

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CRK3 DE *Leishmania donovani*

Fábio da Silva Siqueira¹; Ana Luiza Mélo de Paula²; Vitória Cunha de Oliveira³; Marli de Fátima Corrêa Emiliano⁴; Wagner Alves de Souza Júdice⁵

1. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: fabioatdr37@gmail.com
2. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: queluiza@gmail.com
3. Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: vitoriacunhaoliveira99@gmail.com
4. Mestranda em Biotecnologia; e-mail: mfcemiliano@hotmail.com
5. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com

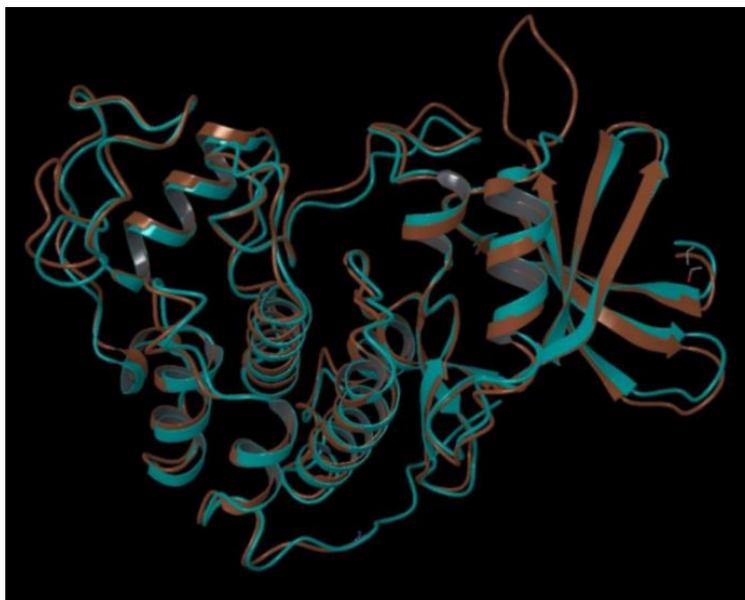
Áreas de conhecimento: **Biotecnologia; bioquímica de microrganismos.**

Palavras-chaves: *Leishmania donovani*; proteína Quinase; Leishmaniose visceral; doença negligenciada.

INTRODUÇÃO

Até o momento foram identificadas mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. Este gênero é causador de um grupo de patogenias conhecidas como leishmaniose (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Durante seu ciclo de vida conta com um vetor, o inseto *Lutzomyia longipalpis*, que meio da saliva infecta o hospedeiro (MENDONÇA, 2018; REY, 2008). Conhecido popularmente conhecido por mosquito palha, este inseto tem preferência por viver em lugares úmidos, escuros e principalmente com acúmulo de material orgânico, uma vez que as fêmeas usam deste material para depositar seus ovos. O protozoário se apresenta de duas formas distintas. O vetor carrega uma das formas de vida, a promastigota, que é flagelada, o que lhe confere motricidade, e a amastigota, forma que o parasito assume ao ser fagocitado pelos macrófagos do hospedeiro (REY, 2008). Cada gênero de *Leishmania* afeta o hospedeiro de uma forma diferente, sendo a mais comum e menos grave, a Leishmaniose cutânea, esta variante causa úlceras na pele do hospedeiro, podendo afetar ao mesmo tempo até 200 regiões diferentes do corpo, quase sempre deixando cicatrizes ou até mesmo sérias deformidades, acarretando em psicossociais ao infectado (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Contudo, existe uma variação que é ocasionada pela *Leishmania donovani*, conhecida por Leishmaniose visceral ou Calazar, esta por sua vez é caracterizada como a mais grave e suas estatísticas são assustadoras. Em uma escala global, existem em torno de 12 milhões de pessoas contaminadas com o parasito, e 500 mil novos infectados todos os anos, dentre eles 80 mil vão a óbito (CHARLES, 2007). A *leishmania donovani* possui uma enzima que tem como objetivo a regulação de seu ciclo celular atuando nos *checkpoints* que correm entre as fases do ciclo, com ênfase na fase G₂-M. A enzima cdc2- related protein kinase 3 (CRK3) da *Leishmania donovani* é composta por 311 aminoácidos, sendo que 99,7% são iguais aos da *Leishmania mexicana*, 99,4% aos da *Leishmania major* e 49,4% aos da CDC2 do *Homo sapiens* (WALKER et al., 2011) Na *L. donovani*. A partir de comparação cristalográfica, é possível observar também a semelhança estrutural entre LmCRK3 (marrom) e a HsCDC2 (azul) como visto na Figura 1. Apesar da similaridade na sequência de aminoácidos não ser tão alta, a função é equivalente à sua homóloga, atuando no mesmo ponto do ciclo celular. Isso provavelmente ocorre devido aos aminoácidos que compõem os sítios catalíticos, apesar de diferentes, possuírem a mesma polaridade e carga.

FIGURA 1 - Representação cristalográfica da LmCRK3 (marrom) e da HsCDC2(azul).



Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al*, 2012.

Os estudos de Banerjee *et al*, 2006, sugerem que a CRK3 forma também complexos com outras CYC e assim como citado anteriormente, o ponto de ação no ciclo celular é alterado. Nestes estudos, houve uma redução da progressão antes da fase S, indicando que o complexo CRK3-CYC1 atua principalmente na preparação da célula para a replicação do DNA (BANERJEE *et al.*, 2006). Maity *et al* (2011), reportam em seus estudos, que a fosforilação ou não do complexo, implica diretamente ao processo de síntese de DNA durante a fase S do Ciclo Celular e conseqüentemente a indução a apoptose (MAITY *et al.*, 2011).

OBJETIVO

Este projeto tem como objetivo a clonagem e expressão da enzima CRK3 de *Leishmania donovani* e ciclina 6 de *Leishmania major*.

METODOLOGIA

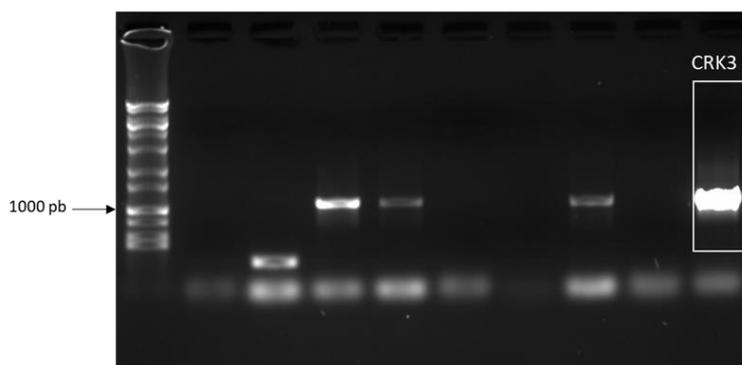
O gene das proteínas, previamente amplificado foi submetido a digestão enzimática utilizando as enzimas de restrição XbaI e SmaI, em seguida purificados utilizando o kit de purificação Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit da empresa GE. Em seguida foram ligados em proporção 10:1 de inserto para o vetor utilizando a enzima T4 DNA ligase em temperatura de 4 a 6 °C durante 16 horas. O material foi transformado utilizando choque térmico em cepa *E. coli* DH5 α , que em seguida foi semeada em placa de petri contendo meio LB Ágar suplementado com Canamicina (25 μ g mL⁻¹). Foi realizada uma lise alcalina utilizando o kit Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit da empresa GE. O DNA recombinante extraído, foi transformado em cepa de expressão *E. coli* BL21(DE3) sob concentração de 50ng cada, totalizando 10ng de DNA na reação, A cepa foi semeada assim como a anterior em petri contendo meio LB Ágar suplementado com Canamicina (25 μ g mL⁻¹). Colônias isoladas foram selecionadas e realizado um PCR de colônia a fim de verificar se a transformação foi bem-sucedida. Após confirmação a colônia foi inoculada em meio de cultura Terrific Broth sob temperatura de 37°C e agitação de 160 RPM até atingir uma OD_{600nm}, em seguida a expressão proteica foi induzida utilizando 0,0008M de IPTG e a temperatura foi alterada para 20°C

durante 18 horas. A bactéria foi então lisada para a obtenção da proteína e realização da eletroforese em gel SDS PAGE.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

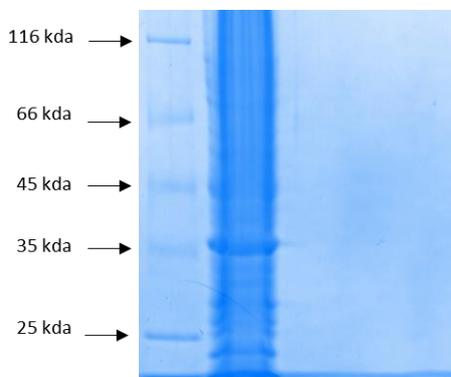
Após realizada a ligação e transformação foram obtidos os DNAs recombinantes das proteínas alvo do estudo, a figura 2 apresenta a eletroforese contendo um produto de PCR realizado para a verificação da inserção do gene entre o promotor e o terminador T7 no vetor plasmidial.

FIGURA 2 – Eletroforese em gel de agarose com o resultado da PCR confirmando a obtenção de DNA recombinante CRK3.



A bactéria contendo o DNA recombinante codificador das duas proteínas alvo foi induzida a expressão e lisada para a obtenção da proteína e o resultado foi confirmado por meio de eletroforese em gel SDS Page como demonstrado na figura 3, Devido a proteína não ter passado pelo processo de purificação e dessalinização a imagem não ficou nítida o suficiente, quando comparado com o trabalho de BANERJEE et al. 2006 e WALKER *et al.* 2011, é possível observar que a banda apresentada no gel indica que foi realizada a expressão de proteínas com massa molecular igual ao desejado, contudo testes posteriores como Western-blot ou espectroscopia de massa são imprescindíveis para confirmar a obtenção da proteína alvo.

FIGURA 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com o resultado da expressão executada em cepa *E. coli* BL21(DE3)



CONCLUSÃO

Com a realização deste projeto foi possível concluir que foram obtidos ambos os DNAs recombinantes, e também que proteínas com massa molecular iguais as desejadas foram expressas com êxito. Contudo, são necessários testes posteriores para que se garanta que a proteína obtida é realmente a esperada.

REFERÊNCIAS

BANERJEE, S.; SEN, A.; DAS, P.; SAHA, P. Leishmania donovani cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. *FEMS Microbiol Lett*, v. 256, n. 1, p. 75-82, Mar 2006. ISSN 0378-1097 0378-1097 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16487322>.

CHARLES M. A. **Leishmaniasis**. *Postgraduate Medical Journal*, Rockville Pike, Bethesda MD, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3202701/>. Acesso em 05 maio. 2018, as 03:21h

MAITY, A. K.; GOSWAMI, A.; SAHA, P. Identification of substrates of an S-phase cell cycle kinase from Leishmania donovani. *FEBS Lett*, v. 585, n. 17, p. 2635-9, Sep 2 2011. ISSN 1873-3468 (Electronic) 0014-5793 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708149>.

MENDONÇA S. **Leishmaniose**. Agência Fiocruz de notícias, saúde e ciência para todos, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <https://agenciafiocruz.br/leishmaniose>. Acesso em: 04 Maio. 2018, as 16:54h

REY L, **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. NELSON D. L., COX M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

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.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Leishmaniasis: What is Leishmaniasis**, 2018. Disponível em: www.who.int/leishmaniasis/disease/en/. Acesso em: 04 Maio. 2018, as 14:32h

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Leishmaniasis: Clinical forms of the Leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis**. 2018. Disponível em www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/. Acesso em: 04 Maio. 2018, as 15:50h