

## EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA CRK3 DE *Leishmania mexicana* E AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS CALCOGENOQUINOLÍNICOS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Vitória Cunha de Oliveira<sup>1</sup>; Ana Luiza Mélo de Paula<sup>2</sup>; Fábio da Silva Siqueira<sup>3</sup>; Wagner Alves de Souza Júdice<sup>4</sup>

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. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagneras@umc.br

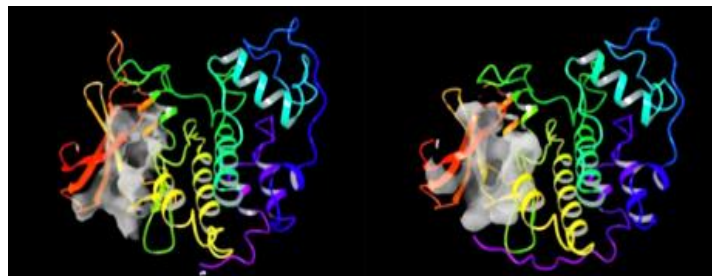
**Área de conhecimento:** Enzimologia, Biologia Molecular.

**Palavras chave:** Quinases; CRK3; *Leishmania mexicana*; Clonagem.

### INTRODUÇÃO

As Leishmanias são um gênero de protozoários parasitas causadores de zoonoses em animais silvestres e, em menor escala, de animais domésticos, tendo os humanos como hospedeiros acidentais (GONTIJO & CARVALHO, 2003). A leishmaniose tegumentar ou cutânea consiste no conjunto de enfermidades que acometem a pele e mucosas dos hospedeiros vertebrados, os quais foram citados acima e é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, uma vez que é uma doença infecciosa negligenciada segundo a Organização das Nações Unidas (1990) (GONTIJO & CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO, 1990). Estes parasitas são dimórficos, se apresentando sob duas formas: promastigota (flagelada) no meio extracelular, na luz do trato digestório dos vetores de transmissão - as fêmeas de flebotomíneos, e amastigota no interior dos macrófagos, células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM). A espécie *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). Estudos de Walker *et al* (2011) evidenciaram a CRK3 (Figura 1), uma serina/treonina quinase relacionada à CDK2 (CDK2 – related protein kinase 3), essencial para a sobrevivência do parasita. A LmCRK3 é uma proteína quinase dependente de ciclina, ou seja, 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.

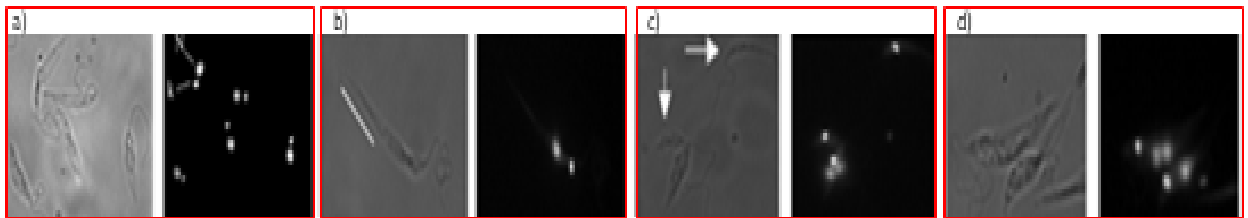


Fonte: Adaptado de PEREIRA *et al.* (2013).

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 da 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; SARAIVA *et al.*, 2011; WALKER *et al.*, 2011). Estudos descritos por Grant et al (2004) identificaram que houve interrupção no ciclo celular ocasionada pela inibição da CRK3 com uso in vitro do inibidor específico de CDK flavopiridol e observou-se que houve inibição da atividade da histona H1, interrompendo então a fase G2 do ciclo celular. Esta interrupção no ciclo celular tem efeito severos na estrutura e morfologia celular da *Leishmania mexicana*, como pode ser observado na Figura 2 (GRANT *et al.*, 2004).

**Figura 2** - Formas promastigotas de *Leishmania mexicana* fixadas e coradas com DAPI (4'-6-diamidino-2-feniindol) e analisadas por microscopia de fluorescência, onde observa-se (a) células controle e células apresentando divergências morfológicas-estruturais após interrupção no ciclo celular : (b) células alongadas, (c) células zoids - sem núcleo (N) e com 1 cinetoplasto (K) e (d) células com 2 núcleos e 1 cinetoplasto.



Fonte: Adaptado de Grant et al. (2004).

## OBJETIVOS

Clonar do gene da enzima CRK3 de *Leishmania mexicana* no microrganismo recombinante *Escherichia coli*.

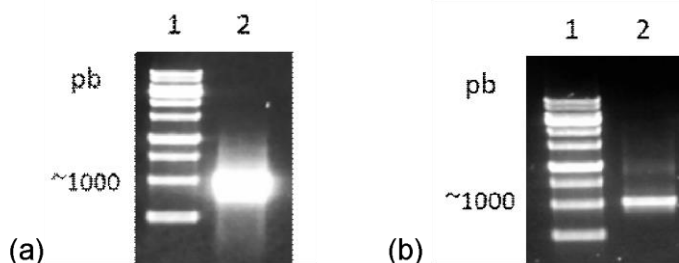
## METODOLOGIA

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 contendo os gene 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 la enzima Taq Polimerase High Fidelity, que fornece cópias do DNA alvo com alta qualidade. O material obtido foi purificado utilizando-se o Kit QIAGEN® QIAquick® Gel Extraction e a purificação e o material armazenado 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 DH5α crescidas em meio LB-Broth suplementado com o antibiótico canamicina (25ug.mL-1) e o material foi armazenado em freezer a -20°C. Foi realizada uma digestão com endonucleases S1a1 e Xba1, adquiridas da empresa Jena Bioscience®, para que as duplas fias do gene (inserto) e do plasmídeo ficassem com pontas coesivas. 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 em bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5α competentes através da técnica do choque térmico, onde todo o conteúdo oriundo da ligação foi inoculado

em 75uL de material contendo as bactérias e após crescimento foi realizada inoculação em placa Ágar suplementada com o canamicina ( $25\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A confirmação se deu através de uma PCR em 6 colônias crescidas na placa utilizando primers FW e RV T7 (que se ligam na região do sítio de clonagem do vetor).

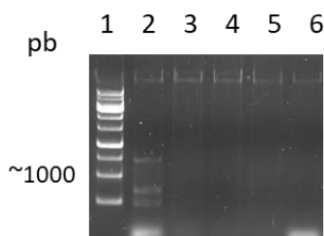
## RESULTADOS E DISCUSSÕES

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio. A amostra foi preparada adicionando-se 1uL de corante 6X Loading Buffer em 5uL 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 (Figura 3).



**Figura 3** – (a) Gel de agarose 1% (m/v). Amplificação do gene LmCRK3 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. (b) Gel de agarose 1% (m/v). Purificação da amplificação do gene LmCRK3 por reação de PCR a partir de DNA genômico. A coluna 1 é o padrão de massa molecular 1kb later 50 ug (Sinapse). 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), onde foi possível observar uma banda localizada em aproximadamente 1000 pb (966pb do gene), e confirmação da amostra da digestão do vetor, confirmada através da banda localizada em aproximadamente 5000pb (após a digestão o material possui 5192 pb) Após as etapas de ligação e transformação foi realizado uma PCR com as colônias crescidas para averiguar a presença do DNA recombinante. A confirmação se deu em gel de agarose 1% (m/v), como mostra a Figura 4.



**Figura 4.** Gel de agarose 1% (m/v). PCR de colônia, sendo a coluna 1 o padrão de massa molecular 1kb later 50 ug (Sinapse), e as colunas 2, 3, 4, 5 e 6 amostras da reação de PCR.

A PCR não comprovou a presença do DNA, uma vez que há uma banda muito fraca no tamanho esperado (aproximadamente 1000 pb) em alguns poços e inexistência de fragmentos em outros poços, bem como evidência de plasmídeos fechados sem o inserto. Fez-se uma diluição das colônias solubilizadas, empregando uma diluição 1:50, e uma nova reação de PCR foi realizada com duas amostras, das colunas 3 e 4, e o gel pode ser

observado na Figura 5. Evidenciou uma banda clara abaixo de 1000pb evidenciando a presença do gene da CRK3 da *L. mexicana* estabelecendo sucesso no processo de clonagem.

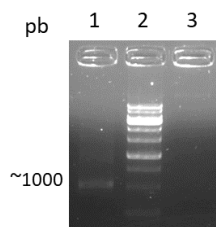


Figura 5. Gel de agarose 1% (m/v). PCR de colônia das diluições 1 e 2, sendo a coluna 1 a amostra 1, a coluna dois o padrão de massa molecular 1kb later 50 ug (Sinapse) e a coluna 3 a amostra 2.

## CONCLUSÕES

Foi possível obter com êxito a amplificação do material genético da LmCRK3 por meio da reação de PCR, bem como o plasmídeo escolhido para ser o vetor. Também foi realizada a digestão com endonucleases de restrição de forma assertiva, tanto no inserto de LmCRK3 como do pET28. Dessa forma foi concluído a transferência do gene LmCRK3 do vetor comercial para o vetor de expressão pET-28 formando o DNA recombinante pET-28-LmCRK3.

## REFERÊNCIAS

GONTIJO, B.; CARVALHO, M, L, R. Leishmaniose tegumentar americana. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.36 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2003.

GRANT, K, M.; DUNION, M.H.; YARDLEY, V.; SKALTSOUNIS, Alexios-Leandros.; MARKO D.; EISENBRAND, G.; CROFT, S, L.; MEIJER, L.; MOTTRAM, J, C. Inhibitors of Leishmania mexicana CRK3 Cyclin-Dependent Kinase: Chemical Library Screen and Antileishmanial Activity. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug. 2004, Vol. 48, No. 8. p. 3033–3042.

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.

MS-MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos Clínico e Diferencial**. 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.

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.