

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

Fábio da Silva Siqueira¹, Wagner Alves de Souza Júdice²

1-Estudante do curso de Farmácia; e-mail: fabioatdr37@gmail.com

2- Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com

Área de conhecimento: Enzimologia

Palavras Chave: Leishmaniose visceral, CRK3, Clonagem, Expressão.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por um protozoário do gênero *Leishmania*, estas patologias são consideradas negligenciadas. Até o momento foram identificadas mais de 20 espécies deste gênero (WHO, 2020a). Apesar de casos serem reportados há anos, atualmente estão sendo notificados casos em países não endêmicos, mostrando-nos que esta é uma patologia emergente (VASCONCELOS et al, 2019). Cada espécie de *Leishmania* afeta o hospedeiro de uma forma diferente, sendo as mais comuns e menos letais, a Leishmaniose cutânea e muco-cutânea, causando úlceras na pele e mucosas, quase sempre deixando cicatrizes ou até mesmo sérias deformidades (WHO 2020b). Contudo, existe uma variação que é ocasionada pela *Leishmania donovani* e outras espécies, conhecida por Leishmaniose visceral ou Calazar, esta por sua vez é caracterizada como a mais grave e suas estatísticas são assustadoras, sendo contabilizadas 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 (PISCOPO e CHARLES, 2006). A leishmaniose visceral atinge majoritariamente o gênero masculino, um estudo toma como base a diferença hormonal do gênero masculino, para com o feminino e o quanto isso afeta a resposta imune (CLOOTS et al, 2020). A enzima CDC2-related protein kinase 3 (CRK3) da *Leishmania donovani* é composta por 311 aminoácidos, sendo que 49,4% são iguais aos da sua homóloga CDC2 do *Homo sapiens* (WALKER et al, 2011). Uma revisão realizada pela universidade de Oxford no Reino Unido em 2019 segue citando o complexo CRK3/CYC6 como estando envolvido no ciclo celular, durante a transição que ocorre entre as fases G2 e M do ciclo celular, reafirma também sobre a ocorrência de citocinese sem mitose, gerando células filhas defeituosas (WHEELER et al, 2019).

OBJETIVO

Expressão e purificação da enzima CRK3 da *Leishmania donovani*, e caracterização de compostos calcogenoquinolínicos avaliando sua capacidade de inibitória sobre a atividade da CRK3.

METODOLOGIA

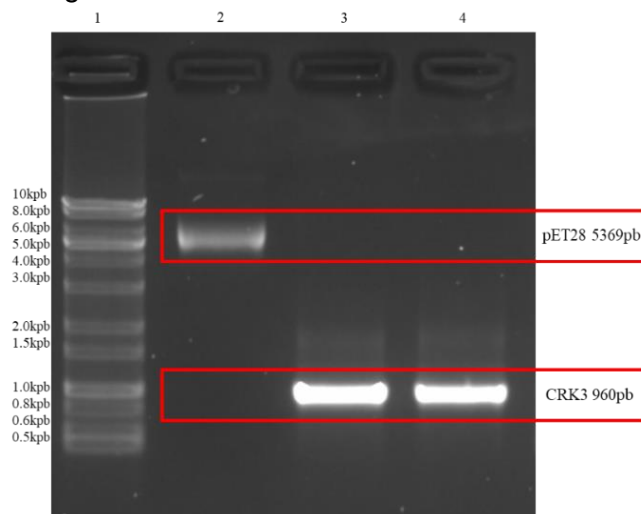
Ao fim do último ciclo do projeto, foi constatada a necessidade de remoção da cauda de histidina que foi inserida na região Carboxi-terminal da proteína CRK3, para que fosse possível obter uma proteína passível de se realizar ensaios enzimáticos dos quais se obtivessem resultados confiáveis. Para isso, foram desenhadas novas sequências de primers para o gene LdCRK3 (*Leishmania donovani* CRK3), forward 5'AGGGCGAATTGGCGGAAGG3', se ligou próximo ao sítio de restrição e ao gene codificador da metionina do start codon, e reverse 5'CTGCTCGAGTTACCAACGCAGATC3'

desenhado para se ligar às últimas trincas de nucleotídeos, e codificar o stop códon e o sítio de restrição. Utilizando dos primers e do gene da CRK3 foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando tampão Taq High fidelity polymerase reaction buffer 1X, 200µM de dNTP Mix, 2.5U de Taq High Fidelity Polymerase, 0,25 µM de primer forward, 0,25 µM de primer reverse e 1µg de material genético. O resultado foi confirmado por meio de eletroforese em gel de Agarose a 1%. Foi realizado também um inóculo de cepa DH5α que continha o gene vetor pET28 (Novagen), em meio LB Broth suplementado de Canamicina a 25µg x mL⁻¹ a 37°C sob agitação de 180 RPM durante 18 horas a noite. No dia seguinte foram centrifugados 5mL do inóculo e o precipitado foi submetido a lise alcalina utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System para obtenção do vetor pET28. O resultado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose a 1%. O produto da PCR foi purificado utilizando o kit QIAquick® Gel Extraction Kit QIAquick® PCR & Gel Cleanup Kit (QIAGEN) e juntamente com o vetor de expressão, pET28 foi digerido com as enzimas de restrição SmaI e XbaI. Em seguida foi realizado a ligação do gene com o vetor utilizando a enzima T4 ligase, seguiu-se a purificação utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE). Cepa *E. coli* DH5α competente foram transformadas por choque térmico com o vetor pET28-LdCRK3. O produto da ligação foi misturado com 50µL de bactérias e mergulhada em banho de gelo durante 30 minutos, seguiu-se 90 segundos um banho maria a 42°C, posteriormente o material ficou em banho de gelo durante 2 minutos. Após este período foi adicionado a reação 800µL de meio de cultura LB Broth e encubado a 37°C sob agitação de 180 RPM durante 2 horas. Em seguida, a mesma foi semeada em placa de petri com meio LB Ágar acrescido de Canamicina (25µg x mL⁻¹) e incubado a 18°C por 18 horas. Colônias foram selecionadas e diluídas em 10µL de água deionizada ultrapura, submetidas à PCR de colônias PCRs utilizando Taq DNA Polimerase e os primers T7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realizada a remoção da cauda de Histidina, foi também realizada amplificação do vetor pET28, ambos os materiais foram purificados e o resultado pode ser observado na Figura 1 onde na coluna 1 se observa o marcador de massa molecular, na coluna 2 o vetor com massa molecular de 5396 pb e nas colunas 3 e 4 uma duplicata de resultados contendo o inserto da LdCRK3.

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose do produto transformação de *E. coli* DH5α e do gene da CRK3 sem calda de histidina.



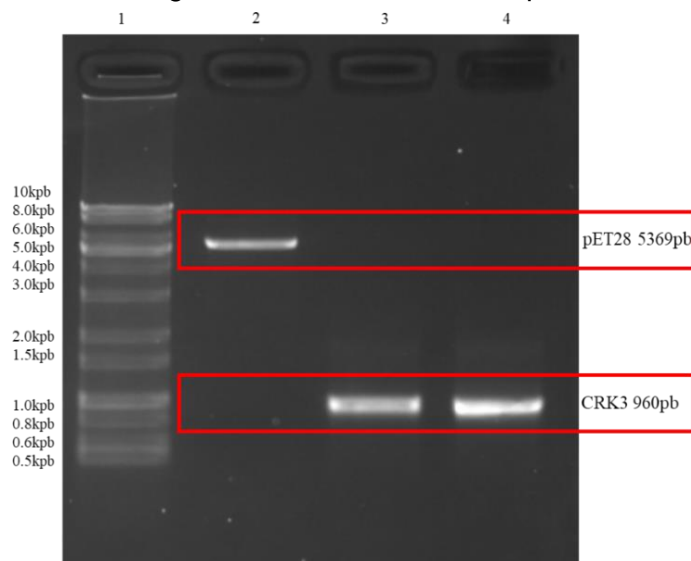
¹Marcador molecular High Range DNA Ladder;

²Resultado da lise alcalina contendo o vetor pET28;

³Resultado da purificação da PCR onde foi realizada a remoção do gene de cauda de histidina localizado nas colunas 3 e 4.

Tendo em mãos o vetor pET28 purificado e o inserto da CRK3 (LdCRK3) prosseguimos para a digestão enzimática para abertura do vetor e corte do inserto utilizando as endonucleases SmaI e XbaI para gerar extremidades coesivas não complementares entre si que irão favorecer a ligação do inserto no vetor e reduzindo assim a chance do vetor fechar sem a inserção do inserto. Seguiu-se a purificação dos produtos da digestão cujos resultados são observados na Figura 2, o vetor contendo 5192pb e o inserto da CRK3.

Figura 2 – Produto da digestão enzimática do vetor pET28 e inserto da CRK3



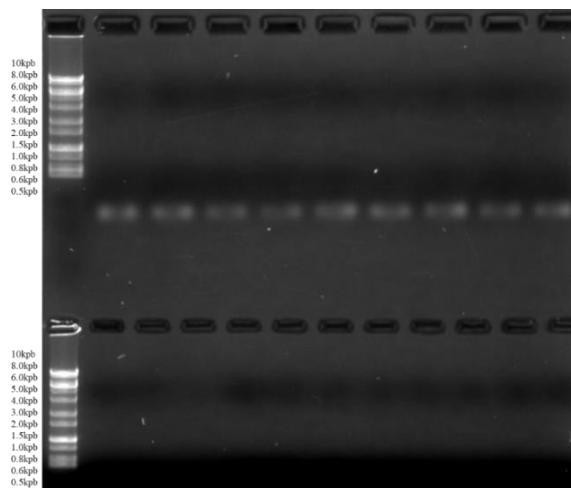
¹Marcador molecular High Range DNA Ladder;

²Resultado da purificação da digestão do vetor pET28 localizado na coluna 2;

^{3,4}Resultado da purificação da digestão do inserto CRK3

Após a realização da purificação da digestão, foram realizadas diversas tentativas de ligação e transformação para a criação e amplificação do cDNA correspondente a Enzima CRK3, porém sem sucesso, foram realizados testes com diferentes alíquotas de tampão e enzima T4 ligase, porém o resultado obtido foi negativo como está exemplificado na Figura 3, o que impediu a continuidade do trabalho.

Figura 3 – PCR de Colônias visando bactérias positivas para o cDNA LddCRK3



¹Marcador molecular High Range DNA Ladder;
Demais PCR de Colônias negativas.

CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados, foi possível concluir que a remoção da cauda de Histidina foi realizada com sucesso, bem como a digestão enzimática realizada tanto no vetor, quanto no inserto, entretanto após a realização da ligação e transformação por choque térmico, não se conseguiam colônias viáveis para a extração de material amplificado. Para tentar desvendar a causa, foi realizada uma triagem dos procedimentos até o momento da ligação onde na última etapa antes da transformação por choque térmico, foi realizada uma pcr do material ligado a fim de verificar se o inverso se encontrava entre o promotor e terminador T7 do vetor. Esta PCR apresentou resultado positivo, logo foi possível concluir também que o problema se encontrava nas alíquotas de Bactéria competente. Sendo assim, logo que possível serão preparadas novas alíquotas de bactérias tratadas e aptas a receber o cDNA exógeno e os trabalhos serão continuados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLOOTS, K; BURZA, S; MALAVIYA, P; HASKER, E; KANSAL, S; MOLLETT, G; CHAKRAVARTY, J; ROY, N; LAL, BK; RIJAL, S; SUNDAR, S; BOELAERT, M. Male predominance in reported Visceral Leishmaniasis cases: Nature or nurture? A comparison of population-based with health facility-reported data. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, e0007995, 2020.

PISCOPO, TV; CHARLES, MA. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, n. 82, p. 649–657, 2006.

VASCONCELOS, J; TORRES, J; GRANADO, J; BAPTISATA, T; MANSINHO, K. Cutaneous leishmaniasis in non-endemic countries: An emerging neglected problem. **IDCases**, n. 17, e00570, 2019.

WALKER, RG; THOMSOM, G; MALONE, K; NOWICKI, MW; BROWN, E; BLAKE, DG; TURNER, N.J; WALKINSHAW, MD; GRANT, KM; MOTTRAM, JC. High Throughput Screens Yield Small Molecule Inhibitors of Leishmania CRK3:CYC6 Cyclin-Dependent Kinase. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, e1033, 2011.

WHEELER, R.J; GULL, K; STUNTER, JD. Coordination of the Cell Cycle in Thrypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, n. 73, p. 133-154.2019.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Leishmaniasis: What is Leishmaniasis**. 2020. Disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Leishmaniasis: Clinical forms of the Leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis**. 2020. Disponível em <www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis/en/>