

EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CRK3 DE *Leishmania mexicana*

Vitoria Cunha de Oliveira¹; de Paula, A. L. M.²; Siqueira, F. S.³; Emiliano, M. F. C.⁴; Júdice, Wagner Alves de Souza Júdice⁵

1. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: vitoriacunhaoliveira99@gmail.com
2. Estudante do curso de Biomedicina; e-mail: queluiza@gmail.com
3. Estudante do curso de Farmácia; e-mail: fabioatdr37@gmail.com
4. Mestranda em 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: Quinase; CRK3; *Leishmania*; Expressão.

INTRODUÇÃO

Leishmaniose tegumentar é uma doença causada por parasitas intracelulares da Família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, tendo como subgênero (*Leishmania*). A leishmaniose tegumentar também é conhecida como leishmaniose cutânea, pois esta doença acomete pele e mucosas com lesões geralmente não ulcerosas, tanto do ser humano como também de animais silvestres e domésticos residentes nas regiões tropicais. A espécie *Leishmania (Leishmania) mexicana* é a causadora de leishmaniose cutânea e cutânea difusa com ocorrências no México e na América Central (PEREIRA *et al.*, 2013; MS, 2006). A leishmaniose cutânea é considerada uma doença infecciosa negligenciada segundo a Organização das Nações Unidas (1990) e seu tratamento medicamentoso atual apresenta efeitos adversos agressivos (MS, 2006; WHO, 1990). As leishmanias são parasitas dimórficos, com forma promastigota (flagelada) no intestino das fêmeas de artrópodes *Phlebotomus* e forma amastigota nas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) dos hospedeiros mamíferos, sendo que os artrópodes flebotomíneos fêmeas são os vetores de transmissão da doença, pois ao realizarem hematofagia nos hospedeiros mamíferos, que manifestam a doença, os infectam com o parasita, estabelecendo um ciclo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; REY, 2010). Estudos de Walker *et al* (2011) evidenciaram a CRK3 (Figura 1), uma enzima quinase relacionada à CDK2 (CDK2 – related protein kinase 3), essencial para a sobrevivência do parasita, sendo esta uma proteína quinase dependente de ciclina, ou seja, a CRK3 apenas é ativa em complexo com uma proteína ciclina, no caso a CYC6.

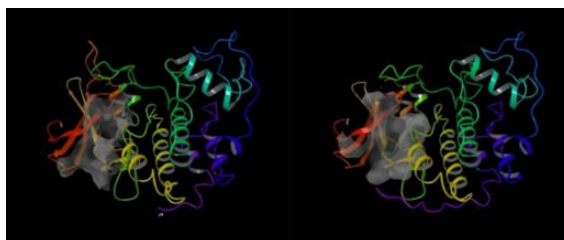


Figura 1 - Estrutura tridimensional da LmCRK3 a esquerda e da HsCDK2 a direita, representando em cinza a superfície correspondente do sítio ativo. Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.* (2013).

A CRK3 é necessária para a transição da fase G2 do ciclo celular (fase responsável pelo preparo para a mitose) para a fase M (fase mitótica), seus substratos de fosforilação são os grupamentos hidroxila da cadeia lateral dos aminoácidos serina ou treonina das proteínas histonas H1, que se ligam à fita de DNA entre dois cromossomos, levando à formação de uma

fibra em zigue-zague mais condensada, que quando fosforiladas adquirem carga negativa, e uma vez que o grupamento fosfato do DNA confere ao mesmo carga negativa há repulsão de cargas, enfraquecendo a associação do DNA com as histonas. (HASSAN *et al.*, 2001; SAJAN & HAWKINS, 2012; SARAIVA *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2011; ZENTER & HENIKOF, 2013).

OBJETIVO

Clonar e expressar a enzima CRK3 de *Leishmania mexicana* no microorganismo recombinante *Escherichia coli*.

METODOLOGIA

A obtenção da enzima se dá pelo processo de clonagem, que fornece um DNA recombinante para que a enzima possa ser expressa. Este processo consiste na obtenção de um DNA artificialmente recombinado do gene da CRK3 com um plasmídeo vetor, o escolhido para o desenvolvimento do presente projeto foi o pET28c, com 5367 pb r contendo os genes ori (origem de replicação), Kan (resistência ao antibiótico Canamicina) e promotor e terminador T7 (região do sítio de clonagem). A metodologia aplicada foi fundamentada nos estudos de Walker *et al* (2011), sendo realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do gene CRK3 de *Leishmania mexicana*, utilizando a enzima Taq Polimerase High Fidelity, que fornece cópias do DNA alvo com alta qualidade. O material obtido foi purificado utilizando-se o Kit Illustra GFX PCR DNA and gel Band purification da General Electric (GE) e a purificação foi armazenada em freezer a -20°C. O plasmídeo vetor foi obtido através de lise alcalina com o kit Wizard® Miniprep, utilizando-se células de uma solução estoque 20% glicerol (v/v) de pET28 em bactéria *Escherichia coli* da linhagem DH5 α crescidas em meio LB-Broth suplementado com o antibiótico canamicina (25 μ g.mL⁻¹) e o material foi armazenado em freezer a -20°C. Em seguida foi feita uma digestão com endonucleases para que as duplas fias do gene (inserto) e do plasmídeo ficassem com pontas coesivas. As enzimas endonucleases de restrição SmaI e XbaI, adquiridas da empresa Jena Bioscience®, foram utilizadas na reação. O material da digestão foi purificado utilizando o Kit Illustra GFX PCR DNA and gel Band purification da General Electric (GE) e o material obtido da purificação foi armazenado em freezer à -20°C. A associação das pontas coesivas do gene (inserto) e do vetor e a ligação destas foram realizadas pela reação da T4 DNA ligase da SibEnzyme®. O material foi deixado em reação à 4°C overnight. A transformação do DNA recombinante foi realizada através da técnica do choque térmico, onde todo o conteúdo oriundo da ligação foi inoculado em 75 μ L de material contendo bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α competentes. A confirmação foi feita através de uma PCR em 4 colônias crescidas na placa utilizando primers FW e RV T7 (que se ligam na região do sítio de clonagem).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A confirmação da etapa de amplificação e de obtenção do plasmídeo foi feita através de gel de agarose 1% (m/v) para confirmação, este sendo preparado com tampão TAE (solução de estoque concentrada 10X – 48,4g de TRIS, 12 mL de ácido acético glacial e 20 mL de EDTA 0,5M pH 8,0) diluído para concentração 1X, sendo adicionado 0,6 g de agarose ultrapura em 60 mL de tampão TAE 1X e adicionou-se 0,5 μ g/mL de brometo de etídio. A amostra foi preparada adicionando-se 1 μ L de corante 6X Loading Buffer em 5 μ L de material oriundo da PCR. A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba contendo tampão TAE 1X, sob tensão de 80V, durante 1 hora. O gel foi visualizado em fotodocumentador Bio-Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System. O resultado está representado na Figura 1.

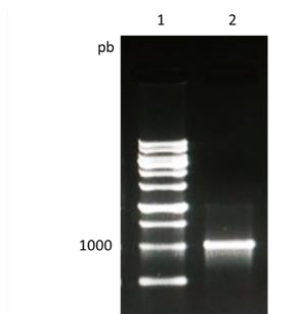


Figura 2 - Gel de agarose 1% (m/v). Amplificação do gene CRK3 de *Leishmania mexicana* por reação de PCR a partir de DNA genômico. A coluna 1 é o padrão de massa molecular High Range DNA Ladder (cellco®). A coluna 2 é a região amplificada do gene com aproximadamente 1000 pb.

A digestão com endonucleases foi confirmada em gel de agarose 1% (m/v), cujo o qual não se obteve imagem, apenas visualização em equipamento fotodocumentador Bio-Rad, ChemiDoc™ MP Imaging System, onde foi possível observar uma banda localizada em aproximadamente 1000 pb, dos quais 966pb são referentes ao gene e os demais são das regiões entre o gene e as sequências em que as enzimas de restrição clivaram, bem como a confirmação da amostra da digestão do vetor, podendo esta ser confirmada através da banda localizada em aproximadamente 5000pb (após a digestão o material possui 5192 pb, pois os demais nucleotídeos foram perdidos após a clivagem das endonucleases nas sequências alvo). A PCR das colônias foi confirmada através de gel de agarose 1% (m/v) preparado da mesma forma como citado anteriormente e está representada na Figura 2, onde nas colunas 5, 7 e 8 observa-se bandas em aproximadamente 2000pb e 1000pb, entretanto há algumas bandas inespecíficas e um arrasto de material também presentes, o que gerou alguns questionamentos sobre a origem de tais fragmentos de DNA, bem como o motivo de tais materiais em arrasto. Uma extração utilizando o kit Wizard® foi realizada, entretanto não houve fragmentos de DNA aparentes no gel de agarose feito para confirmação. Uma nova série de estudos está sendo efetuada a fim de averiguar possíveis causas, bem como uma avaliação nos protocolos está em andamento para que se defina os experimentos a serem realizados para a obtenção do DNA recombinante.

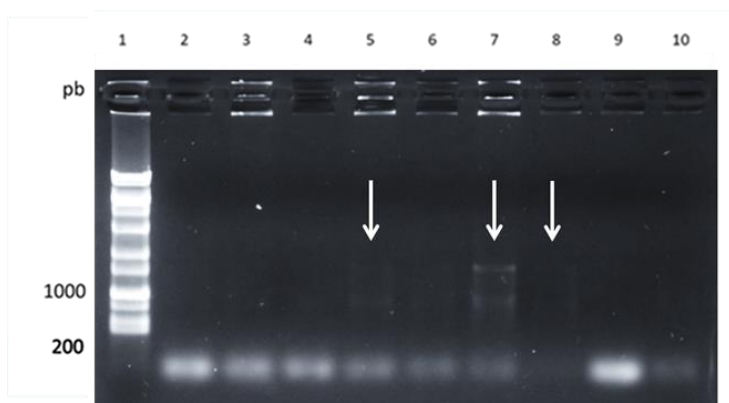


Figura 3 - Gel de agarose 1% (m/v). PCR de colônia duvidoso nas colunas 5, 7 e 8, sendo a coluna 1 o padrão de massa molecular High Range DNA Ladder (cellco®).

CONCLUSÕES

No presente projeto foi possível amplificar o gene da CRK3 de *Leishmania mexicana*, bem como realizar a clivagem do material em pontas coesivas com endonucleases, entretanto

foram encontradas divergências na obtenção do DNA recombinante, uma vez que não se obteve confirmação da PCR com primers T7 e não foram obtidos clones positivos do DNA recombinante, o que está sendo averiguado em novos estudos.

REFERÊNCIAS

HASSAN, P.; FERGUSSON, D.; GRANT, K. M.; & MOTTRAM, J. C. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, UK, 113 (2001), 189–198.

MIELE, V.; VAILLANT, C.; D'AUBENTO N-CARAFI, Y.; THERMES, C.; GRANGE T. DNA physical properties determine nucleosome occupancy from yeast to fly. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 36, p. 3746-3756, 2008.

MS-MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos Clínicos e Diferenciais**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

PEREIRA, F.S.S.; SARAIVA, L.A.; SILVEIRA, N.J.F.; VELOSO, M.P. Modelagem molecular por homologia e validação estrutural da crk3 de *Leishmania mexicana*. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. (X) 2, 42 - 52, 2013.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SARAIVA, L. A. Veloso M. P.; Camps, I.; da Silveira, N. J. F. 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.; THOMSON, 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. The control of leishmaniasis: report of an expert committee. WHO **Technical Report Series**, 1990; 793: 50-55

ZENTER, G. E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 20, p. 259-266, 2013.