

PALOMA DIAS E VASCONCELLOS

AÇÕES DE CALPAÍNA A NO SISTEMA IMUNOLÓGICO  
DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*



**Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO  
JULHO / 2023

**Trabalho realizado no Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ, sob a orientação da Professora Helena Maria Marcolla Araujo e coorientação de Alison Henrique Ferreira Julio.**

**FICHA CATALOGRÁFICA****CIP - Catalogação na Publicação**

V541a Vasconcellos , Paloma Dias e  
Ações de Calpaína A no sistema imunológico de  
Drosophila melanogaster / Paloma Dias e  
Vasconcellos . -- Rio de Janeiro, 2023.  
45 f.

Orientador: Helena Araujo.  
Coorientador: Alison Henrique .  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:  
Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Calpaína A. 2. Via de Toll. 3. Imunidade  
inata. 4. NFkappaB. 5. BMP. I. Araujo, Helena,  
orient. II. Henrique , Alison , coorient. III.  
Titulo.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ**  
**COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO  
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,  
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E  
 IMUNOLOGIA**

**ALUNO: Paloma Dias e Vasconcellos**

DRE: 116195880

**BANCA EXAMINADORA:** Profa. Leticia de Albuquerque (Presidente)  
 Prof. Fábio Mendonça Gomes  
 Prof. Leonardo Holanda Travassos Correa  
 Profa. Alessandra Filardy (Suplente)

**Título da Monografia: “Ações de Calpaína A no sistema imunológico de  
*Drosophila melanogaster*”**

**Local: Auditório do PCM (Bloco F), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB)/CCS/UFRJ**  
**Data e hora de início: 21 de dezembro de 2023 às 13:30h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,33 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 21 de dezembro de 2023.

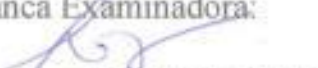
NOTA

9,0

10

9,0

**Banca Examinadora:**


  
 Profa. Leticia de Albuquerque

  
 Prof. Fábio Mendonça Gomes


  
 Prof. Leonardo Holanda Travassos Correa

  
 Profa. Alessandra Filardy

**Aluno:**

  
 Paloma Dias e Vasconcellos

**Orientador:**

  
 Prof. Helena-Maria Marcolli Arujo /  
 Codorientador: Dr. Alison Henrique Ferreira Julio Vilela

**Coordenador  
 de TCC**

  
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## Agradecimentos

Agradeço imensamente a minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Helena Araujo, que abriu a porta de seu laboratório quando eu ainda nem sonhava que me apaixonaria pela ciência e cursaria microbiologia. Mesmo com seus muitos afazeres, Helena sempre esteve disponível para me guiar por esse longo caminho até a finalização do meu TCC, responder a todas as minhas dúvidas e corrigir meu TCC quantas vezes foram necessárias. Ao meu coorientador, Alison Henrique, por toda paciência, ensinamento e até mesmos “puxões de orelha” ao longo desses anos. Alison foi extremamente importante para meu crescimento profissional e meus conhecimentos básicos em biologia molecular. Agradeço a Maira Cardoso, minha primeira coorientadora, quem me apresentou o laboratório e fez eu me apaixonar pelas *Drosophilas*, me ensinando desde técnicas básicas como pipetagem até “Western blot”.

Aos membros atuais e passados do Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento, pela amizade e por sempre estarem disponíveis para me ajudar quando eu precisava, em especial: Daniel, Matheus, Gabriela, Jamile, Robson, Camila, Leonardo, Ingrid, Lucas, Professor Attilio Pane, Daniela, Mariana.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem com seus conhecimentos para melhora do meu trabalho. As agências de fomento FAPERJ e PIBIC-UFRJ por investirem em mim e ajudarem a me manter na faculdade

Aos meus familiares, em especial Marta (mãe), Márcio (pai) e Gabriel (irmão) por todo amor recebido ao longo dos meus 26 anos e por sempre apoiarem a todas minhas decisões. A minha avó Lucilia, que hoje é uma estrela que olha por nós lá de cima, mas em vida foi meu exemplo de ser humano íntegro e mulher forte. Ao meu companheiro Marcos Marcello por me apoiar não só na vida, mas com coisas extremamente necessárias para que esse TCC saísse (caronas ao fundão nos finais de semana, edição de imagens e numeração de página do WORD). E por fim aqueles que não acreditaram que um dia eu conseguiria meu tão sonhado diploma, pois só me deixaram mais forte e disposta a batalhar pelos meus sonhos.

## RESUMO

PALOMA DIAS E VASCONCELLOS

### AÇÕES DE CALPAÍNA A NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**Orientador:** Helena Maria Marcolla Araujo  
**Coorientador:** Alison Henrique Ferreira Júlio

**Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Em *Drosophila melanogaster* a eliminação de patógenos requer um sistema complexo de vias de controle orquestradas que atuam regulando a resposta imune inata em diferentes tecidos. Dentre elas, a via de Toll, que responde a infecções por fungos e bactérias Gram-positivas. A ativação do receptor Toll induz a fosforilação N-terminal e degradação via proteassoma de Cactus (Cact), homólogo de IkappaB e inibidor de proteínas da superfamília NFkappaB como Dorsal (DI) e Dif, favorecendo a translocação nuclear destes e, conseqüentemente, impulsionando a transcrição de genes relacionados com a produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs). Além da via de Toll, Calpaína A (CalpA), uma cisteíno-protease dependente de Cálcio, cliva Cact livre presente como dímeros no citosol, gerando fragmentos não responsivos à Toll (CactE10). A atividade de CalpA sobre Cactus é, por sua vez, reprimida pela via de BMP (Bone Morphogenetic Protein). Nosso objetivo nesse estudo é explorar o mecanismo pelo qual CalpA regula a atividade de NFkappaB na imunidade inata em *D. melanogaster* e verificar a atuação e importância da via de BMP no contexto do sistema imune. Com a finalidade de gerar uma Calpaína cataliticamente inativa, através de CRISPR-Cas9, geramos novos alelos de Calpaína com mutações pontuais ou mudanças de frame próximos ao sítio ativo. Um dos novos alelos gerados *CalpA[51]* apresentou uma grande diferença na sobrevivência, em comparação com moscas controle, mesmo na ausência de desafio imune. Além disso, os machos em homozigose de *CalpA[51]* apresentaram problemas na fertilidade.

**Palavras-chave:** Cactus, Calpaína, Toll, BMP, imunidade inata, NfkappaB.

**ABSTRACT****PALOMA DIAS E VASCONCELLOS****EFFECTS OF CALPAIN A ON THE IMMUNOLOGICAL SYSTEM OF  
DROSOPHILA MELANOGASTER****Orientador: Helena Maria Marcolla Araujo  
Coorientador: Alison Henrique Ferreiro Júlio**

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

In *Drosophila melanogaster*, the elimination of pathogens requires a complex system of orchestrated control pathways that act by regulating the innate immune response in different tissues. Among them, the Toll pathway, which responds to infections by fungi and Gram-positive bacteria. Activation of the Toll receptor induces N-terminal phosphorylation and degradation via the Cactus proteasome (Cact), IkappaB homologue and inhibitor of NFkappaB superfamily proteins such as Dorsal (DI) and Dif, favoring their nuclear translocation and, consequently, boosting the transcription of genes related to the production of antimicrobial peptides (AMPs). In addition to the Toll pathway, Calpain A (CalpA), a Calcium-dependent cysteine protease, cleaves free Cact presents as dimers in the cytosol, generating Toll-nonresponsive fragments (CactE10). CalpA activity on Cactus is, in turn, repressed via the BMP (Bone Morphogenetic Protein) pathway. Our aim in this study is to explore the mechanism by which CalpA regulates NFkappaB activity in innate immunity in *D. melanogaster* and to verify the role and importance of the BMP pathway in the context of the immune system. In order to generate a catalytically inactive Calpain, through CRISPR-Cas9, we generated new Calpain alleles with punctual records or frame changes close to the active site. One of the newly generated *CalpA[51]* alleles showed a large difference in survival, compared to control flies, even in the absence of immune challenge. Furthermore, males homozygous for *CalpA[51]* showed fertility problems.

**Key-words:** Cactus, Calpain, Toll, BMP, innate immunity, NfkappaB.

## RESUMO PARA LEIGOS

PALOMA DIAS E VASCONCELLOS

### AÇÕES DE CALPAÍNA A NO SISTEMA IMUNOLÓGICO DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

**Orientador:** Helena Maria Marcolla Araujo  
**Coorientador:** Alison Henrique Ferreira Júlio

**Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Apesar da enorme diferença de tamanho e complexidade entre a mosca do vinagre e humanos, essas duas espécies possuem mais pontos em comum do que os olhos podem enxergar. As moscas do vinagre se alimentam de frutas extremamente maduras e se reproduzem com grande facilidade. O surgimento de várias gerações de moscas em um curto espaço de tempo tornou-as excelentes para o estudo da genética. Além disso, o avanço da ciência permitiu o desenvolvimento de técnicas que possibilitaram a fácil edição de seu código genético, ou seja, da “mensagem” contida no DNA que dita características como cor dos olhos, formato das asas, tamanho, etc. Uma dessas técnicas é conhecida como CRISPR-Cas9 ou “tesoura genética”. Cas9 é uma enzima que funciona como uma tesoura, ela pode ser guiada para um local específico no DNA e cortá-lo. Dessa forma uma parte da mensagem contida no DNA pode ser totalmente apagada ou então o sentido da mensagem pode ser alterado. Utilizamos essa técnica para editar a mensagem que codifica para a produção de uma proteína denominada Calpaína A. Produzimos diferentes grupos de moscas que possuem erros distintos nas mensagens que ditam como a proteína calpaína deve ser produzida, gerando proteínas defeituosas. Em seguida estudamos como defeitos nessa proteína podem prejudicar a imunidade, sobrevivência e a eclosão de ovos dessas moscas. Como resultado observamos que essa proteína precisa ter seu nível controlado dentro da mosca, pois seu excesso ou falta pode prejudicar no combate contra infecções e que certos tipos de defeitos na mensagem que codificam a Calpaína podem reduzir a expectativa de vida das moscas e provocar desenvolvimento anormal de embriões.



## ÍNDICE

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
RESUMO PARA LEIGOS .....	viii
1. INTRODUÇÃO: .....	1
1.1. <i>D. melanogaster</i> como organismo modelo para a imunologia: .....	1
1.2. Ativação da via de Toll: .....	3
1.3. Cascata de sinalização da via de Toll:.....	5
1.4. Cisteíno-proteases dependentes de Cálcio (Calpaínas): .....	6
1.5. A via das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs):.....	10
2. JUSTIFICATIVA: .....	11
3. OBJETIVOS: .....	12
3.1. Objetivo geral: .....	12
3.2. Objetivos específicos:.....	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS:.....	12
4.1. Linhagens de <i>D. melanogaster</i> :.....	12
4.2. Desafio imune de moscas adultas de <i>D. melanogaster</i> com alterações genéticas em elementos da via de BMP e de Toll: .....	15
4.3. Análise da sobrevivência de mutantes de <i>CalpA</i> gerado por CRISPR-Cas9: .....	15
4.4. Análise da viabilidade de embriões: .....	16
4.5. Contagem de corpos melanóticos: .....	16
5. RESULTADOS:.....	16
5.1. Efeitos do desafio imune em moscas adultas com alterações em elementos da via de Dpp e de Toll:.....	16
5.2. Efeitos do knockdown para <i>calpA</i> e para <i>cactus</i> na resposta imune celular de larvas. ....	20
5.3. Viabilidade em homozigose das linhagens <i>CalpA</i> [51] e <i>CalpA</i> [55]: .....	22
5.4. Ensaio de viabilidade dos novos alelos de <i>CalpA</i> . .....	23
5.5. Sobrevida de linhagens transgênicas para <i>CalpA</i> injetadas com <i>Micrococcus luteus</i> viável e/ou inativado:.....	25
6. DISCUSSÃO: .....	28
6.1. O papel de <i>CalpA</i> evidenciado pelos novos alelos gerados por CRISPR/Cas9. ....	28
6.2. <i>CalpA</i> modula a via de Toll durante o período larvar. ....	29
6.3 <i>tkv</i> é importante para uma resposta imune eficiente mediante desafio com o fungo <i>B. bassiana</i> . ....	30
7. CONCLUSOES: .....	31
8. REFERÊNCIAS:.....	32

## 1. INTRODUÇÃO:

### 1.1. *D. melanogaster* como organismo modelo para a imunologia:

Um importante pré-requisito para evolução dos metazoários foi o desenvolvimento de mecanismos que permitissem o reconhecimento e o combate a patógenos e sua discriminação em relação às células que constituem o próprio organismo (Hoffmann e Reichhart, 2002). Em vertebrados, dois sistemas atuam em conjunto para a eliminação de invasores: sistema imune inato e sistema imune adaptativo. A imunidade inata consiste na primeira linha de defesa contra infecções, pode constituir de uma barreira física, como a pele, de uma resposta celular, como a fagocitose, ou atuar por mecanismos moleculares como a liberação de substâncias antimicrobianas. Já a imunidade adaptativa é gerada ao longo da vida pelo contato com patógenos, sendo capaz de gerar memória imunológica. Em organismos onde ambas as respostas estão presentes, para manter a homeostasia é necessário que os dois sistemas funcionem em harmonia (Govind, 2008).

Desprovida de imunidade adaptativa, altamente resistente a infecções microbianas e com genoma facilmente manipulável pela existência de numerosas ferramentas genéticas e de edição, *Drosophila melanogaster* tornou-se um importante modelo biológico para o estudo da imunidade inata (Buchon, Silverman e Cherry, 2014). Seu sistema imune inato desenvolve tanto reações celulares quanto humorais. As respostas celulares são desempenhadas pelas células sanguíneas, em *Drosophila*, chamadas de hemócitos. Existem três classes de hemócitos: plasmócitos (células similares aos macrófagos de mamíferos que fazem fagocitose), lamelócitos (células capazes de encapsular microrganismos grandes) e células cristais (células capazes de produzir fenoloxidase) (Hultmark, 2003). Já a resposta imune humoral é caracterizada pela presença de cascatas proteolíticas, como cascatas de melanização, coagulação e do tipo complemento, mas principalmente pela atividade sistêmica de peptídeos antimicrobianos (AMPs) produzidos pelo corpo gorduroso (órgão com várias funções metabólicas e imunes importantes para a *Drosophila*, equivalente funcional do fígado dos mamíferos) (Hoffmann e Reichhart, 2002).

Os AMPs agem desestabilizando a membrana celular de microrganismos, pois esses pequenos peptídeos são carregados positivamente, dessa forma eles são atraídos pela membrana negativa dos microrganismos, onde se aderem e provocam a morte celular (Hanson e Lemaitre, 2020). Até o momento, sete peptídeos antimicrobianos distintos foram bem caracterizados em *Drosophila*, são eles: Defensina (possui ação contra bactérias Gram-positivas); Cecropina,

drosocina, atacinas e dipterocina (ação contra bactérias Gram-negativas); Drosomicina e metchnikowin (ação antifúngica) (Imler e Bulet, 2005). Um estudo utilizando MALDI-TOF apontou para a existência de 24 moléculas induzidas por imunidade (IMs), no qual a maior parte corresponde a peptídeos ainda não caracterizados (Uttenweiler-Joseph *et al.*, 1998). O advento do CRISPR-Cas9 tornou mais fácil a caracterização desses pequenos peptídeos e utilizando essa metodologia foi descoberta uma família de doze genes – os *Bomanins* (*Boms*) que codificam pequenos peptídeos induzidos por Toll (Clemmons, Lindsay e Wasserman, 2015). Mais recentemente, também foi evidenciado a existência de um gene denominado de “*Baramicina A* (*BaraA*)” importante no combate à infecções fúngicas, responsável pela codificação de um terço dos IMs de *Drosophila* originalmente descritos, dentre eles IM5, IM6, IM8, IM10, IM12, IM13, IM22 e IM24 (Hanson *et al.*, 2021).

O sistema imune de *Drosophila melanogaster* é capaz de distinguir entre as diferentes classes de microrganismos invasores e, baseado nessa distinção, vias regulatórias distintas são ativadas. Padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são reconhecidos por receptores celulares gerando uma cascata de sinalização que culmina com a translocação de fatores de transcrição para o núcleo, onde estes irão ativar a transcrição de genes imunes. Em *Drosophila*, existem 4 principais vias de sinalização imune, são elas: A via de Toll, via de IMD, JAK/STAT e JNK (Yu *et al.*, 2022).

A via Toll e a via de IMD ativam a sinalização de NF- $\kappa$ B mediante a invasão de patógenos. A via de Toll responde principalmente a infecções por bactérias Gram-positivas e fúngicas (Michel *et al.*, 2001), culminando com a translocação dos fatores de transcrição, membros da família NF $\kappa$ B, Dorsal (Dl) e dorsal-related immunity factor (Dif) para o núcleo (Hetru e Hoffmann, 2009). Possui importância tanto na imunidade humoral, com a ativação de genes relacionados com a produção de peptídeos antimicrobianos (drosomicina, atacina e metchnikowin), quanto na imunidade celular (Yu *et al.*, 2022), promovendo a sobrevivência (Matova e Anderson, 2010) e regulando a proliferação de células sanguíneas (Qiu, Pan e Govind, 1998). Infecções por bactérias Gram-negativas ativam principalmente a via de IMD (Michel *et al.*, 2001) culminando com a translocação nuclear de outro fator de transcrição NF $\kappa$ B (Relish) (Yu *et al.*, 2022) e sendo responsável por controlar a expressão da maioria dos AMPs de *Drosophila* (Myllymäki, Valanne e Rämetsä, 2014).

A via de JAK/STAT é bem conservada evolutivamente, com grande importância na regulação da imunidade em humanos. Seu mau funcionamento está associado a diversas doenças como artrite reumatóide, psoríase e doença inflamatória intestinal (Myllymäki, Valanne e Rämetsä, 2014). Em *Drosophila*, JAK/STAT participa da resposta imune humoral

ativando a expressão de Turandot A (TotA) que aumenta a resistência da mosca ao estresse e na resposta imune celular, na diferenciação de plasmócitos e linfócitos (Yu *et al.*, 2022). Por fim, as quinases N-terminais c-Jun (JNKs) são membros da família de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e respondem ao estresse causado por espécies reativas de oxigênio, infecções bacterianas, danos ao DNA e citocinas inflamatórias (Tafesh-Edwards e Eleftherianos, 2020).

## 1.2. Ativação da via de Toll:

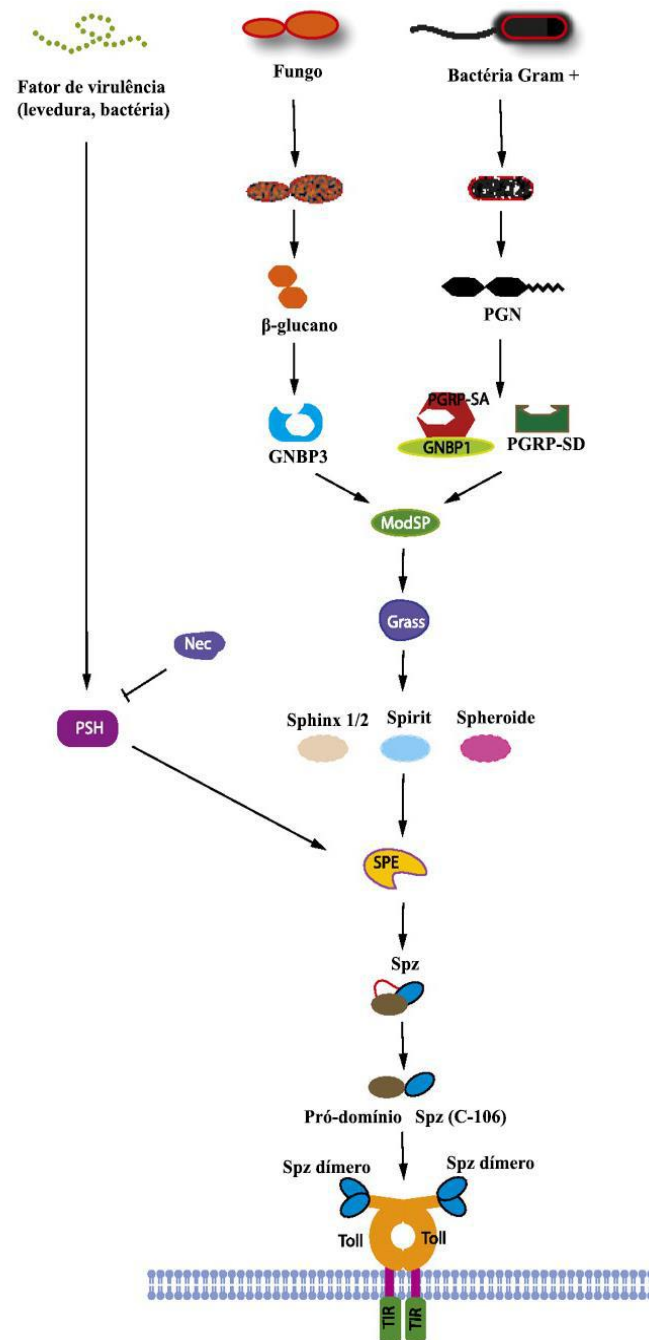
Na imunidade inata, diferentes classes de patógenos podem ser detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na circulação, na membrana celular, no citosol ou no endossoma (Chamy *et al.*, 2008). Em *Drosophila*, PGRPs (Proteínas de reconhecimento de peptídeo glicano) e GNBPs (proteínas de ligação Gram-negativa) são exemplos de PRRs capazes de ativar cascatas de serino-proteases que culminam na clivagem do ligante do receptor Toll, Spatzle (Spz) (Chamy *et al.*, 2008). Spz é uma pró-proteína, constituída por um domínio C-terminal (C-106) e por um pró-domínio N-terminal (Mizuguchi *et al.*, 1998). O pró-domínio oculta sítios de ligação ao receptor Toll presentes em C-106. A proteólise realizada pela enzima processadora de Spz (SPE) provoca mudanças conformacionais que permitem a exposição desses sítios (Arnot, Gay e Gangloff, 2010).

Bactérias Gram-negativas e bacilos Gram-positivos possuem o terceiro aminoácido das porções peptídicas do peptídeo glicano (PGN) formado por um resíduo de ácido meso-diaminopimélico (DAP). Entretanto, muitas bactérias Gram-positivas de importância médica possuem nesse local um resíduo de lisina (Lys) (Ferrandon *et al.*, 2007). Bactérias Gram-positivas do tipo Lys podem ser detectadas por dois membros da família PGRP (PGRP-SA e PGRP-SD) e por um membro da família de GNBPs, o GGBP1 (Ferrandon *et al.*, 2007). PGRP-SA e GGBP1 formam um complexo proteico, com GGBP1 funcionando como uma enzima, hidrolisando o PGN de bactérias e apresentando-o para PGRP-SA (Wang *et al.*, 2006). Para uma resposta imune completa e eficiente contra uma grande gama de espécies de bactérias Gram-positivas, é necessário a presença das três proteínas circulantes na hemolinfa (PGRP-SA, PGRP-SD e GGBP). A importância de cada uma depende do tipo de microrganismo infectante. Algumas bactérias possuem um receptor específico de reconhecimento, outras dependem da combinação deles. Em infecções por *S. pyogenes* e *S. saprophyticus*, PGRP-SD e o complexo receptor PGRP-SA-GGBP1 são funcionalmente redundantes (Bischoff *et al.*, 2004)

As Infecções fúngicas são detectadas por um membro da família dos GNBPs (GNBP3). Ele é capaz de reconhecer componentes que constituem a parede celular de fungos, como os

glucanos (Ferrandon *et al.*, 2007). O reconhecimento de componentes da parede celular de fungos e bactérias por GNBPs e PGRP-SA/GNBP1, respectivamente, convergem em ModSP-Grass e em outras quatro serino-proteases: *pirit*, *spherioide*, and *sphinx1/2* (Valanne, Wang, e Rämét, 2011).

Além dos PRRs, uma outra cascata capaz de ativar SPE é mediada por Perséfone (PSH), essa via é capaz de detectar atividades proteolíticas anormais na hemolinfa induzidas por infecções bacterianas Gram-positivas e fúngicas (Chamy *et al.*, 2008)



**Figura 1** - Ativação da via de Toll por Spz. Componentes da parede celular de fungos e bactérias são reconhecidos por PRRs da família dos PGRPs e GNBPs ou pela via de Perséfone (PSH), em seguida cascatas de serino-proteases

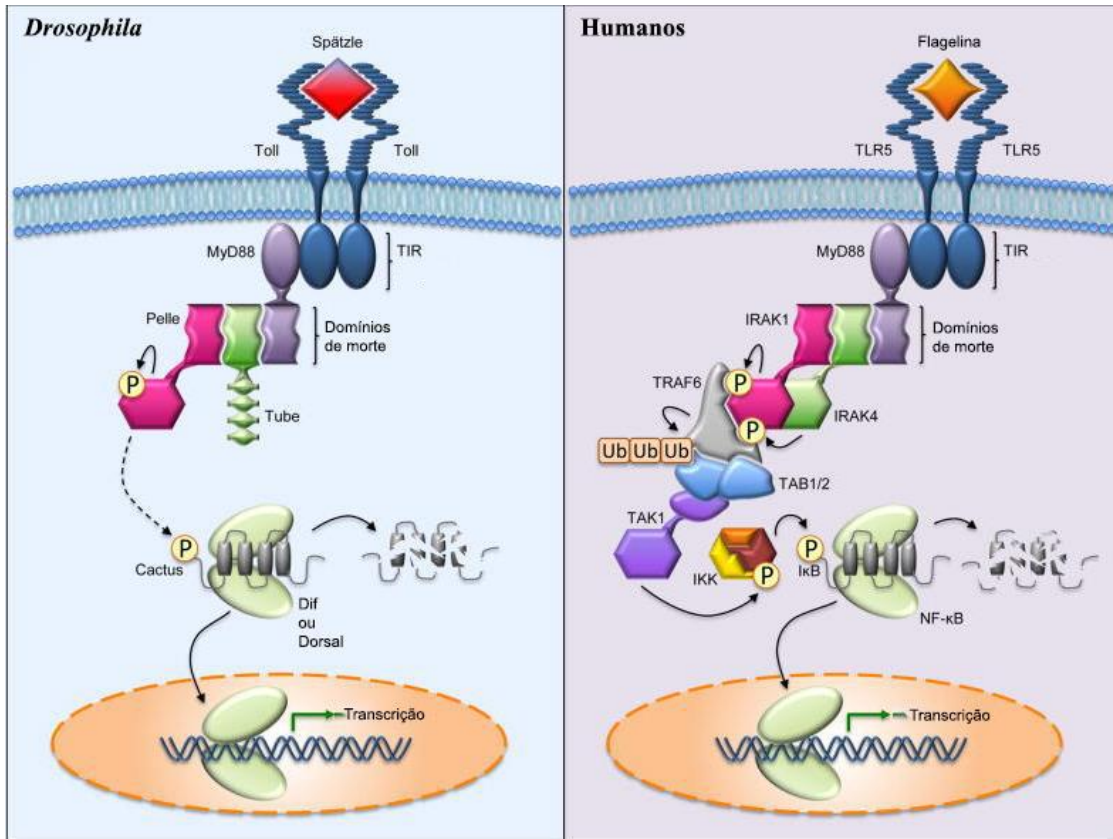
são ativadas culminado com a clivagem de Spz por SPE. Spz ativo (C-106) se liga ao receptor Toll, ativando a via. Esquema adaptado de (Valanne, Wang, e Rämetsä, 2011).

### 1.3. Cascata de sinalização da via de Toll:

O receptor Toll é uma proteína transmembrana que possui um domínio extracelular rico em repetições de leucina e um domínio intracelular denominado de Toll-IL-1R (TIR) devido à similaridade de sequência com o receptor de interleucina 1 (IL-1R) (Hoffmann *et al.*, 2002). Spz se liga como um dímero ao ectodomínio do receptor Toll, ativando a via (Arnot, Gay e Gangloff, 2010).

Após ativação da via, a proteína adaptadora MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88) se associa ao domínio TIR do receptor Toll (Horng e Medzhitov, 2001) e a Tube no domínio de morte. Uma associação heterodimérica é formada, composta por MyD88-Tube-Pelle, onde Tube se liga a MyD88 e Pelle, uma proteína homóloga a IRAKs de mamíferos (quinases associadas ao receptor de interleucina-1), no heterotrímero por duas superfícies distintas no domínio de morte, não havendo uma interação direta entre MyD88 e Pelle (Sun *et al.*, 2004). O efeito final dessa cascata de sinalização é a degradação de Cactus (Cact), membro da família I $\kappa$ B e inibidor de proteínas da superfamília NF $\kappa$ B como Dorsal e Dif, via proteassoma (Belvin, Jin e Anderson, 1995). A identidade da quinase que fosforila Cactus ainda não é conhecida. No entanto, um grupo relata que esta pode ser a proteína homóloga a IRAK, codificada por *pelle* (Daigneault, Klemetsaune e Wasserman, 2013). Cact existe em forma livre ou acoplada a um dímero de Dl ou Dif (Isoda e Nüsslein-Volhard, 1994). Quando Cactus é degradado via proteassoma, Dl e Dif tornam-se livres para migrar para o núcleo, favorecendo a ativação da transcrição de genes relacionados com a produção de peptídeos antimicrobianos (Weber *et al.*, 2003; Ganesan *et al.*, 2011). Em moscas adultas, Toll ativa Dif (Meng, Khanuja e Ip, 1999), enquanto em adultos e em larvas ele é capaz de ativar Dorsal e/ou Dif (Hoffmann e Reichhart, 2002).

A via de Toll em *Drosophila* possui conservação evolutiva com as vias mediadas pelos receptores Toll-like (TLRs) em mamíferos, visto a presença de ortólogos entre as vias (MyD88, Tube e Pelle com MyD88, IRAK4 e IRAK1, respectivamente e Dorsal/Dif semelhantes em sequência e função às proteínas NF- $\kappa$ B de mamífero). Entretanto, em mamíferos a sinalização de TLRs possui componentes que não estão presentes em *Drosophila*, entre eles: TRAF6, TAB, TAK1 e proteínas que compõem o complexo I $\kappa$ B quinase (IKK) (Lindsay e Wasserman, 2014). Uma comparação é apresentada na figura 2.



**Figura 2** - Via de Toll em *Drosophila* e em humanos. Em *Drosophila*, Spätzle se liga ao receptor Toll ativando a via. Em seguida, o domínio TIR da proteína adaptadora MyD88 interage com o domínio TIR do receptor. Ocorre o recrutamento da proteína adaptadora Tube e da quinase Pelle. A ligação de Tube à MyD88 e Pelle ocorre através de domínios de morte. Pelle se autofosforila e Cactus é degradado via proteassoma. Dif ou dorsal tornam-se livres para migrar para o núcleo. A imagem à direita representa um exemplo da sinalização de TLR5 em humanos ativado por Flagelina (componente dos flagelos bacterianos). Após reconhecimento da flagelina pelo TLR5, forma-se a associação MyD88-IRAK4-IRAK1. IRAK4 fosforila IRAK1. IRAK1 se autofosforila, se dissocia do complexo e se liga ao TRAF6. TRAF6 se autoubiquitina e se liga às proteínas TAB/TAK1. TAK1 fosforila o complexo IKK. IκB é fosforilado por IKK e degradado, NFκB torna-se livre para se translocar para o núcleo. Esquema adaptado de (Lindsay e Wasserman, 2014).

#### 1.4. Cisteíno-proteases dependentes de Cálcio (Calpaínas):

Encontrada em quase todos os eucariotos e em algumas bactérias, membro da subfamília das papaínas, a Calpaína é uma protease de cisteína dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  capaz de realizar proteólise de seu substrato em um ou em vários locais, transformando-o e afetando suas funções celulares, ou seja, ela atua modulando a atividade de outras proteínas e regendo diversas funções importantes, como por exemplo, a transdução de sinal e morfogênese celular (Sorimachi, Hata, e Ono, 2011).

Em 1964, Guroff isolou parcialmente a primeira Calpaína descoberta, hoje conhecida como Calpaína-2, da fração solúvel de cérebro de rato, atribuindo-a função proteolítica quando ativada por cálcio (Guroff, 1964). Meyer, Fisher e Krebs denominaram-na como fator ativador de quinase (KAF), pois observaram que essa proteína participa da ativação da fosforilase b

quinase do músculo esquelético de coelho (Meyer, Fisher e Krebs, 1964). Esta protease foi purificada para um estado homogêneo a partir do músculo esquelético de frango por Imahori e colaboradores em 1978, que a chamaram de protease neutra ativada por cálcio (CANP) (Ishiura, *et al.*, 1978). Somente em 1981 a CANP passou a ser chamada de Calpaína, onde cal significa cálcio e a terminação -pain está relacionada com tiol proteases bem conhecidas, incluindo papaína (Murachi *et al.*, 1981).

As Calpaínas podem ser classificadas em clássicas e não-clássicas. A maior parte dos estudos realizados são sobre as  $\mu$ - e m-Calpaínas, também denominadas de Calpaína-1 e Calpaína-2 respectivamente, dessa forma elas constituem as chamadas “Calpaínas clássicas”. A origem da primeira nomenclatura citada está relacionada à quantidade de  $\text{Ca}^{2+}$  necessária para a ativação dessas proteínas *in vitro* ( $\mu$ -Calpaína é ativada por concentrações em micromolares e m-Calpaína em milimolares) (Pal *et al.*, 2003; Ono, Saido e Sorimachi, 2016).

Em relação à estrutura, as Calpaínas clássicas são heterodímeros formadas por uma subunidade grande de 80 kDa (denominada de CAPN1 para Calpaína-1 e CAPN2 para Calpaína-2), envolvida com a atividade proteolítica e por uma subunidade pequena de 28 kDa, que constitui a subunidade reguladora (Tsuji *et al.*, 1981). A subunidade grande é subdividida em: Uma região de hélice âncora N-terminal; um domínio catalítico denominado de protease de cisteína do tipo calpaína conservada (CysPc) que pode ser subdividido em: núcleo de protease 1 e 2 (PC1 e PC2), nele se localiza a tríade catalítica constituída por Cisteína, Histidina e Asparagina, onde a cisteína encontra-se localizada em PC1 e a histidina e asparagina em PC2; domínio de  $\beta$ -sanduíche do tipo calpaína (CBSW), responsável pelo direcionamento da proteína Calpaína para a membrana, onde seus substratos estão localizados e por fim, um domínio penta-EF-hand (PEF) que possui cinco sítios de ligação a cálcio (Ono, Saido e Sorimachi, 2016; Araujo, Julio e Cardoso, 2018; Spinozzi *et al.*, 2021). Já a subunidade pequena (CAPNS1), comum a ambas, apresenta um domínio rico em glicina e outro domínio contendo 5 sítio de ligação à  $\text{Ca}^{2+}$  (PEF). Para definir uma proteína como homóloga de Calpaína é preciso que ela possua a sequência do sítio CysPc semelhante à sequência das calpaínas convencionais (Goll *et al.*, 2003; Ono, Saido e Sorimachi, 2016). As calpaínas não clássicas não possuem similaridade de domínios completa em relação às clássicas, a região CysPc possui homologia de sequência, mas as não clássicas geralmente não possuem o domínio PEF e/ou o domínio CBSW (Spinozzi *et al.*, 2021).

A Calpaína é uma proteína que participa de vários sistemas. É bem conhecido na literatura que o equilíbrio correto dos seus níveis se faz necessário, visto que sua saturação pode



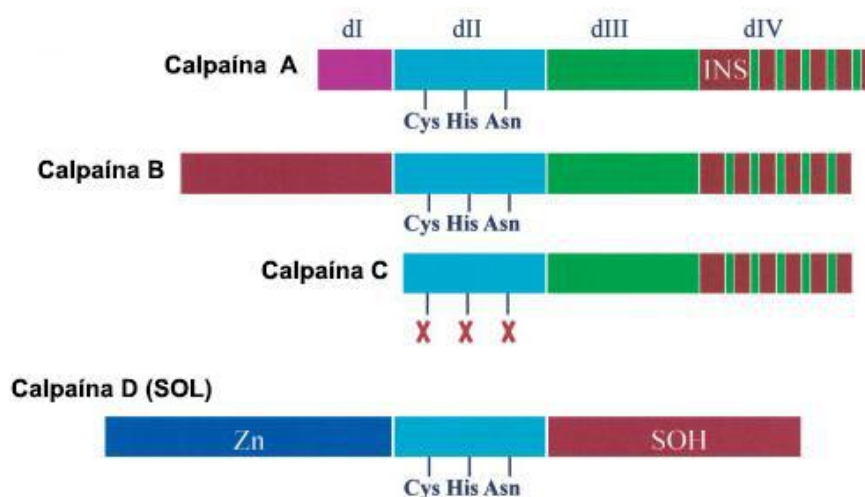
ser prejudicial assim como seu *knockdown*. As  $\mu$ - e  $m$ -Calpaínas apresentam atividade elevada em pacientes com distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Reddy, Anandavalli e Anandaraj, 1986), assim como mutações de ganho de função do gene CAPN5 (gene que codifica a subunidade grande de Calpaína-5) levam a vitreorretinopatia inflamatória neovascular autossômica dominante (ADNIV), uma condição autoimune do olho que progride para a cegueira completa (Mahajan *et. al.*, 2012). Já pacientes com distrofias musculares de cinturas (LGMDs) apresentam mutações no gene CANP3 (gene que codifica a subunidade grande da Calpaína-3) que gera uma deficiência em seu produto gênico (Richard *et. al.*, 1995), a paraplegia espástica e ataxia espinocerebelar são também exemplos de doenças causadas por mutações de perda de função, dessa vez em Calpaína-1 (Gan-Or *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016).

Dessa forma, com o objetivo de manter a homeostase é necessário que os eventos proteolíticos realizados pela Calpaína tenham um rigoroso controle. Um exemplo de regulação é a presença de um inibidor da Calpaína, a calpastatina, que se liga ao seu sítio ativo, impedindo sua atividade (Spinozzi *et al.*, 2021). Outro aspecto da regulação da Calpaína é que o seu sítio ativo na ausência de  $Ca^{2+}$  possui uma geometria que impossibilita a sua ação, devido a grande distância entre os aminoácidos cisteína e histidina. A ligação do  $Ca^{2+}$  reduz essa distância e permite que a tríade catalítica alcance uma geometria favorável para sua plena atividade. A ligação do  $Ca^{2+}$  também leva à autólise da âncora N-terminal de Calpaína, influenciando na formação da tríade, visto que permite uma maior liberdade de PC1 para que esse domínio se mova em direção a PC2, permitindo a ativação de Calpaína em concentrações mais baixas de  $Ca^{2+v}$  (Hosfield *et al.*, 1999). Porém, a autólise não é um evento indispensável para a ativação (Chou *et al.*, 2011)

Enquanto o genoma humano possui 15 genes que codificam para proteases do tipo Calpaína, a *Drosophila melanogaster* possui apenas quatro (*CalpA*, *CalpB*, *CalpC* e *CalpD*). As calpaínas de *Drosophila* não dispõem de subunidade pequena, apenas a subunidade grande catalítica. Calpaína A e B (*CalpA* e *CalpB*) são classificadas como convencionais e possuem os 4 domínios similares às  $\mu$ - e  $m$ -calpaínas, a diferença mais marcante é a inserção de 76 aminoácidos no domínio IV em Calpaína A e o longo domínio N-terminal de Calpaína B (Friedrich, 2004). Calpaína C não possui domínio I e apresenta os aminoácidos que constituem a tríade catalítica mutados (Cys  $\rightarrow$  Arg, His  $\rightarrow$  Val e Asn  $\rightarrow$  Ser). A Calpaína D é classificada como Calpaína não convencional, visto que o domínio I possui um domínio de dedo de zinco (Zinc finger) e um domínio SOL no lugar dos domínios III e IV (Friedrich, 2004). Defeitos no gene que codifica esse tipo de calpaína resultam em alterações comportamentais durante o vôo das

moscas. Isso ocorre devido a degeneração de células nos lobos ópticos em desenvolvimento que resultam na ausência de certas classes de neurônios (Delaney *et al.*, 1991).

Em vertebrados, I $\kappa$ B $\alpha$  (membro de uma família de proteínas celulares que inibem o fator de transcrição NF- $\kappa$ B) é alvo de Calpaína, assim como seu homólogo em *Drosophila*, a proteína Cactus. Ambos possuem em sua região C-terminal uma região enriquecida em Prolina (P), Glutamato (E), Serina (S) e Treonina (T), denominada de sequência PEST, necessária para a ligação com Calpaína (Fontenele *et al.*, 2009). Em vertebrados, após essa ligação, I $\kappa$ B $\alpha$  é clivado e degradado (Shumway, Maki, e Miyamoto, 1999). Em *Drosophila*, após reconhecimento do domínio C-terminal, Cact é clivado em sua região N-terminal, originando um fragmento não responsivo a Toll, conhecido como CactE10, que é capaz de interagir e inibir a translocação nuclear de Dorsal (Fontenele, *et al.* 2013). Por outro lado, nosso grupo mostrou que além deste efeito, CactE10 potencializa a atividade transcricional de Dorsal durante a embriogênese (Cardoso *et al.*, 2017). No entanto, ainda não é claro se CactE10 é capaz de potencializar ou inibir a atividade de Df/Dif na transcrição dos peptídeos antimicrobianos (AMPs), porém sua presença já foi detectada no corpo gorduroso de larvas e de moscas adultas (Fontenele *et al.*, 2013). Além disso, resultados indicam que CalpA altera sinais da via de Toll, visto que tanto o *knockdown* quanto a superexpressão de *CalpA* levam a um decréscimo nos níveis da AMP Drosomicina, mas não modificam os níveis de Diptericina (peptídeo regulado pela via de IMD) (Fontenele *et al.*, 2013).



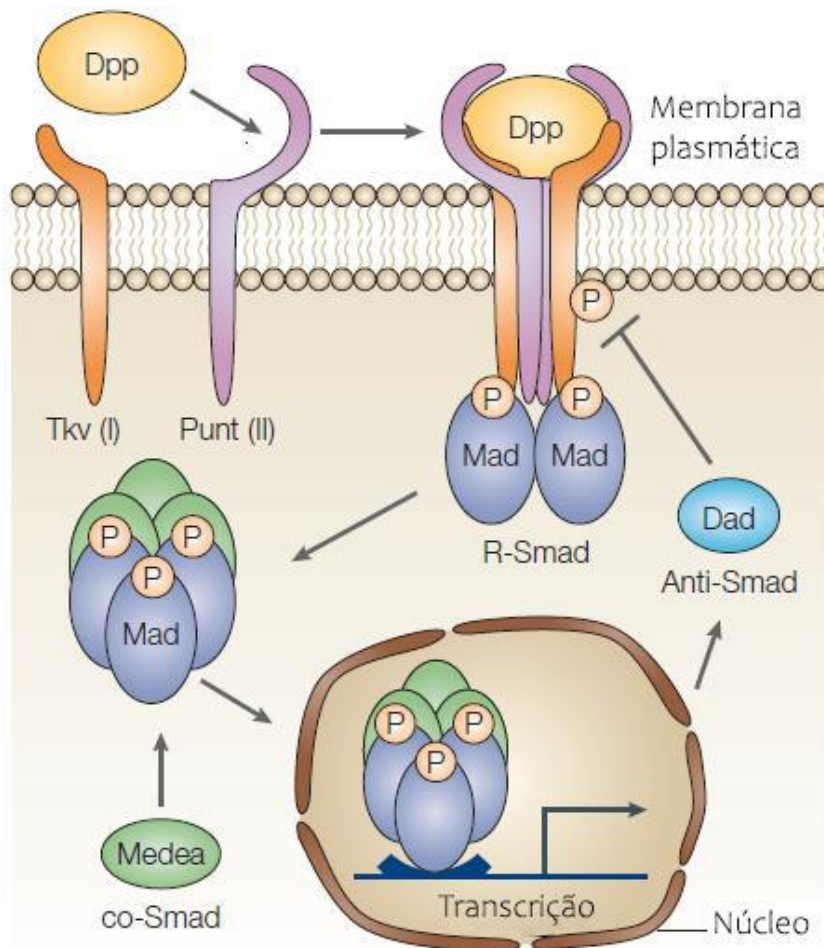
**Figura 3** - Estrutura das quatro Calpaínas presentes em *D. melanogaster*. Barras verticais no domínio IV representam os sítios de ligações à cálcio (PEF: penta-EF-hand). “X” em Calpaína C representa mutação nos três resíduos do sítio catalítico. INS (insert) - inserção de 76 aminoácidos no domínio IV em Calpaína A. Esquema adaptado de (Friedrich, Tompa e Farkas, 2004).

### 1.5. A via das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs):

Pertencente à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ), a via das proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) constitui um conjunto de proteínas sinalizadoras envolvidas na manutenção da homeostase dos tecidos e no desenvolvimento embrionário (Wang *et al.*, 2014). As vias que fazem parte da superfamília TGF $\beta$  possuem um mecanismo básico de sinalização que envolve dois receptores de serina/treonina quinases (receptor do tipo I e II), onde o receptor II ativa o I e o receptor I fosforila uma R-Smads. R-Smad se associa a uma Co-Smad e o complexo R-Smad/Co-Smad é então translocado para o núcleo onde atua como fator de transcrição (Parker, Stathakis e Arora, 2004). Em *Drosophila*, foram identificados três ligantes pertencentes à subfamília de BMP (Decapentaplegic - Dpp, Screw - Scw e Glass-bottom boat - Gbb), três receptores do tipo I (Saxophone - Sax, Atr-1/Baboon Babo e Thickveins - Tkv), dois receptores do tipo II (Punt - Put e Wishful thinking - Wit), dois R-Smads (Mad e dSmad2) e Medea como o único Co-Smad (Parker, Stathakis e Arora, 2004).

O ligante Dpp atua em todas as fases do desenvolvimento da *Drosophila* e também possui papel importante na homeostase tecidual (Hamaratoglu, Affolter e Pyrowolakis, 2014). Durante a ativação da via de Dpp, o receptor Thick veins (Tkv) forma um complexo heteromérico com o receptor Punt (Put), mediante o recrutamento do ligante Decapentaplegic (Dpp). Put fosforila Tkv. Essa fosforilação sinaliza para a fosforilação da proteína citoplasmática Mothers against Dpp (Mad). P-Mad (forma fosforilada de Mad) associa-se com uma segunda proteína, denominada Medea. O complexo pMad-Medea migra para o núcleo onde atua como um fator de transcrição (Hamaratoglu, Affolter e Pyrowolakis, 2014) (fig. 2).

Dpp é capaz de regular negativamente a atividade de Calpaína A durante a embriogênese, visto que embriões com a via de Dpp maternal inibida, utilizando uma forma Dominante Negativo de thickveins (tkv[DN]) possuem a atividade e os níveis de mRNA de CalpA aumentados em relação a embriões selvagens (Fontenele *et al.*, 2009). Ainda não é reconhecido se o mesmo ocorre no contexto do sistema imune, porém já foi demonstrado que a superexpressão de Dpp reduz os níveis de peptídeos antimicrobianos (Clark *et al.*, 2011). Além disso, a presença de elementos silenciadores Mad-Med-Shn próximos aos genes AMP e o aumento da expressão de AMPs em *knockdown* para mad no corpo de gorduroso, indicam que a via de Dpp atua inibindo peptídeos antimicrobianos de maneira direta (Clark *et al.*, 2011).



**Figura 4** - Esquema da sinalização de BMP/Dpp em *Drosophila*. O ligante Dpp se liga ao receptor do tipo I (Tkv) e ao receptor do tipo II (Punt). Tkv forma um complexo heteromérico com o Punt e é fosforilado por ele. Tkv fosforila Mad. Mad se associa a Medea. O complexo Mad-Medea é translocado para o núcleo, onde regulam a transcrição de genes-alvo. Daughters against Dpp (Dad) é antagonista da sinalização. Este esquema foi concebido a partir de (Häcker, Nybakken e Perrimon, 2005).

## 2. JUSTIFICATIVA:

NF- $\kappa$ B consiste em uma família de proteínas que atuam como fatores de transcrição, regulando resposta imunes inatas e adaptativas (Taniguchi e Karin, 2018). A regulação da atividade de NF- $\kappa$ B em mamíferos é essencial, visto que sua ativação constitutiva é associada à inflamação crônica e câncer (Karin, 2006). Essa regulação ocorre através do controle dos níveis e degradação de I $\kappa$ Bs, que pode ser realizado pela via de Toll, mas também por mecanismos independentes (Hinz e Scheidereit, 2014). Em vertebrados, I $\kappa$ B $\alpha$  é alvo de Calpaína, assim como seu homólogo em *Drosophila*, a proteína Cactus. Em *D. melanogaster*, Calpaína A (CalpA) cliva moléculas de Cactus livres, presentes como dímeros no citosol, gerando uma molécula de Cactus íntegro e um fragmento CactE10 que não possui região N-terminal, sendo portanto insensível à via de Toll (Fontenele *et al.*, 2009). Em humanos, a

proteólise de I $\kappa$ B $\alpha$  e ativação de NF- $\kappa$ B por Calpaína também é realizada por processo independente de Toll (Han *et al.*, 1999). Em ambos organismos os mecanismos pelos quais as Calpaínas atuam ainda não foram desvendados, dessa forma, propomos avaliar o papel de CalpA como regulador de Cactus no contexto do sistema imune de *Drosophila*. Os mecanismos desvendados por esse trabalho poderão servir de base para estudos de organismos mais complexos como o homem.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. Objetivo geral:**

Verificar a atuação e importância da via de BMP e de Calpaína A no contexto do sistema imune de *Drosophila melanogaster*.

#### **3.2. Objetivos específicos:**

3.2.1. Verificar se alterações genéticas em elementos da via das BMPs e de Toll afetam a sobrevivência de moscas adultas após desafio imune com o fungo *Beauveria bassiana*.

3.2.2. Determinar efeitos de mutações geradas por CRISPR/Cas9 no gene de CalpA sobre a resposta imune.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **4.1. Linhagens de *D. melanogaster*:**

As linhagens aqui utilizadas foram obtidas pelo Bloomington *Drosophila* Stock Center - BDSC (Indiana- EUA), exceto pT>cacteGFP e pT>cactE10eGFP que foram geradas por Helena Araujo no laboratório da Dr<sup>a</sup> Trudi Schupbach, na Universidade de Princeton. A expressão de RNA de interferência ou de inserções acopladas ao GFP (Green fluorescent protein) pode ser dirigida para tecidos imune específicos através do sistema UAS/GAL4, proveniente de leveduras (Brand e Perrimon, 1993). Neste sistema aplicado à *Drosophila*, a sequência UAS (Upstream Activation Sequence) é um enhancer capaz de ativar a expressão de um transgene apenas na presença do fator de transcrição GAL4. GAL4 liga-se à sequência UAS e ativa a expressão do gene alvo sob controle de UAS. A expressão de GAL4, por sua vez, pode ser dirigida por um enhancer de expressão tecido-específica presente no genoma da mosca. Deste modo, as construções são expressas no mesmo padrão de expressão do enhancer endógeno que agora dirige GAL4 (Fontenele, 2006). Utilizando diferentes linhagens GAL4 (Cg>GAL4 e He>GAL4), podemos alterar a via de BMPs ou de Toll no corpo gorduroso e

hemócitos, ou especificamente nos hemócitos, respectivamente. Através de cruzamentos de linhagens He>GAL4 ou Cg>GAL4 com as transgênicas dirigidas pelo elemento UAS, a sobrevivência de moscas com diferentes backgrounds genéticos (Tabela 1) pode ser verificada após o desafio imune.

**Tabela 1** - Características de linhagens transgênicas utilizadas no desafio imune.

Genótipos:	Cromossomo:	Efeito:
Cg>Gal4; CactE10eGFP	2,3	Superexpressão de CactE10eGFP no corpo gorduroso e nos hemócitos.
Cg>Gal4; pT- CacteGFP	2,3	Superexpressão de CacteGFP no corpo gorduroso e nos hemócitos.
Cg>Gal4; pT- CalpAeGFP	2,3	Superexpressão de CalpAeGFP no corpo gorduroso e nos hemócitos.
Cg>Gal4; UAS- dppRNAi	2,2	<i>Knockdown</i> da expressão de <i>dpp</i> , por RNA de interferência direcionado ao corpo gorduroso e aos hemócitos.
Cg>Gal4; UAS- dppGFP	2,2	Superexpressão de <i>dppGFP</i> no corpo gorduroso e nos hemócitos.
He>Gal4; UAS- dppGFP	2,2	Superexpressão de <i>dppGFP</i> nos hemócitos apenas.
He>Gal4; UAS- tkv RNAi	2,3	<i>Knockdown</i> de <i>tkv</i> através de RNA de interferência nos hemócitos apenas.
Cg>Gal4; UAS- tkv[DN]	2,3	Dominante negativo para <i>tkv</i> no corpo gorduroso e nos hemócitos.
Cg>Gal4 ; UAS- tkv RNAi	2,3	<i>Knockdown</i> de <i>tkv</i> através de RNA de interferência no corpo gorduroso e nos hemócitos.

As construções de CacteGFP, CactE10eGFP e CalpAeGFP estão sobre o controle de várias sequências “UAS”, contidas no vetor de transformação pT (pTiger, Ferguson *et al.*, 2012)

As linhagens editadas de Calpaína foram geradas pelo doutorando Alison Henrique durante seu estágio de modalidade Sanduíche no Laboratório do Dr. Ethan Bier (UCSD-EUA), laboratório de referência na área de edição de genomas em *Drosophila*. O objetivo foi a geração de mutantes que apresentassem a proteína CalpA cataliticamente inativa pela substituição do aminoácido Cisteína por um aminoácido Serina em seu sítio ativo. Foram injetados dois gRNA's (um responsável por guiar a Cas9 para realizar a clivagem no éxon 4 e outro que se liga no éxon 12) nas células polares de uma linhagem de *Drosophila* denominada CalpA CRIMIC (CRISPR-Mediated Integration Cassette). Essa linhagem apresenta a inserção de um cassete MIMIC contendo T2A-Gal4 em conjunto com 3xP3-dsRed inserida de forma precisa por CRISPR no genoma da *Drosophila* (Lee *et al.*, 2018). Além disso, essa linhagem também possui uma inserção da proteína fluorescente GFP no gene CalpA. Além dos gRNA's, também foi injetado um plasmídeo que codifica a proteína Cas9 e um plasmídeo para reparar o DNA clivado que contém toda a sequência de nucleotídeos do gene de CalpA do éxon 3 ao éxon 13, porém possui nucleotídeos alterados para permitir a troca de um aminoácido (Cisteína143 por Serina). Os embriões sobreviventes das injeções foram em seguida cruzados com uma linhagem balanceadora (Sco/Cyo). Machos F1, provenientes do cruzamento entre F0 e a linhagem balanceadora, foram cruzados novamente com uma linhagem balanceadora. O screening de machos F1 foi realizado observando a fluorescência de GFP no olho das moscas. A ausência de GFP no olho é um indício que houve edição do DNA, pois a inserção do GFP que estava presente no gene *CalpA* foi removido. Foi realizado o sequenciamento da região do sítio ativo (do éxon 4 ao 5) de moscas que não apresentavam GFP nos olhos. Os resultados do sequenciamento indicam que houve mutações no sítio ativo das moscas sequenciadas, porém o reparo do DNA não foi um Reparo Direcionado por Homologia (HDR), mas sim uma União de Extremidade Não Homóloga (NHEJ). Neste trabalho utilizamos as seguintes linhagens geradas: *CalpA[61]*, *CalpA[64]* e *CalpA[51]*. *CalpA[61]* possui deleção de um nucleotídeo no éxon 3 de CalpA que ocasiona uma mudança de quadro de leitura (frame-shift). *CalpA[64]* possui uma grande deleção no gene de CalpA. *CalpA[51]* possui no éxon 3 uma substituição de um nucleotídeo resultando em uma mutação redundante que codifica Val135 e uma substituição de 3 pares de bases seguida por uma deleção de 6 nucleotídeos no intron 3.



**Figura 5 -** Mutações presentes nas novas linhagens transgênicas para CalpA geradas via NHEJ. Esquema de (Julio, 2022).

#### 4.2. Desafio imune de moscas adultas de *D. melanogaster* com alterações genéticas em elementos da via de BMP e de Toll:

Para o desafio imune, machos adultos de 0 a 7 dias de uma determinada linhagem transgênica foram separados em 3 tubos contendo alimentação, cada tubo com 20 machos e representando uma condição experimental diferente. Na primeira condição, os machos não foram desafiados (No Prick/NP). Na segunda condição, os machos foram desafiados, mas sem inóculo (Prick Only/PO), com uma agulha previamente esterilizada com álcool 70% e em seguida flambada em bico de Bunsen. Já na terceira condição, os machos foram desafiados com uma agulha contendo esporos de *Beauveria bassiana* (BB). O fungo BB utilizado no desafio cresce previamente em meio BDA (Batata - Dextrose - Agar), em estufa a 30°C. Para realizar a injúria, as moscas foram adormecidas em flypad permeado por CO<sub>2</sub>. As injúrias ocorreram na parte lateral inferior do tórax da mosca adulta. Em seguida, as moscas foram mantidas a 25°C, repicadas de 2 em 2 dias, e sua sobrevivência monitorada diariamente por 10 dias consecutivos de modo cego, de forma em que os tubos são numerados por uma segunda pessoa e contados sem o conhecimento da correspondência dos números com os genótipos e com os inoculantes. Foram realizados 3 experimentos independentes (para cada genótipo e condição), correspondendo às 3 replicatas biológicas (n=3). As curvas de sobrevivência e o teste estatístico “Log-rank” foram gerados no software Prism a fim de verificar a presença de diferença significativa entre curvas de sobrevivência de moscas controle e de moscas transgênicas.

#### 4.3. Análise da sobrevivência de mutantes de *CalpA* gerado por CRISPR-Cas9:

Com objetivo de analisar a sobrevivência das linhagens de CalpA geradas por CRISPR-Cas9, machos adultos de 0 a 7 dias foram separados em 3 tubos contendo alimentação, cada tubo com 20 machos e representando uma condição experimental diferente. Na primeira condição, os machos não foram injetados. Na segunda condição, com auxílio de uma lupa e um microinjetor, os machos foram injetados com meio LB (Luria Bertani). Já na terceira condição, os machos foram injetados com uma mistura de 100µl da bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* (*M.*



*luteus*) (OD600 = 300) e 2 µl de um corante azul na região anterior lateral do tórax. A bactéria *Micrococcus luteus* foi cultivada durante a noite em meio LB a 37° e concentrada para OD600 = 300 em 20% de glicerol. A sobrevivência dessas moscas foi monitorada diariamente por 10 dias consecutivos. Nas injeções com a bactéria morta, *M. Luteus* foi inativada pelo calor de autoclavação a 121 °C por 21 min. Foram realizados 3 experimentos independentes, correspondendo às 3 replicatas biológicas (n=3).

#### **4.4. Análise da viabilidade de embriões:**

Com objetivo de analisar a viabilidade de embriões gerados a partir do cruzamento das linhagens transgênicas de CalpA entre si, com linhagens controle ou com linhagens deficientes para CalpA, 20 fêmeas de um determinado genótipo foram mantidas com 10 machos de outro genótipo por 48h, a 22 °C, em uma garrafa com levedura. Após o cruzamento, fêmeas e machos foram passados para outra garrafa contendo meio de uva e levedura. Vinte e quatro horas depois foram coletados e alinhados 100 embriões de cada cruzamento, mantidos na estufa à 22 °C em um pote vedado e forrado com papel úmido, o número de ovos eclodidos e não eclodidos foi contabilizado após 24h da oviposição.

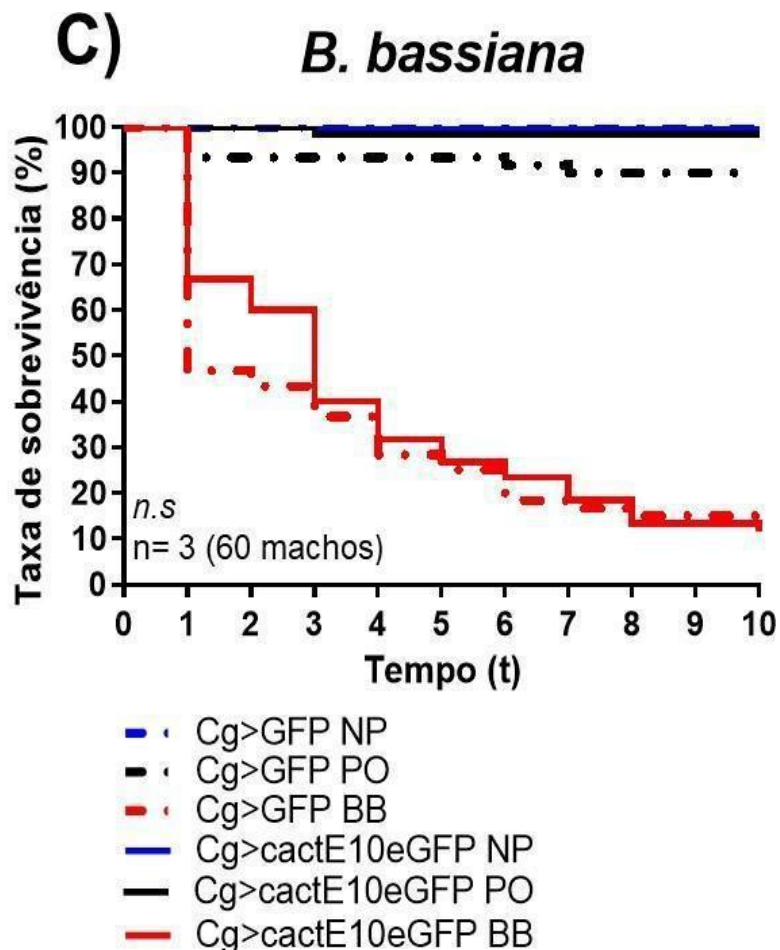
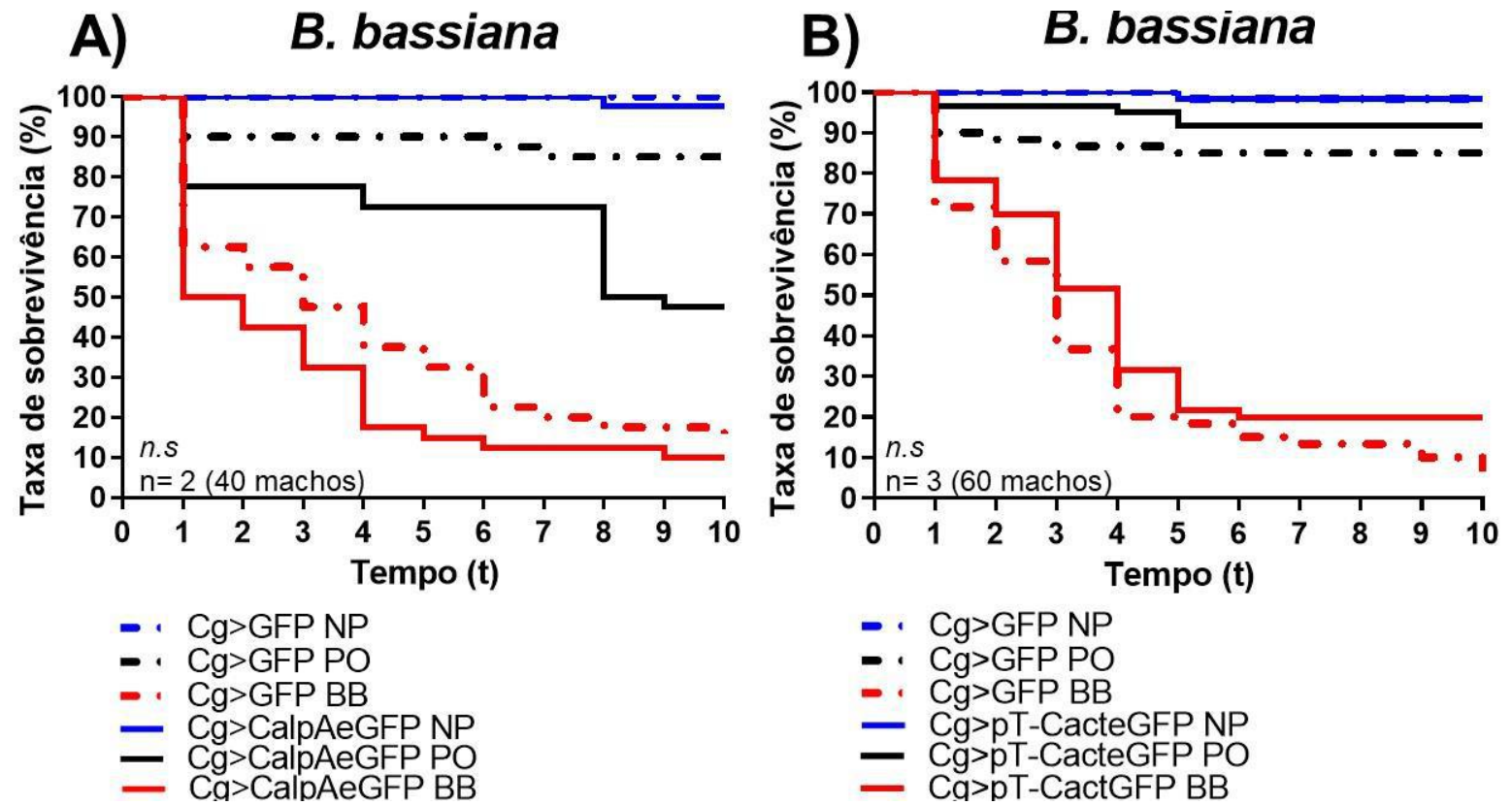
#### **4.5. Contagem de corpos melanóticos:**

Trinta larvas de 3º ínstar, por genótipo, foram anestesiadas com gelo e a quantidade de corpos melanóticos presentes na cutícula dessas larvas foi contabilizado com auxílio de uma lupa. O gráfico da quantidade de corpos melanóticos por larva foi gerado no software Prism utilizando o teste estatístico “T test”. Foi realizado um experimento independente (n=1).

### **5. RESULTADOS:**

#### **5.1. Efeitos do desafio imune em moscas adultas com alterações em elementos da via de Dpp e de Toll:**

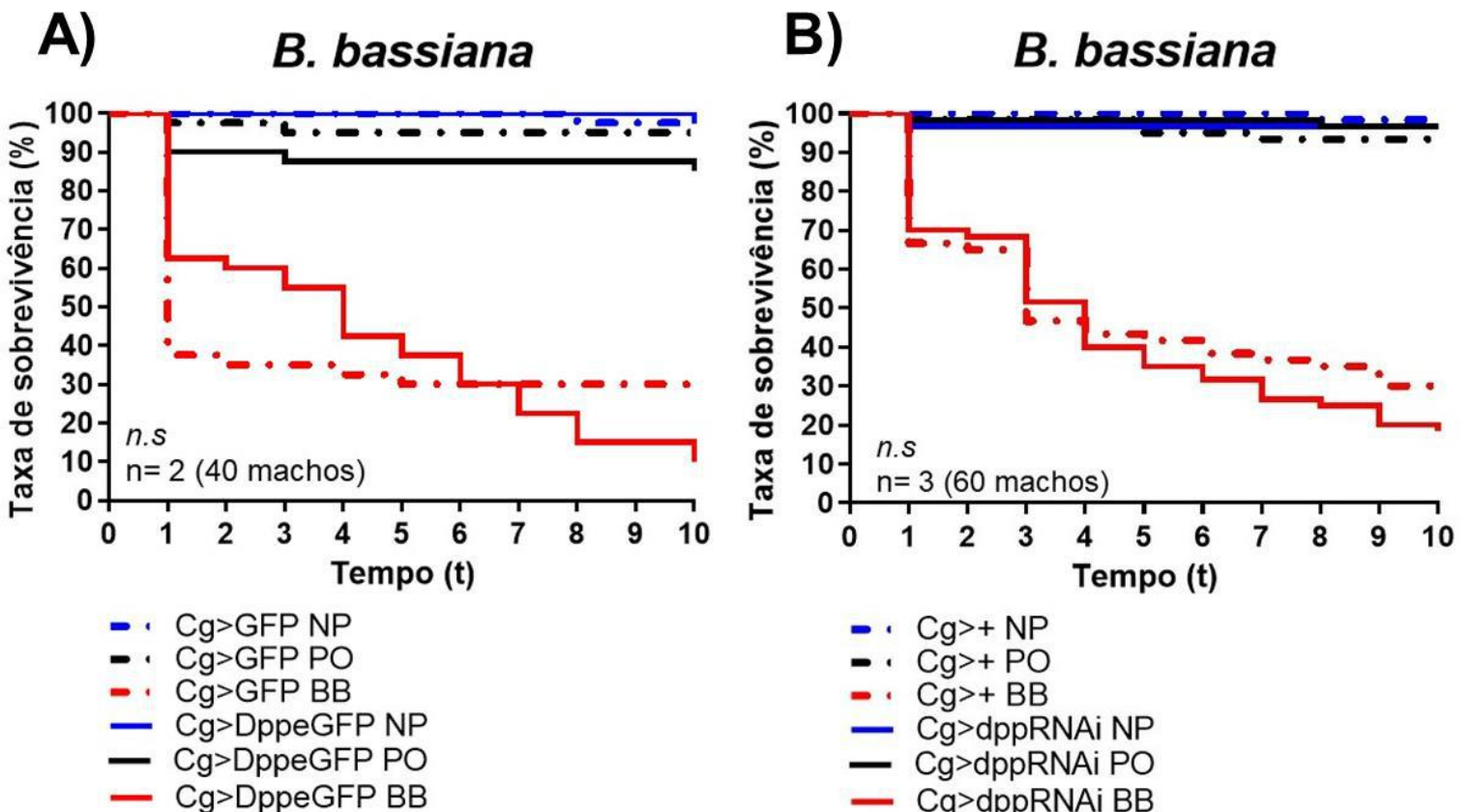
Uma vez que estudos anteriores apontaram para um papel de CalpA no sistema imune e para sua interação física com Cactus (Fontenele *et al.*, 2013), investigamos se alterando a expressão de ambos afetava a resposta imune em moscas adultas. Dessa forma, desafiamos machos, de 0 a 7 dias, provenientes de linhagens com superexpressão de Calpaína, Cactus íntegro e do fragmento CactusE10 (gerado pela clivagem de Cactus por CalpA) com o fungo *B. bassiana*, pois este é capaz de ativar a via de Toll (Fig 6).

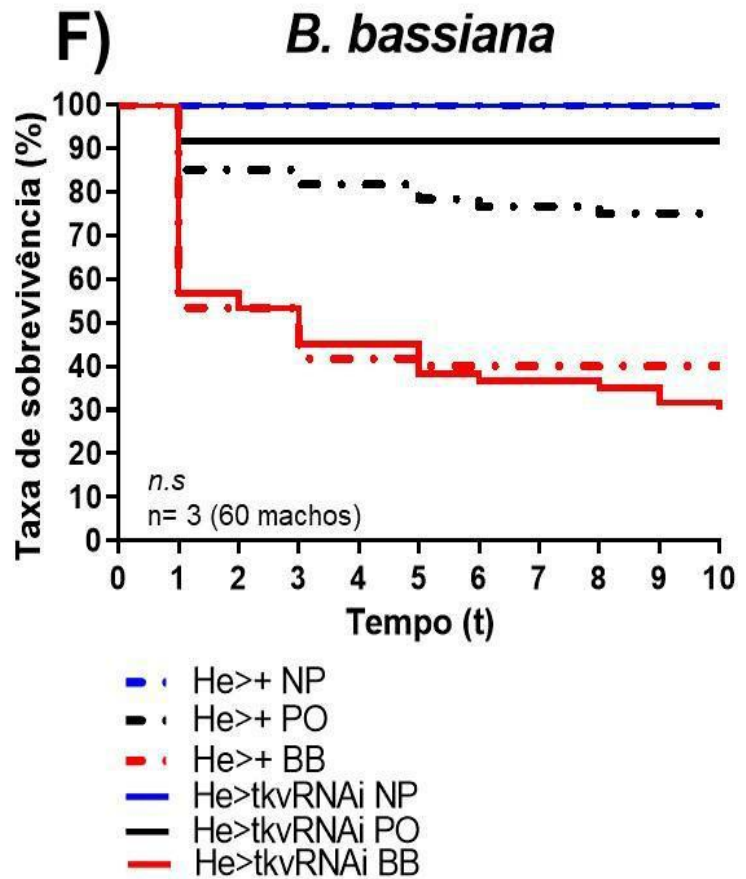
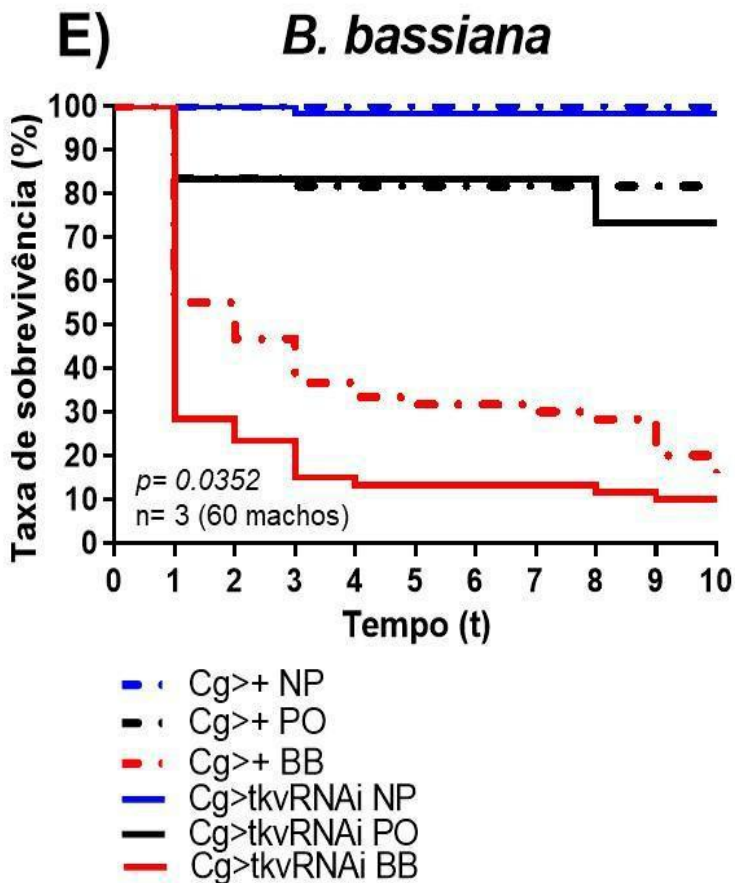
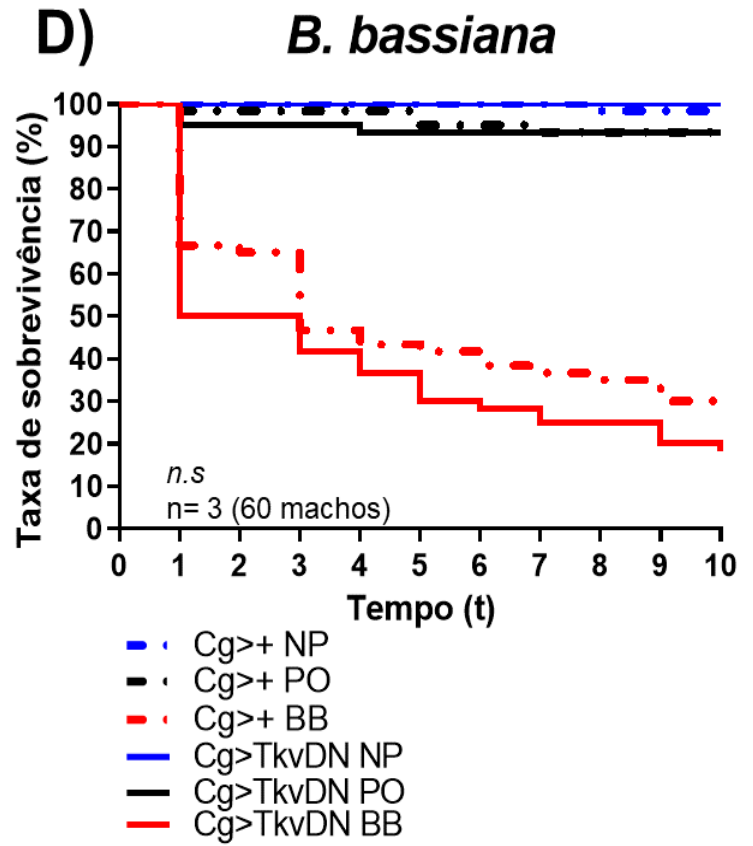
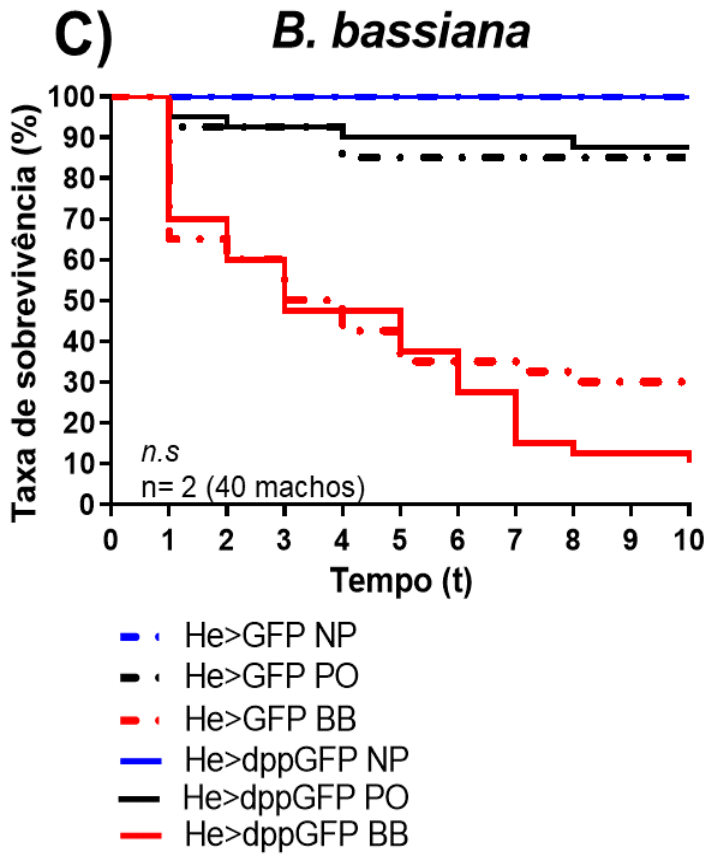


**Figura 6** - Curvas de Sobrevivência de linhagens com alterações na via de Toll. (NP) – Machos não desafiadas, Prick Only (PO) – Machos desafiadas com agulha estéril, *Beauveria bassiana* (BB) – Machos desafiados com agulha contaminada com *Beauveria bassiana*. O *p*-value apresentado foi calculado apenas para a diferença entre a curva de moscas controle e de moscas transgênicas desafiadas com o fungo (BB). As demais condições experimentais não exibiram diferenças significativas. O teste estatístico utilizado foi o “Log-rank” gerado no software Prism. Curvas de sobrevivência de moscas controle estão representadas em tracejado e curvas de sobrevivência de moscas transgênicas representadas em linha reta. O número de replicatas biológicas está indicado por “n”, cada replicata é formada por um total de 20 machos.

Apesar de já ter sido demonstrado uma queda na sobrevivência de moscas *knockdown* para CalpA mediante a desafio imune (Fontenele *et al.*, 2013), a superexpressão de CalpA não resultou em diferença significativa (Fig. 6A). É possível que o pequeno número de ensaios não tenha permitido observar uma diferença, já que uma tendência de queda na sobrevivência é observada. O mesmo ocorreu para superexpressão de Cactus íntegro (Cg>pT-CacteGFP) (Fig. 6B) e o fragmento CactusE10 (Cg>pT-CactE10eGFP) (Fig. 6C). A realização de um desafio imune utilizando moscas *knockdown* para Cactus não foi possível devido a viabilidade extremamente baixa da linhagem mesmo na ausência de um desafio imune.

Em seguida, realizamos desafios imunes utilizando linhagens transgênicas para elementos da via de BMP (Fig.7), visto que CalpA é regulada negativamente por essa via durante o processo de padronização do eixo dorso-ventral embrionário, nos perguntamos se o mesmo ocorreria durante a resposta imune.





**Figura 7** - Curvas de Sobrevivência de linhagens com alterações na via de BMP. (NP) – Machos não desafiadas, Prick Only (PO) – Machos desafiadas com agulha estéril, *Beauveria bassiana* (BB) – Machos desafiados com agulha contaminada com *Beauveria bassiana*. O *p-value* apresentado foi calculado apenas para a diferença entre a curva de moscas controle e de moscas transgênicas desafiadas com o fungo (BB). As demais condições experimentais não exibiram diferenças significativas. O teste estatístico utilizado foi o “Log-rank” gerado no software Prism. Curvas de sobrevivência de moscas controle estão representadas em tracejado e curvas de sobrevivência de moscas transgênicas representadas em linha reta. O número de replicatas biológicas está indicado por “n”, cada replicada é formada por um total de 20 machos.

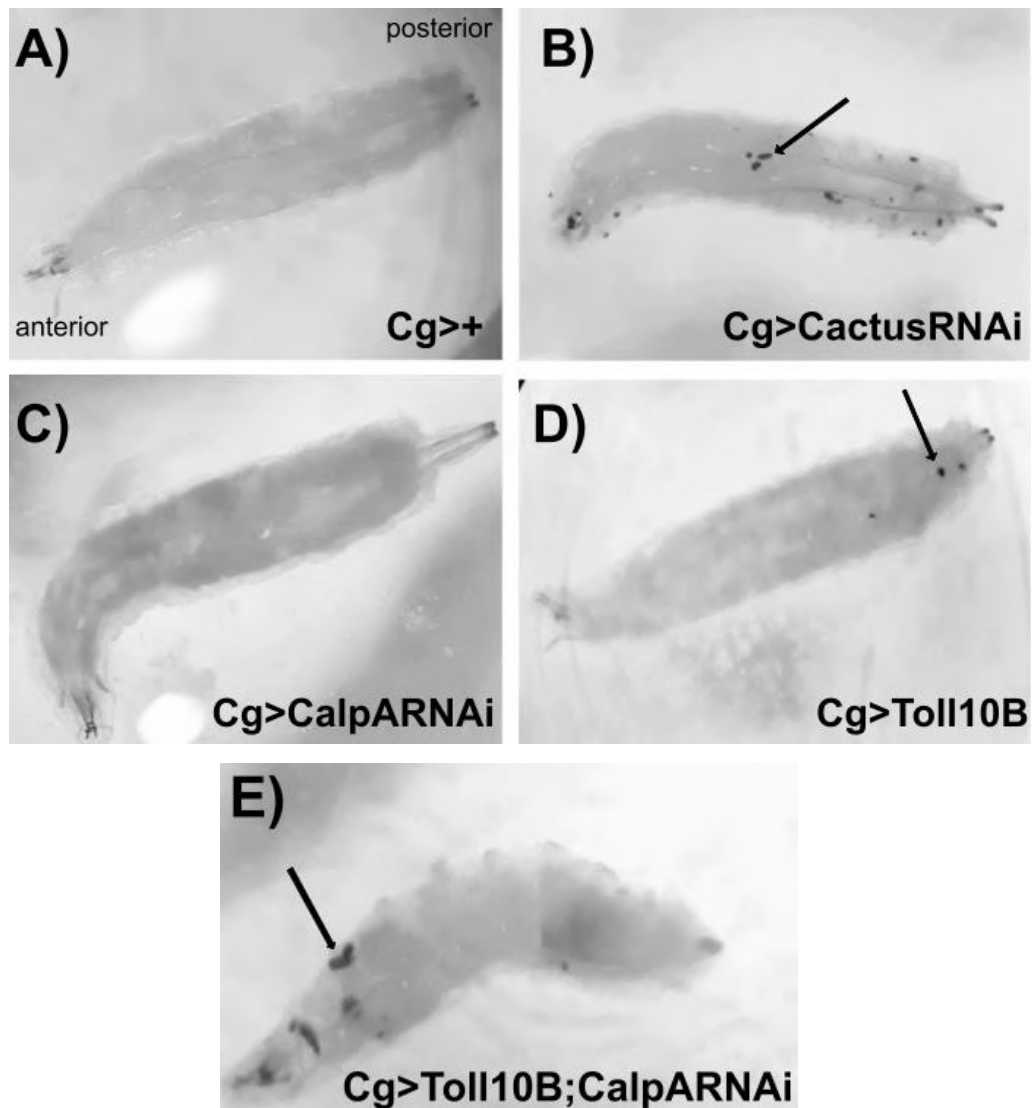
Primeiro utilizamos linhagens de superexpressão e linhagens *knockdown* para o ligante da via de BMP (Dpp). Como Dpp é encontrado no corpo gorduroso e nos hemócitos, superexpressamos *dpp* no corpo gorduroso e nos hemócitos (Cg>UAS-dppGFP) (Fig. 7A) ou apenas nos hemócitos (He>UAS-dppGFP) (Fig. 7C). Já para avaliar o efeito da expressão reduzida de *dpp* na sobrevivência utilizamos apenas o promotor que direcionava o *knockdown* da expressão de *dpp* para ambos (corpo gorduroso e os hemócitos) (Cg> UAS-dppRNAi) (Fig. 7B). Não houve diferença significativa na sobrevivência dos transgênicos para *dpp* quando desafiados com *B. bassiana*. Dados da literatura demonstram que a superexpressão de *dpp* reduz os níveis de diferentes peptídeos antimicrobianos como metchnikowin, defensina, atacina, drosocina e dipterocina, não incluindo drosomicina (Clark *et al.*, 2011), um peptídeo antifúngico regulado pela via de Toll muito importante no combate contra a infecção por *B. Bassiana* utilizado em nosso desafio imune.

Em seguida, analisamos a sobrevivência de mutantes *knockdown* de *tkv* por RNA de interferência e dominante negativo para *tkv* direcionados para corpo gorduroso e hemócitos (Cg> UAS-*tkv* RNAi e Cg>UAS- *tkv*[DN], respectivamente) e *knockdown* de *tkv* por RNA de interferência direcionado apenas para hemócitos (He>UAS-*tkv* RNAi) . Cg> UAS-*tkv* RNAi (Fig. 7E) apresentou uma queda significativa na sobrevivência quando desafiado com fungo em comparação com moscas controle. A mesma tendência, apesar de não ser significativa, é vista em Cg>*tkv*[DN] (Fig. 7D), e na segunda metade do período avaliado para He>*tkv* RNAi (Fig. 7F), sugerindo que *tkv* é importante para uma resposta imune eficiente, numa condição em que a via de Toll está ativa pela infecção com *B. bassiana*.

## 5.2. Efeitos do *knockdown* para *calpA* e para *cactus* na resposta imune celular de larvas.

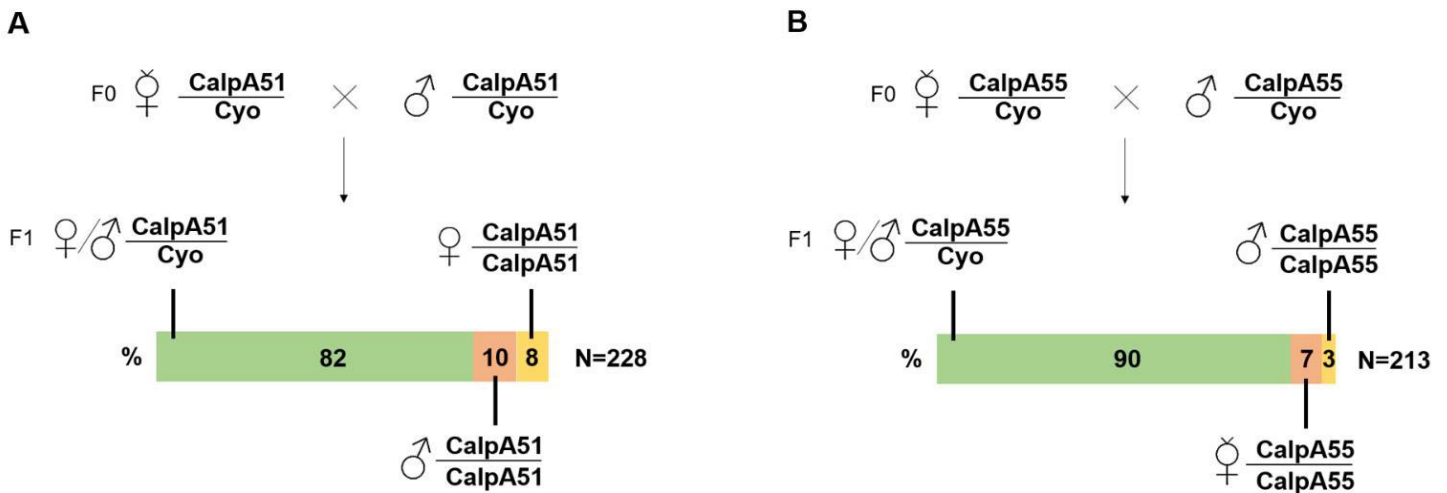
Corpos melanóticos são uma espécie de tumores não invasivos, causados por uma agregação de hemócitos, gerados durante uma resposta imune anormal (Zhang, Hao e Jin, 2016). A via de Toll participa da hematopoiese e sua super ativação resulta na formação de nódulos melanóticos aumentados em larvas (Minakhina e Steward, 2006). Dessa forma, contabilizamos o número de corpos melanóticos presentes em moscas controle e em uma linhagem em que a via de Toll se encontra constitutivamente ativa (Toll10B) no corpo

gorduroso, assim como em mutantes *knockdown* para *cactus* (na ausência de ativação constitutiva de Toll) e para *CalpA* (Na ausência de ativação constitutiva de Toll e combinado com Toll10B).



**Figura 8** - Presença de corpos melanóticos em larvas de 3 instar *knockdown* para *calpA* e para *cactus*. A) Larva controle; B) Larva apresentando *knockdown* para Cactus no corpo gorduroso e hemócitos; C) Larva apresentando *knockdown* para *CalpA* no corpo gorduroso e hemócitos; D) Larva apresentando receptor Toll constitutivamente ativo (Toll10B) no corpo gorduroso e hemócitos; E) Larva apresentando receptor Toll constitutivamente ativo (Toll10B) e *knockdown* para *CalpA* no corpo gorduroso e hemócitos. Setas indicam presença de corpos melanóticos.





**Figura 10** - Duas das linhagens geradas (*CalpA[51]* e *CalpA[55]*) são semiletais em homozigose.

#### 5.4. Ensaio de viabilidade dos novos alelos de CalpA.

Ao gerar novos alelos mutantes, é importante definir a que classe alélica estes pertencem e se apresentam ou não complementação intra-alélica. Com objetivo de avaliar a interação alélica entre os novos mutantes de CalpA, realizamos uma série de cruzamentos entre as linhagens geradas pelo CRISPR, a linhagem controle (w1118), uma linhagem com inserção de um elemento P em *CalpA* (P{RS5}CalpA<sup>[5-SZ-3979]</sup>) e uma linhagem com uma deficiência que cobre o locus CalpA e outros adjacentes (Df(2R)BSC26). Após cruzamento, avaliamos a porcentagem de embriões viáveis resultantes. Devido às dificuldades encontradas para obtenção de fêmeas virgens em heterozigose em *CalpA[51]* e *CalpA[55]* não foi possível realizar os diferentes cruzamentos com tais genótipos.



**Tabela 2** - Porcentagem de embriões viáveis provenientes de múltiplos cruzamentos.

Embriões viáveis (%)	♂ w1118/w1118	♂ CalpA[61]/CalpA[61]	♂ CalpA[64]/[64]	♂ P{RS5}CalpA <sup>[5-SZ-3979]</sup> / P{RS5}CalpA <sup>[5-SZ-3979]</sup>	♂ Df(2R)BSC26/ Cyo
♀ w1118/w1118	94%	91%	92%	90%	93%
♀ CalpA[61]/CalpA[61]	68%	63%	41%	72%	43%
♀ CalpA[64]/[64]	93%	64%	90%	84%	82%
♀ P{RS5}CalpA <sup>[5-SZ-3979]</sup> / P{RS5}CalpA <sup>[5-SZ-3979]</sup>	89%	83%	82%	80%	79%
♀ Df(2R)BSC26/ Cyo	90%	81%	87%	96%	73%

Foram realizados 3 experimentos independentes (n=3). Moscas Cyo/Cyo não são viáveis.

Nossos resultados demonstraram que provavelmente *CalpA[61]* é um alelo hipomorfo, ou seja, um alelo que produz uma perda parcial de função. Em um alelo hipomorfo, a homozigose produz um efeito menor do que o hipomorfo sobre a deleção (Greenspan, 2004), o que condiz com nosso resultado, visto que há uma redução da viabilidade dos embriões de *CalpA[61]/CalpA[61]* em comparação com o controle w1118/w1118, porém esse fenótipo é ainda mais visível quando *CalpA[61]* é combinado com uma deleção Df(2R)BSC26 ou com o alelo *CalpA[64]*, alelo este que apresenta uma grande deleção do gene de Calpaína. Os embriões Cyo/Cyo não são viáveis, a porcentagem esperada do cruzamento entre *CalpA[61]* e Df(2R)BSC26 era de 50% *CalpA[61]/Cyo* e 50 % *CalpA[61]/Df(2R)BSC26*, porém apenas 43% dos embriões provenientes desse cruzamento foram viáveis, indicando que *CalpA61/Df(2R)BSC26* não é viável. Curiosamente, *CalpA[64]*, alelo em que esperaríamos um fenótipo forte devido a grande deleção do gene de CalpA não apresentou graves problemas na eclosão de ovos, nem mesmo quando combinado com Df(2R)BSC26.

Experimentos de viabilidade também foi realizado para *CalpA[51]* (tabela 3) que resultaram na inexistência de embriões viáveis quando o macho do cruzamento possuía duas cópias para *CalpA[51]*, concluindo que os mesmos são estéreis.

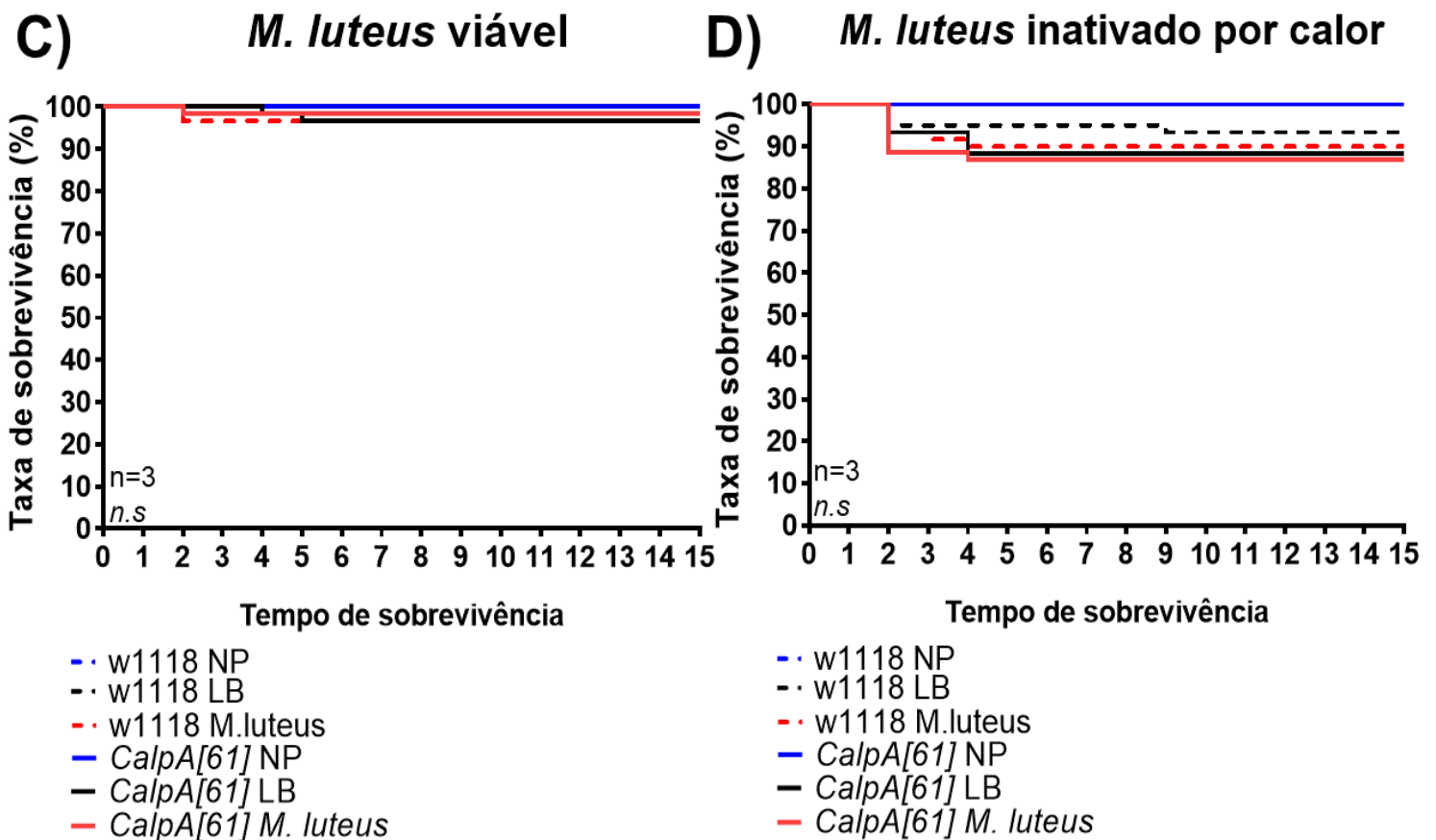
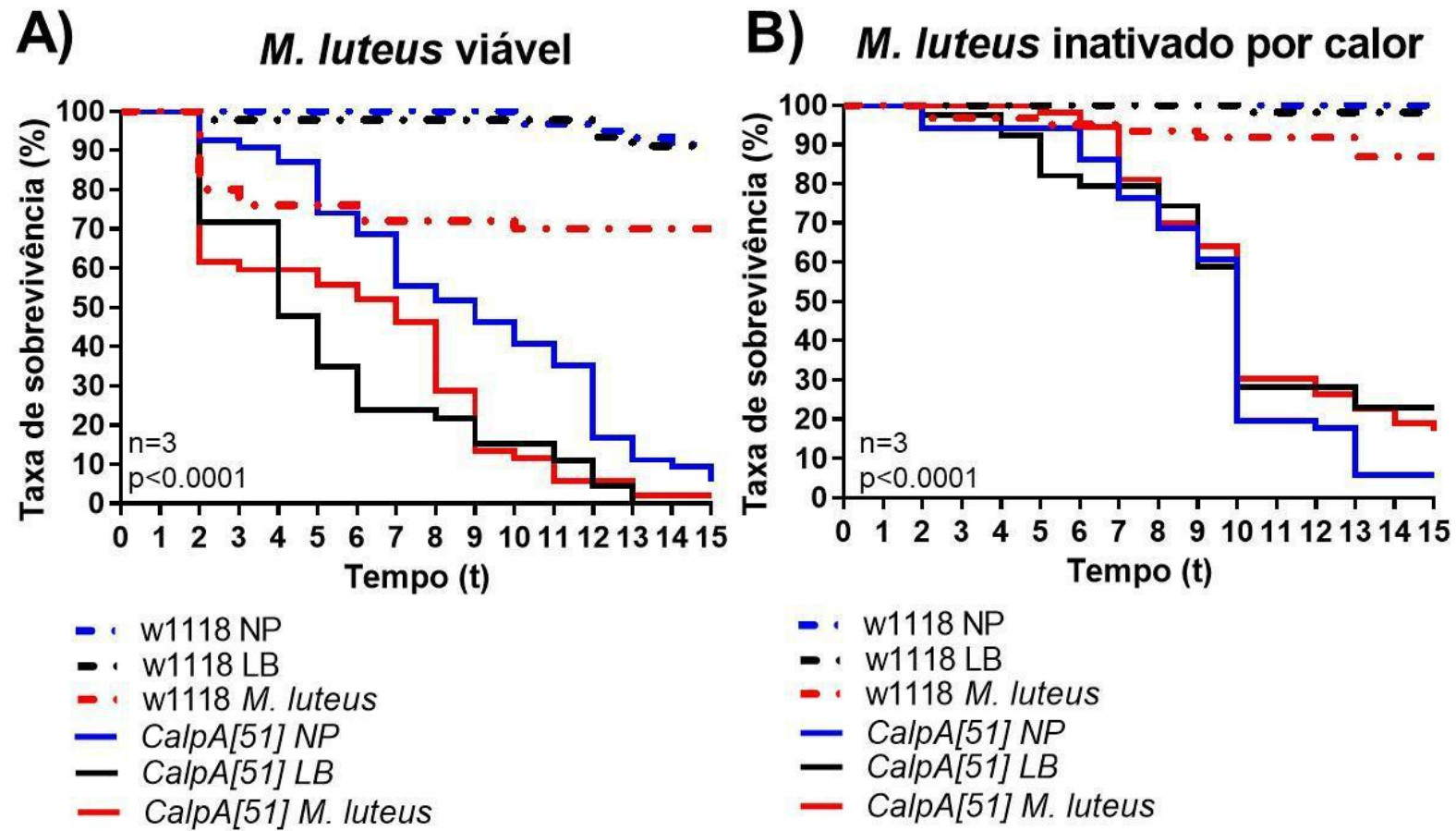
**Tabela 3** - Porcentagem de embriões viáveis provenientes de cruzamentos com *CalpA[51]*.

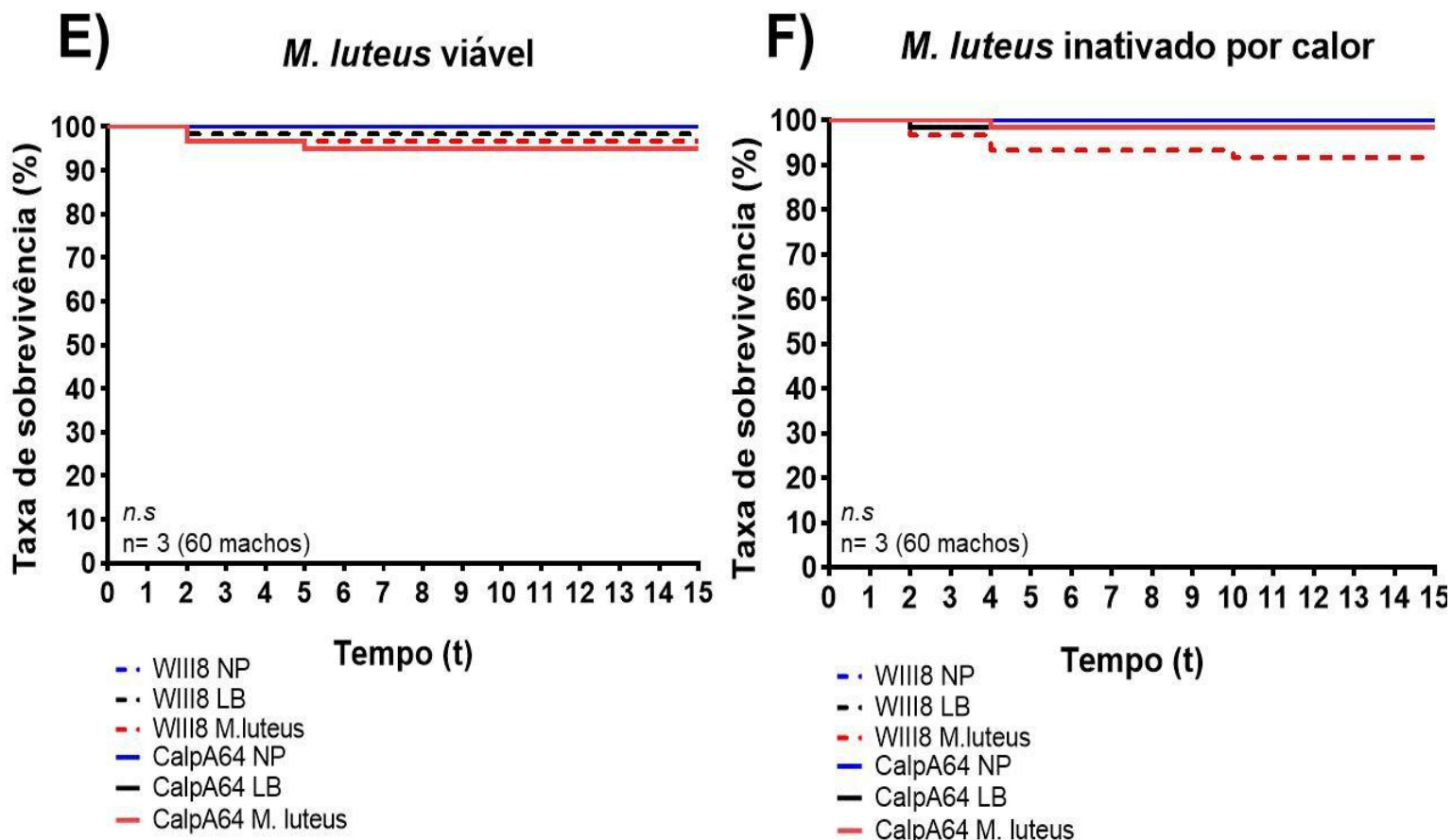
<b>Embriões viáveis (%)</b>	<b>♂ w1118/w1118</b>	<b>♂ CalpA[51]/+</b>	<b>♂ CalpA[51]/CalpA[51]</b>
<b>♀ w1118/w1118</b>	75%	Cruzamento não realizado	0%
<b>♀ CalpA[51]/+</b>	90%	90%	0%

\*Dados gerados por (Alison, 2023).

### **5.5. Sobrevida de linhagens transgênicas para *CalpA* injetadas com *Micrococcus luteus* viável e/ou inativado:**

Com o objetivo de analisar a capacidade das novas linhagens de *CalpA*, geradas via CRISPR-Cas9, em ativar o sistema imune e combater infecções, desafiamos essas moscas com a bactéria Gram-positiva *Micrococcus luteus* morta, inativada pelo calor, e, com a bactéria viável, capaz de gerar infecção (Fig 11). A bactéria morta é capaz de ativar a via de Toll na ausência de crescimento bacteriano.





**Figura 11** - Curva de Sobrevivência dos novos alelos gerados por CRISPR-Cas9 mediante a injeção com *M. luteus* viável e inativado por calor. Azul - Machos não desafiados (NP), preto - machos injetados com o meio Luria Bertani (LB), vermelho – machos injetados com *M. luteus* viável ou inativado pelo calor. O *p-value* apresentado foi calculado para a diferença entre a curva de moscas controle e de linhagens transgênicas para CalpA injetadas com *M. Luteus*. Os gráficos foram plotados em um gráfico de sobrevivência no software Prism e o teste estatístico realizado foi o “Log-rank”. Curvas de sobrevivência de moscas controle estão representadas em linha tracejada e curvas de sobrevivência de linhagens transgênicas representadas em linha contínua. O número de replicatas biológicas está indicado por “n”. Todas as linhagens se encontram em homocigose.

Observamos em nossos resultados uma sobrevivência significativamente menor em *Calpa[51]* em relação a moscas controle (*w1118*). No experimento com a bactéria viável observa-se uma queda na sobrevivência logo nos primeiros dias, mesmo na ausência de desafio imune ou injúria física (Fig. 11A), onde moscas injetadas com *M. luteus* viável apresentam um padrão bastante similar às demais condições (NP e LB). Já na injeção com a bactéria morta (Fig. 11B), a grande queda na sobrevivência nos primeiros dias se repete nas três condições, porém após o décimo dia podemos observar diferenças, onde, surpreendentemente, *Calpa[51]* injetada com bactérias inativada e com LB apresenta uma sobrevivência maior se comparada às moscas não desafiadas (NP).

Em *Calpa[61]* e *Calpa[64]* a injeção da bactéria viável não afetou a sobrevivência e não houve diferença significativa entre as três condições (NP, LB e *M. luteus*). Em relação à injeção com a bactéria inativada por calor, apesar de um pequeno decréscimo na sobrevivência, não houve diferença significativa entre o controle e as duas linhagens transgênicas quando injetadas com a bactéria morta.

## 6. DISCUSSÃO:

### 6.1. O papel de CalpA evidenciado pelos novos alelos gerados por CRISPR/Cas9.

A via de Toll responde a infecções por fungos e bactérias Gram-positivas através da degradação via proteassoma do modulador negativo (Cactus) das proteínas Rel: Dorsal e Dif (Meng, Khanuja e Ip, 1999). Além disto, os níveis de Cactus também são regulados pela protease Calpaína A que cliva Cact no N-terminal e gera um fragmento não responsivo a Toll, conhecido como CactE10, e este fragmento ainda é capaz de interagir com Dorsal (Fontenele, *et al.* 2013). Tanto o *knockdown* quanto a superexpressão de CalpA leva a um decréscimo nos níveis da AMP Drosomicina, mas não modifica os níveis de Diptericina, indicando que CalpA altera sinais da via de Toll, mas não da via de Imd (Fontenele *et al.*, 2013). Além disso, CactE10 foi detectado no corpo gorduroso em maiores quantidades comparativamente ao extrato embrionário por western blotting, sugerindo que os fragmentos de Cact gerados pelo CalpA podem desempenhar um papel no sistema imune, assim como no embrião (Fontenele *et al.*, 2013). Outro resultado intrigante que nosso grupo encontrou foi o efeito ativador de Cactus sobre a atividade de Dorsal durante a embriogênese (Cardoso *et al.*, 2017). Assim, a geração de novos alelos que permitissem fazermos cruzamentos complexos com diferentes elementos das vias de Toll e BMP seria de grande ajuda para compreender suas relações funcionais.

Nossos ensaios com superexpressão de Cact, CactE10 e CalpA não foram capazes de revelar uma ação destes genes no contexto do sistema imune. No entanto, ensaios prévios com *knockdown* de *CalpA* no mesmo contexto (Fontenele *et al.*, 2013) mostraram uma menor sobrevivência de moscas desafiadas com *B. bassiana*. A produção de linhagens mutantes de CalpA geradas por CRISPR deveria permitir expandir esses ensaios.

Realizamos desafios imunes com os novos alelos gerados por CRISPR e como resultado observamos que a linhagem *CalpA[51]* apresentou uma menor sobrevivência em relação a moscas controle quando eram desafiadas com a bactéria *M. luteus*. No entanto, moscas *CalpA[51]* tiveram uma menor sobrevivência em relação ao controle mesmo quando não desafiadas ou quando as moscas eram simplesmente sujeitas à injúria não imune, indicando que a letalidade independe de seu papel no sistema imune e/ou uma ação independente da ativação da via de Toll. Ensaios futuros serão necessários para definir que papel é este.

É importante ressaltar que observamos uma sobrevivência maior de *CalpA[51]* injetada com a bactéria inativada em comparação com *CalpA[51]* na ausência de desafio imune e/ou

injúria física. Uma explicação provável é de que a injúria e/ou injeção da bactéria morta ativa vias necessárias para a homeostase que estão prejudicadas em condições basais devido à deficiência de Calpaína. Como citado anteriormente, o *knockdown* de CalpA leva a um decréscimo nos níveis da AMP Drosomicina. O insulto realizado sem a presença da infecção ativa a via de Toll, e um possível aumento na produção de peptídeos antimicrobianos poderia deixar as moscas mais protegidas contra possíveis infecções oportunistas.

Além de afetar a sobrevivência de moscas adultas, a mutação presente em *CalpA[51]* também torna machos adultos estéreis (resultado 5.3). É possível que CalpA participe do processo de espermatogênese de *Drosophila*. Análises de dados públicos de RNA sequencing revelaram maior expressão de CalpA em espermátocitos iniciais e espermatogônias tardias (Julio, 2022), condizente com esta interpretação. Em contrapartida, *CalpA[61]* e *CalpA[64]* não apresentaram efeitos sobre a sobrevivência, *CalpA[61]* diferente de *CalpA[64]* apresentou efeitos na viabilidade das moscas quando em homozigose e essa queda foi maior quando em transheterozigose (*CalpA[61]/CalpA[64]*). É curioso o fato de que a grande deleção do gene da CalpA presente em *CalpA[64]* não produza um fenótipo forte como o observado em *CalpA[51]* que possui uma mutação redundante no éxon 3 e modificações no intron 3. É possível que as mutações presentes no terceiro íntron de *CalpA* interfiram no processo de splicing, afetando o sítio ativo de Calpaína, visto que o códon TGT de Cys143 encontra-se localizado entre éxon 3 e éxon 4 (Julio, 2022). Por outro lado, a viabilidade de *CalpA[64]* em homozigose indica que CalpA não é um gene essencial. No entanto, é necessário verificar se de fato não há expressão de CalpA nessas moscas ou uma compensação de suas funções pela expressão de outras Calpaínas (como B e C).

## 6.2. CalpA modula a via de Toll durante o período larvar.

A resposta imune é importante não apenas durante a vida adulta das moscas, mas também durante o período larvar, onde os insetos são expostos e também ingerem substâncias carregadas de agentes infecciosos. Um dos mecanismos de defesa da resposta imune inata e que é claramente observado em larvas de *Drosophila melanogaster* consiste na fagocitose de materiais estranhos e na indução de uma cascata de melanização realizada por hemócitos. Esta indução leva à formação de “tumores”, na sua maior parte não invasivos, denominados de corpos melanóticos. Mutantes que apresentam a via de Toll ativada constitutivamente ou que apresentam perda de função de *cactus* possuem uma produção excessiva de hemócitos que leva

à formação das massas melanóticas (Lemaitre *et al.* 1995; Qiu, Pan, e Govind, 1998; Lavine e Strand, 2002).

Para que a reação de melanização ocorra, é necessário que a profenoloxidase (PPO) seja ativada em fenoloxidase (PO) por uma serina protease chamada de enzima ativadora de profenoloxidase (PPAE). A via de Toll é capaz de ativar a melanização pois PPO ou um cofator, que estimula sua ativação, é alvo transcricional de Dif (Ligoxygaki *et al.*, 2002). Além disso, a cascata de melanização e a via de Toll compartilham serinas proteases que ativam as duas vias (Dudzic *et. al.*, 2019).

Em nossos resultados observamos um número aumentado de corpos melanóticos em moscas *knockdown* para *cactus*, e em moscas *knockdown* para *CalpA* que apresentam Toll ativado (com alelos de ganho de função de *Toll* - *Toll*[10B]). Esse fenótipo pode ser causado pela atividade transcricional excessiva das proteínas Dorsal e Dif, o que indica que CalpA interfere nos níveis de Dorsal presentes no núcleo, num contexto em que a via de Toll está ativa. Calpaína é capaz de clivar moléculas de Cactus livres no citoplasma produzindo fragmentos CactE10 não responsivos a Toll. Em um *knockdown* de CalpA ocorre um aumento de Cactus livre responsivos a Toll, que podem ser degradados via proteassoma. Uma vez degradados Dorsal se torna livre para migrar para o núcleo, podendo ocorrer nesse caso um aumento de Dorsal/Dif no núcleo resultando na produção de corpos melanóticos. Foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo que quando presente em altos níveis após a ativação de Toll CactE10 diminui os níveis de Dorsal nuclear (Julio, 2022).

### **6.3 *tkv* é importante para uma resposta imune eficiente mediante desafio com o fungo *B. bassiana*.**

As Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) são importantes na manutenção da homeostase tecidual, controlando respostas anti-inflamatórias em mamíferos (Wang *et. al.*, 2014; Patrignic, Heryanto e Eleftherianos, 2018). Em *Drosophila*, foi demonstrado que o ligante Dpp da via de BMP inibe a inflamação após ferida estéril, reprimindo a produção de peptídeos antimicrobianos (Clark *et al.*, 2011). Outro exemplo da sua importância como fator anti-inflamatório é a aceleração da neurodegeneração mediada por inflamação causada por células gliais ativadas em moscas com expressão reduzida de *dpp* (Dalui *et. al.*, 2020). Nossos resultados mostraram que moscas mutantes *knockdown* para o receptor de dpp, o *tkv*, apresentaram menor resistência à infecção fúngica em relação ao controle. Uma explicação possível é que nessas moscas a resposta anti-inflamatória após infecção está prejudicada. A

inflamação aguda é importante para combater agentes infecciosos, porém uma reação em excesso e prolongada pode causar danos teciduais.

Apesar da diferença na sobrevivência observada em moscas *knockdown* para o receptor de *tkv*, moscas *knockdown* para seu ligante (*dpp*) não apresentaram uma redução na sobrevivência quando comparadas a moscas controle. Uma explicação possível é que o RNAi de *dpp* apresenta uma menor eficiência quando comparado com o RNAi para *tkv* ou então que *dpp* é produzido por outras células para atuar sobre os receptores Tkv no corpo gorduroso que não seriam as células do corpo gorduroso e nem os hemócitos, visto que o *knockdown* de *dpp* estaria sendo direcionado especificamente para essas células.

Além disso, é importante ressaltar que embora o teste Log-rank seja amplamente utilizado como teste estatístico para avaliação de curvas de sobrevivência, estudos comprovaram que quando ocorre o cruzamento de duas curvas, esse teste não é o melhor a ser utilizado, pois nesses casos ocorre uma violação da suposição de riscos proporcionais. Encontramos esse perfil de curva na superexpressão de *dpp*.

Foi demonstrado pelo nosso grupo que Calpaína A é regulada pela via de BMP durante a padronização do eixo dorso-ventral em embriões e que sua atividade é aumentada em embriões dominantes negativos para o receptor Tkv (Fontenele *et al.*, 2013). Como detectamos diferenças na sobrevivência de moscas com a via de BMP alterada, um próximo passo seria verificar se ao menos parte desta ação se dá pelo controle da ação da CalpA. Um experimento possível seria realizar o cruzamento de moscas *knockdown* para *tkv* com moscas *knockdown* para Calpaína A e observar se o fenótipo da sobrevivência é recuperado e também determinar os níveis de peptídeo antimicrobiano presentes nessas moscas.

## 7. CONCLUSOES:

- 1) *tkv*, expresso no corpo gorduroso, é importante para uma resposta imune eficiente em moscas adultas, indicando que a ativação da via de BMPs atua na imunidade humoral.
- 2) A mutação no íntron 3 em *CalpA[51]* provoca um forte fenótipo na sobrevivência dessas moscas e esterilidade em machos homocigotos, o mesmo não é visto quando uma grande parte do gene de CalpA é deletado (*CalpA[64]*) ou quando um nucleotídeo é deletado causando uma mudança no quadro de leitura (*CalpA[61]*). Tais resultados indicam que *CalpA[51]* não é um alelo de perda de função do locus.



3) *CalpA[61]* é um alelo hipomorfo. A combinação dos alelos *CalpA[61]* e *CalpA[64]* ou *CalpA[61]* e *Df(2R)BSC26* gera uma viabilidade altamente reduzida. Como próximos passos seria interessante realizar tais combinações para ensaios de desafio imune.

4) Mutantes *knockdown* para *CalpA* num background onde a via de Toll está constitutivamente ativa apresentam um aumento na quantidade de corpos melanóticos presentes na cutícula de larvas de 3º ínstar. Este resultado amplia os contextos onde *CalpA* modifica respostas à ativação de Toll, sendo tais efeitos encontrados na embriogênese, na imunidade humoral, e agora na imunidade celular. Este efeito é provavelmente devido ao aumento de Dorsal causado pela diminuição de CactE10.

## 8. REFERÊNCIAS:

- Araujo, H., Julio, A., & Cardoso, M. (2018). Translating genetic, biochemical and structural information to the calpain view of development. *Mechanisms of Development*, 154, 240-250.
- Arnot, C. J., Gay, N. J., & Gangloff, M. (2010). Molecular mechanism that induces activation of Spätzle, the ligand for the Drosophila Toll receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19502-19509.
- Belvin, M. P., Jin, Y., & Anderson, K. V. (1995). Cactus protein degradation mediates Drosophila dorsal-ventral signaling. *Genes and Development*, 9(7), 783-793.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I. G., Michel, T., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2004). Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nature immunology*, 5(11), 1175-1180.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *development*, 118(2), 401-415.
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in Drosophila melanogaster—from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature reviews immunology*, 14(12), 796-810.
- Cardoso, M. A., Fontenele, M., Lim, B., Bisch, P. M., Shvartsman, S. Y., & Araujo, H. M. (2017). A novel function for the IκB inhibitor Cactus in promoting Dorsal nuclear localization and activity in the Drosophila embryo. *Development*, 144(16), 2907-2913.
- Chamy, L. E., Leclerc, V., Caldelari, I., & Reichhart, J. M. (2008). Sensing of 'danger signals' and pathogen-associated molecular patterns defines binary signaling pathways' upstream of Toll. *Nature immunology*, 9(10), 1165-1170.
- Chou, J. S., Impens, F., Gevaert, K., & Davies, P. L. (2011). m-Calpain activation in vitro does not require autolysis or subunit dissociation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1814(7), 864-872.
- Clark, R. I., Woodcock, K. J., Geissmann, F., Trouillet, C., & Dionne, M. S. (2011). Multiple TGF-β superfamily signals modulate the adult Drosophila immune response. *Current Biology*, 21(19), 1672-1677.
- Clemmons, A. W., Lindsay, S. A., & Wasserman, S. A. (2015). An effector peptide family required for Drosophila Toll-mediated immunity. *PLoS Pathogens*, 11(4), e1004876.

- Daigneault, J., Klemetsaune, L., & Wasserman, S. A. (2013). The IRAK homolog Pelle is the functional counterpart of I $\kappa$ B kinase in the *Drosophila* Toll pathway. *PLoS One*, 8(9), e75150.
- Dalui, S., Chatterjee, S., Sinha, P., & Bhattacharyya, A. (2020). Reduced Dpp expression accelerates inflammation-mediated neurodegeneration through activated glial cells during altered innate immune response in *Drosophila*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104680.
- Delaney, S. J., Hayward, D. C., Barleben, F., Fischbach, K. F., & Miklos, G. L. (1991). Molecular cloning and analysis of small optic lobes, a structural brain gene of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7214-7218.
- Dudzic, J. P., Hanson, M. A., Iatsenko, I., Kondo, S., & Lemaitre, B. (2019). More than black or white: melanization and toll share regulatory serine proteases in *Drosophila*. *Cell reports*, 27(4), 1050-1061.
- Ferguson, S. B., Blundon, M. A., Klovstad, M. S., & Schüpbach, T. (2012). Modulation of gurken translation by insulin and TOR signaling in *Drosophila*. *Journal of cell science*, 125(6), 1407-1419.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature reviews immunology*, 7(11), 862-874.
- Fontenele, M. (2006). Diferentes atividades da proteína Short gastrulation requeridas para a padronização do córion e do embrião de *Drosophila melanogaster*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Fontenele, M., Carneiro, K., Agrellos, R., Oliveira, D., Oliveira-Silva, A., Vieira, V., ... & Araujo, H. (2009). The Ca<sup>2+</sup>-dependent protease Calpain A regulates Cactus/I $\kappa$ B levels during *Drosophila* development in response to maternal Dpp signals. *Mechanisms of development*, 126(8-9), 737-751.
- Fontenele, M., Lim, B., Oliveira, D., Buffolo, M., Perlman, D. H., Schupbach, T., & Araujo, H. (2013). Calpain A modulates Toll responses by limited Cactus/I $\kappa$ B proteolysis. *Molecular biology of the cell*, 24(18), 2966-2980.
- Friedrich, P. (2004). The intriguing Ca<sup>2+</sup> requirement of calpain activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(4), 1131-1133.
- Friedrich, P., Tompa, P., & Farkas, A. (2004). The calpain-system of *Drosophila melanogaster*: coming of age. *Bioessays*, 26(10), 1088-1096.
- Ganesan, S., Aggarwal, K., Paquette, N., & Silverman, N. (2011). NF- $\kappa$ B/Rel proteins and the humoral immune responses of *Drosophila melanogaster*. *NF- $\kappa$ B in Health and Disease*, 25-60.
- Gan-Or, Z., Bouslam, N., Birouk, N., Lissouba, A., Chambers, D. B., Vérièpe, J., ... & Bencheikh, B. O. A. (2016). Mutations in CAPN1 cause autosomal-recessive hereditary spastic paraplegia. *The American Journal of Human Genetics*, 98(5), 1038-1046.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. E. I., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiological reviews*.
- Govind, S. (2008). Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and pathways. *Insect science*, 15(1), 29-43.
- Guroff, G. (1964). A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *Journal of Biological Chemistry*, 239(1), 149-155.
- Häcker, U., Nybakken, K., & Perrimon, N. (2005). Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(7), 530-541.
- Greenspan, R. J. (2004). Fly pushing: the theory and practice of *Drosophila* genetics.

- Hamaratoglu, F., Affolter, M., & Pyrowolakis, G. (2014, August). Dpp/BMP signaling in flies: from molecules to biology. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 32, pp. 128-136). Academic Press.
- Han, Y., Weinman, S., Boldogh, I., Walker, R.K., Brasier, A.R., 1999. Tumor necrosis factor-alpha-inducible I $\kappa$ B $\alpha$  proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* 274, 787-794
- Hanson, M. A., & Lemaitre, B. (2020). New insights on *Drosophila* antimicrobial peptide function in host defense and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 62, 22-30.
- Hanson, M. A., Cohen, L. B., Marra, A., Iatsenko, I., Wasserman, S. A., & Lemaitre, B. (2021). The *Drosophila* Baramicin polypeptide gene protects against fungal infection. *PLoS pathogens*, 17(8), e1009846.
- Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (2009). NF- $\kappa$ B in the immune response of *Drosophila*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), a000232.
- Hinz, M., & Scheidereit, C. (2014). The I $\kappa$ B kinase complex in NF- $\kappa$ B regulation and beyond. *EMBO reports*, 15(1), 46-61.
- Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature immunology*, 3(2), 121-126.
- Hornig, T., & Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12654-12658.
- Hosfield, C. M., Elce, J. S., Davies, P. L., & Jia, Z. (1999). Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca<sup>2+</sup>-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *The EMBO journal*, 18(24), 6880-6889.
- Hultmark, D. (2003). *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current opinion in immunology*, 15(1), 12-19.
- Imler, J. L., & Bulet, P. (2005). Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Mechanisms of epithelial defense*, 86, 1-21.
- Ishiura, S., Murofushi, H., Suzuki, K., & Imahori, K. (1978). Studies of a calcium-activated neutral protease from chicken skeletal muscle: I. Purification and characterization. *The Journal of Biochemistry*, 84(1), 225-230.
- Isoda, K., & Nüsslein-Volhard, C. (1994). Disulfide cross-linking in crude embryonic lysates reveals three complexes of the *Drosophila* morphogen dorsal and its inhibitor cactus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5350-5354.
- Julio, A.H. (2022). Structural and evolutionary aspects of Calpain functions in insects. Dissertação (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 217f.
- Karin, M. (2006). NF- $\kappa$ B and cancer: Mechanisms and targets. *Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center*, 45(6), 355-361.
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(10), 1295-1309.
- Lee, P. T., Zirin, J., Kanca, O., Lin, W. W., Schulze, K. L., Li-Kroeger, D., ... & Bellen, H. J. (2018). A gene-specific T2A-GAL4 library for *Drosophila*. *elife*, 7, e35574.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of dorsal during the immune response in *Drosophila*. *The EMBO journal*, 14(3), 536-545.

- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. (2002). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science*, *297*(5578), 114-116.
- Lindsay, S. A., & Wasserman, S. A. (2014). Conventional and non-conventional *Drosophila* Toll signaling. *Developmental & Comparative Immunology*, *42*(1), 16-24.
- Mahajan, V. B., Skeie, J. M., Bassuk, A. G., Fingert, J. H., Braun, T. A., Daggett, H. T., ... & Stone, E. M. (2012). Calpain-5 mutations cause autoimmune uveitis, retinal neovascularization, and photoreceptor degeneration.
- Matova, N., & Anderson, K. V. (2010). *Drosophila* Rel proteins are central regulators of a robust, multi-organ immune network. *Journal of cell science*, *123*(4), 627-633.
- Meng, X., Khanuja, B. S., & Ip, Y. T. (1999). Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF- $\kappa$ B factor. *Genes & development*, *13*(7), 792-797.
- Meyer, W. L., Fischer, E. H., & Krebs, E. G. (1964). Activation of skeletal muscle phosphorylase b kinase by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry*, *3*(8), 1033-1039.
- Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., & Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, *414*(6865), 756-759.
- Minakhina, S., & Steward, R. (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics*, *174*(1), 253-263.
- Mizuguchi, K., Parker, J. S., Blundell, T. L., & Gay, N. J. (1998). Getting knotted: a model for the structure and activation of Spätzle. *Trends in biochemical sciences*, *23*(7), 239-242.
- Murachi, T., Tanaka, K., Hatanaka, M., & Murakami, T. (1981). Intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Advances in enzyme regulation*, *19*, 407-424.
- Myllymäki, H., Valanne, S., & Rämetsä, M. (2014). The *Drosophila* imd signaling pathway. *The Journal of Immunology*, *192*(8), 3455-3462.
- Ono, Y., Saido, T. C., & Sorimachi, H. (2016). Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, *15*(12), 854-876.
- Pal, G. P., De Veyra, T., Elce, J. S., & Jia, Z. (2003). Crystal structure of a  $\mu$ -like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca<sup>2+</sup> requirement. *Structure*, *11*(12), 1521-1526.
- Parker, L., Stathakis, D. G., & Arora, K. (2004). Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Invertebrate Cytokines and the Phylogeny of Immunity: Facts and Paradoxes*, 73-101.
- Patrnogic, J., Heryanto, C., & Eleftherianos, I. (2018). Wounding-induced upregulation of the Bone Morphogenic Protein signaling pathway in *Drosophila* promotes survival against parasitic nematode infection. *Gene*, *673*, 112-118.
- Qiu, P., Pan, P. C., & Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development*, *125*(10), 1909-1920.
- Qiu, P., Pan, P. C., & Govind, S. (1998). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development*, *125*(10), 1909-1920.
- Reddy, P. A., Anandavalli, T. E., & Anandaraj, M. P. J. S. (1986). Calcium activated neutral proteases (milli- and micro-CANP) and endogenous CANP inhibitor of muscle in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Clinica chimica acta*, *160*(3), 281-288.

- Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougères, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., ... & Beckmann, J. S. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, *81*(1), 27-40.
- Shumway, S. D., Maki, M., & Miyamoto, S. (1999). The PEST domain of I $\kappa$ B $\alpha$  is necessary and sufficient for in vitro degradation by  $\mu$ -calpain. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(43), 30874-30881.
- Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011). Impact of genetic insights into calpain biology. *The journal of biochemistry*, *150*(1), 23-37.
- Spinozzi, S., Albini, S., Best, H., & Richard, I. (2021). Calpains for dummies: What you need to know about the calpain family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1869*(5), 140616.
- Sun, H., Towb, P., Chiem, D. N., Foster, B. A., & Wasserman, S. A. (2004). Regulated assembly of the Toll signaling complex drives Drosophila dorsoventral patterning. *The EMBO journal*, *23*(1), 100-110.
- Tafesh-Edwards, G., & Eleftherianos, I. (2020). JNK signaling in Drosophila immunity and homeostasis. *Immunology Letters*, *226*, 7-11.
- Taniguchi, K., & Karin, M. (2018). NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nature Reviews Immunology*, *18*(5), 309-324.
- Tsuji, S., Ishiura, S., Takahashi-Nakamura, M., Katamoto, T., Suzuki, K., & Imahori, K. (1981). Studies on a Ca<sup>2+</sup>-activated neutral proteinase of rabbit skeletal muscle. II. Characterization of sulfhydryl groups and a role of Ca<sup>2+</sup> ions in this enzyme. *The Journal of Biochemistry*, *90*(5), 1405-1411.
- Uttenweiler-Joseph, S., Moniatte, M., Lagueux, M., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A., & Bulet, P. (1998). Differential display of peptides induced during the immune response of Drosophila: a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(19), 11342-11347.
- Valanne, S., Wang, J. H., & Rämetsä, M. (2011). The Drosophila toll signaling pathway. *The Journal of Immunology*, *186*(2), 649-656.
- Wang, L., Weber, A. N., Atilano, M. L., Filipe, S. R., Gay, N. J., & Ligoxygakis, P. (2006). Sensing of Gram-positive bacteria in Drosophila: GGBP1 is needed to process and present peptidoglycan to PGRP-SA. *The EMBO journal*, *25*(20), 5005-5014.
- Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., ... & Shi, L. L. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & diseases*, *1*(1), 87-105.
- Wang, Y., Hersheson, J., Lopez, D., Hammer, M., Liu, Y., Lee, K. H., ... & Baudry, M. (2016). Defects in the CAPN1 gene result in alterations in cerebellar development and cerebellar ataxia in mice and humans. *Cell reports*, *16*(1), 79-91.
- Weber, A. N., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J. A., Lelièvre, E., Gascan, H., Ray, K. P., ... & Gay, N. J. (2003). Binding of the Drosophila cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling. *Nature immunology*, *4*(8), 794-800.
- Yu, S., Luo, F., Xu, Y., Zhang, Y., & Jin, L. H. (2022). Drosophila innate immunity involves multiple signaling pathways and coordinated communication between different tissues. *Frontiers in Immunology*, *13*, 905370.
- Zhang, G., Hao, Y., & Jin, L. H. (2016). Overexpression of jumu induces melanotic nodules by activating Toll signaling in Drosophila. *Insect biochemistry and molecular biology*, *77*, 31-38.