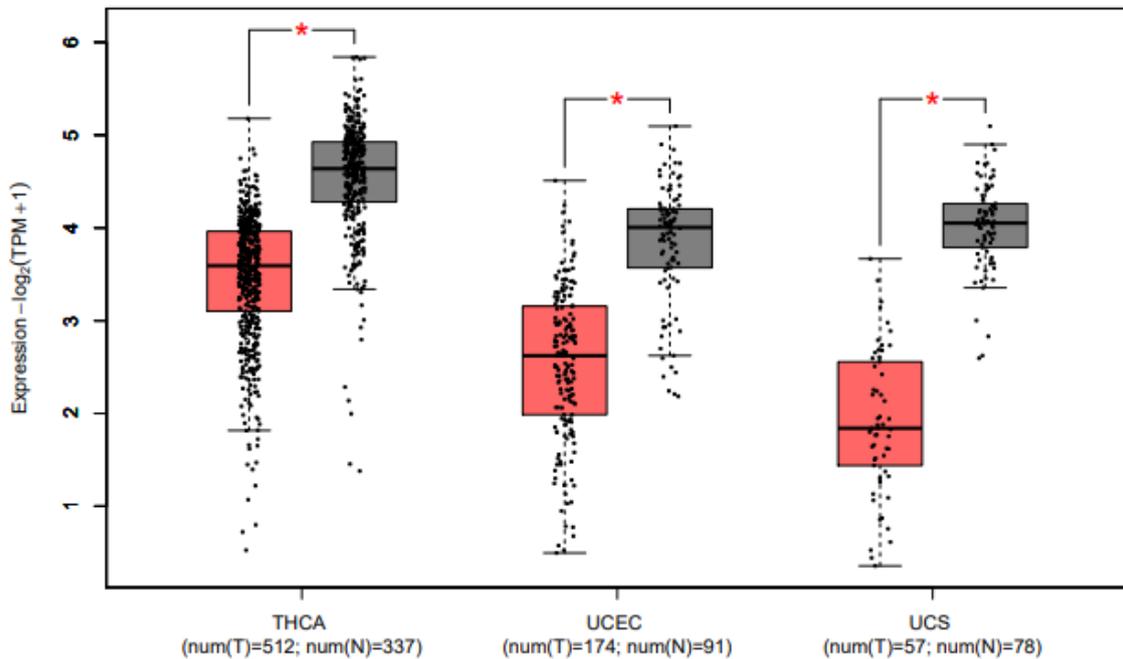
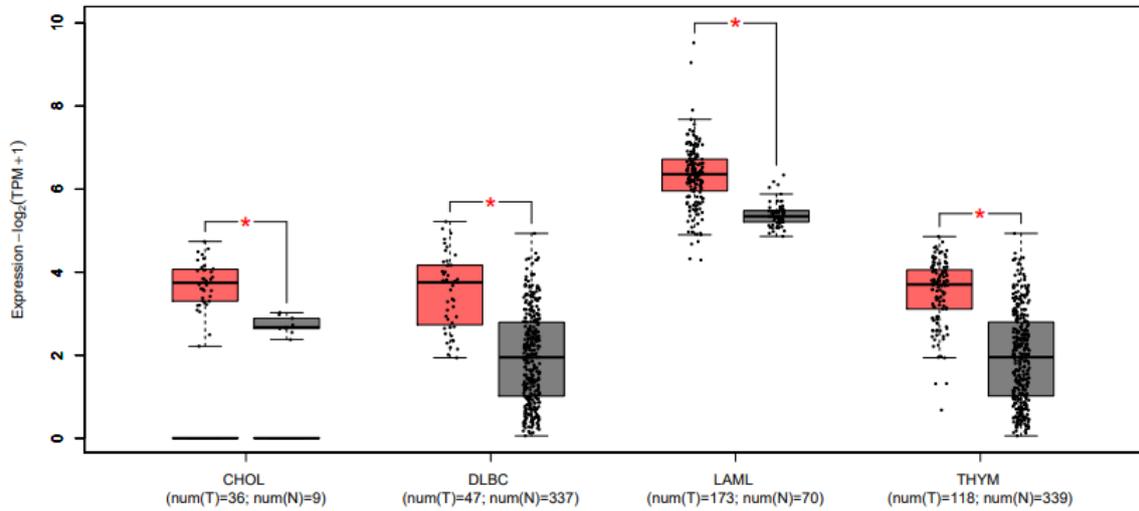


Figura 32: Expressão do gene PPIP5K1 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). A. aumento da expressão em colangiocarcinoma e timoma. B. Diminuição da expressão em carcinoma adenocarcinoma, glioblastoma multiforme, carcinoma de ovário, tumor de testículos de células germinativas. C Diminuição da expressão em carcinoma de tireoide, carcinoma endometrial e carcinosarcoma uterino. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. *P < 0,01.

Os níveis de expressão de PPIP5K2 tiveram um aumento nos tumores colangiocarcinoma com duas vezes mais, no linfoma difuso de grandes células B com aumento de quatro vezes, na leucemia mieloide aguda com duas vezes mais e timoma com aumento de quatro vezes (Fig. 33A). Por outro lado, no carcinoma de ovário a expressão de PPIP5K2 foi diminuída em duas vezes (Fig. 33B).

A análise de expressão do gene IPPK mostrou que houve um aumento nos seguintes tipos de câncer: carcinoma de células escamosas cervicais, com aumento de duas vezes; linfoma difuso de grandes células B, com três vezes mais; adenocarcinoma pancreático, com aumento de duas vezes e timoma em três vezes (Fig. 34A). Em contrapartida, outros tipos de câncer tiveram sua expressão diminuída quando comparada com controle sendo eles: carcinoma esofágico, como diminuição de três vezes; melanoma cutâneo de pele, com seis vezes menos, e tumores de células germinativas testiculares, apresentando diferença de três vezes (Fig. 34B).

A



B

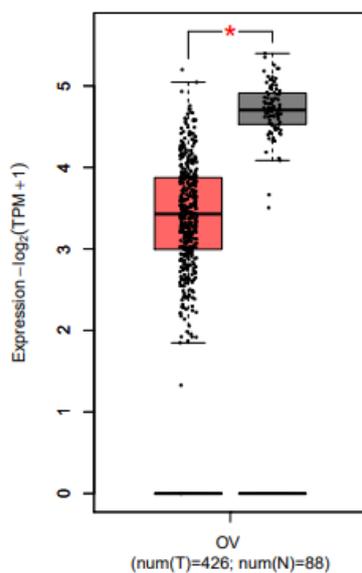


Figura 33: Expressão do gene PIP5K2 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). A. Aumento da expressão em colangiocarcinoma, linfoma difuso de grandes células B, leucemia mieloide aguda e timoma B. Diminuição da expressão em carcinoma de ovário. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$.

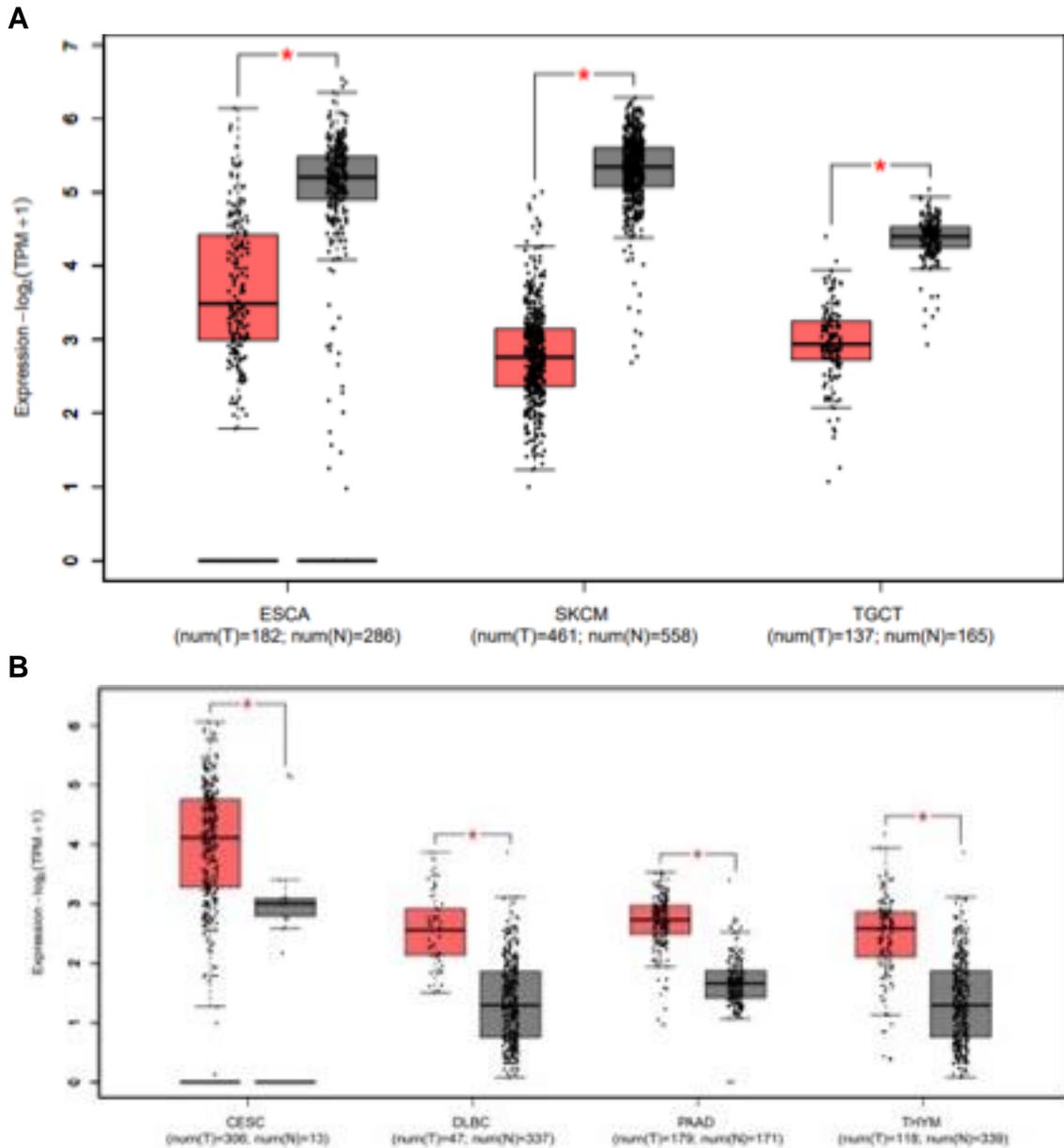


Figura 34: Expressão do gene IPPK em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). a. aumento da expressão em carcinoma de células escamosas cervicais, linfoma difuso de grandes células B, adenocarcinoma pancreático e timoma B. Diminuição da expressão em carcinoma esofágico, melanoma cutâneo de pele e tumores de células germinativas testiculares. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$.

Analisando o gene NUDT3 observamos um aumento de expressão em cinco tipos de câncer, sendo que no colangiocarcinoma esse aumento foi de três vezes, no linfoma difuso de grandes células B e melanoma cutâneo de pele o aumento foi de duas vezes (Fig. 35A). Já no adenocarcinoma de esôfago o aumento foi de duas vezes e no timoma esse aumento foi de três vezes (Fig. 35B). Destacamos que para esse gene não foi observado diminuição de expressão para nenhum tipo de câncer.

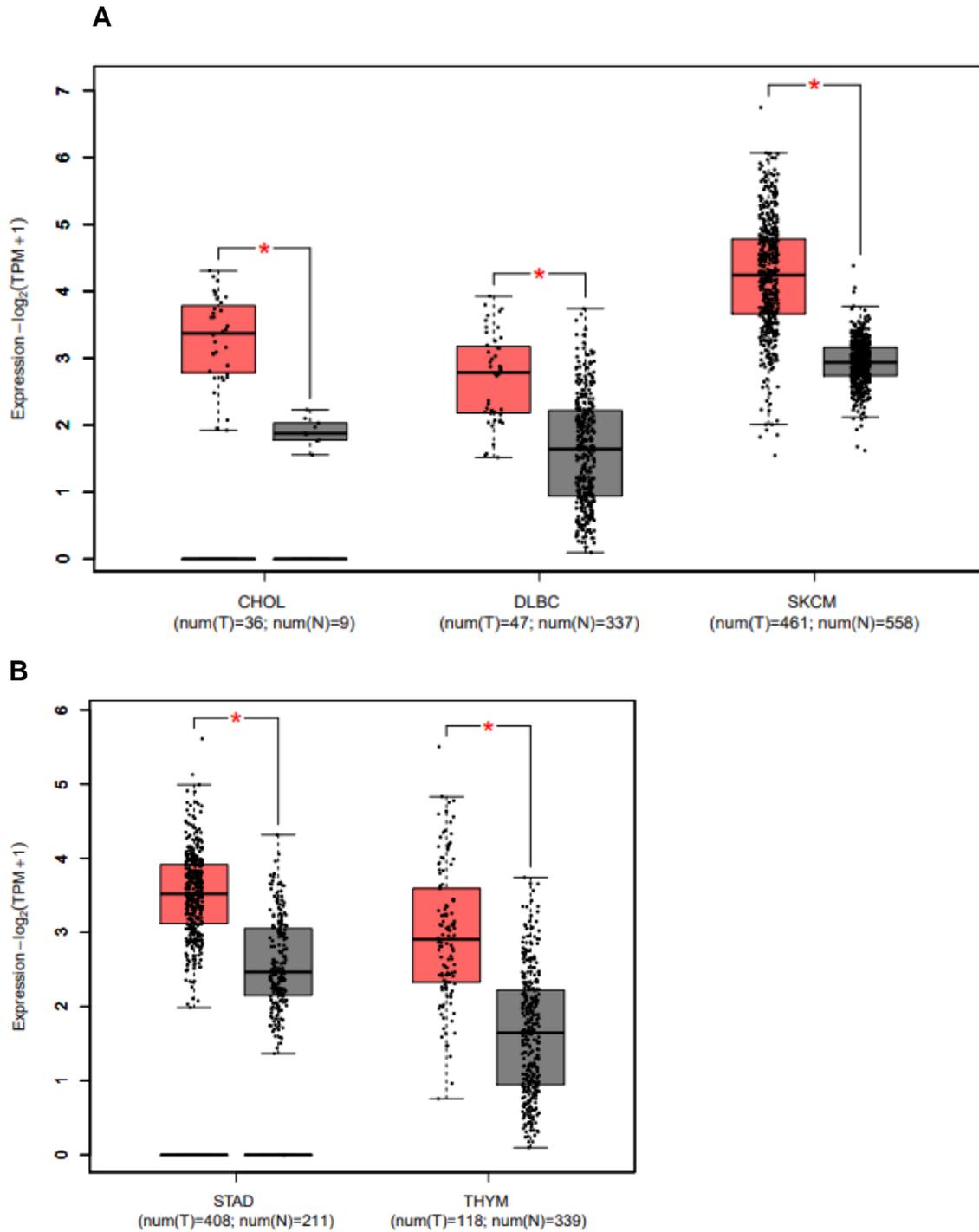


Figura 35: Expressão do gene NUDT3 em tecidos normais (box plot cinza) e tecidos tumorais (box plot vermelho). A Aumento da expressão em colangiocarcinoma, linfoma difuso de grandes células B, melanoma cutâneo de pele. B Aumento da expressão em adenocarcinoma de esôfago e timoma. Dados obtidos pela plataforma GEPIA 2. * $P < 0,01$.

4.5 Expressão diferencial dos genes do metabolismo de Inositol fosfatos em glioblastoma multiforme e carcinoma cromóforo de células renais

A Figura 36 apresenta perfil (*heat-map*) da expressão diferencial do conjunto de genes envolvidos no metabolismo de inositol fosfatos em glioblastoma, onde foi possível observar uma redução da expressão do gene da inositol trifosfato 3 quinase A (ITPKA) e da inositol polifosfato 5 fosfatase J (INPP5J) quando comparado com seus respectivos tecidos normais (Fig. 36A). Já em carcinoma cromóforo de células renais houve uma diminuição da expressão de inositol-trifosfato-3-quinase B (ITPKB) e um aumento da expressão de INPP5J (Fig. 36B). Essas mudanças de expressão indicam reprogramação na biossíntese dos fosfoinosítídeos possivelmente relacionada com assinatura molecular dessas células tumorais.

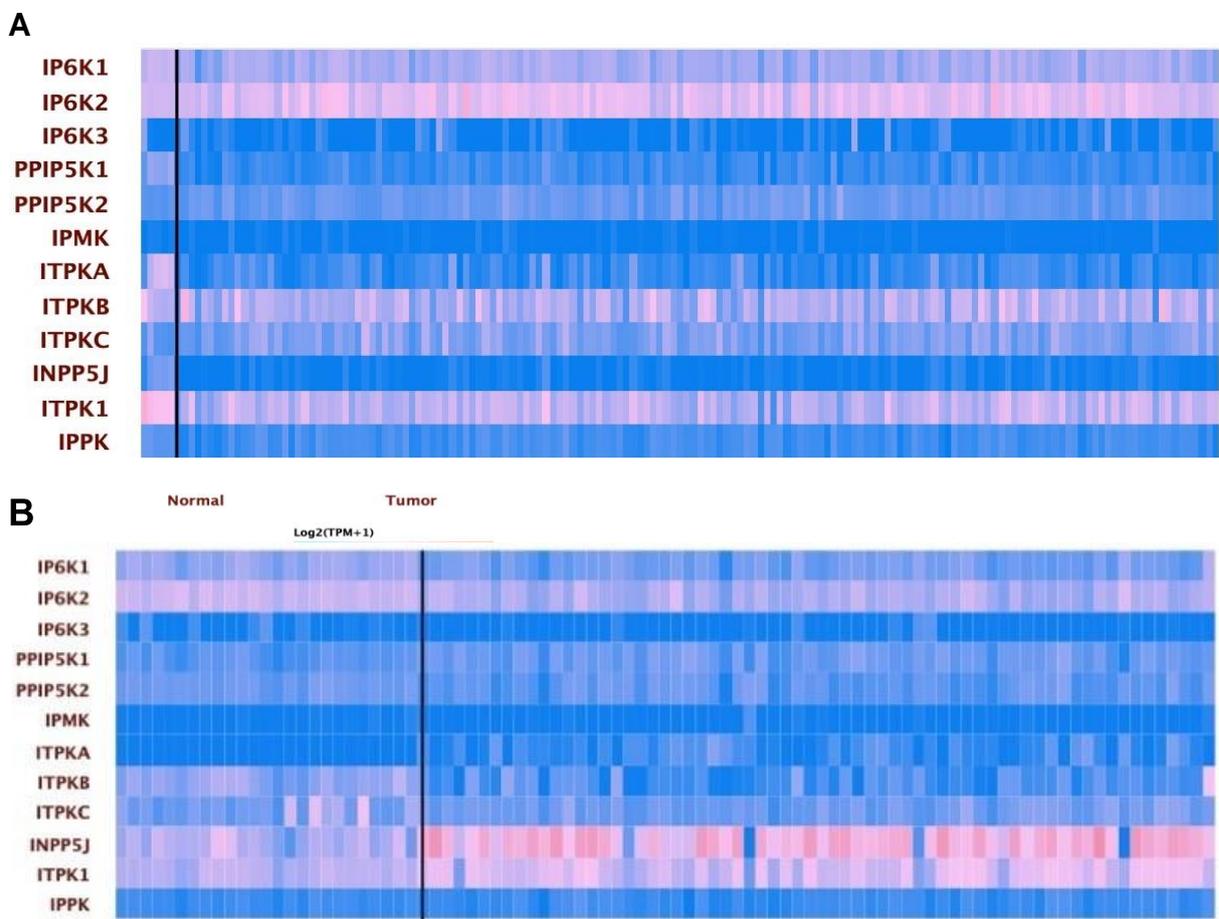


Figura 36: Expressão diferencial (*heat map*) dos genes envolvidos na biossíntese de inositol polifosfatos em glioblastoma multiforme (A) e carcinoma cromóforo de células renais (B). A expressão é dada com base nas cores azul para baixa expressão e vermelha para alta expressão.

4.6 Rede de interação entre V-H⁺-ATPase enzimas e metabolismo de inositol polifosfatos

Para identificar a rede de interação entre proteínas/genes de metabolismo de inositol polifosfatos com genes/proteínas das subunidades da V-H⁺-ATPase, realizamos análises de interações PPI usando a ferramenta STRING. A rede de interações revelou uma integração metabólica sinalizadora através da proteína quinase mTOR e LAMTOR2 (Fig. 37). Destaque para IPMK e isoformas de IP6K1-3, formando eixo com MTOR. A proteína quinase mTOR, localizada na membrana de lisossomos, é essencial para proliferação celular, bem ativa em células de câncer, regulando o crescimento, proliferação e sobrevivência celular, através do controle via cascatas de sinalização/fosforilação da síntese proteica e autofagia (Lipton e Sahin, 2014). Notavelmente, os estudos sugerem a ativação da mTOR por polifosfatos (Wang *et al.*, 2003).

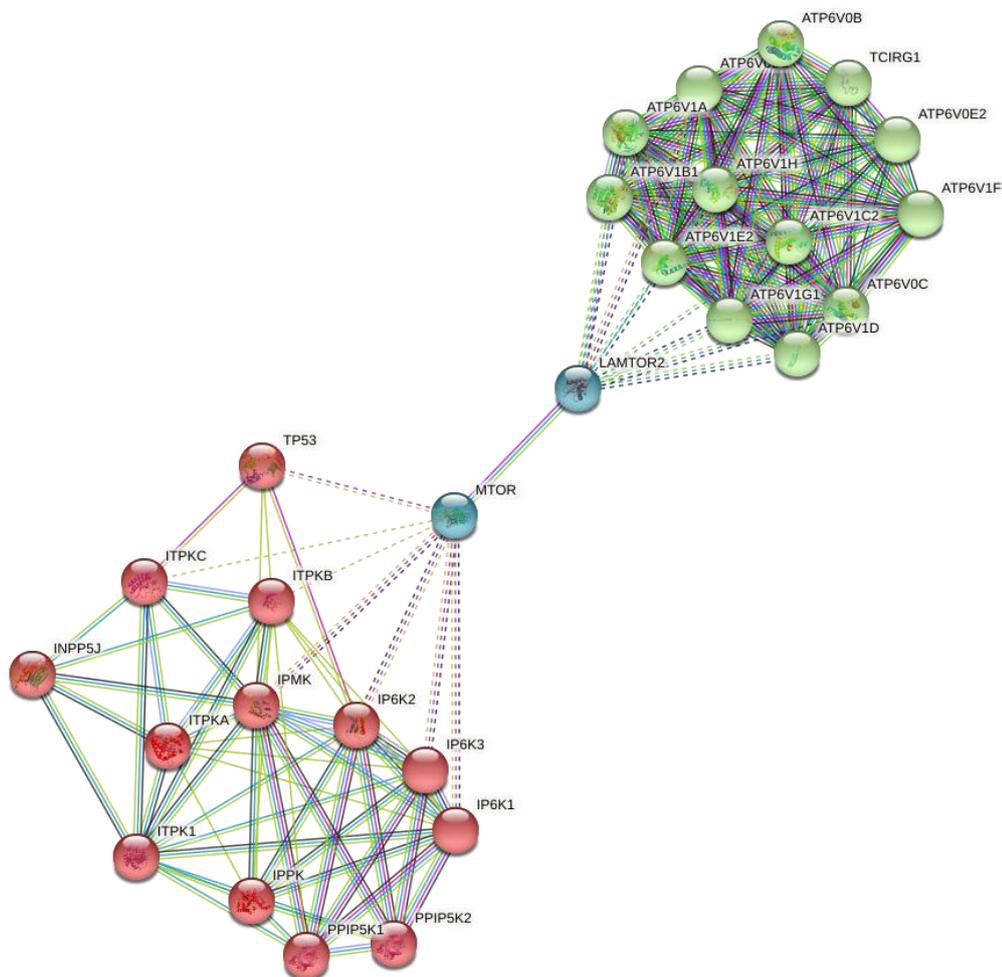


Figura 37: Rede de interação entre subunidades do complexo de V-ATPase e enzimas do metabolismo de inositol polifosfatos em humanos.

4.7 Rede de interação entre os genes da V-H⁺-ATPase com os genes do metabolismo de inositol fosfatos e os genes da família da calcineurina

Analizamos em seguida a interação entre as subunidades de V-ATPase, enzimas do metabolismo do inositol polifosfatos e subunidades da calcineurina. Conforme apresentado na Figura 38 um destaque importante para proteína supressora de tumor da P53, que é um importante regulador do ciclo celular, fazendo interação com IP6K2, podendo então modular sua atividade. P53 também apresentou interação com MTOR e com NFATC1 que por sua vez interage com a TCIRG1 da V-ATPase, enquanto MTOR também participa de interações com várias subunidades da V-ATPase, com IPMK e FKBP1A, que desempenham um papel na imunorregulação e nos processos celulares básicos que envolvem o enovelamento e o tráfego de proteínas.

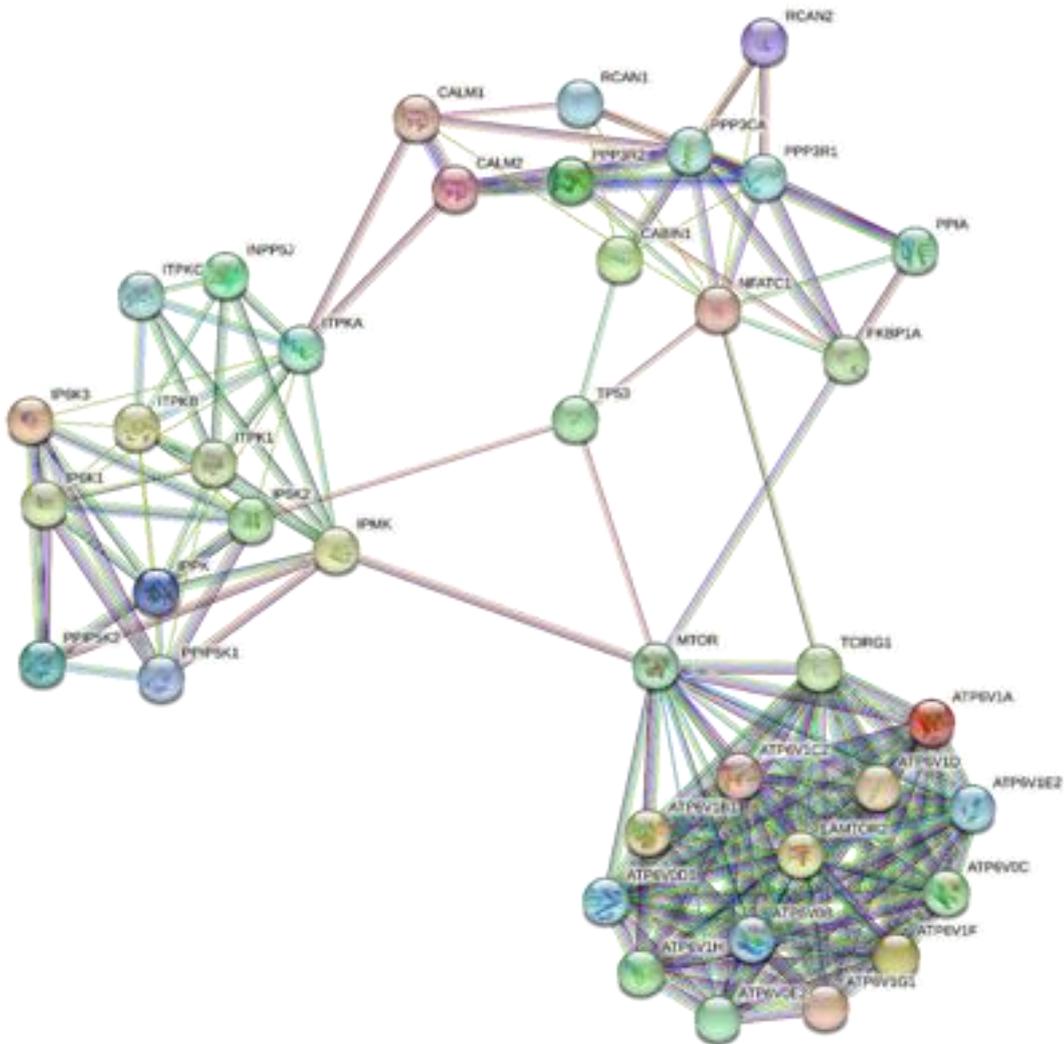


Figura 38: Rede de interação obtida usando STRING entre subunidades de V-ATPase, enzimas de metabolismo de polifosfatos de inositol e subunidades de calcineurina de humanos.

4.8 Determinação dos níveis de polifosfato em células selvagens e mutantes deficientes de calcineurina em *Saccharomyces cerevisiae*

Analizamos os níveis de polifosfatos em células eucarióticas usando como modelo as células levedura do tipo selvagem e deficiente de calcineurina. Na Figura 39 estes polímeros foram subdivididos em ortofosfato, polifosfato solúvel (de baixo peso molecular com até vinte e cinco unidades de fosfato) e polifosfato insolúvel (de alto peso molecular com mais de setenta e cinco resíduos de fosfato na cadeia).

Foram analisados, portanto, os ortofosfatos, polifosfatos solúveis e insolúveis nas células da cepa selvagem (K601) e mutante deficiente na subunidade regulatória de calcineurina (K603) de levedura de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*. Nossas análises permitiram observar que as células mutantes possuíam menor número de Pi (1,7 vezes) e polyP solúvel (~2 vezes) e maior quantidade de PolyP insolúvel (5,3 vezes) quando comparadas com as células selvagens, especialmente no PolyP solúvel, em que as diferenças foram bem significativas (Fig.39).

Os níveis de polifosfato solúvel na cepa K603 foram cerca de três vezes menores quando comparadas a cepa K601. Enquanto os níveis de polifosfato insolúvel foram aproximadamente três vezes maiores quando comparados com cepas selvagem. Indicando que a regulação da calcineurina é importante para a síntese de polyP solúveis, enquanto a sua ausência de regulação promove a síntese de polyP insolúveis.

Os estudos anteriores com levedura *S. cerevisiae* demonstraram que a calcineurina pode estar envolvida na regulação da atividade da V-ATPase, interferindo com sua capacidade de formação do gradiente de H⁺ (Teixeira, 2016). Assim, é possível que o funcionamento do complexo VTC estivesse sob controle indireto da CaN, impactando ambas síntese e reserva de polyP nesse organismo.

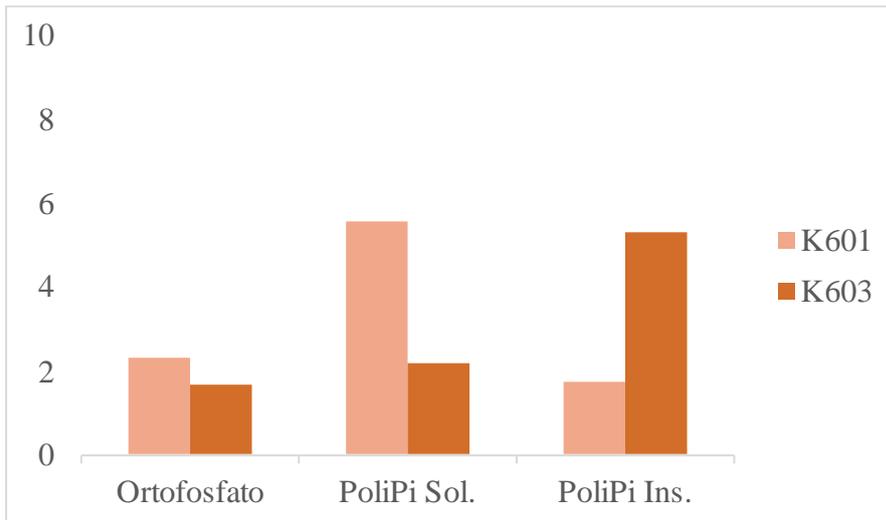


Figura 39: Os níveis de polifosfatos em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* cepa selvagem (K601) e cepa deficiente na subunidade regulatória de calcineurina (K603).

A construção da rede de interações entre as subunidades de V-ATPase, VTC e de calcineurina revelou como intermediário a H^+ -ATPase de membrana plasmática, consistente com seu papel na regulação de pH intracelular e sinalização celular (Fig. 40).

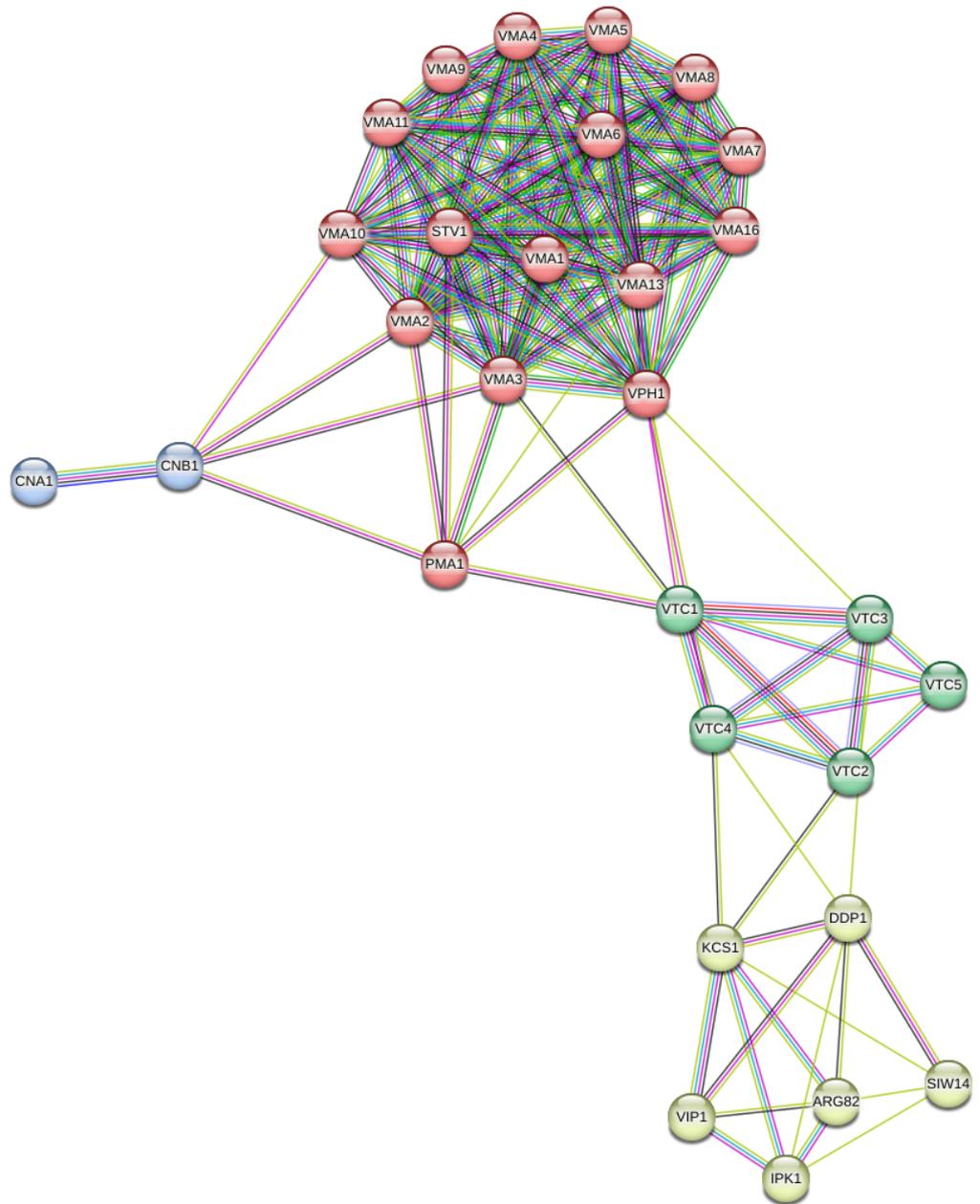


Figura 40: Rede de interação obtida usando STRING entre subunidades de V-ATPase, enzimas de metabolismo de polifosfatos de inositol e subunidades de calcineurina de levedura.

5. CONCLUSÕES

- Os genes de metabolismo de inositol polifosfatos apresentam expressãodiferenciada em diversos tumores, como colangiosarcoma e glioblastoma, indicando uma participação chave desses genes e dos pirofosfatos de inositol na sinalização mediados por estas moléculas na reprogramação metabólica tumoral;
- As redes de interação estabelecem a sinalização mediada por mTOR como um eixo integrador da reprogramação bioenergética induzida na tumorigênese associando a expressão dos genes do metabolismo de inositol polifosfatos com V-ATPase e sinalização por cálcio e calcineurina;
- Os níveis de polifosfatos solúvel foram menores e de polifosfatos insolúveis maiores em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* deficiente na subunidade regulatória de calcineurina, quando comparados com células controle selvagens, revelando papel de calcineurina na regulação da síntese de polifosfatos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcázar-Román, AR.; Wente SR. (2008). Inositol polyphosphates: a new frontier for regulating gene expression. *Chromosoma*, 117: 1-13.
- Almeida, MV.; da Silva, AD.; de Souza, MVN.; Benício, AAA. (2003). A cascata dos fosfoinosítídeos. *Química Nova*, 26: 105-111.
- Andreeva, N.; Trilisenko, L.; Eldarov, M.; Kulakovskaya, T. (2015). Polyphosphatase PPN1 of *Saccharomyces cerevisiae*: switching of exopolyphosphatase and endopolyphosphatase activities. *PLoS One*, 10 e 0119594.
- Auesukaree, C.; Tochio, H.; Shirakawa, M.; Kaneko, Y.; Harashima, S. (2005). Plc1p, arg82p, and kcs1p, enzymes involved in inositol pyrophosphate synthesis, are essential for phosphate regulation and polyphosphate accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 25127–25133.
- Austin, S.; Mayer, A. (2020). Phosphate Homeostasis – A Vital Metabolic Equilibrium Maintained Through the INPHORS Signaling Pathway. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1367.
- Azevedo, C.; Saiadi, A., (2017). Eukaryotic phosphate homeostasis: the inositol pyrophosphate perspective. *Trends in Biochemical Sciences*, 42: 219-231.
- Balla T. (2013). Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiological Reviews*, 93: 1019–1137.
- Banerjee, S.; Kane, PM. (2020). Regulation of V-ATPase activity and organelle pH by phosphatidylinositol phosphate lipids. *Frontiers Cell Developmental Biology*, 8: 510.
- Belda, I.; Ruiz, J.; Santos, A.; Wyk, NV.; Pretorius, IS. (2019) *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome of the Month*, 35: 956-957.
- Beyenbach KW, Wiczorek H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 209: 577-589.
- Borden EA, Furey M, Gattone NJ, Hambardikar VD, Liang XH, Scoma ER, Abou Samra A, D-Gary LR, Dennis DJ, Fricker D, Garcia C, Jiang Z, Khan SA, Kumarasamy D, Kuppala H, Ringrose S, Rosenheim EJ, Van Exel K, Vudhayagiri HS, Zhang J, Zhang Z, Guitart-Mampel M, Urquiza P, Solesio ME. (2021) Is there a link between inorganic polyphosphate (polyP), mitochondria, and neurodegeneration? *Pharmacol Res*, 163:105211.
- Bru, S.; Martínez-Laínez, JM.; Hernández-Ortega, S.; Quandt, E.; Torres-Torronteras, J.; Martí, R.; Canadell, D.; Arino, J.; Sharma, S.; Jiménez, J.; Clotet, J. (2016).

- Polyphosphate is involved in cell cycle progression and genomic stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*., 101: 367-380.
- Chakraborty A., Koldobskiy M.A., Bello N.T., Maxwell M., Potter J.J., Juluri K.R., Maag D., Kim S., Huang A.S., Dailey M.J., et al. (2010). Inositol pyrophosphates inhibit akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell*.,143:897–910.
- Chandrashekar DS, Karthikeyan SK, Korla PK, Patel H, Shovon AR, Athar M, Netto GJ, Qin ZS, Kumar S, Manne U, Creighton CJ, Varambally S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia*., 25:18-27.
- Christ, J.J.; Smith, S.A.; Willbold, S.; Morrissey, J.H.; Blank, L.M. (2020). Biotechnological synthesis of water-soluble food-grade polyphosphate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*., 117: 2089-2099.
- Cohen, P. (1989). The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual Review of Biochemistry*., 58: 453-508.
- Connolly, S.; Quase-Woode, D.; Waldron, L.; Eberly, C.; Waters, K.; Muller, EM; Kingsbury, T.J. (2018). Calcineurin regulatory subunit calcium-binding domains differentially contribute to calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics Society of America*., 209: 801-813.
- Conrad, M.; Schothorst, J.; Kankipati, HN.; Zeebroeck, GV.; Rubio-Texeira, M.; Thevelein, JM. (2014). Nutrient sensing and signaling in the levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*., 38: 254– 299.
- Creamer, TP. (2020). Calcineurin. *Cell Commun Signal*., 18: 137.
- Cyert, MS.; Kunisawa, R.; Kaim, D.; Thorner, J. (1991). Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*., 88(16), 7376–7380.
- Dahi, JU.; Xie, L.; Jakob, U. (2018). Extraction and quantification of polyphosphate (PolyP) from Gram-negative bacteria. *Bio-protocol*., 8 e 3011.
- Desfougères, Y.; Gerasimaitê, R.; Jessen, HJ.; Mayer, A. (2016). VTC5, a novel subunit of the vacuolar transporter chaperone complex, regulates polyphosphate synthesis and phosphate homeostasis in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*., 291: 22262-22275.
- Dick CF.; Dos-Santos ALA.; Fonseca-de-Souza AL.; Rocha-Ferreira J.; Meyer Fernandes JR. (2010). *Trypanosoma rangeli*: differential expression of ecto-

- phosphatase activities in response to inorganic phosphate starvation. *Exp Parasitol.*, 124:386-393.
- Ferrucci, V.; Kong DY.; Asadzadeh, F.; *et al.*, (2021). Long-chain polyphosphates impair SARS-CoV-2 infection and replication. *Science Signaling.*, 14 e. 690.
- Forgac, M. (2007). Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, 8: 917-929.
- Forsburg, SL. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravit Space Biol Bull.*,18: 3-9.
- Gerasimaitê, R.; Mayer, A. (2016) Enzymes of yeast polyphosphate metabolism: structure, enzymology and biological roles. *Biochemical Society Transactions.*, 44: 234 – 239.
- Gerasimaite, R.; Sharma, S.; Desfougères, Y.; Schmidt, A.; Mayer, A. (2014). Coupled synthesis and translocation restrains polyphosphate to acidocalcisome-like vacuoles and prevents its toxicity. *Journal of Cell Science.*, 127: 5093–5104.
- Goffeau, A.; Barrell, BG.; Bussey, H.; Davis, RW.; Dijon, B.; Feldmann, H.; Galibet, F.; Hoheisel, JD.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, EJ.; Mewes, HW.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, SG. (1996). Life with 6000 genes. *Science.*, 274: 546-567.
- Hanahan D , Weinberg RA . (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.*, 144(5) : 646-74.
- Harold, FM. (1966). Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriology Reviews.*, 30: 772–794.
- Harvey, WR. (1992). The Physiology of V-ATPase. *The Journal of Experimental Biology.*, 172: 1-17.
- Hoeflich KP, Ikura M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell.*, 108:739-742.
- Hoffman, CS.; Wood, V.; Fantes, P. (2015). An ancient yeast for Young geneticists: A primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics.*, 201: 403-423.
- Hoxhaj, G., & Manning, B. D. (2019). The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer.*, 20(2), 74–88.
- Hudmon, A., & Schulman, H. (2002). Structure–function of the multifunctional

- Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochemical Journal.*, 364(3), 593–611.
- Kane, PM. (2006). The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 70: 177–191.
- Kornberg A.; Rao NN.; Ault-Riché D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review Biochemistry.*, 68: 89-125.
- Kuenzel NA, Alcázar-Román AR, Saiardi A, Bartsch SM, Daunaraviciute S, Fiedler D, Fleig U. (2022). Inositol pyrophosphate-controlled kinetochore architecture and mitotic entry in *S. pombe*. *Journal of Fungi.*, 8(9):933.
- Lei, M.; Zhu, C.; Liu, Y., Karthikeyan, AS.; Bressan, RA.; Raghotham, KG.; Liu, D. (2011). Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*. *New Phytol.*, 189:1084-1095.
- Lei Y, Klionsky DJ. (2023). Transcriptional regulation of autophagy and its implications in human disease. *Cell Death Differ.* 30: 1416–1429.
- Levine, TP.; Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Current Biology.*, 12: 695-704.
- Li, SC.; Diakov, TT.; Xu, T.; Tarsio, M.; Zhu, W.; Couoh-Cardel, S.; Weisman, LS.; Kane, PM. (2014). The signaling lipid PI(3,5)P₂ stabilizes V1-V0 sector interactions and activates the V-ATPase. *Molecular Biology of the Cell.*, 25: 1251–1262.
- Liu, S.; Hou, Y.; Liu, W.; Lu, C.; Wang, W.; Sun, S. (2015). Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell.*, 14: 324-334.
- Lonetti, A.; Sziogyarto, Z.; Bosch, D.; Loss, O.; Azevedo, C.; Saiardi, A. (2011). Identification of an evolutionarily conserved family of inorganic polyphosphate endopolyphosphatases. *The Journal of biological chemistry.*, 286: 31966– 31974.
- López-Sánchez, U.; Tury, S.; Nicolas, G.; Wilson, MS.; Jurici, S.; Ayrignac, X.; Courgnaud, V.; Saiardi, A.; Sitbon, M.; Battini, JL. (2020). Interplay between primary familial brain calcification-associated SLC20A2 and XPR1 phosphate transporters requires inositol polyphosphates for control of cellular phosphate homeostasis. *Journal of Biological Chemistry.*, 295: 9366-9378.
- Marshansky, V.; Futai, M. (2008). The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Current Opinion in Cell Biology.*, 20: 415-426.

- Matsumoto, TK.; Ellsmore, AJ.; Cessna, SG.; Low, PS.; Pardo, JM.; Bressan, RA.; Hasegawa, PM. (2002). An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry.*, 277: 33075-33080.
- Minin, M.; Senni, A.; Unfer, V.; Bizzarri, M. (2020). The key role of IP6K: A novel target for anticancer treatments? *Molecules.*, 25: 4401.
- Müller O, Neumann H, Bayer MJ, Mayer A. (2003). Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J Cell Sci.*, 116(Pt 6):1107-15.
- Neef, DV.; Kladde, MP. (2003). Polyphosphate loss promotes SNF/SWI- and Gcn5-dependent mitotic induction of PHO5. *Molecular and Cellular Biology.*, 23: 3788-3797.
- Nelson, N.; Harvey, W. R. (1999). Vacuolar and plasma membrane proton-adenosine triphosphatase. *Physiological Review.*, 79: 361-385.
- Norman KL, Shively CA, De La Rocha AJ, Mutlu N, Basu S, Cullen PJ, Kumar A. (1992). Inositol polyphosphates regulate and predict yeast pseudohyphal growth phenotypes. *PLoS Genet.*, 14(6):e1007493.
- O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., & O'Neill, E. A. (1992). FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature.*, 357(6380): 692–694.
- Ogawa, N.; DeRisi, J.; Brown, PO. New Components of a System for Phosphate (2000). Accumulation and Polyphosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* Revealed by Genomic Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell.*, 11: 4309–4321.
- Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Genetic Systems.*, 72: 323–334.
- Park, H-S.; Lee, SC.; Cardenas, ME.; Heitman, J. (2019). Calcium-calmodulin-calcineurin signaling: A globally conserved virulence cascade in eukaryotic microbial pathogens. *Cell Host & Microbe.*, 26: 453-462.
- Park, SJ.; Lu, S.; Park, SE.; Kim, S. (2018). Inositol pyrophosphates as multifaceted metabolites in the regulation of mammalian signaling networks. *Animal Cells and Systems.*, 22: 1-6.
- Pascual-Ortiz M, Walla E, Fleig U, Saiardi A. (2021). The PPIP5K Family Member Asp1 Controls Inorganic Polyphosphate Metabolism in *S. pombe*. *Journal of Fungi.*

- 7(8):626.
- Patton-Vogt J. (2007). Transport and metabolism of glycerophosphodiester produced through phospholipid deacylation. *Biochim Biophys Acta.*, 1771: 337-342.
- Persson, BL.; Lagerstedt, JO.; Pratt, JR.; Pattison-Granberg, J.; Lundh, K.; Shokrollahzadeh, S.; Lundh, F. (2003). Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics.*, 43: 225–244.
- Puga, MI.; Rojas-Triana, M.; de Lorenzo, L.; Leyva, A.; Rubio, V.; Paz-Ares, J. (2017). Novel signals in the regulation of Pi starvation responses in plants: facts and promises. *Curr Opin Plant Biol.*, 39: 40-49.
- Rao, NN.; Gómez-García, MR.; Kornberg, A. (2009). Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual Review Biochemistry.*, 78: 605-647.
- Rashid, MH.; Rumbaugh, K.; Passador, L.; Davies, DG.; Hamood, AN.; Iglewski, BH.; Kornberg, A. (2000). Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97: 9636-9641.
- Samarão, SS.; Teodoro, CES.; Silva, FE.; Ribeiro, CC.; Granato, TM.; Bernardes, NR.; Retamal, CA.; Façanha, AR.; Okorokova-Façanha, AL.; Okorokov, LA. (2009). V H⁺ - ATPase along the yeast secretory pathway: Energization of the ER and Golgi membranes. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1788: 303–313.
- Sawada N, Ueno S, Takeda K. (2021). Regulation of inorganic polyphosphate is required for proper vacuolar proteolysis in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry.*, 297 e 100891.
- Secco, D.; Wang, C.; Arpat, BA.; Wang, Z.; Poirier, Y.; Tyerman, SD.; Wu, P.; Shou, H.; Whelan, J. (2012A). The emerging importance of the spx domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytologist.*, 193: 842–851.
- Secco, D.; Wang, C.; Shou, H.; Whelan, J. (2012B). Phosphate homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the key role of the SPX domain-containing proteins. *FEBS Lett.*, 586: 289–295.
- Shen, X.; Li, H.; Ou, Y.; Tao, W.; Dong, A.; Kong, J.; Ji, C., Yu, S. (2008). The Secondary Structure of Calcineurin Regulatory Region and Conformational Change Induced by Calcium/Calmodulin Binding. *Journal of Biological Chemistry.*, 283(17), 11407–11413.
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biology.*, 1(2): Reviews 1011.

- Staiano, L., De Matteis, MA. (2019). Phosphoinositides in the kidney. *Journal of lipid research.*, 60: 287–298.
- Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary, D, Warshawsky D, Guan- Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, and Lancet D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome SequenceAnalyses. *Current Protocols in Bioinformatics.*, 54:1.30.
- Swilius, MT; Waxham, MN. (2008). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, 65: 2637-2657.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Von Mering C. (2019). String v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research.*, 47:D607-613. 2019.
- Tang Z, Li C, Kang B, Gao G, Li C, Zhang Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer andnormal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.*, 45(W1):W98-W102.
- Teixeira, L. R. S. (2014). Influência da calcineurina sobre a ativação de P e V H⁺-ATPase porpH e glicose em *Saccharomyces cerevisiae*. *Tese de Doutorado, Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro*.
- Thewes, S. (2014). Calcineurin-Crz1 signaling in lower eukaryotes. *Eukaryotic Cell*, 13: 694-705.
- Tomashevsky, AA.; Ryasanova, LP.; Kulakovskaya, TV.; Kulaev, IS. (2010). Inorganic polyphosphate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* with a mutation disturbing thefunction of vacuolar ATPase. *Biochemistry.*, 75: 1052-1054.
- Trilisenko, L.; Tomashevsky, A.; Kulakovskaya, T.; Kulaev, I. (2013). V-ATPase dysfunction suppresses polyphosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica.*, 58: 437–441.
- Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT, Maitland A, Mostafavi S, Montojo J, Shao Q, Wright G, Bader GD, Morris Q. (2010). *Nucleic Acids Research*, 38 *Suppl*: W214-20.
- Wang, L.; Fraley, DC.; Faridi, J.; Kornberg, A.; Roth, RA. (2003). Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of

- mammary cancer cells. *PNAS.*,100: 11249-11254.
- Weinberg, SE.; Sun, LY.; Yang, AL.; Liao, J.;Yang, GY. (2021). Overview of inositol and inositol phosphates on chemoprevention of colitis-induced carcinogenesis. *Molecules.* 26.
- Wild, R.; Gerasimaite, R.; Jung, JY.; Truffault, V.; Pavlovic, I.; Schmidt, A.; Saiardi, A.; Jessen, HJ.; Poirier, Y.; Hothorn, M.; Mayer, A. (2016). Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science.*, 352: 986–990.
- Wood, V.; Gwilliam, R.; Rajandream, MA.; et al. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.*, 415: 871-880.
- Wood, V.; Rutherford, KM.; Ivens, A.; Rjandream, M-A; Barrel, B. (2001). A reannotation of the *Saccharomyces cerevisiae* Genome. *Comp Funct Genom*, 2: 143-154.
- Wu, M.; Chong, LS.; Perlman, DH.; Resnick, AC.; Fiedler, D. (2016). Inositol polyphosphates intersect with signaling and metabolic networks via two distinct mechanisms. *PNAS.*, 113: 6757-6765.
- Xie, L.; Jakob, U. (2019). Inorganic polyphosphate, a multifunctional polyanionic proteinscaffold. *Journal of Biological Chemistry.*, 294: 2180-2190.
- York, JD. (2006). Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1761: 552-559.