

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CRK3 DE *Leishmania major*

Ana Luiza Mélo de Paula¹; Vitoria Cunha de Oliveira²; ³Siqueira, F.S; ⁴Emiliano, M.F.C;
Wagner Alves de Souza Judice⁵

1. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: queluiza@gmail.com
2. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: vitoriacunhaoliveira99@gmail.com
3. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: fabioatdr37@gmail.com
4. Mestranda do Programa de Biotecnologia; e-mail: mfcorreaemiliano@gmail.com
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

Área de conhecimento: **Enzimologia**

Palavras-Chaves: *Leishmania*, CRK3, CYC6, 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 está presente no parasita *Leishmania major* e é uma proteína serina/treonina quinase dependente de ciclina (CDK) (WALKER, *et al.*, 2011). Por ser uma CDK, observa-se que é inativa em forma monomérica, sendo ativada na presença da ciclina 6 (SILVEIRA *et al.*, 2011), ela está ativa nos dois estágios de vida do parasita *Leishmania major*, desempenhando um papel importante em seu ciclo celular (WALKER, *et al.*, 2011). 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, logo essa ligação é reversível e responsável por estímulos extras e intracelulares, provendo um mecanismo eficiente para a modulação de sua atividade (SILVA, *et al.*, 2009).

OBJETIVO

Realizar a clonagem, co-expressão da enzima quinase dependente de ciclina CRK3 de *Leishmania major* e da proteína ciclina CYC6.

METODOLOGIA

Os genes comerciais da CRK3 e CYC6 foram amplificados por PCR utilizando primers específicos e a enzima taq DNA polimerase e tal produto foi purificado. Os insertos e o vetor pET 28 (a+) foram digeridos com as enzimas de restrição Sma I e Xba I a fim de formar extremidades coesivas e retirar os insertos do vetor comercial. Após a digestão foi realizado o procedimento de ligação no qual o inserto CRK3 e CYC6 foram ligados separadamente ao vetor pET 28 (a+), através da T4 ligase, formando clones das respectivas enzimas. Através de transformação por choque térmico o clone foi introduzido em bactéria competente DH5 α a fim de confirmar a clonagem, com o crescimento de colônias foi realizado PCR de colônia utilizando primers T7. Os clones foram introduzidos em bactéria competente BL21 (DE3) em um processo de cotransformação por choque térmico sendo também analisado por PCR de

colônia, com a confirmação e seleção do clone foi realizado um inóculo e a partir dele a expressão da proteína foi induzida adicionando IPTG a 0,8 mM, foi realizado eletroforese em gel de SDS-Page a fim de confirmar a expressão.

RESULTADOS

A amplificação do gene CRK3LMJ foi analisada e confirmada utilizando gel de agarose 1% apresentando uma única banda contendo ~966 pb condizendo com o tamanho do mesmo (Figura 1).

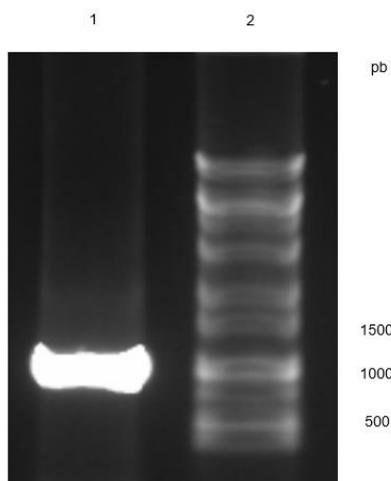


Figura 1. Gel de agarose 1%. Amplificação do gene CRK3LMJ por reação de PCR a partir de DNA genômico. A coluna 2 é o padrão de massa molecular 1kb ladder 50 mg (Sinapse). A coluna 1 é a região amplificada do gene CRK3LMJ.

A digestão por *Sla* I e *Xba* I do vetor e do gene CRK3 foi confirmada com gel de agarose 1% contendo bandas com ~966 pb e ~5366 pb condizendo respectivamente com o gene CRK3 e vetor digeridos, bem como a presença de uma banda contendo aproximadamente 942 pb, condizente com o gene CYC6. Após a ligação dos materiais, estes foram inseridos em DH5a e a clonagem foi confirmada com PCR de colônia em gel de agarose 1% no qual foi observado a presença de clones positivos. A partir da transformação em BL21 (DE3), com o crescimento de colônias e confirmação dos clones por PCR e gel de agarose 1% confirmando a presença dos insertos contendo bandas condizentes com o tamanho dos mesmos foi realizada coexpressão com IPTG e logo em seguida, purificação da coexpressão. A coexpressão da proteína foi confirmada com gel SDS-PAGE de acrilamida a 15% (Figura 2), através da presença de uma banda de 35 kDa (WALKER, *et al.*, 2011).

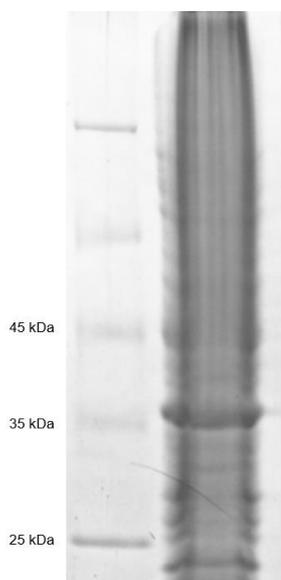


Figura 2. Gel SDS-PAGE 15% demonstrando a co-expressão das proteínas CRK3LMJ E CYC6 com aproximadamente 35 kDa.

CONCLUSÃO

Neste trabalho conseguimos clonar e co-expressar as enzimas CRK3 de *Leishmania major* e CYC6 de *Leishmania major* que serão, portanto, co-expressos em larga escala, purificados, e posteriormente utilizados em testes de inibição enzimática.

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.