

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CRK3 DE *Leishmania major* E ANÁLISE DE COMPOSTOS CALCOGENOQUINOLÍNICOS NA POSSÍVEL MODULAÇÃO DE SUA ATIVIDADE

Ana Luiza Mélo de Paula¹; Wagner Alves de Souza Júdice².

- 1- Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: queluiza@gmail.com
- 2- Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras-Chaves: *Leishmania major*, CRK3, Clonagem.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma patologia que apresenta diferentes manifestações clínicas em humanos e animais; é causada por protozoários flagelados e intracelulares da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) que se apresentam em duas formas: amastigota (células fagocíticas do sistema mononuclear) e promastigota (tubo digestório do vetor) (CHANG, 1985). A CRK3 presente no parasita *Leishmania major* é uma proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina (CDK) que está ativa nos dois estágios de vida do parasita *Leishmania major*, desempenhando um papel importante em seu ciclo celular. Está presente na transição da fase G2 (fase de preparo para mitose) para M (fase mitótica) sendo responsável por catalisar a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato de ATP ou GTP para um grupo hidroxila da cadeia lateral de aminoácidos treonina, serina ou resíduos de tirosina por possuir um domínio catalítico onde se liga uma molécula de ATP (SILVA, *et al.*, 2009), logo essa ligação é reversível e responsável por estímulos extras e intracelulares, provendo um mecanismo eficiente para a modulação de sua atividade. Por ser uma CDK, se encontra inativa em sua forma monomérica, precisando então estar ligada à ciclina 6 (CYC6) a fim de ser ativada, promover a fosforilação dos determinados sítios procedendo com o funcionamento normal do ciclo celular (SILVEIRA *et al.*, 2011; WALKER, *et al.*, 2011).

OBJETIVOS

Realizar a clonagem, co-expressão e purificação da enzima quinase dependente de ciclina de *Leishmania major* e da enzima CYC6.

METODOLOGIA

O gene comercial da CRK3 foi transformado em bactéria *E.coli* DH5 α , sendo em seguida amplificado por PCR utilizando primers específicos e a enzima taq DNA polimerase e tal produto foi purificado. O inserto e o vetor pET 28 (a+) foram digeridos com as enzimas de restrição *Sla* I e *Xba* I sendo posteriormente realizado o processo de ligação do inserto CRK3 e o vetor utilizando a DNA T4 ligase, obtendo o clone da enzima. O material obtido foi introduzido em bactéria *E. coli* BL21 (DE3) juntamente com o clone da enzima CYC6 e posteriormente foi realizado um ensaio co-expressão da enzima a partir de um inóculo, o ensaio foi induzido adicionando IPTG em concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mM, foi realizado eletroforese em gel de SDS-Page a fim de confirmar a co-expressão.

RESULTADOS/DISCUSSÃO

Através da PCR de colônia observou-se a presença de uma banda única em três colônias com 966 pb, correspondente com inserto, indicando sucesso da reação (FIGURA 1).



Figura 1: Gel de agarose 1% (m/v). PCR de colônia positivo para colônias das colunas 5, 6 e 7.

Através da amplificação do cDNA por uma nova reação de PCR, a partir do material extraído por lise alcalina, foi possível observar a presença de uma banda com 966 pb, após revelação eletroforética, demonstrando que a amplificação do gene foi realizada com êxito, uma vez que o tamanho do fragmento observado é condizente com o peso molecular do gene CRK3LMJ (FIGURA 2).

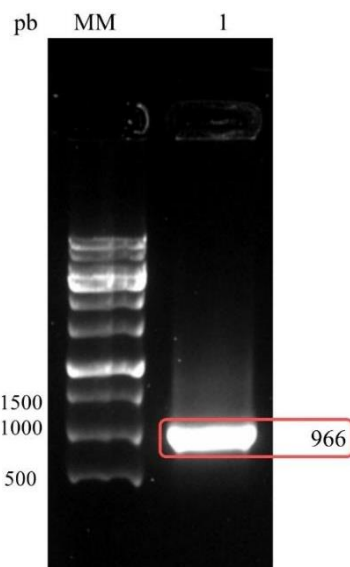


Figura 2: Gel de agarose 1% (m/v). Amplificação do gene CRK3LMJ por reação de PCR a partir de DNA genômico. A coluna 1 é a região amplificada do gene CRK3LMJ.

A digestão do inserto e do vetor através das enzimas *Sla I* e *Xba I* foi confirmada com gel de agarose 1% contendo bandas com ~966 pb e ~5366 pb, respectivamente, conforme o esperado condizente com seus tamanhos, indicando sucesso da reação. A partir da ligação e transformação em DH5 α , foi possível obter o clone positivo através de PCR de colônia e posterior extração do material. Tal material foi então co-expresso em bactéria *E.coli* BL21 (DE3), juntamente com a enzima CYC6, no entanto, como mostra a Figura 3, as condições em que ocorreu a expressão não foram ideais de acordo com a ausência da banda esperada

condizente com o tamanho do complexo CRK3LMJ-CYC6 – 35 - 38 kDa (WALKER *et al.*, 2011), necessitando de novos ensaios em diferentes condições.

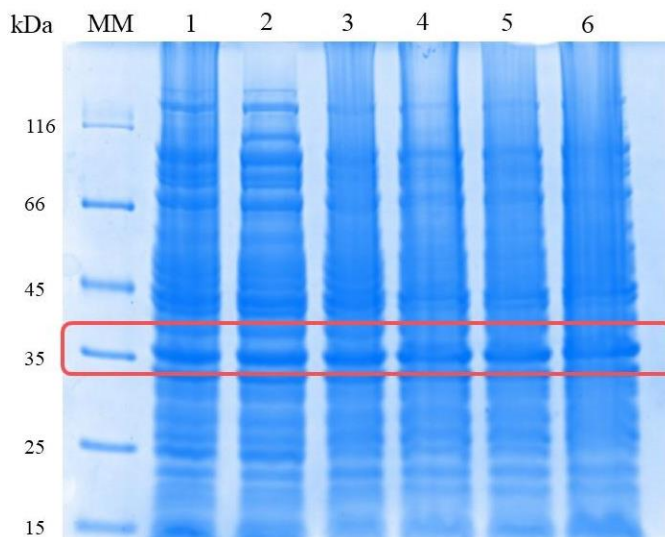


Figura 3: SDS – page. Em 1 – BL21 vazia, 2 – BL21 com IPTG, 3 – sem IPTG, 4 – 0,25 mM de IPTG, 5 – 0,5 mM de IPTG, 6 – 1 mM de IPTG.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível clonar com sucesso a enzima CRK3 de *Leishmania major*, no entanto, obtivemos algumas complicações no processo de co-expressão a fim de posteriormente purificá-la e realizar os testes de inibição enzimática com os compostos calcogenoquiolínicos, sendo necessário mais ensaios de expressão a fim de obtermos um protocolo final com sucesso.

REFERÊNCIAS

CHANG KP, FONG D, BRAY RS. Biology of Leishmania and leishmaniasis. In: K.P.Chang & R.S.Bray eds **Leishmaniasis**, elsevier London 1985; 1-30.

ROSS R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Further notes on leishman's bodies. **Br Med J** 1903; 2: 1261-1401.

SILVA, B. V; HORTA, B. A. C; ALENCASTRO, R. B; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 2, 453-462, 2009.

SILVEIRA, N. J. F; CAMPS, I; VELOSO, M. P; SARAIVA, L. A. **Structural bioinformatics approach of cyclin-dependent kinases 1 and 3 complexed with inhibitors**. Molecular Informatics, Alemanha, v. 30, p. 219-231,2011.

WALKER R. G., THOMSOM G., MALONE K., NOWICKI M. W., BROWN E., BLAKE D. G., TURNER N.J., WALKINSHAW M. D., GRANT K. M., MOTTRAM J. C **High Throughput Screens Yield Small Molecule Inhibitors of Leishmania CRK3:CYC6 Cyclin-Dependent Kinase**. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2011.