

EMÍLIO SANTANA DE ABREU

***Leishmania infantum chagasi*: ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE  
UMA NUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE-2 (NTPDase-2) E  
CLONAGEM DE UMA POSSÍVEL *SERINE/ARGININE PROTEIN KINASE*  
(SRPK)**

Dissertação apresentada a Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
graduação em Bioquímica Aplicada, para  
obtenção do título *Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A162L  
2019 Abreu, Emilio Santana de, 1985-  
*Leishmania infantum chagasi* : estudo da atividade  
enzimática de uma Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase-2  
(NTPDase-2) e clonagem de uma possível *Serine/Arginine  
Protein Kinase* (SRPK) / Emilio Santana de Abreu. – Viçosa,  
MG, 2019.

x, 53 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Leishmaniose. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Bioquímica. Programa de  
Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 572.7

EMÍLIO SANTANA DE ABREU

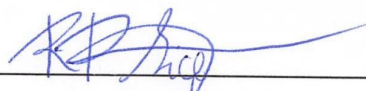
***Leishmania infantum chagasi*: ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE  
UMA NUCLEOTÍDEO TRIFOSFATO DIFOSFOHIDROLASE-2 (NTPDase-2) E  
CLONAGEM DE UMA POSSÍVEL *SERINE/ARGININE PROTEIN KINASE*  
(SRPK).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

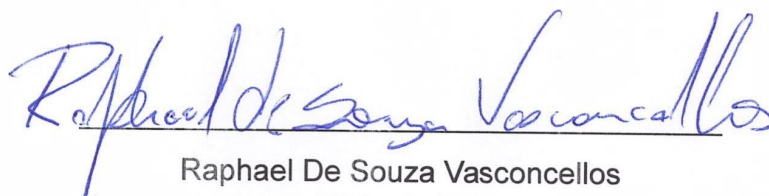
APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.



Christiane Mariotini-Moura



Raoni Pais Siqueira



Raphael De Souza Vasconcellos  
(Orientador)

“Confiai-lhe todas as vossas preocupações,

porque Ele tem cuidado de vós.”

1Pedro 5:7

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, pelos meus familiares e amigos e por ter me proporcionado todas as condições de chegar até aqui.

Agradeço aos meus pais, Geralda e Custódio, pelos ensinamentos, agradeço a minha irmã, Leiliane, pelo seu exemplo de determinação e superação.

Agradeço a minha esposa, Leide Sara, pelo companheirismo, palavras de calma, pelo colo e pelo seu amor.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares, pela vivência e bons momentos durante minha jornada. Agradeço aqui também, á Deus, os momentos que tive com meu primo Leonardo Chaves (*in memorian*), durante sua vida.

Agradeço aos companheiros de Laboratório, sem vocês o caminho seria intransitável, principalmente: Nancy, Anna Paula, Juliana, João, Eduarda, Mônica, Éverton, Carine.

Agradeço aos funcionários e colaboradores da UFV.

Agradeço ao meu orientador, Raphael Vasconcellos pela dedicação a este trabalho e pelos seus ensinamentos.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho e pela capacitação.

Agradeço também aos meus amigos de trabalho e alunos do Unifaminas-Muriaé-MG.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas .....	viii
Resumo .....	ix
Abstract .....	x
1. Introdução Geral .....	1
2. Referências .....	6
Capítulo 1 Estudo da atividade enzimática de LicNTPDase-2 em diferentes tampões de renaturação .....	9
1.1 Introdução .....	10
1.2 Objetivos.....	12
1.2.1 Objetivo Geral.....	12
1.2.2 Objetivos específicos .....	12
1.3 Material e Métodos.....	13
1.3.1 Indução de expressão de LicNTPDase 2 .....	13
1.3.2 Pré – purificação.....	13
1.3.3 Purificação dos corpos de inclusão.....	14
1.3.4 Purificação de NTPDase-2 Por Cromatografia de Afinidade resina <i>HIS- Select Nickel Affinity Gel</i> .....	14
1.3.5 Quantificação e verificação da pureza da proteína purificada .....	15
1.3.6 Renaturação da LicNTPDase2.....	16
1.3. 7 Reação de atividade enzimática .....	17
1.3.8 <i>Thermal Shift</i> .....	18
1.3.9 Análises estatísticas .....	19
1.4 Resultados e Discussão.....	19
1.4.1 Purificação e Renaturação de LicNTPDase-2 .....	19
1.4.2 Atividade enzimática de LicNTDPase-2 em diferentes tampões de renaturação.....	20
1.4.3 Atividade enzimática de LicNTPDase-2 em temperaturas de 25°C e 37°C .....	23
1.4.4 Análise de LicNTPDase-2 utilizando diferentes nucleotídeos e pHs	24
1.4.5 Análise da estabilidade de LicNTPDase-2 utilizando <i>Thermal Shift</i>	26

1.5 Conclusões .....	30
1.6 Referências .....	31
Capítulo 2 .....	35
Clonagem de Serine/Arginine Protein Kinase (SRPK) de <i>Leishmania infantum chagasi</i> .....	35
2.1 Introdução .....	36
2.2 Objetivos.....	37
2.2.1 Objetivo Geral .....	37
2.2.2 Objetivos Específicos .....	38
2.3 Material e Métodos .....	38
2.3.1 Análises de Bioinformática .....	38
2.3.2 Clonagem da <i>Serine/Arginine Protein Kinase</i> de <i>L. Infantum chagasi</i> (LicSRPK) .....	38
2.4 Resultados e Discussão .....	40
2.4.1 Análises “ <i>in silico</i> ” .....	40
2.4.2 Clonagem de LicSRPK .....	48
2.5 Conclusão .....	51
2.6 Referências .....	52

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1: Ciclo de Leishmania .....	2
Figura 1. 2: Sinalização purinérgica.....	12
Figura 1.3: Gel de eletroforese de poliacrilamida 10%.....	20
Figura 1.4: Atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com 7 tampões de Renaturação após 24 horas.....	21
Figura 1.5: Comparação da atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com os tampões 4 e 7 a 37°C durante 10 dias consecutivos.....	23
Figura 1.6: Comparação da atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com os tampões 4, 5 e 7 nas temperaturas de 25°C e 37°C.....	24
Figura 1.7: Comparação da atividade enzimática de LicNTPDase-2 com os tampões 4 e 7 a 37°C, avaliando sua atividade frente a nucleotídeos.....	25
Figura 1.8: Comparação da atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com os tampões 4 e 7 a 37°C, avaliando sua atividade em diferentes pHs.....	26
Figura 1.9: Comparação entre o tampão 1 e 7.....	27
Figura 1.10: Comparação entre o tampão 2 e 7.....	28
Figura 1.11: Comparação entre o tampão 3 e 7.....	28
Figura 1.12: Comparação entre o tampão 4 e 7.....	29
Figura 1. 13: Comparação entre o tampão 5 e 7.....	29
Figura 2.1: Alinhamento entre SRPKs .....	47
Figura 2.2: Análise da proteína LicSRPK.....	48
Figura 2.3: Resultado de PCR em gel de agarose 1% .....	49
Figura 2.4: Resultado positivo para a presença do gene de SRPK no vetor pGEM-T easy.....	49
Figura 2.5: Resultado da digestão pelas enzimas <i>XhoI</i> e <i>NdeI</i> .....	50
Figura 2.6: Resultado de PCR do gene em vetor de expressão pET28a..	50
Figura 2.7: Resultado da digestão do vetor pET 28a .....	51
Tabela 1.1: Concentração dos tampões de Renaturação.....	17
Tabela 1.2: Resultado do <i>Shift</i> de cada tampão testado em <i>Thermal</i> <i>Shift</i> .....	27

Tabela 2.1: Primers utilizados na clonagem de LicSRPK.....	39
Tabela 2.2: Comparação entre as sequências de aminoácidos e o percentual de identidade entre as SRPKs de <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Homo sapiens</i> , <i>Trypanossoma cruzi</i> com a suposta SRPK de <i>Leishamnia infantum chagasi</i> .....	41
Tabela 2.3: Comparação entre as sequências de aminoácidos e o percentual de identidade da região espaçadora característica das SRPKS entre <i>Trypanossoma cruzi</i> com a suposta SRPK de <i>Leishamnia infantum chagasi</i> .....	41
Tabela 2.4 Comparação entre as sequências de aminoácidos e o percentual de identidade dos dois domínios quinases entre a SRPK de <i>Trypanossoma cruzi</i> com a suposta SRPK de <i>Leishamnia infantum chagasi</i> .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Difosfato de adenosina  
AfSRPK – SRPK de *Aspergillus flavus*  
AMP - Adenosina 3',5'-monofosfato  
ATP – Trifosfato de adenosina  
BSA - Albumina de soro bovino  
CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de cálcio  
cDNA – DNA complementar  
DbSRPK – SRPK de *Drosophila busckii*  
DO - densidade optica  
GSH – Glutathiona Reduzida  
GSSG – Glutathiona Oxidada  
HCl – Ácido clorídrico  
hSRPK1 – SRPK1 de humano  
hSRPK2 – SRPK2 de humano  
IPTG - Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida  
KCl – Cloreto de potássio  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio  
mM - Milimolar  
mRNA – RNA mensageiro  
Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – Fosfato de Sódio  
NaCl – cloreto de Sódio  
nm – nanometro  
NTPDase - Nucleosideo trifosfato difosfohidrolase  
p/v – Peso/volume  
PfSRPK1 – SRPK1 de *Plasmodium falciparum*  
RPM – Rotações por minuto  
SRPK – Serina/ arginina proteína quinase  
TcSRPK - SRPK de *Trypanosoma cruzi*  
TgSRPK – SRPK de *Toxoplasma gondii*  
Tm - Temperatura de melting  
v/v – Volume/ volume

## RESUMO

ABREU, Emílio Santana de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. ***Leishmania infantum chagasi*: *Leishmania infantum chagasi*: estudo da atividade enzimática de uma Nucleotídeo Trifosfato Difosfohidrolase-2 (NTPDase-2) e clonagem de uma possível *Serine/Arginine Protein Kinase* (SRPK).** Orientador: Raphael de Souza Vasconcellos. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan e Juliana Lopes Rangel Fietto.

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *leishmania* sendo transmitidas por flebotomíneos. A doença pode se manifestar com lesões na pele e mucosas do indivíduo infectado ou pode atingir órgãos internos (leishmaniose visceral). A *Leishmania infantum chagasi* é um dos protozoários causadores de leishmaniose visceral com importante manifestação no Brasil. Neste contexto, o estudo de enzimas quinases como alvos de ação de medicamentos proporciona meios racionais para a pesquisa de novas drogas. Neste trabalho foram estudadas duas enzimas, uma apirase, NTPDase-2 e uma quinase SRPK de *L. infantum chagasi*. O objetivo deste estudo é padronizar a renaturação da LicNTPDase-2 e avaliar a atividade da enzima frente a diferentes nucleotídeos (ADP, UDP, GDP e ATP), verificar melhor atividade frente a diferentes pHs, temperaturas de 25°C e 37°C e verificar variações de sua estabilidade utilizando *thermal shift*. Também foi realizada a clonagem da SRPK de *Leishmania infantum chagasi* para a realização de estudos bioquímicos e biológicos. Assim, neste estudo foi possível identificar que os tampões de 3, 4, 5 e 6 apresentaram melhora atividade enzimática, comparado com os tampões 1, 2 e 7, após 24 horas de renaturação de 2 °C a 8 °C. Dentre os tampões o tampão 4 apresentou o maior *shift*. Não ocorreu diferença significativa nos testes realizados a 25°C e a 37°C, assim como no teste para avaliação de pH. Para as análises de nucleotídeos o UDP, GDP e ADP apresentaram melhora na atividade quando comparados com o ATP. Foi possível realizar a clonagem de LicSRPK predita nas análises de bioinformática em *Leishmania infantum chagasi*, sendo importante agora a realização de sequenciamento e ampliação de seus estudos.

## ABSTRACT

ABREU, Emilio Santana de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. ***Leishmania infantum chagasi*: study of enzymatic activity of a Nucleotide Trifosphate Difosfoholase-2 (NTPDase-2) and cloning of a possible Serine/Arginine Protein Kinase (SRPK)**. Adviser: Raphael de Souza Vasconcellos. Co-advisers: Gustavo Costa Bressan and Juliana Lopes Rangel Fietto.

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* which are transmitted by sandflies. The disease can manifest with lesions on the skin and mucous membranes of the infected individual or can reach internal organs (visceral leishmaniasis). *Leishmania infantum chagasi* causes the visceral form of leishmaniasis with important manifestation in Brazil. In this context, the study of kinase enzymes as chemotherapeutic targets provides rational means for the research of new drugs. In this work two enzymes from *L. infantum chagasi* were studied: the NTPDase-2, an apyrase, and a SRPK kinase. The objective of this study is to standardize the renaturation of LicNTPDase-2 and to evaluate the activity of this enzyme against different nucleotides (ADP, UDP, GDP and ATP) in order to verify optimal activity against different pHs, temperatures of 25°C and 37°C and to evaluate variations on folding stability using thermal shift assay. The SRPK of *Leishmania infantum chagasi* was also cloned to perform biochemical and biological studies. Thus, in this study it was possible to observe that buffers 3, 4, 5 and 6 allowed improved enzymatic activity, compared to buffers 1, 2 and 7, after 24 hours of renaturation of 2 ° C to 8 ° C. Among all tested buffers, the buffer 4 presented the largest folding shift. There was no significant difference in the tests performed at 25°C and at 37°C, as well as in pH variations. Regarding the nucleotide analyzes, UDP, GDP and ADP showed an improvement in the activity when compared to the ATP. It was possible to perform the cloning of predicted LicSRPK by bioinformatics analysis in *Leishmania infantum chagasi*, and it is now important to carry out the sequencing and amplification of its studies.

## 1. Introdução Geral

Wright, 1903, fez descrições de lesões ulcerativas identificando uma forma protozoária nestas lesões, descrevendo como sendo uma doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais. Atualmente sabe-se que esta doença é caracterizada como a leishmaniose.

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *leishmania*, sendo representado por mais de vinte espécies de protozoários, sendo transmitidos por insetos flebotomíneos. Dentre as espécies causadoras desta doença pode-se citar o complexo *L. donovani* com 2 espécies (*L. donovani*, *L. infantum* [também conhecido como *L. chagasi* no Novo Mundo]); o complexo *L. mexicana* com 3 espécies principais (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*; *L. aethiopica*; e o subgênero *Viannia* com 4 espécies principais (*L. [V.] braziliensis*, *L. [V.] guyanensis*, *L. [V.] panamensis* e *L. [V.] peruviana*) (DESJEUX, 2004; WHO, 2018; CDC, 2018).

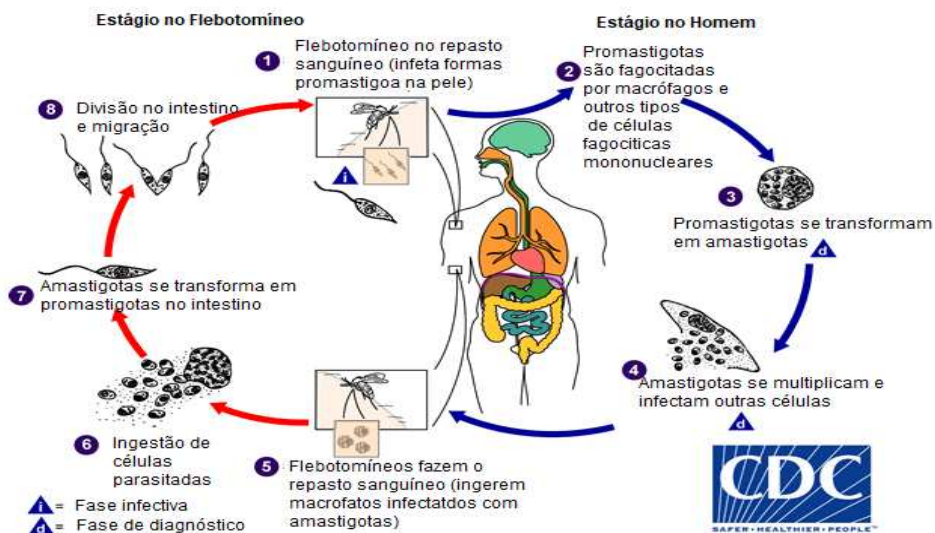
As duas formas clínicas mais comuns são as cutâneas com aparecimento de ulcerações no local da picada do flebotomíneo transmissor e a leishmaniose visceral que ataca órgãos internos como fígado, baço e medula no homem. Nestes pacientes, os principais sintomas são perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia, sendo a leishmaniose visceral uma forma grave da doença podendo levar o indivíduo a morte se não for tratada. A leishmaniose pode ser encontrada em aproximadamente 90 países em todo o mundo sendo mais comum em áreas subdesenvolvidas (CDC, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 94% das notificações de novos casos de leishmania são provenientes do Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Ainda segundo esta entidade, a leishmaniose representa um problema de saúde pública no Brasil onde ocorre cerca de 96% dos casos de leishmaniose visceral das Américas (WHO, 2018).

No velho mundo as leishmanioses são transmitidas pela fêmea do inseto flebotomíneo do gênero *Phlebotomus* e pelo inseto do gênero *Lutzomia* no novo

mundo. O mosquito por sua vez transmite o protozoário através da picada em seus hospedeiros que podem ser homens, animais selvagens e animais domésticos (DESJEUX, 1996).

Dois estágios de vida podem definir o ciclo do protozoário *Leishmania* sendo conhecidas as formas promastigota e amastigota. A forma promastigota é caracterizada por uma célula flagelada se divide em procíclica e metacíclica, enquanto que a forma amastigota não possui flagelo em sua estrutura, sendo sua forma intracelular (BATES, 2007). A infecção ocorre devido a inoculação de formas promastigotas, após a picada do inseto na pele do indivíduo. Neste local as promastigotas vão se deparar com linfócitos e macrófagos, e após serem fagocitadas transformam-se em amastigotas. Assim, as formas amastigotas vão se multiplicar e invadir outras células. O ciclo tem continuidade quando o flebotomíneo pica um hospedeiro infectado e adquire macrófagos infectados com formas amastigotas, onde estas vão ser liberadas e se transformar em promastigotas procíclica e após multiplicação vão se transformar em promastigotas metacíclica, que por sua vez podem infectar novos hospedeiros através da picada do inseto, como pode ser observado na figura 1.1 (NEVES, 2002 e CDC 2018).



**Figura 1.1: Ciclo de Leishmania:** 1- Picada do flebotomíneo inoculando formas promastigotas metacíclica de *Leishmania* no homem. 2- Macrófagos fagocitam promastigotas. 3- Transformação de promastigotas em amastigotas. 4- Amastigotas intracelulares multiplicam-se e infectam outras células. 5 – Flebotomíneo ingerem macrófagos infectados com amastigotas. 6 – Ingestão de células parasitadas. 7-Amastigotas transformam-se em promastigotas no intestino do inseto. 8- Multiplicação das amastigotas intracelulares. Disponível em [www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html](http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html) acesso em 20/12/2018 .

Fatores como superpopulação e busca por áreas de cultivo em regiões endêmicas, militares em trabalhos em áreas atingidas, trabalhadores em construções de rodovias em regiões afetadas, rápido crescimento urbano atingindo áreas rurais e baixas condições socioeconômicas em subúrbios de alguns países, ajudaram e ainda promovem o aumento da disseminação da doença. Outro problema está relacionado com uma co-infecção por HIV, no qual o indivíduo se torna mais susceptível a infecção pela leishmania (DESJEUX, 1996).

Não há vacina contra a leishmaniose, sendo importante a busca por diagnóstico precoce e tratamento de pessoas e animais infectados, uma vez que a leishmaniose visceral quando não tratada pode levar a morte do indivíduo (FRÉZARD, 2009). No passado, raspagens de feridas, inserção de ácido láctico, aplicação de sulfato de cobre, ácido de bateria, extrato de plantas e outras formas já foram aplicadas com o objetivo de tratar a leishmaniose (BERMAN, 1988). Compostos de Antimonio, Anfotericina B lipossomal, Pentamidina, Paromomicina e Miltefosina são drogas utilizadas no tratamento (HENDRICKX, BEYERS, *et. al.*, 2016; CASTES, *et. al.*, 1983). A ferida da leishmaniose cutânea pode desaparecer após meses ou anos, mas poderá deixar cicatrizes no local, sendo importante o seu tratamento. A interrupção do tratamento ou tratamento inadequado, leva a quadros de resistência (CDC, 2018).

A *leishmania infantum chagasi* é a espécie causadora de leishmaniose visceral no Brasil. O cão é o principal reservatório, mas já foram identificados os parasitas em outros animais como raposas e cachorro-vinagre (SOUZA *et. al.*, 2010). A transmissão inicia quando ocorre a picada de um vetor infectado por *Leishmania (L.) chagasi* no homem ou animal. Não há transmissão direta entre um homem infectado para o outro. Crianças e idosos estão mais sujeitos a infecção, que pode atingir em qualquer idade, sendo que em muitos casos não ocorre o desenvolvimento de sinais e sintomas da doença. A infecção proporciona uma supressão da imunidade mediada por células levando ao avanço patológico e aumento da multiplicação dos parasitas. Em pacientes sintomáticos é comum o aparecimento de aumento de fígado, baço e aparecimento de febre (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Assim, o entendimento de mecanismos e associação de vias de replicação do parasita são importantes para a busca inibidores e caracterização de alvos para tentar reduzir os impactos causados pela leishmaniose. Um dos alvos importantes na célula do protozoário são as proteínas, que possuem muitas funções, destacando sua importante atividade enzimática. Duas enzimas têm se tornado alvo de estudo em leishmaniose, sendo conhecidas como NTPDases (*Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases*) e SRPKs (*serine/arginine protein kinase*).

As NTPDases são enzimas ectonucleotidases dependes de cátions divalentes com funções de hidrólises de nucleotídeos, sendo classificadas em oito enzimas com diferentes localizações celulares em mamíferos (ZIMMERMANN, 2001). Estudos já caracterizaram a presença de NTPDase-2 em *Leishmania infantum chagasi* relacionando sua atividade como importante fator para o desenvolvimento da infecção (VASCONCELLOS *et. al.*, 2014). Estudos em camundongos apresentaram relação da atividade de ectonucleotidases com virulência na infecção por *Leishmania amazonensis*, relatando suas atividades com fatores de virulência do parasito (DE SOUZA, *et. al.*, 2010).

Nucleotídeos são moléculas importantes no contexto de sinalização purinérgica, assim, há receptores purinérgicos que são ativados por moléculas como ATP, UTP, UDP e adenosina (figura 1.2) desencadeando uma cascata de eventos celulares (ROBSON, 2006).

Algumas células não possuem vias de produção de purinas sendo necessário, para sua replicação, a obtenção através de vias do hospedeiro, contribuindo para o processo de infecção por parasitas como nos *trypanossomatídeos* (HAMMOND e GUTTERIDGE, 1984). As NTPDases são enzimas que realizam hidrólise de nucleotídeos, colaborando para sinalização purinérgica em células que não possuem vias de síntese de purinas e pode estar relacionada com o processo de infecção de *L. infantum chagasi*, onde foi caracterizada (VASCONCELLOS *et. al.*, 2014).

As SRPKs fazem parte de outro grupo enzimático com importantes funções celulares. Dentre elas, a fosforilações de compostos químicos podendo ser envolvidas em diversas doenças humanas (JANG *et. al.*, 2009). Já foram

encontradas em alguns parasitas como *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (PORTAL, LOBO, *et. al.*, 2003; DIXIT *et. al.*, 2010). Para leishmania, há uma possibilidade de apresentar uma SRPK devido sua predição em análises de bioinformática. Assim o estudo de SRPK, poderá revelar dados que podem favorecer o entendimento do processo de infecção pela *Leishmania infantum chagasi*, assim como a padronização de melhores condições de estabilidade de LicNTPDase-2, sendo, portanto, o objetivo do estudo a busca de melhores condições de renaturação de NTPDase-2 e realização da clonagem de SRPK deste parasita.

## 2. Referências

Bates, Paul A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*. Volume 37, pages 1097-1106. August 2007.

Berman, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis. May-Jun; 10(3):560-86*. 1988.

Castes, M.; Agnelli, O. Verde, A. J. Rondón. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, Vol. 27, Issue 2, May 1983.

CDC, 2018. Disponível em [www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html](http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html) acesso em 20/12/2018 .

De Souza, M. C., E. A. De Assis, R. S. Gomes, A. Marques Da Silva Ede, M. N. Melo, J. L. Fietto e L. C. Afonso. The influence of ecto-nucleotidases on *Leishmania amazonensis* infection and immune response in C57B/6 mice. *Acta Trop*, V. 115, n.3, Sep, p. 262-9. 2010.

Desjeux, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin Dermatol*, v.14, n.5, Sep-Oct, p.417-23. 1996.

Desjeux, P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 305-318. 2004.

Dixit, A.; P. K. Singh. PfSRPK1, a novel splicing-related kinase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, v.285, n.49, Dec 3, p.38315-23. 2010.

Frézard, F.; Demicheli C.; Ribeiro R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 14(7):2317-36. 2009.

Hammond, David J.; Gutteridge, Winstin e. Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Volume 13, Issue 3, November 1984.

Hendrickx, S.; M. Van den Kerkhof; D. Mabile, P. Cos; P. Delputte, L. Maes; G. Caljon. Combined treatment of miltefosine and paromomycin delays the onset of experimental drug resistance in *Leishmania infantum*. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(5), e0005620. doi:10.1371/journal.pntd.0005620. 2016.

Jang, S. W.; Liu X.; Fu H.; Rees H.; Yepes M; Levey A.; Y. K. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 Mediates Cell Cycle and Cell Death in Neurons. *The Journal of Biological Chemistry*. 284: 24512– 24525. 2009.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. 1ª edição. Brasília, DF. Brasil. 2014.

NEVES, P. D. Parasitologia Humana. 11ª edição, editora Atheneu, 2002.

Portal D.; Lobo G. S.; Kadener S.; Prasad J.; Espinosa J. M.; Pereira C. A.,; Tang Z.; Lin R.J.; Manley J. L.; Kornblihtt A. R.; Flawia M. M.; Torres H. N. Trypanosoma cruzi TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases. *Mol Biochem Parasitol*. 127:9–21. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00299-2. 2003.

Robson, S. C.; J. Sévigny; H. Zimmermann. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2(2):409-30. 2006.

Souza, Nely Pinheiro; Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida; Tatiana Pádua Tavares de Freitas; Regina Celia Rodrigues da Paz; Valéria Dutra; Luciano Nakazato; Valéria Régia Franco Sousa. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43(3):333-335, mai-jun, 2010.

Vasconcellos, R., Mariotini-Moura, C., Gomes, R. S., Serafim, T. D., Firmino, R., Silva E Bastos, M., Castro, F. F., Oliveira, C. M., Borges-Pereira, L., de Souza, A. C., de Souza, R. F., Gómez, G. A., Pinheiro, A., Maciel, T. E., Silva-Júnior, A., Bressan, G. C., Almeida, M. R., Baqui, M. M., Afonso, L. C., Fietto, J. L. *Leishmania infantum* ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. *PLoS*

*neglected tropical diseases*, 8(11), e3309. doi:10.1371/journal.pntd.0003309. 2014.

Wright JH. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). *J Med Res*. Dec;10(3):472-82. 1903.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 03/01/2019.

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52:44–56. 2001.

# CAPÍTULO 1

**Estudo da atividade enzimática de LicNTPDase-2 em diferentes tampões de renaturação**

## 1.1 Introdução

As NTPDases, Nucleosídeo Trifosfato Difosfohidrolases, são uma família de oito enzimas em mamíferos com diferenças entre si, mediante localização e propriedades. As NTPDases 1,2,3 e 8 de mamíferos necessitam de  $\text{Ca}^{+2}$  ou  $\text{Mg}^{+2}$  para obterem sua atividade e possuem a função de hidrolisar ATP e UTP (ZIMMERMANN, 2001).

As NTPDases são classificadas como ectonucleotidasas que possuem cinco regiões conservadas de apirases, realizando quebras de nucleotídeos e nucleosídeos formando moléculas menores de monofosfatos. Nos mamíferos elas podem ser encontradas nas membranas celulares (NTPDases 1, 2, 3 e 8) e também podem ser encontradas no interior das células (4, 5, 6 e 7), sendo que as NTPDases 5 e 6 são secretadas enquanto que 4 e 7 não são (ROBSON, 2006; ZIMMERMANN, 2001).

Atividades de ATPases já foram identificadas em pâncreas de porco e aorta de bovinos (KACZMAREK, 1996) e sistema renal (KISHORE, 2005). Foram demonstradas atividades antitrombogênicas em vasos sanguíneos (ROBSON, 1997) e cérebro (KEGEL, 1997). Em parasitas, foram identificadas em *Toxoplasma gondii* (ASAY, 1983), *Neosporum caninum* (ASAY, 1998), *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania infantum* (FIETTO, 2004 e MARIOTINI - MOURA, 2013).

Estudos caracterizaram a NTPDase-2 de *Leishmania infantum chagasi*, demonstrando sua capacidade de hidrolisar nucleotídeos difosfatados e trifosfatados. Foi confirmada também a presença desta enzima na superfície de promastigotas e localizada intracelularmente no cinetoplastídeo, mitocôndrias e núcleo destas células. Outra característica encontrada desta enzima está relacionada a sua capacidade de utilizar cálcio e magnésio como cofatores, sendo demonstrando ainda a sua importância em adesão e infecção em células de hospedeiro (VASCONCELLOS *et. al.*, 2014).

A atividade de NTPDases estão relacionadas com o desenvolvimento de lesão de leishmania, principalmente em *Leishmania amazonensis*, onde ocorre maior hidrólise de ATP, ADP e AMP, levando a hipótese da importância das NTPDases no curso da doença (MARQUES-DA-SILVA, *et. al.*, 2008).

As NTPDases são alvos promissores para atuação de drogas contra leishmanias e, embora, estudos com a NTPDase-1 em *Leishmania Major* não apresentaram bons resultados, ainda assim, é importante a busca de novas pesquisas com NTPDases de outras espécies de leishmanias (SANSON, *et. al.*, 2014; PIMENTEL *et. al.*, 2016).

O estudo de NTPDase-2 proporcionou resultados que relacionaram uma importante via de diagnóstico de leishmanias canina através da detecção de antígenos em tecidos de cães infectados, demonstrando que o estudo desta enzima também poderá levar a formulação de diagnóstico de leishmaniose visceral (VASCONCELLOS *et. al.* 2014).

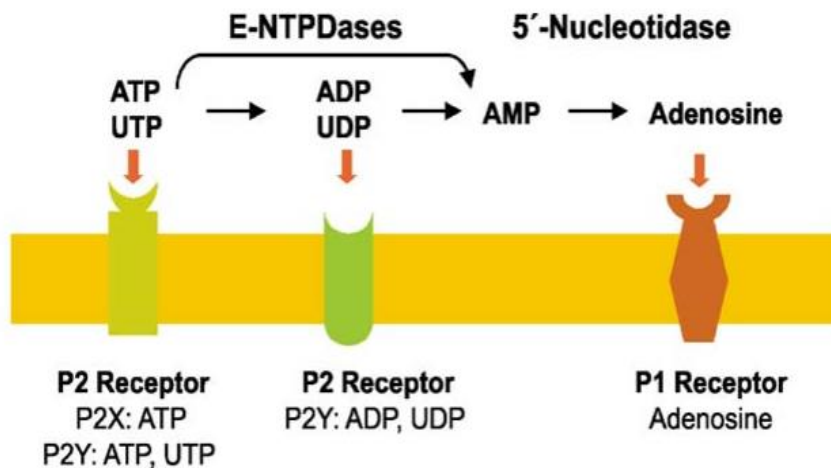
As NTPDases realizam hidrólise de nucleotídeos e por isso são enzimas importantes na sinalização purinérgica, formando moléculas que vão ativar receptores, como por exemplo na modulação de moléculas de ATP, que além da função energética, também possui uma função de ativar receptores e possui atividade em sinalizações extracelulares (BURNSTOCK, 2014). Atualmente, sabe-se que as moléculas de ATP e ADP possuem significado em muitos processos celulares incluindo a capacidade de atuar como neurotransmissores. Assim, surgiram os receptores classificados como purinérgicos sendo subdivididos em subclasses de receptores de adenosina (P1) e receptores de ATP (P2) (BURNSTOCK, 1978; FREDHOLM *et. al.*, 2000).

Os receptores P2 são subdivididos em P2X e P2Y, sendo P2X caracterizados como ionotrópicos e ativados por ATP e os receptores P2Y são subdivididos em 8 subtipos e classificados como metabotrópicos, figura 1.2 (BURNSTOCK e KENNEDY, 1985). Com relação a localização de receptores purinérgicos sabe-se que estão presentes em tecidos excitáveis e na maioria das células não neuronais no corpo humano (BURNSTOCK, 2014).

O ATP é uma molécula importante na resposta inflamatória, assim como sua regulação por E-NTPDase, que através de hidrólise de ATP extracelular regula vias de ativação de processos inflamatórios e ativação de células de defesa do hospedeiro (LANGSTON, *et. al.*, 2003).

As NTPDases estão presentes nas espécies de *Leishmania infantum chagasi* (BASTOS *et. al.*, 2017), *Leishmania amazonenses* e *L. brasiliensis* (MAIOLI, *et. al.*, 2004). A *L. amazonensis* possui importante atividade na hidrólise de ATP no qual está relacionado com sua virulência (BERREDO-PINHO *et al.*

2001) e a *L. brasiliensis* também é capaz de realizar hidrólise de ATP e AMP extracelular sugerindo a importância da atividade NTPDásica no controle da infecção pelo parasita (MAIOLI, et. al, 2004).



**Figura 1.2: Sinalização purinérgica.** Hidrólise de nucleotídeos ATP gerando ADP e hidrólise de UTP gerando UDP. Hidrólise de ADP e UDP gerando AMP. Estas reações são catalisadas por enzimas da família das NTPDases. As enzimas 5'-Nucleotidases são responsáveis pela hidrólise de AMP em Adenosina. Receptores P2X são ativados por ATP, enquanto que receptores P2Y podem ser ativados por ATP, UTP, ADP e UDP e os receptores P1 são ativados por Adenosina. Modificado de: Robson, 2006; Purinergic Signalling (2006) 2:409–430.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é verificar a estabilidade da enzima LicNTPDase-2 mediante diferentes composições de tampões de renaturação. Tais situações podem garantir uma melhor atividade da enzima mediante diferentes variações de concentrações e compostos químicos, auxiliando para melhoria de estudos para esta enzima.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Verificar a atividade enzimática de LicNTPDase-2 mediante hidrólise dos nucleotídeos ADP, UDP, GDP e ATP;
- Avaliar estabilidade da enzima em tampão de renaturação utilizando testes de atividade enzimática;

- Verificar a melhor atividade enzimática em diferentes pH;
- Estudar a atividade enzimática frente temperaturas de 25°C e 37°C;
- Verificar condições de estabilidade da enzima utilizando a tecnologia de *Thermal-shift*, analisando sua variação de *T<sub>m</sub>* em cada tampão testado.

### **1.3 Material e Métodos**

#### **1.3.1 Indução de expressão de LicNTPDase - 2**

As amostras de *Escherichia coli* BL21 com gene da LicNTPDase-2 foram processadas para realização de indução. Uma alíquota de 20 µL, foi retirada e colocada em 20 mL de meio SOC (2 % de bacto-triptona; 0,5% de extrato de levedura 0,05% de NaCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM de KCl e 20 mM de glicose; pH 7), (SAMBROOK, 2001) com mais 20µL de Ampicilina, num tubo falcon de 50 mL. Este material foi incubado por 16 horas a 180 RPM a 37° C. Foi realizado um outro tubo com 20 mL contendo apenas meio SOC, como controle negativo e deixado nas mesmas condições. Após o período e análise do controle negativo e turvação no tubo com a amostra, este foi adicionado em em 980 mL de meio SOC e incubado a 37°C sob agitação de 180 RPM. A densidade optica (DO) foi medida em placa de 96 poços e ao atingir 0,600 de absorbância foi adicionado 0,25mM de IPTG e prosseguiu por um período de 1 hora a 37° e 180 RPM para processo de indução. Após este período procedeu a centrifugação a 5600 G por 10 minutos, descartando o sobrenadante e armazenando o precipitado a -80°C. Os precipitados foram separados em dez pellets contendo cada um cerca de 100 mL de material.

#### **1.3.2 Pré – purificação**

Para cada pellet obtido na indução foi realizado suspensão e lise do material centrifugado. Para isso foi utilizado o tampão de lise que contém 50 mM Tris; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol e adicionou-se 4 mL deste tampão em cada pellet, adicionando os inibidores de proteases (5µL de Pepstatina A, 100 µL de Leupeptina, 100µL de Aprotinina; 100 µL de lisozima 50 mg/mL por pellet). Após adição do tampão de lise e inibidores de protease realizou-se uma

homogeneização e foram colocados durante 30 minutos no gelo. Após este período realizou uma sonicação por 6 vezes, com amplitude de 20 por 1 minuto (10 segundos ON e 10 segundos OFF). Após este período realizou-se uma centrifugação a 2800 G por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado e identificado como 1º sobrenadante para realização de testes posteriores. O precipitado contém os corpos de inclusão onde procedeu para purificação.

### **1.3.3 Purificação dos corpos de inclusão**

Os corpos de inclusão obtidos foram suspensos em 1 mL de tampão de lavagem. Este tampão é composto por 50 mM Tris em pH 8,0; 500mM NaCl; 10mM  $\beta$ -mercaptoetanol, e 2M de Ureia. Após a suspensão e homogeneização o volume foi completado para 20 mL com tampão de lavagem e realizou a segunda sonicação 6 vezes, com amplitude de 20 por 1 minuto (10 segundos ON e 10 segundos OFF). Realizou-se a centrifugação a 2800 G por 10 min a 4 °C, onde foi coletado o sobrenadante e denominado de 2ª sobrenadante. Os passos para purificação dos corpos de inclusão foram repetidos onde encontrou-se o 3ª sobrenadante. Desta forma espera-se que os corpos de inclusão estejam mais puros no precipitado.

Após o procedimento com o tampão de lavagem o precipitado obtido foi suspenso em 25 mL de tampão de solubilização. Este tampão é composto por 50 mM Tris pH 8,0; 500mM NaCl, 8 M de Ureia e 10mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. Este pellet foi homogeneizado e incubado por 10 minutos a 55 °C. Em seguida procedeu para processo de sonicação por 6 vezes, com amplitude de 20 por 1 minuto (10 segundos ON e 10 segundos OFF). Realizou-se uma centrifugação por 20 min a 4 °C, 2800 G onde o sobrenadante foi transferido para outro falcon. Neste sobrenadantes os corpos de inclusão estão presentes pois foram dissolvidos neste tampão de solubilização. Em seguida filtrou-se em filtro de 0.42  $\mu$ m.

### **1.3.4 Purificação de NTPDase-2 Por Cromatografia de Afinidade resina *HIS-Select Nickel Affinity Gel*.**

Retirou-se 1 mL de coluna e adicionou em tubo de fundo cônico onde foi adicionado 10 mL de tampão de Solubilização (50 mM Tris pH 8,0; 500mM NaCl;

8M de Ureia, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Este tampão é o mesmo em que os corpos de inclusão estão solubilizados, assim realizou-se uma ambientalização da coluna. Em seguida procedeu por uma centrifugação por 5 minutos à 5000 G, a 4° C e o sobrenadante foi descartado. Os corpos de inclusão purificados foram adicionados sobre a coluna onde foram deixados no gelo, sob agitação, 180 RPM, por 60 minutos, e após este período, procedeu por centrifugação por 5 minutos à 5000 G e o sobrenadante (que não contém a proteína, volume não ligado) foi retirado uma alíquota para eletroforese (figura 1.3, canaleta 2) e o restante foi descartado. Neste momento a proteína foi deslocada do tampão de solubilização e foi associada a coluna. A proteína contém uma parte de sua estrutura composta por aminoácidos de histidina, no qual possui afinidade pela coluna utilizada.

Para desligar a proteína da coluna foi adicionado 2 mL de tampão de eluição contendo 50mM de Tris, 100mM de NaCl, 8M de Ureia e 250 mM de Imidazol, sobre o precipitado. Procedeu a uma centrifugação por 5 minutos à 5000 G, a 4 °C, e o sobrenadante foi coletado num microtubo. Neste momento a proteína estará presente neste sobrenadante, pois o imidazol presente no tampão, realizará um deslocamento da proteína da coluna. Este procedimento foi repetido por mais quatro vezes, com o objetivo de extrair toda a proteína contida na coluna. Por fim a coluna foi lavada com 2mL de solução contendo 2M de imidazol, foi centrifugada e descartou-se o sobrenadante. A coluna foi armazenada em tampão contendo 20% de etanol entre 2 a 8°C.

### **1.3.5 Quantificação e verificação da pureza da proteína purificada**

Para quantificação da proteína foi retirada uma alíquota 10  $\mu$ L para realização do teste de Bradford (BRADFORD, 1976). Para este teste foi realizada uma curva padrão com BSA (albumina de soro bovino) na concentração de 1,4mg/mL. Inicialmente utilizou-se 200  $\mu$ L de BSA e colocou-se no primeiro poço e colocou-se 100  $\mu$ L de água nos sete poços seguintes. Seguiu-se para uma realização de uma diluição seriada, no qual retirou-se 100  $\mu$ L de BSA contido no primeiro poço e transferiu para o segundo poço onde continha 100  $\mu$ L de água, homogeneizou-se e transferiu deste poço 100  $\mu$ L para o terceiro. Esta etapa foi

realizada até o penúltimo poço onde descartou-se 100  $\mu$ L, deixando o ultimo poço com 100  $\mu$ L de água. Em seguida retirou-se 30  $\mu$ L de cada poço e transferiu-se para outro poço, seguindo com todos os outros poços da diluição realizada, assim repetiu-se este procedimento por mais duas vezes para verificação dos valores da curva em triplicata.

Para realização de análise do branco utilizou-se 10  $\mu$ L do tampão de eluição (50mM de Tris, 100mM de NaCl, 8M de Ureia e 250 mM de Imidazol) e 30  $\mu$ L de água. Realizando também sua leitura em triplicata. Para a análise da proteína obtida foram aplicados 10  $\mu$ L da amostra purificada com 30  $\mu$ L de água. O teste também foi realizado em triplicata. E por fim foi adicionado 150  $\mu$ L de reagente de Bradford em todos os poços em análise, homogeneizou-se por cerca de 60 segundos e aguardou por 5 minutos para realizar a leitura em 595nm. Após a obtenção dos valores de absorbância realizou-se os testes mediante a equação da reta através de uso de programa de *Microsoft Office Excel*.

Para análise da pureza e tamanho da proteína purificada procedeu ao teste de eletroforese de proteínas utilizando o gel de acrilamida 10% em cuba de eletroforese, com corrida inicial por 20 minutos a 70 V e posteriormente até o final por 120V. Após finalização do teste, colocou-se o gel por 20 minutos sob agitação em solução corante (0,1% p/v de azul de comassie, 9% v/v de ácido acético e 45% v/v de etanol) e em seguida procedeu por processo de descoloração em solução descorante (75% v/v de ácido acético e 25% v/v de etanol).

### **1.3.6 Renaturação da LicNTPDase2**

Como a proteína estava presente em corpos de inclusão foi necessário a realização de sua renaturação para realização dos testes de atividades enzimática. Assim foram preparados sete tampões como descrito a seguir na tabela 1.1. Em cada um deles foi colocado 100 $\mu$ L da proteína purificada em 900 $\mu$ L de cada um dos tampões de renaturação. Cada tampão contendo a proteína purificada foi armazenado de 2 a 8° C por um período de 24 horas e seguido de uma atividade durante 10 dias consecutivos para verificação da estabilidade da enzima frente aos diferentes tampões.

**Tabela 1.1 : Concentração dos tampões de Renaturação.** Concentrações dos tampões de renaturação utilizados com a enzima LicNTPDase-2.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
<b>Tris</b>	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM	100mM
<b>NaCl</b>	600mM	600mM	600mM	600mM	600mM	600mM	600mM
<b>GSSG</b>	-	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	-
<b>GSH</b>	-	-	2mM	2mM	2mM	2mM	-
<b>KCl</b>	-	-	-	10mM	10mM	10mM	-
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	-	-	-	-	2mM	2mM	-
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	-	-	-	-	-	2mM	-
<b>Glicerol</b>	33%	33%	33%	33%	33%	33%	-

Posteriormente foi realizado o mesmo processo de renaturação, porém ocorrendo somente para os tampões 4 e 7, no qual o objetivo era avaliar a atividade enzimática após 24 horas e sob temperaturas de 25°C e de 37° C das atividades enzimáticas. O tampão 4 não apresentou nos primeiros testes alterações significativas comparado com os tampões 5 e 6 e por ter menos componentes foi escolhido para os demais testes, além de ter apresentado um shift maior comparado com os demais tampões e a escolha do tampão 7, foi devido a presença de menos componentes (somente Tris e NaCl) comparado com os demais.

O mesmo processo de renaturação para os tampões 4 e 7 foram realizados para verificação de atividade enzimática sob os nucleotídeos (ADP, ATP, GDP e UDP), todos com verificação após 24 horas. E posteriormente os tampões 4 e 7 foram novamente renaturados para verificação da atividade enzimática frente a diferentes pH (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0). Para este teste com pH os tampões foram ajustados para cada pH do teste, sendo acrescentados os reagentes Hepes e MES todos também com seu pH ajustado.

### 1.3.7 Reação de atividade enzimática

Inicialmente foi realizado uma curva de dosagem de fosfato (*P<sub>i</sub>*). Foi preparado uma curva no qual foi adicionado no primeiro poço, 150µL de Tampão de atividade 1X e 10µL de padrão Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> na concentração de 1,5mg/mL. O

tampão de atividade é composto por Hepes 1M pH 8,0; Tris 1 M pH 8,0; MgCl<sub>2</sub> 2 M; NaCl 4M e KCl 2M. Nos demais poços foram adicionados 80µL de Tampão de atividade 1X. Em seguida retirou-se 80µL do primeiro poço e adicionou sobre os 80µL de tampão 1X contido no segundo poço, homogeneizou e retirou-se 80µL deste segundo poço e transferiu para o terceiro poço, procedendo da mesma forma e realizando uma diluição seriada até o penúltimo poço, onde descartou-se 80 µL e no último poço ficou apenas 80 µL de tampão de atividade. Em seguida foi adicionado 80µL de HCl 0,2M em todos os poços. Por último foi adicionado 40µL reagente colorimétrico em todos os poços e foram incubados a 37° C por 10 minutos. As leituras foram realizadas em 650 nm em leitora de placa *Biotek Sinergy HT*. Os tampões utilizados foram os contidos na tabela 1.1, sendo realizado uma leitura para cada tampão estudado.

Para a realização da reação de atividade enzimática adicionou-se 16µL de tampão de atividade 5X no primeiro poço e em seguida adicionou 8µL de nucleotídeo em teste a 25mM. Foi adicionado 0,5µg de proteína purificada e renaturada. Posteriormente adicionou-se água suficiente para completar o volume para 80 µL. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37° C e a reação foi parada com 80 µL de HCl 0,2M. Adicionou-se cerca de 40 µL de reagente colorimétrico e incubou-se por 10 minutos. As leituras foram realizadas em 650 nm em leitora de placa *Biotek Sinergy HT*. Todos os testes foram realizados em triplicatas foi utilizado o branco para cada tampão estudado.

### 1.3.8 Thermal Shift

Para análise da estabilidade da proteína frente a alterações de temperatura, utilizou-se a técnica de *Thermal Shift* em aparelho de *Real Time PCR System*. Foi utilizado a sonda *Sypro Orange* com ensaio realizado em triplicata com 1 uM de proteína. A curva de *melting* variando de 4°C a 99°C sendo 0,95 °C/min. Utilizou-se o tampão 7 como referência, pois este havia menor variações de reagentes, obtendo o T<sub>m</sub> da proteína no tampão 7 = 40°C. Os demais tampões foram comparados com o tampão 7 e foi analisado o *shift* gerado em cada tampão.

Pipetou-se 19,5µL de cada um dos 7 tampões de renaturação com a proteína num poço de uma placa para análise e em seguida pipetou-se 0,5µL da sonda (Sypro). Homogeneizou e levou ao aparelho *Real Time PCR System* para análise. Os testes foram realizados em triplicatas. Após a obtenção dos resultados, os dados foram analisados no software *Protein Thermal Shift software* 1.3.

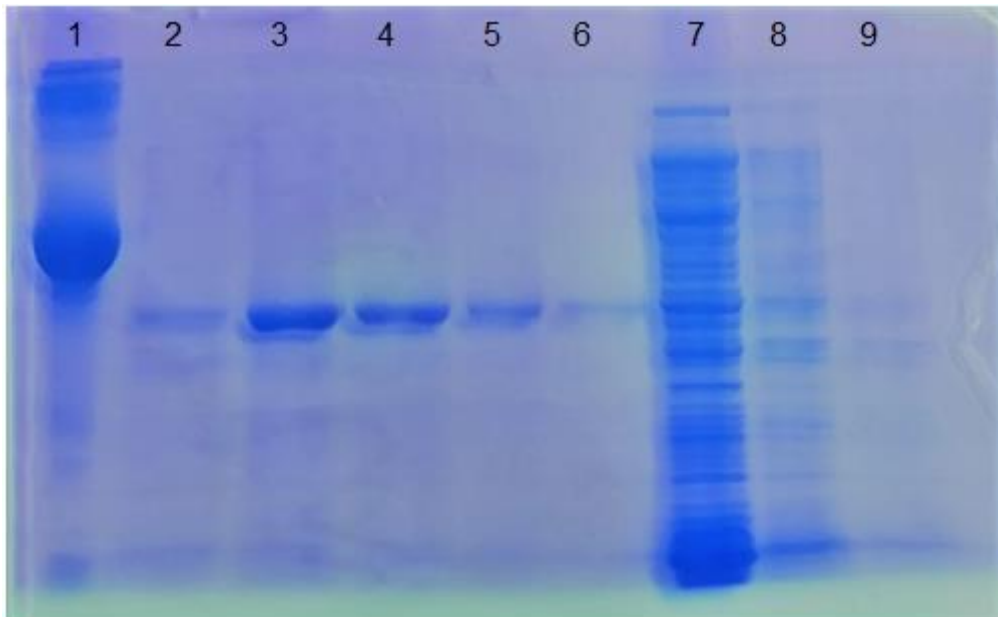
### **1.3.9 Análises estatísticas.**

Após realização dos resultados dos testes de atividades enzimáticas em triplicatas, foi realizada uma análise estatística dos dados gerados. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 6 para geração dos resultados utilizando o teste ANOVA, com  $p < 0,05$ , além de geração dos gráficos, médias e desvio padrão de cada grupo testado.

## **1.4 Resultados e Discussão**

### **1.4.1 Purificação e Renaturação de LicNTPDase-2**

Após a indução, pré-purificação e purificação dos corpos de inclusão, conforme descrito na metodologia, a enzima LicNTPDase-2 foi purificada através de técnica manual com coluna de *His - Select Nickel Affinity Gel*. Foram utilizados 8 pellets de 100 mL e o rendimento foi de 0,85 mg/800mL de proteína total, numa purificação na coluna. A dosagem de proteína foi obtida através da realização da técnica de *Bradford*. Após este procedimento realizou-se uma eletroforese em gel de acrilamida a 10% para verificação da purificação da proteína obtida, como pode ser visualizado na figura 1.3. Assim pode-se observar que apresentou apenas uma banda visível nas canaletas destinadas a amostra (canaleta 3, 4, 5 e 6), correspondendo a proteína LicNTPDase-2. Desta forma purificação da proteína demonstrou um bom resultado, embora possa existir outras proteínas nesta canaleta, porém em concentrações mínimas e não visíveis.



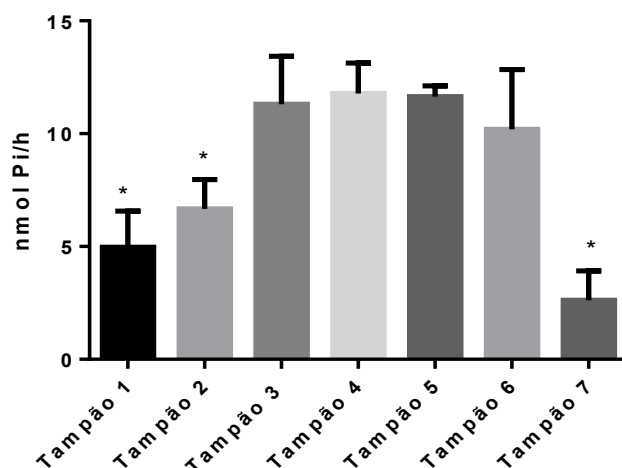
**Figura 1.3: Gel de eletroforese de poliacrilamida 10%.** Canaleta 1 BSA 1,4mg/mL, canaleta 2, Volume não ligado, canaleta 3, 4, 5 e 6, LicNTPDase-2 e canaleta 7 primeiro sobrenadante na pré purificação, seguido do segundo sobrenadante na canaleta 8 e terceiro sobrenadante na canaleta 9.

Na purificação da enzima LicNTPDase-2 ocorre a formação de corpos de inclusão no qual a proteína está agregada, e a concentração de ureia na purificação é muito alta. Assim, é importante que ocorra o processo de renaturação desta enzima para poder realizar testes com sua atividade. Dependendo dos componentes de um tampão podemos ter um processo de melhoria da atividade enzimática ou poderá reduzir sua estabilidade, dependendo do componente químico presente e das concentrações. Desta forma é importante saber qual o seu melhor tampão de renaturação e quanto tempo sua atividade será mantida nestes tampões. Após a purificação foi realizado um teste de atividade enzimática no qual utilizou-se 100  $\mu$ L da proteína purificada em 900  $\mu$ L de tampão de renaturação (tabela 1.1, descrito na metodologia). Assim foram testados 7 tampões de renaturação nos quais a proteína renaturada foi mantida de 2 a 8 $^{\circ}$  C durante um período de 24 horas. A concentração da proteína utilizada foi de 0,2mg/mL, no qual foi realizado uma diluição de 10X em cada tampão gerando uma concentração final de 0,02mg/mL em cada tampão testado.

#### **1.4.2 Atividade enzimática de LicNTPDase-2 em diferentes tampões de renaturação.**

Após a renaturação, de LicNTPDase-2 nos sete tampões, foi realizado os testes em triplicatas da atividade ADPásica e suas médias obtidas foram utilizadas para gerar o gráfico contido na figura 1.4.

**Atividade enzimática de LicNTPDase-2 com 7 tampões de Renaturação após 24 horas**



**Figura 1.4 : Atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com 7 tampões de Renaturação após 24 horas.**

Sete tampões com composições diferentes foram testados para verificação da melhor atividade enzimática a 37°C de LicNTPDase-2. Não há variações estatisticamente significativa entre os tampões 3, 4, 5 e 6. Ocorre varrições significativamente entre os tampões 1, 2 e 7 quando comparado com os demais (3, 4, 5 e 6).

Pode-se notar que não houve variações estatisticamente significativas entre os tampões 3, 4, 5 e 6 não podendo relatar neste grupo qual deles apresentou melhor atividade enzimática. Quando comparado este grupo (tampões 3, 4, 5 e 6) com os tampões 1, 2 e 7 pode-se notar que houve variações estatisticamente significativas entre eles e não houve variações entre os tampões 1, 2 e 7. O tampão 4 apresentou 11,78 nmol Pi/h/mg enquanto que o tampão 5 apresentou um pouco menos de atividade, com 11,64 nmol Pi/h/mg, seguido pelo tampão 3 com 11,31 nmol Pi/h/mg e tampão 6 com 10,19nmol Pi/h/mg. O tampão 4 possui Tris 100mM; NaCl 600 mM; 1mM de Glutaciona oxidada (GSSG); 2 mM de Glutaciona reduzida (GSH), 10mM de KCl e 33% de glicerol. A glutaciona é um composto derivado dos aminoácidos Cisteína, glicina e Glutamato. A Glutaciona na forma oxidada (GSSG), é o produto de duas moléculas de glutaciona unidas por uma ponte dissulfeto, produzida no curso de suas atividades redox. A glutaciona provavelmente ajuda a manter os grupos

sulfidrilas das proteínas no estado reduzido melhorando sua estabilidade (NELSON, 2014).

O tampão 7 apresentou baixa atividade enzimática, sendo que este apenas possui Tris 100 mM e NaCl 600 mM. Quando comparado com o tampão 7 pode-se notar que adição de apenas glicerol 33% no tampão 1 já promove um aumento da média da atividade enzimática, seguindo de 2,62 nmol Pi/h/mg no tampão sete para 4,96 nmol Pi/h/mg no tampão 1, que continha glicerol 33% como componente adicional. O glicerol favorece o estado nativo de uma proteína em solução aquosa e conseqüentemente melhora a atividade enzimática *in vitro* (GEKKO e TIMASHEF, 1981). A adição de GSSG no tampão 2 também já promove uma melhoria da atividade enzimática apresentando 6,67 nmol Pi/h/mg.

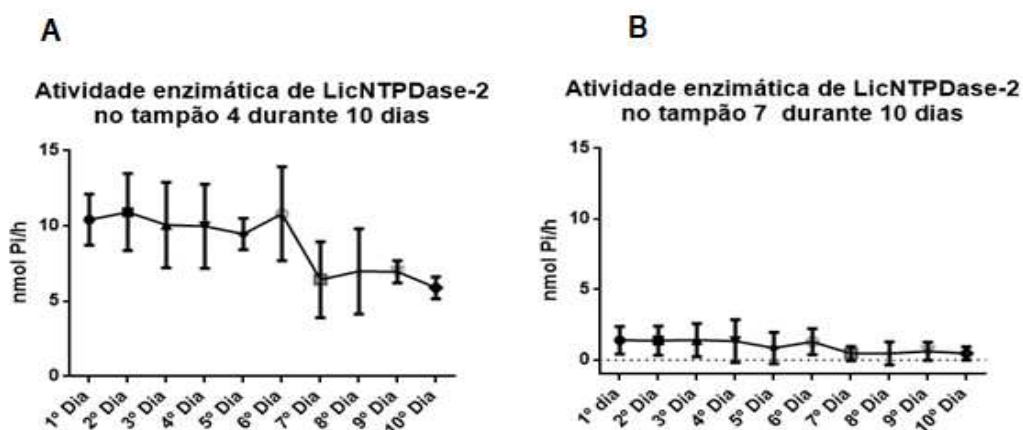
Como já visto a adição de GSSG, GSH e Glicerol 33% promovem aumento das médias de atividades ADPásicas após 24 horas da LicNTPDase-2 nos tampões de renaturação testados, assim como a adição de 10mM KCl no tampão 4. Adição de 2mM de MgCl<sub>2</sub> no tampão 5 não promoveu ganho da atividade enzimática. Estatisticamente não ocorreram alterações significativas entre os tampões 3,4,5 e 6, e como o tampão 4 apresentou um pequeno valor de aumento de atividade, outros testes foram realizados com este tampão, uma vez que ele não tem a presença de MgCl<sub>2</sub> promovendo uma redução de custos nos testes. A adição de 2 mM de CaCl<sub>2</sub> não promove ganho de atividade comparado com os tampões 3, 4, e 5, não sendo assim, economicamente viável seu uso para testes posteriores.

A LicNTPDase-2 é uma enzima que atua na presença de cátion divalente, podendo ser cálcio ou magnésio (ZIMMERMANN, 2001) e através das análises pode-se observar que tanto a presença de MgCl<sub>2</sub> quanto a presença de CaCl<sub>2</sub> não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois tampões que continham estes componentes.

Após os primeiros testes, foi realizada uma nova renaturação dos tampões 4 e 7 para realização de outros testes de atividade enzimática. A escolha destes tampões foi baseada em menor quantidade de componentes presentes nos tampões, uma vez que entre os tampões 3, 4, 5 e 6 não ocorreram alterações significativas e o tampão 4 foi aquele que apresentou o maior *shift*

testado. A escolha do tampão 7 se deve ao fato de ter apenas Tris e NaCl. A renaturação ocorreu da mesma forma descrita para os testes iniciais com os sete tampões. Desta vez a atividade enzimática foi realizada novamente após 24 horas, sendo continuada até um período de 10 dias. Os testes foram realizados em triplicatas, sendo que, em cada momento foi realizada uma nova renaturação.

Os valores da média das triplicatas foram utilizados para gerar os dados contidos na figura 1.5. Estes resultados confirmam os dados de 24 horas apresentados na figura 1.4 para os tampões 4 e 7, onde o tampão 4 apresenta melhor atividade quando comparado com o tampão 7, sendo notado uma queda de atividade ao decorrer dos dias não estatisticamente considerável até o 8 dia ( $p > 0,05$ ). Na atividade ADPásica para o tampão sete, pode-se observar que apresentou baixa atividade e sua análise em dias seriados não apresenta alterações estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Durante o período destes testes os tampões foram mantidos a temperatura de 2 a 8 °C e as análises foram realizados a cada 24 horas.



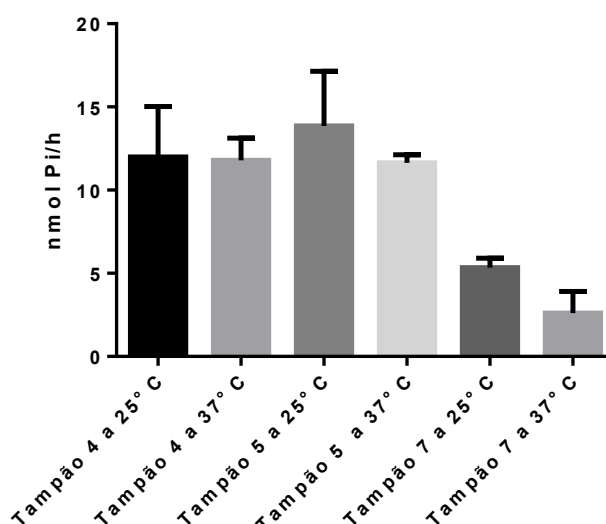
**Figura 1.5 : Comparação da atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com os tampões 4 e 7 a 37°C durante 10 dias consecutivos.** A) O tampão 4 apresenta melhor atividade quando comparado com o tampão 7, sendo notado uma queda de atividade ao decorrer dos dias não estatisticamente considerável até o 8 dia ( $p > 0,05$ ). B) Apresenta baixa atividade enzimática do tampão 7 e sua análise em dias seriados não apresenta alterações estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

### 1.4.3 Atividade enzimática de LicNTPDase-2 em temperaturas de 25°C e 37°C

A leishmania geralmente encontra no percurso de seu ciclo infeccioso, alterações de ambiente que favorece o desenvolvimento de estresse pois as

promastigotas nos flebotomíneos pode encontrar temperaturas entre 22°C a 28°C, enquanto que nas células dos mamíferos encontram temperaturas em torno de 37°C (CLOS e KROBITSCH, 1999). Assim, com o objetivo de avaliar as diferenças de atividades enzimáticas em temperatura de 25°C e 37°C, os tampões 4, 5 e 7 foram submetidos a novas atividades enzimáticas com incubação nas temperaturas desejadas utilizando o ADP como nucleotídeo. O resultado (Figura 1.6) não apresentou variações estatisticamente significativas entre os tampões 4, 5 e 7 para as temperaturas de 25 °C e 37°C, com  $p < 0,05$ . Desta forma tanto os tampões 4 e 5 são úteis para determinação de atividade enzimática a 25°C e a 37°C e o tampão 7 não apresentou boa atividade como já visto em testes anteriores.

**Comparação da atividade enzimática de LicNTPDase-2 com os tampões 4, 5 e 7 nas temperaturas de 25°C e 37°C**

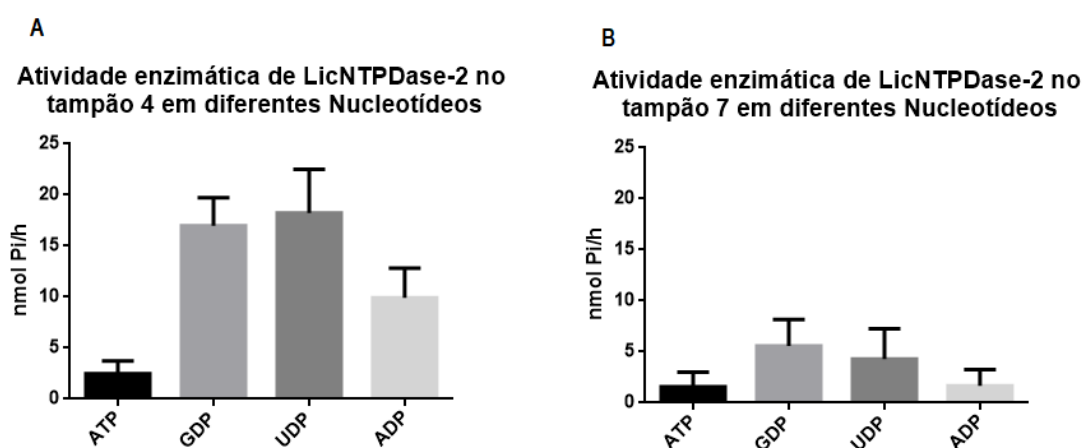


**Figura 1.6 : Comparação da atividade ADPásica de LicNTPDase-2 com os tampões 4, 5 e 7 nas temperaturas de 25°C e 37°C. Não apresentou variações estatisticamente significativas entre os tampões 4, 5 e 7 para as temperaturas de 25 °C e 37°C.**

#### **1.4.4 Análise de LicNTPDase-2 utilizando diferentes nucleotídeos e pHs**

Além do ADP utilizado em todos os testes até esse momento, foi testada a atividade enzimática de LicNTPDase-2 frente a ATP, GDP e UDP. Pode-se

verificar na figura 1.7, o resultado dos tampões 4 e 7 nos diferentes nucleotídeos. Para o tampão 4, (figura 1.7 A) observa-se uma melhor hidrólise de LicNTPDase-2 para os nucleotídeos GDP, UDP e ADP com  $p < 0,05$  quando comparados com a hidrólise de LicNTPDase-2 com o ATP e não havendo variações estatisticamente significativas entre os nucleotídeos GDP, UDP e ADP. Para o tampão 7, todas as atividades foram inferiores quando comparadas com o tampão 4 e não houve variações estatisticamente significativas entre o GDP, UDP, ADP e ATP.



**Figura 1.7 : Comparação da atividade enzimática de LicNTPDase-2 com os tampões 4 e 7 a 37°C, avaliando sua atividade frente a nucleotídeos.** Os testes foram realizados após 24 horas. A) Para o tampão 4 apresentou melhor hidrólise enzimática para os nucleotídeos UDP, seguido de GDP e ADP,  $p < 0,05$  quando comparado com o ATP menor hidrólise. B) No tampão 7 a atividade enzimática não foi estatisticamente significativa entre os substratos.

Para análise de atividade em diferentes pHs, utilizando os tampões 4 e 7 pode-se notar que não ocorreu variações estatisticamente significativas nas atividades testadas com ADP em diferentes pHs (Figura 1.8 A). Da mesma forma não foi possível estabelecer a relação entre a melhor atividade enzimática para o tampão 7 nos pHs testados (Figura 1.8 B). Como este tenha sido o último teste realizado acredita-se que a enzima possa ter perdido um pouco de atividade, através de processos de descongelamento para renaturações, uma vez que as atividades ficaram em valores menores em todos os pHs, quando comparado com os testes nos primeiros tampões renaturados.

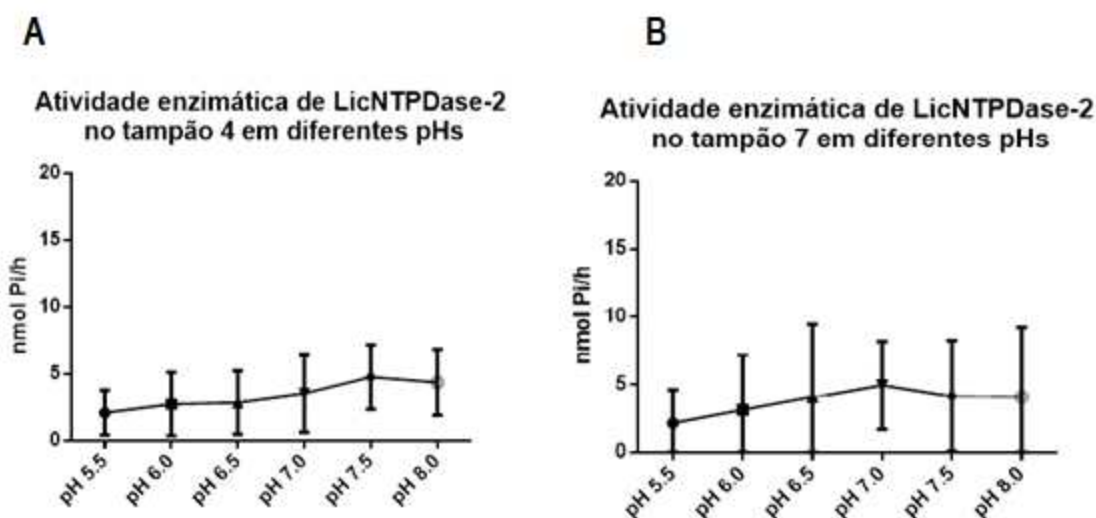


Figura 1.8 : Comparação da atividade ADPDásica de LicNTPDase-2 com os tampões 4 e 7 a 37°C, avaliando sua atividade em diferentes pHs. Os testes foram realizados após 24 horas. A) Resultado do tampão 4 frente diferentes pHs. B) Resultado do tampão 7 frente a diferentes pHs.

#### 1.4.5 Análise de LicNTPDase-2 utilizando *Thermal Shift*

Foram realizados novamente os testes de renaturação no qual foram utilizados 100  $\mu$ L da proteína a 0,2 mg/mL em 900  $\mu$ L de tampão de renaturação. Após 24 horas sob refrigeração a 8 °C foi realizado um ensaio em triplicata com 1  $\mu$ M de proteína. O aparelho utilizado foi o *Real Time PCR System* na técnica de *Thermal shift*. Os resultados foram analisados utilizando o programa *Protein Thermal shift software 1.3*. A Curva de *melting* variou de 4°C a 99°C com valor de 0,95 °C /min. Foi utilizada a sonda *Sypro Orange* e dentre os tampões foi utilizado o tampão 7 como referência pois este possui 100mM de Tris e 600 mM de NaCl, ou seja dentre todos os tampões é aquele que possui menor variedade de componentes químicos. O  $T_m$  da proteína no tampão 7 foi de 40°C.

A desnaturação térmica expõe resíduos hidrofóbicos no qual a sonda se liga e promove a formação de um sinal fluorescente. Define-se temperatura de *melting* ( $T_m$ ), ou temperatura de pareamento, como a temperatura na qual metade das moléculas estão pareadas e a outra metade não. A partir de uma emissão de um sinal de fluorescência em ambiente hidrofóbico é possível verificar quando uma proteína está expondo partes não polares a partir de análises com *Thermal Shift*. A amostra sofre aquecimento e verifica-se o

aparecimento de sinal que aumentará até a desnaturação completa da proteína (GRØFTEHAUGE, 2015).

Na tabela 1.2 pode-se observar o resultado do *Shift* de cada tampão testado em *Thermal Shift*. Como pode ser verificado o tampão 4 apresentou um *shift* de 5,9 sendo o maior *shift* quando comparado com os outros tampões. O tampão 6 por ter apresentado um *shift* negativo não foi apresentado valores.

Tabela 1.2 : Resultado do *Shift* de cada tampão testado em *Thermal Shift*.

	Shift
Tampão 1	0,41
Tampão 2	1,5
Tampão 3	4,5
Tampão 4	5,9
Tampão 5	5
Tampão 6	-

Na figura 1.9 apresenta a comparação entre os tampões 1 e 7. Pode se notar que o *shift* foi muito pequeno, sendo representado pela linha tracejada verde. Desta forma somente a adição de glicerol no tampão 1 não apresentou ganho significativo de estabilidade proteica.

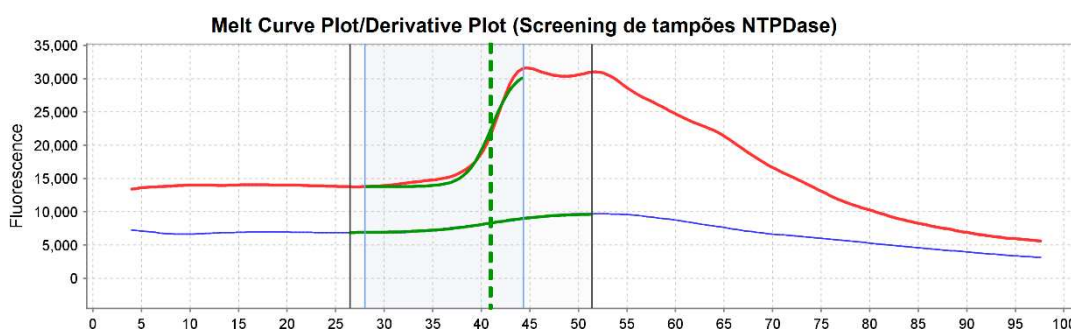
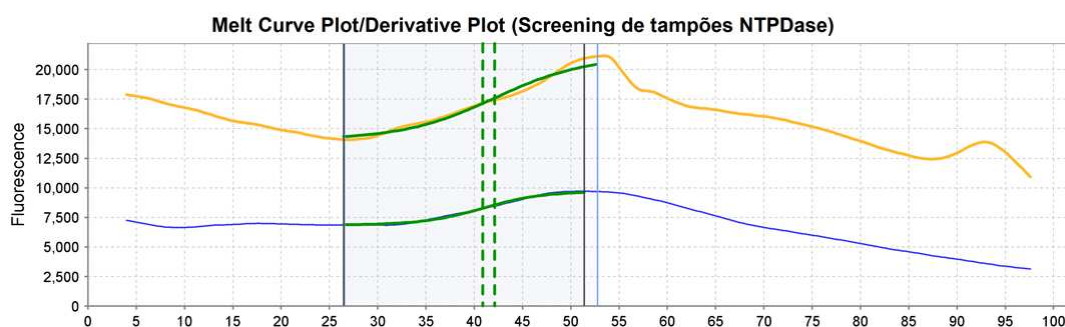


Figura 1.9 : Comparação entre o tampão 1 e 7. Em azul o tampão 7 e em vermelho o tampão 1, *shift* de 0,41 °C.

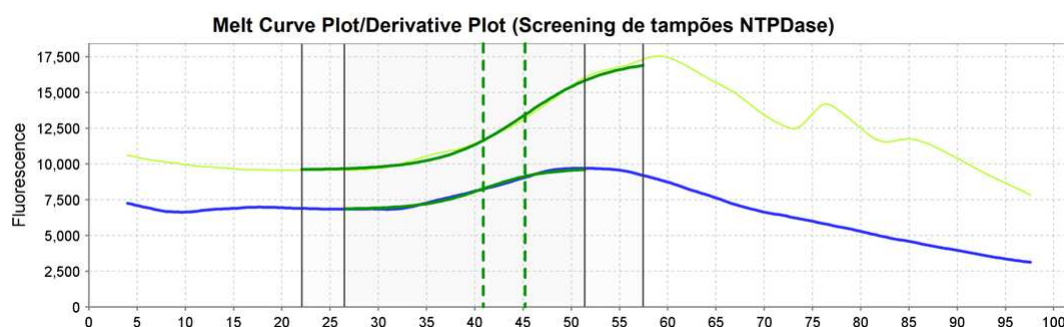
Na figura 1.10 há comparação entre os tampões 2 e 7, no qual pode-se observar que um *shift* de 1,25 °C, sendo representado pela diferença entre as linhas tracejadas verticalmente na curva de *melt*. O tampão 2 apresenta 1mM de

GSSG, além dos componentes já presente no tampão 1 (100mM de Tris, 600mM de NaCl e 33% de glicerol).



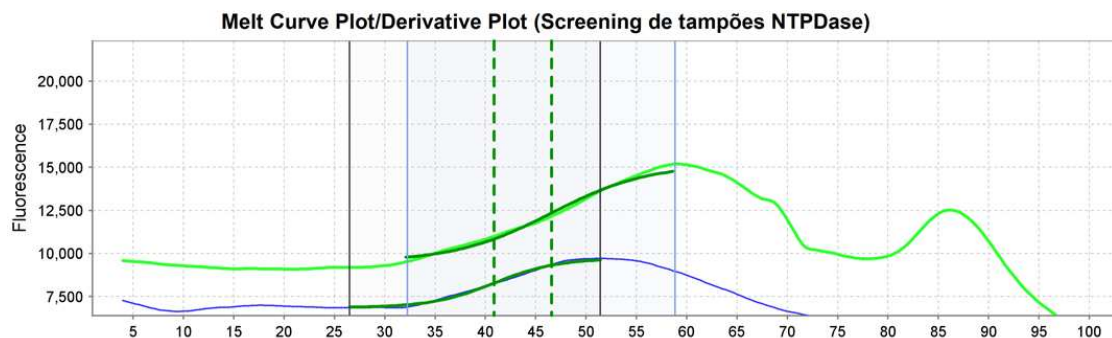
**Figura 1.10 : Comparação entre o tampão 2 e 7.** Em azul o tampão 7 e em amarelo o tampão 2. Shift de 1,5 °C.

Na figura 1.11, pode-se notar que existe uma melhora do valor de *shift* quando comparado com o tampão anterior (tampão 2). Assim a adição de 2 mM de GSH promove uma melhora da estabilidade da enzima.



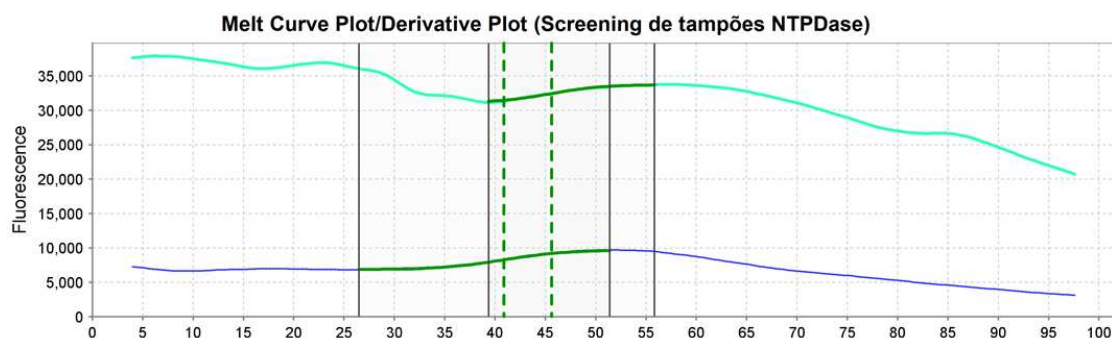
**Figura 1.11 : Comparação entre o tampão 3 e 7.** Em azul o tampão 7 e em Verde claro o tampão 3. Shift de 4,5 °C.

Pode-se notar que as adições de glutathione (reduzida e oxidada), juntamente com KCl (Tampão 4), promoveram uma melhora da estabilidade de LicNTPDase-2. Sendo o tampão 4, aquele que apresentou um melhor resultado de *shift*, quando comparado com os outros tampões de renaturação. Como pode se observar na figura 1.12.



**Figura 1.12 : Comparação entre o tampão 4 e 7.** Em azul o tampão 7 e em Verde o tampão 4. Shift de 5,9 °C.

Na figura 1.13, a adição de  $MgCl_2$  também ajuda na estabilização da proteína renaturada quando comparada com os tampões 1,2,3 e 7, porém apresenta um valor de *shift* inferior ao tampão 4 que não contem  $MgCl_2$ . Porém os resultados em relação aos KCl e  $MgCl_2$  não apresentaram reprodutibilidade nas triplicatas.



**Figura 1.13 : Comparação entre o tampão 5 e 7.** Em azul o tampão 7 e em Verde o tampão 5. Shift de 5 °C.

O tampão 6 que contém o  $CaCl_2$  não favoreceu o ganho de estabilidade provocando um *shift* negativo na  $T_m$ . Assim quando comparado com as atividades enzimáticas é possível observar que os componentes do tampão 4 (100mM de Tris, 600mM de NaCl, 1mM de GSSG, 2 mM de GSH e 10 mM de KCl) favorecem uma melhora de estabilidade da enzima LicNTPDase-2 nos tampões de renaturação, podendo ser comprovado com os testes em *Thermal Shift*, no qual também apresentou uma redução de estabilidade com a adição de  $CaCl_2$ , o que também é confirmado com a redução de atividade enzimática de NTPDase-2, no tampão 6 (figura 1.4).

Os diferentes tipos de tampões podem afetar a estabilidade de uma proteína, desta forma, realizar análises de um melhor tampão poderá promover melhores condições de trabalhos com esta macromolécula. Com a técnica de *Thermal shift* é possível prever tais situações levando a resultados que auxiliam em melhores condições de armazenamento e melhorar as taxas de sucesso de purificação, cristalização e renaturação de proteínas.

## 1.5 Conclusões

A LicNTPDase-2 é uma enzima caracterizada em *Leishmania infantum chagasi* e atua em hidrólise de nucleotídeos difosfatos e trifosfatos. Após a sua purificação foi possível identificar tampões no qual pode-se verificar uma melhoria de sua atividade enzimática. Os tampões de renaturação 3, 4, 5 e 6 apresentaram um melhor resultado promovendo um ganho de atividade enzimática quando comparado com outros tampões (1, 2 e 7). As análises em *Thermal Shift*, o tampão 4 demonstrou ser aquele em que a proteína manteve melhor estabilidade após período de 24 horas a 8°C. A atividade enzimática demonstrou diminuição após período de 24 horas, sendo o momento com maior atividade e levando a redução posteriormente nos dias seguintes. Não ocorreu diferença significativa nos testes realizados a 25°C e a 37°C, assim como nos resultados com faixa de pH para o tampão 4 e 7. Para as análises de nucleotídeos o UDP, GDP e ADP apresentaram melhora na atividade quando comparados com o ATP. De forma geral as análises permitem a identificação de tampão de atividade com boa atividade enzimática e sobretudo permite novos estudos *in vitro* com NTPDase-2 que podem utilizar esta metodologia nas condições estabelecidas.

## 1.6 Referências

Asai, T., W. J. O'Sullivan, e M. Tatibana. A potent nucleoside triphosphate hydrolase from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. Purification, some properties, and activation by thiol compounds. *J. Biol. Chem.* 258:6816–6822. 1983.

Asai, T.; D. K. Howe; K. Nakajima; T. Nozaki; T. Takeuchi; and L. D. Sibley. *Neospora caninum*: tachyzoites express a potent type-I nucleoside triphosphate hydrolase. *Exp. Parasitol.* 90:277–285. 1998.

BASTOS, M. S. et al. The expression of NTPDase1 and -2 of *Leishmania infantum chagasi* in bacterial and mammalian cells: Comparative expression, refolding and nucleotidase characterization. *Protein Expression and Purification*, v. 131, p. 60–69, 2017.

Berredo-Pinho M, Peres-Sampaio CE, Chrispim PP, Belmont-Firpo R, Lemos AP, Martiny A, Vannier-Santos MA, MeyerFernandes JR. A Mg-dependent ecto-ATPase in *Leishmania amazonensis* and its possible role in adenosine acquisition and virulence. *Arch Biochem Biophys* 391:16–24. 2001.

Burnstock, Geoffrey. Purinergic signaling: from discovery to current developments. *Exp Physiol.*; 99(1): 16–34. 2014.

Burnstock, G.; C. Kennedy. Is there a basis for distinguishing two types of purinoceptor? *Gen Pharmacol.*; 16:433–440. [PubMed: 2996968]. 1985.

Burnstock, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach*. pp. 107 – 118, *Raven Press*, New York. 1978.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72. 248-254. 1976.

Clos, J; S. Krobitsch. Heat shock as a regular feature of the life cycle of *Leishmania* parasites. *American Zoologist.*; 39:848–856. 1999.

Fietto, J. L. R.; R. De Marco; I. P. Nascimento; Ieso de Miranda Castro; Técia Maria Ulisses de Carvalho; Wanderley de Souza; Maria Terezinha Bahia; Maria Júlia Manso Alves; Almeida, Sérgio Verjovski. Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. ;316(2):454–460. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.071. 2004.

Fredholm, B.B.; Ljzerman, A. P.; Jacobson K. A.; Linden J. Adenosine receptors. In, *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and classification*., pp.78-87. 2000.

Gekko, Kunihiro; Timasheff, Serge N. Mechanism of Protein Stabilization by Glycerol: Preferential Hydration in Glycerol-Water Mixtures. *Biochemistry*. VOL. 20, NO. 16, 1981.

Grøftehaug, M. K.; Hajizadeh, N. R.; Swann, M. J., Pohl, E. Protein-ligand interactions investigated by thermal shift assays (TSA) and dual polarization interferometry (DPI). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*.71(Pt 1):36-44. 2015.

Kaczmarek, E.; K. Koziak; J. Se´vigny; J. B. Siegel; Anrather J.; Beaudoin A. R.; Bach F. H.; Robson S. C. Identification and characterization of CD39 vascular ATP diphosphohydrolase. *J Biol Chem* 271:33116–33122. 1996.

Kishore, B. K.; J. Isaac; M. Fausther; Sheryl R. Tripp; H. Shi; P. S. Gill; N. Braun; H. Zimmermann; J. Se´Vigny e S. C. Robson. Expression of NTPDase1 and NTPDase2 in murine kidney: Relevance to regulation of P2 receptor signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 288:F1032–F1043. 2005.

Kegel, B.; N. Braun; P. Heine; P. Maliszewski; C. R, Zimmermann. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacology* 36:1189–1200. 1997.

Langston, H. P.; Ke, Y.; Gewirtz, A. T.; Dombrowski, E.; Kapp, J. A.; Kapp, J. A. Secretion of IL-2 and IFN-  $\gamma$  , But Not IL-4, by Antigen-Specific T Cells Requires Extracellular ATP. *The Journal of Immunology*, v.170, p.2962-2970, 2003.

MAIOLI, T. U.; TAKANE, E.; ARANTES, R. M. E.; FIETTO, J. L. R.; AFONSO, L. C. C. Immune response induced by New World Leishmania species in C57BL/6 mice. *Parasitology Research*, v. 94, p.207–212, 2004.

Mariotini-Moura, Christiane; Matheus Bastos; Felipe De Castro; Mellina Lanna Trindade; Raphael Vasconcellos; Myrian Augusta Araújo Neves-do-Valle; Bernardo Moreira; Ramon de Freitas Santos; Claudia Miranda de Oliveira; Luana Cunha; Xênia Souto; Gustavo Bressan; Abelardo Silva; Munira Baqui; Maria Bahia; Márcia Rogéria de Almeida; José Meyer-Fernandes; Juliana Fietto. Trypanosoma cruzi Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 1 (TcNTPDase-1) biochemical characterization, immunolocalization and possible role in host cell adhesion. *Acta tropica*. 130. 10.1016/j.actatropica.2013.11.008. 2013.

Marques-da-Silva, Eduardo de Almeida; Oliveira, Jamile Carmargos de; Figueiredo, Amanda Braga; Júnio, Djalma de Souza Lima; Carneiro, Cláudia Martins; Fietto, Juliana Lopes Rangel; Afonso, Luis Carlos Crocco. Extracellular nucleotide metabolism in Leishmania: influence of adenosine in the establishment of infection. *Microbes and Infection*. Pages 850-857. Volume 10, Issue 8, July 2008.

Nelson, David L.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Pimentel, F. G.; M. S. Bastos, R. F. Santos; C. Mariotini-Moura; G. C. Bressan; A. Silva-Junior; M. R. Almeida; J.L.R. Fietto. The leishmania-macrophage interactions: role of E-NTPDases and purinergic signaling. *Macrophage* 3: 1143–55. 2016.

Robson, S. C.; J. Sévigny; H. Zimmermann. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal*. 2(2):409-30. 2006.

Robson, S. C; S. Daoud; Begin M. Côté YP; Siegel J. B; Bach FH, Beaudoin AR. Modulation of vascular ATP diphosphohydrolase by fatty acids. *Blood Coagulation Fibrinolysis* 8:21–27. 1997.

Sansom, F.M.; Ralton J. E, Sernee MF, Cohen AM, Hooker DJ, Hartland EL, Naderer T, McConville MJ. Golgi-located NTPDase1 of *Leishmania major* is required for lipophosphoglycan elongation and normal lesion development whereas secreted NTPDase2 is dispensable for virulence. *PLoS Negl Trop*. 2014.

Sambrook, J.; D. W. Russell. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

Vasconcellos, R., C. Mariotini-Moura, R. S. Gomes, T. D. Serafim, R. Firmino, M. Silva E Bastos, F. F. Castro, C. M. Oliveira, L. Borges-Pereira, A. C. de Souza, R. F. de Souza, G. A. Gómez, A. Pinheiro, T. E. Maciel, A. Silva-Júnior, G. C. Bressan, M. R. Almeida, M. M. Baqui, L. C. Afonso, J. L. Fietto. *Leishmania infantum* ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is an apyrase involved in macrophage infection and expressed in infected dogs. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(11), e3309. doi:10.1371/journal.pntd.0003309. 2014

Zimmermann, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 52:44–56. 2001.

# CAPÍTULO 2

**Clonagem de Serine/Arginine Protein Kinase (SRPK) de *Leishmania infantum chagasi***

## 2.1 Introdução

As enzimas exercem papéis fundamentais em diferentes células para manter um processo organizacional. O estudo destas enzimas proporciona melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nas atividades celulares auxiliando o entendimento de alguns atividades e patologias. As enzimas são alvos farmacológicos e seus estudos poderá explicar algumas relações entre os diferentes metabolismos celulares com objetivo de elucidar vias de infecção ou novas formas de tratamento. Uma enzima, com importante atividade celular, tem sido caracterizada com uma região espaçadora entre dois sítios catalíticos e são conhecidas como SRPK (*serine/arginine protein kinase*) e pode ser bons alvos de estudos para inibição enzimática por drogas (ENDICOTT, NOBLE & JOHNSON, 2012).

As SRPKs podem ser divididas em SRPK1, SRPK2 e SRPK 3, sendo que elas podem ser diferenciadas com relação a sua estrutura e suas funções além da localização em diferentes células. Estas proteínas são caracterizadas por duas regiões quinases separadas por uma região espaçadora, onde relaciona diretamente com sua atividade enzimática. Outra característica importante deste grupo está relacionada com sua capacidade de realizar fosforilações em proteínas ricas em serinas e argininas importantes para o desenvolvimento do *splicing* (WANG *et. al.*, 1998 e NAKAGAWA O, 2005).

Jang *et. al.*, 2009, encontrou relação entre atividades fosforilativas em SRPK2, promovendo sua transferência para o núcleo e desencadeando morte neuronal por apoptose. Desta forma as SRPKs estão envolvidas em muitos processos patológicos como leucemias, crescimento de endotélio vascular e morte neuronal. Revisão da literatura realizada por Jones *et. al.*, 2018, demonstra que dentre vários alvos celulares para pesquisa e atuação de drogas está relacionado o estudo de vias de fosforilações de proteínas, podendo assim, as SRPKs se tornarem bons alvos de estudos. As SRPKs estão presentes também em parasitas como evidenciado em algumas pesquisas relatando a presença de SRPK em *Plasmodium falciparum* e *Trypanossoma cruzi* (PORTAL, LOBO, *et. al.*, 2003; DIXIT *et. al.*, 2010).

Além da função de fosforilações de proteínas, as SRPKs também possuem importantes atividade regulatórias nas células, como por exemplo, as fosforilações em fatores relacionados ao *splicing*. Este é caracterizado quando partes dos genes presentes numa célula são retiradas (*introns*) e não vão codificar uma proteína, enquanto que a parte codificante é conhecida como *éxon* (SHARP, 2005). Na formação do *splicing* há duas formas: *Cis* e *trans*. Quando ocorre numa mesma molécula de RNA, é conhecido como *cis-splicing* e quando ocorre em mRNAs diferentes é conhecido como *trans-splicing*. Para realização do *splicing* é necessário um conjunto proteico chamado de *spliceosoma*. As proteínas ricas em serina/arginina (proteínas SR) e ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas (hnRNPs) são duas das famílias de proteínas envolvidas que se juntam no complexo A para participar da montagem do *exon* cruzado, regulando a ligação U1 e U2 snRNP ao pre-spliceossoma (WAHL *et. al.* 2015). As SRPKs atuam realizando fosforilações nas proteínas SR, sendo estas fosforilações pré-requisito para montagem do *spliceosom* (XIAO, 1997).

Em tripanosomatídeos poderá ocorrer tanto *cis splicing* quanto *trans splicing*. Seus genes codificadores de proteínas são transcritos em RNAs policistrônicos, diferentemente da maioria dos eucariontes e posteriormente foi encontrado um único gene carregando um *intron* em *cis* sugerindo que esses dois processos de *splicing* estão presentes em tripanossomos (MAIR, 2000)

Através de fosforilações das proteínas SR de *P. Falciparum* poderá ocasionar inibição do *splicing* (DIXIT *et. al.*, 2010). Assim como as SRPKs podem ter sítios de ligação a proteínas e DNA e podem sofrer fosforilações, seu estudo poderá auxiliar nas descobertas de vias fundamentais para replicação em leishmania contribuindo para descoberta de sítios alvos para drogas.

## **2.2 Objetivos**

### **2.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar através de análises de bioinformática a presença da SRPK e clonar em sistema de expressão de procarionto a *Serine/Arginine Protein Kinase* putativa (SRPK) de *Leishmania infantum chagasi*

## 2.2.2 Objetivos Específicos

- Pesquisar a SRPK no genoma de *Leishmania infantum chagasi* (LicSRPK)
- Alinhar a LicSRPK com SRPK's de outros organismos.
- Clonar no vetor de entrada pGEM T-easy a LicSRPK
- Clonar no vetor de expressão pET28α a LicSRPK.

## 2.3 Material e Métodos

### 2.3.1 Análises de Bioinformática

Primeiramente foi realizada uma busca em bancos de dados nos sites *NCBI* e *TriTrypDB* (banco de dados de genoma de cinetoplastídeos), onde foi possível identificar uma possível *Serine/Arginine Protein Kinase* em *Leishmania infantum chagasi*. Foi realizada uma busca por sequencias homólogas a *Serine/Arginine Protein Kinase* de humano (hSRPK1 – *accession number* U09564) no banco de dados *TriTrypDB* onde encontrou-se uma hSRPK1 com maior semelhança onde o transcrito continha 2247 nucleotídeos (748 resíduos de aminoácidos), com 46% de identidade.

### 2.3.2 Clonagem da *Serine/Arginine Protein Kinase* de *L. Infantum chagasi* (LicSRPK)

Primeiramente foi obtido o RNA total a partir de culturas de *Leishmania infantum chagasi* em meio Grace's e posteriormente foi sintetizado o cDNA, obtendo assim o possível gene para a SRPK de *Leishmania infantum chagasi*, o qual foi amplificado em PCR contendo os sítios de restrição das enzimas de *XhoI* e *NdeI* (Tabela 2.1)

**Tabela 2.1** – Primers utilizados na clonagem de LicSRPK

Primer direto	Nde I LicSRPK: 5' CATATGGGGAAATCAAAGAAGCAC 3'
Primer reverso	Xho I LicSRPK: 5' CTCGAGCTACTCAGCACCATC 3'

Após a obtenção do cDNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para confirmação do tamanho. Após confirmação seguiu para uma purificação do cDNA.

Após a obtenção do gene realizou-se uma reação de ligação no vetor de pGEM-T-easy, seguindo para a transformação em *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Após a transformação realizou-se uma *miniprep* com o objetivo de obtenção do DNA plasmidial. Após a obtenção do plasmídeo seguiu-se a digestão para ter certeza se o gene estava presente no vetor plasmidial. Na realização da digestão foram utilizadas as enzimas Xho I FD e Nde EI Fd. Após confirmação em eletroforese, o gene foi purificado e subclonado em vetor de expressão pET28a, e seguido de transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Após confirmação da transformação em *E. coli* DH5  $\alpha$ , foi realizado nova miniprep para obtenção do plasmídeo, pGEM-T-easy (PROMEGA) contendo o inserto, juntamente com o pET28a (NOVAGEN) e seguiu para uma digestão com as enzimas de restrição *Nde* I e *Xho* I.

Os produtos das digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose e purificados com GenElute™ Gel Extraction Kit (SIGMA). O inserto digerido e o pET28a linearizado foram ligados utilizando-se a enzima DNA ligase. Após a reação de ligação, bactérias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes foram transformadas.

## 2.4 Resultados e Discussão

### 2.4.1 Análises “*in silico*”

Foi realizado um alinhamento da sequência de LicSRPK-2, comparando com SRPKs de outros organismos. Foram utilizadas a SRPK -1 e SRPK-2 de humano (HsSRPK/SRSF - NP\_003128.3 e hSRPK2- AAH68547.1), SRPK de *Trypanosoma cruzi* (TcSRPK - AAM50042.1), SRPK de *Plasmodium falciparum* (PfSRPK1- KNG78685.1), *Drosophila busckii* (DbSRPK - ALC41381.1), *Toxoplasma gondii* (TgSRPK - EPT31812.1) e fungo *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST - Q03656.1). Desta forma é possível observar homologia entre suas sequências de aminoácidos, observando regiões conservadas de domínio *kinase*, separadas por uma região espaçadora, característico das *Serina/argininina proteína quinase (SRPK)*, como pode ser observado na figura 2.1, onde estão representados a sequência completa de todos os resíduos de aminoácidos entre as sequências comparadas. Para esta análise foi utilizado os sites NCBI e *Clustal Omega*. A maior sequência de aminoácidos comparados com a sequência de LicSRPK pertence a TgSRPK com 1763 resíduos e apresenta 38,96% de identidade com LicSRPK, e a menor sequência foi de HsSRPK/SRSF com 655 resíduos de aminoácidos e 51,9% de identidade com LicSRPK. A LicSRPK tem previsto cerca de 748 resíduos de aminoácidos, sendo um pouco maior do que a de TcSRPK (716 resíduos de aminoácidos) e possuem 57,3% de identidade, sendo a maior entre as comparações. Entre as SRPKs analisadas e quando se observa as sequências a região espaçadora pode-se observar que há maior semelhança com TcSRPK com 47,60% de identidade (Tabela 2.3). Quando se compara os domínios quinases, pode-se observar que também há maior semelhança com a TcSRPK com 79,3% de identidade na sequência de resíduos de aminoácidos no primeiro domínio e 76,33% de identidade no segundo domínio quinase (Tabela 2.4). Dentre as sequências comparadas nota-se que a maior semelhança em todas as regiões proteicas pertence a LicSRPK e TcSRPK.

Tabela 2.2 Comparação entre as sequências de aminoácidos e o percentual de identidade entre as SRPKs de *Toxoplasma gondii*, *Homo sapiens*, *Trypanossoma cruzi* com a suposta SRPK de *Leishmania infantum chagasi*.

	<b>Sequencia</b>	<b>Identidade</b>
<b>TgSRPK</b>	1763	38,96%
<b>HsSRPK/SRF</b>	655	51,90%
<b>TcSRPK</b>	716	57,30%
<b>LicSRPK</b>	748	

Tabela 2.3 Comparação entre as sequências de aminoácidos e o percentual de identidade da região espaçadora característica das SRPKs entre *Trypanossoma cruzi* com a suposta SRPK de *Leishmania infantum chagasi*.

	<b>Região Espaçadora</b>	<b>Identidade</b>
<b>TcSRPK</b>	86	47,60%
<b>LicSRPK</b>	76	

Tabela 2.4 Comparação entre as sequências de aminoácidos e o percentual de identidade dos dois domínios quinases entre a SRPK de *Trypanossoma cruzi* com a suposta SRPK de *Leishmania infantum chagasi*.

	<b>1º Domínio quinase</b>	<b>Identidade</b>	<b>2º Domínio quinase</b>	<b>Identidade</b>
<b>TcSRPK</b>	150	79,30%	234	76,33%
<b>LicSRPK</b>	150		169	

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

TcSRPK	-----	0
LicSRPK	-----	0
PfSRPK	-----	0
TgSRPK	MVLQRNRRRQRKKKAPGGGGAPAGVVAAVATAGRDESASEESGGGVSSGEEGPRAEVSQ	60
YEAST	-----	0
DbSRPK	-----	0
HsSRPK2	-----	0
HsSRPK/SRSF	-----	0
TcSRPK	-----MPKFNK--KTGGWCAKNGKKSAPTCKKTK-----YIDPC	32
LicSRPK	-----MGKSKKHGKPVKGASKKSKHDKSKRKAK-----FIDPT	34
PfSRPK	-----	0
TgSRPK	VRGGIHDDEPSPFFSPISTAVHPPVGGCQPRGMELLGKPRSSLGTRQIRQMQRSSDDSC	120
YEAST	-----MGSSI---	5
DbSRPK	-----MNSKA---	5
HsSRPK2	-----	0
HsSRPK/SRSF	-----	0
TcSRPK	GTNEVDASI--N-----TATEEVESH-----EEPLGQPHF	60
LicSRPK	SSVSRDVRETVA-----ALVQEI-ER-----EEPVAEEKL	63
PfSRPK	-----	0
TgSRPK	EK--RDYRSSGAEIESDGAG--ERGPEDHGGTECSVTESEQYSNSGQDEEEDYMSRHR	176
YEAST	----NYPGFV----T-KSAHLADTSTD--ASISCEEATSSQEAKKNFFQRDYNMMKKAP	53
DbSRPK	----DVNRRVLAIQAKKKRHKNNKKRGKQNGAAAAANVPENQQ-QQQQHRSDNCAS--P	57
HsSRPK2	-----	0
HsSRPK/SRSF	-----	0
TcSRPK	SKIKRKKNDKLQLQ-----EIGRLTLK-----PGMTVAQA-----HEKANKV	97
LicSRPK	QLKKGKK-CQEIA-----EKEGILVK-----TGMTKEQA-----HTIANRL	99
PfSRPK	-----	0
TgSRPK	SDAED--VDS-----YSSEGEDGEEYDDVGSNRPLDLSGDDEGEEYEDEEGDSLDDL	228
YEAST	APTKS--KLSLALQTSKSSSANGTVQEDT--SSKTEDFSTKSI-----KKKPD	98
DbSRPK	VPAAT--PASPAATENAILSLLEGKLLNADEAAI LATSFGMVTA-----TASTS	104
HsSRPK2	-----M-----SVNSEKSSS-----SER-P	14
HsSRPK/SRSF	-----MERSKVL-----ALQARKKRT-----KAKKD	20
TcSRPK	YQQKPLQN-----IPDPSFEEEEEGYE-----EGEEDHGGSDDEDY	132
LicSRPK	KQQQSTTH-----RSDGEG--DVGSDG-----GGDGGGGTEEDY	132
PfSRPK	-----MSFSNTCSLS-----NNSNSSSSSEDATSGKLQY	29
TgSRPK	SPQGASPVAPSKGSSCGSGGASGETGESGTEGGSSAAQDDTGEAEDDAKGNMESDMYF	288
YEAST	SGVESHVSIQ-----S----DS--GPQS-DSDLSDSSISSC	128
DbSRPK	SGSSNTPVVSMPPP-----KQKS--NSYNQQPPRSSNESDESEMNS	145
HsSRPK2	EPQQKAPLVPPPPPP-----P-----PPPPPLPDPTTPEPEEEILGS	52
HsSRPK/SRSF	KAQRK-----SET-----Q-----HRGSAPHSESDLPEQEEELGS	51
TcSRPK	SDTANERSVEYRKGGYHPVWVGEVY-HDRYRVVRKLGWGYFSTVWLVWDYVTK--RYQAL	189
LicSRPK	SDTANEPSREYRKGGYHHVIGEVY-NDRYRVVKKLGWGYFSTVWLVWDYQKE--RYQAM	189
PfSRPK	TESDDEGSDEYCEGGYHPVKINEIY-NDRYRIEGLGWGHFSTVWVATDLKSKPLKFAI	88
TgSRPK	TESDDEDAKEYRKGGYHPVKVGEIY-RRRYRIEAKLGWGHFSTVWLATDLQSSPLEYVAI	347
YEAST	DERNEESLKDYRPGGYHPAFKGEPIKDARYILVRKLGWGHFSTVWLAKDMVNN--THVAM	186
DbSRPK	ENEEQELKEDYCKGGYHPVNIIGDLF-QGRYHVIRKLGWGHFSTVWLCWDLQET--RYVAI	202
HsSRPK2	DDEEQEDPADYCKGGYHPVKIGDLF-NGRYHVIRKLGWGHFSTVWLCWDMQGK--RFVAM	109
HsSRPK/SRSF	DDDEQEDPNDYCKGGYHLVKIGDLF-NGRYHVIRKLGWGHFSTVWLSWDIQGK--KFVAM	108
	: :* : * **** . . : : . ** : *****:*****: * . : *	

TcSRPK	KVQKSAKHYTEAAYDEIKLLGEIMSSDPDK-----	219
LicSRPK	KIQKSAASYEAAYDEIKLLSEIMEADPHK-----	219
PfSRPK	KIQKGSETYTESAKCEINYLNVTVKVNSFDSSWVELKEQQRE----RLFH-----	133
TgSRPK	KFQKSAKHYTEAAVDEVHLLTAVKEGKVNATWREASKGYSEIVKERLVEGNAVDTNNSRL	407
YEAST	KIVRGDKVYTEAAEDEIKLLQRVNDADNTK-----	216
DbSRPK	KIVKSAQHFAETAKEIKILRTVRETDPNS-----	232
HsSRPK2	KVVKSAQHYTETALDEIKLLKCVRESDRSD-----	139
HsSRPK/SRSF	KVVKSAEHYTETALDEIRLLKSVRNSDPND-----	138
	*. :. :*: * *. * :	
TcSRPK	-----TCCARMNDYFEHTGPNGVHVMVFDVYGEDLLSLIDRYEYRGVPLPI	267
LicSRPK	-----NRCCARLNDYFKHTGPNGTHVCMFLDVYGENLLSLMERYEYRGIPLPI	267
PfSRPK	-----YNMTKGVSFIDSEHKGPNGTHICMVFEMGPNLLSLIKHYDYKGIPLNL	184
TgSRPK	PPPLSPNSSLAPPVVVFEKFAHTGPNGRHMCLVFEVLGPNLLSLIKRFNFRGLPML	467
YEAST	-----EDSMGANHILKLLDHFNHKGPNGVHVVMVFEVLGENLLALIKKYEHRGIPLIY	269
DbSRPK	-----P---RRQKTVQMLDDFKITGVNGTHICMVFELGDNLLKLIKRSNYRGIPLDN	282
HsSRPK2	-----P---NKDMVQLIDDFKISGMNGIHVMVFEVLGHLLKWIISNYQGLPVRC	189
HsSRPK/SRSF	-----P---NREMVQLIDDFKISGVNGTHICMVFELGHLLKWIISNYQGLPLPC	188
	: : * . * * * : : * : . * . * * : : : * : * :	
TcSRPK	VKCI SRQVLVGLEHLS-LDIIHTDLKPENVLLSSPKHAIISLMKRY-----	313
LicSRPK	VKCIARQVLIGLDHINS-IDIIHTDLKPENVLLSTPKHSIISLMKHF-----	313
PfSRPK	VRKIATHVLIGMQLHDVCKIIHSDIKPENLVSPLTITPKPKDYTKDKLESNKSNQVEK	244
TgSRPK	VRRVATDVLYGLSYLHDVCDIHTDLKPENVCVSAYPLPSPLPPAG-----AGA---	516
YEAST	VKQISKQLLLGLDYMHRRCGIIHTDIKPENVLEIGDVEGIVQMV-----ALDKQKREA---	324
DbSRPK	VKITRQVLEGLDYLHGNCIIHTDIKPENVLLCVDEPHVRSLAVE--ATQLYCMNS---	337
HsSRPK2	VKSIIIRQVLQGLDYLHCKCKIIHTDIKPENILMCVDDAYVRRMAE--ATEWQKAGA---	244
HsSRPK/SRSF	VKKIIQQVLQGLDYLHTKRIIHTDIKPENILLSVNEQYIRRLAAE--ATEWQRSGA---	243
	*: : .:* *: : : : * * * : * : * * * : :	
TcSRPK	--HPPPLHQ-----RLRLVERD-----	328
LicSRPK	--HPPPLHQ-----RPKLTERD-----	328
PfSRPK	KENDQNVDKKLITMNNNINTNLSEKVKVINDTQKNDKNIYDQKCTSSKENIEDNVSVFV	304
TgSRPK	-----VPAV-----STAGPLTAEDKKR-----	533
YEAST	---KRL-QRHV-----SRSSDITANDSSDEKWAECQTSMPGCS-----	358
DbSRPK	---KM-YPSLV-----SRAP-----KEYREQPITGK-----	359
HsSRPK2	---PPPSGSAV-----STA-----PQKPIGK-----	263
HsSRPK/SRSF	---PPPSGSAV-----STA-----PQKPADK-----	262
TcSRPK	-----PKTM-----TKSQRRRYK----KLKAEQN--	350
LicSRPK	-----PKTM-----TKSQRRRYK----KLAKEERK--	350
PfSRPK	NDPSDPNQNNLNININITDNNIIPSNVQIEKQSTLSKNKKNEKDSYININNSLTNDQNLK	364
TgSRPK	---ERRKRKKQ-----NRKQRKKA--LAAALAAAEKE--	560
YEAST	---SSNSKRSI-----EKDLSKRCFR-RP-RRHTI-----	384
DbSRPK	---MSKNKKKL-----KKKAKRMEL-FKKQRDYLEQT--	389
HsSRPK2	---ISKNNKKKL-----KKKQKRQAEI-LEKRLQEIEEL--	293
HsSRPK/SRSF	---MSKNKKKL-----KKKQKRQAEI-LEKRMQEIEEM--	292
	. . : . :	
TcSRPK	-----GKKN-----E-----N---ISEKDNQCATAK----	368
LicSRPK	-----TLLG-----E-----D---DGDHKS-----	363
PfSRPK	REDIKFNDKAEGITKYDMLNIKNNISIEKEKINDCH-SPNEN--KNKDNHNQCEDNSINIC	421
TgSRPK	-----EDGEKG-----DNA-----GSVAEGDEDEAEGAENDTGLPHGR----	594
YEAST	-----I---TG-----SQPLSPPISS-N---FFEMR----	404
DbSRPK	-----IEGETG-----K-----PPVNGEAAGS-N---DEELK----	412
HsSRPK2	-----E-REAE-----RKIIIEENITSA--APSNDQDGE--Y---CPEVK----	324
HsSRPK/SRSF	-----E-KESG-----PGQKRPNKQEESESPVERPLK---E---NPPNK----	324



TcSRPK	PEVILGEPYSTPIDLWSAACLIFELITGEFLFDPKGENYSRDEDHLALMTELLGDLVPS	489
LicSRPK	PEVILGEPYSTPIDIWSACMIFELITGQFLFDPKKGDDYSRDEDHLALMSELLGDLVES	480
PfSRPK	PEVILKSGFNETADIWSFACMVFELVTGDFLFNPKGDRYDKNEEHLFSFIEVLGNIPKH	775
TgSRPK	PEVIRAGYDCSADIWSFACMLFELITGDYLFDPKSSSAFDRDEDHLALIEELGMPFTD	936
YEAST	PEVLLGAPWGCADIWSTACLIFELITGDYLFEPDEGHSYTKDDDHIAQIIIEELGELPSY	632
DbSRPK	LEVILGAGYDTSADIWSTACMVFELATGDYLFEPHSGEYTRDEDHIAHIEELGPIPRH	705
HsSRPK2	IEVLIGAGYSTPADIWSTACMAFELATGDYLFEPHSGEDYSRDEDHIAHIEELGSIPIRH	612
HsSRPK/SRSF	LEVLIIGSYNTPADIWSTACMAFELATGDYLFEPHSGEEYTRDEDHIALIEELLGKVPK	579
	***: : . *:* ** : ** **:* ** : . : : : : : : : *:* *	
TcSRPK	MRLGEGKYRSQFYNSR-GALRNIKDLNFWSLDDVLYRKHKFRKKAEEIADFLPLMEFD	548
LicSRPK	MRLGDGKYRSYYNSK-GDLRNIKDLQYWVLEDVLRHQRHKFKKKAKEIADFLPLMEYA	539
PfSRPK	MID-AGYNSHKYFNKNYRLKNIRNIKKYGLYKILKYKYNLPEKEISPLCSFLLPLMSVD	834
TgSRPK	FVS-RGRLSGRFFRGNTSQLRRIQQLRFWPLDAVLRKYHLPAIEAESLSDFLPLMLAID	995
YEAST	LLR-NGKYTRTFNSR-GLLRNISKLFWPLEDVLTEKYKFSKDEAKEISDFLSPMLQLD	690
DbSRPK	IVF-RGTYAQQTFRNR-GELRNITGLKPWGLMDVLMKEYWAERDAEQFAEFLKPLDFD	763
HsSRPK2	FAL-SGKYSREFFNRR-GELRHITKLPWGLFDVLMKEYGWPHEDAAQFTDFLLPMLM	670
HsSRPK/SRSF	LIV-AGKYSKEFFTKK-GDLKHITKLPWGLFEVLMKEYEWSQEEAAGFTDFLLPMLLEI	637
	: * : . *:* : . : * : * : : . : .** **	
TcSRPK	PQKRATATEMLANFEHFFEI-KEDDYSPFC--FVSSDADREMVEASTSNEEDSETSGDSN	605
LicSRPK	PDTRATPAAMLRDHDAFFDI-QDDDYAPLC--FVDEDSGDEEGSASDEEEETDSDS	595
PfSRPK	PQTRPSAYTMLQHPWLNMVSLIEEGDDMYINDESYSINNDRNMKNNNSNNFIYDGHNSK	894
TgSRPK	PRHRQSAQMLQHPWLRMRTMQDEIVYA-----QMRRNMHVSHPAIDGILQHAPGEE	1047
YEAST	PRKRADAGGLVNHPWLKDTLGMEIRVP-----D--RELYGSGSDIPGWFEVRODHK	740
DbSRPK	PATRATAAECLQHPWLR-----	780
HsSRPK2	PEKRASAGECLRHPWLNS-----	688
HsSRPK/SRSF	PEKRATAAECLRHPWLNS-----	655
	* * : .	
TcSRPK	DADDESENTSLGRGK---TRCGNKEMD----S-----	630
LicSRPK	QSYSSAPSEL TAKRSRQPDNDADRSD-----T-----	623
PfSRPK	-NKNSSNKKKIDVNYKIGNNGNAYNDNYNKNYKNNKNNNFNDVVEPSDQYMHANY	953
TgSRPK	-QQEAAPRP-----RPRGTASASHNTLSAS-----LISSGTVEASQ--ALAAAQ	1088
YEAST	-RH-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----AQFLGTFPFLPG-----SSLEKRG-----LSLLD	654
LicSRPK	-----FRYWEEHPILNR-----TYLEERG-----LTIAD	647
PfSRPK	NNDIVHAVLYEKPYNSNN---VISYT--NNKGHKNNFDINYLQHRNDNNSNKQNISLTT	1007
TgSRPK	QQLAGHHFSYDSL FASGVSPGDATSSADGNLSGTGTATTA--STR--SCGGITVPVVS	1143
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	IHDL----LAGKELEDPAAHKSALE--VIHLLSEEAADRGE----GHAD--RDG-----	697
LicSRPK	IQSV----LAGNFLDDAAAHEAAAE--VIRLLSEETDRLSNDHGS DGHEADNEDG-----	696
PfSRPK	NDYTFNSDYIANMMHDHTYRKQIIK-----NIP-AHQI-----SKLKDGKNFKA	1050
TgSRPK	-GSSFLTGAAPVGSHPAYAASALEAAVAGLVSSAP-SSSGTSASLGAAASLVSGAGSAR	1201
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655

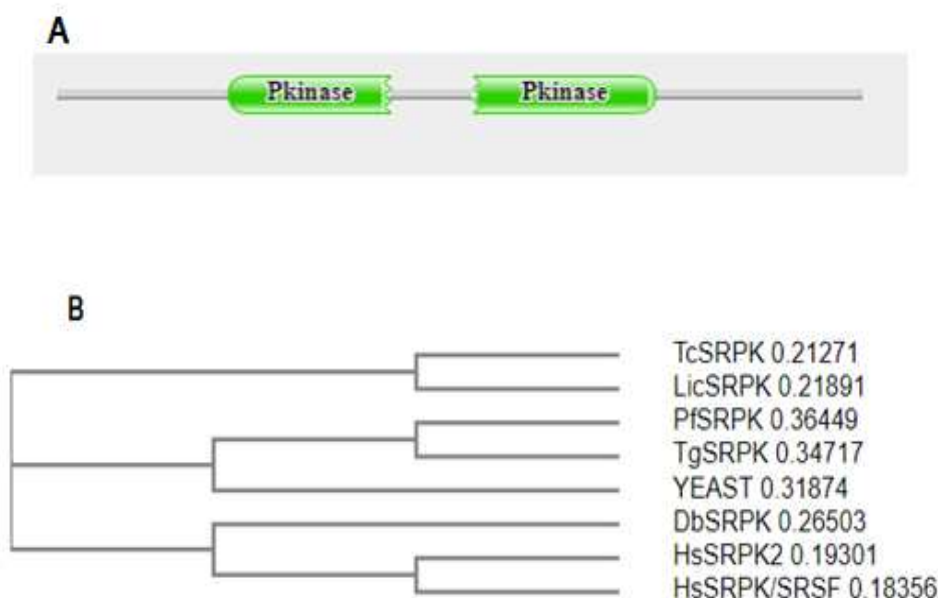
TcSRPK	-----DATS RVEELNNS	709
LicSRPK	-----GDGDNDDEEETT	708
PfSRPK	YNESIQYEMHDFQQYNEHDFEYKFNKRFEHAHHIKEMKHNDDEYEEDEDEDDDED---	1107
TgSRPK	LPPH----LSPTVALSPHGTAHQP-SPVSPCS---SL-ASHSAYPPSGESQARAQPPAVG	1252
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	IGDA-----GSD-----	716
LicSRPK	QGSE-----GPEKVVVGK-----AAPCDDGVDE---DEETTDEE---EEGS	743
PfSRPK	-----YE-----SDVDYDDDDDEYDEGQEHADADQDEKKNDN-EKQQEQQ	1144
TgSRPK	QSSAAGGRAAGAPETAATGSGAGVGATSFMGNSPLSGSAFHLASQDGPSTHREGKPGAGS	1312
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	SDGAE-----	748
PfSRPK	NYGEKYNIEHYENNMGYNKNIQQLSYTNNDNENFCETQNIYILQNKRDINFK----EC	1200
TgSRPK	LFGQQLPP-----QDLQQLLLLLPAEK-----QALLQEHSTVSGAATSRGV	1353
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	TPRNNINKEIKSDKYQSSKVINQ-----KDN-----WNYKIKENTKLREHA	1242
TgSRPK	ETPAAIRGTLSLDAFDQAFLAGRVHPTPTTSSPPRTSYPEARNAQVRLPVSARPSMTEHA	1413
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	KKQHYSNNN-----NINKNDNTNI-----MNQIDTKDQISKNLHDLSTNNMDQKHGA	1290
TgSRPK	SAGDISALASARGPTNRRKPDEEQFGSPCSRTASMQRREQLRQQLDGLITSSVLG-----	1468
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	LQKMHMNEKTNQDKPLNDEEILINRDDQNVNKINCKVINK-----KTSCAY	1337
TgSRPK	-----AERHSLNADEF-----AALRQQHCTPLPLGAAGNACGNNSGILGSCAT	1511
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655

TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	T-----	1338
TgSRPK	DVDFPSDVDFDFTQAGFPLTRDMAGSDPRGAVHMLLGGTDSRGQHGGRRNTLPSGTASGTFP	1571
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	-----	1338
TgSRPK	WQIQNQQLASAE LLAALKQEQRAVSNCFPYAGMGSGPTPGAQVKSGAGGDVKQHIPPYGP	1631
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	-----	1338
TgSRPK	CKAQQLAQAGGSGVDFASFQHHQVAGGGRDNTFSEATRKADERGQATPTNSCQQWRPDC	1691
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	-----	1338
TgSRPK	SGISFHPYQARHQQLDQLVQQDGVQRQMQHQLHEKDQREKLKQQLLRQQEDLTRLGKAQ	1751
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655
TcSRPK	-----	716
LicSRPK	-----	748
PfSRPK	-----	1338
TgSRPK	QQFQQQQQLQQQ	1763
YEAST	-----	742
DbSRPK	-----	780
HsSRPK2	-----	688
HsSRPK/SRSF	-----	655

**Figura 2.1 – Alinhamento entre SRPK.** Comparação entre as SRPKs. SRPK de *Trypanosoma cruzi* (TcSRPK); SRPK de *Leishmania infantum chagasi* (LicSRPK); SRPK de *Plasmodium falciparum* (PfSRPK); SRPK de *Toxoplasma gondii* (TgSRPK); SRPK de *Saccharomyces cerevisiae* (YEAST); SRPK de *Drosophila busckii* (DbSRPK); SRPK2 de humano (HsSRPK2) e SRPK1 de humanos (HsSRPK/SRSF).

Em análise no Pfam (<https://pfam.xfam.org/search/sequence>) pode-se observar que existe uma sequência de aminoácidos com região quinase sendo separada com uma região espaçadora entre elas, como pode ser observado na figura 2.2 A, sendo característicos de grupos proteicos quinases para a LicSRPK.

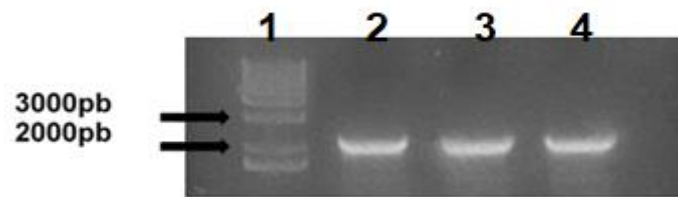
Na figura 2.2 B está representado a árvore filogenética das SRPKs utilizadas em alinhamento. Pode-se notar a presença de semelhanças entre as TcSRPKs e LicSRPKs.



**Figura 2.2: Análise da proteína LicSRPK.** A) Presença de dois locais com possível atividade quinase separados por uma região espaçadora, característicos das Serina/ arginina proteína quinase – SRPKs. B) Árvore filogenética onde fica representado a similaridade entre LicSRPK e TcSRPK.

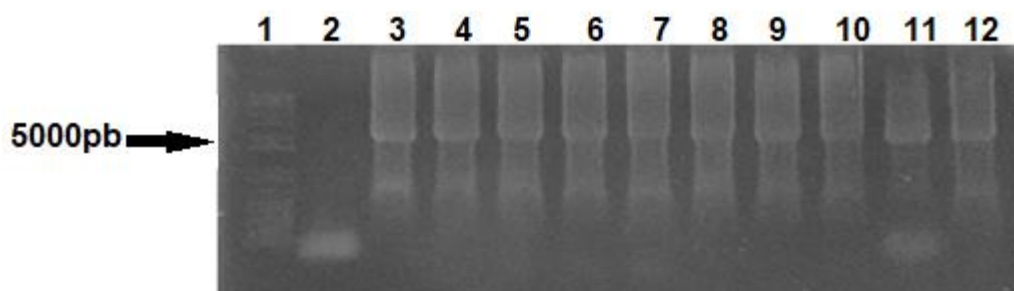
#### 2.4.2 Clonagem de LicSRPK

Inicialmente para os testes o RNA total foi obtido através de células de *Leishmania infantum chagasi* cultivadas em meio Grace's, onde este foi usado para obtenção do cDNA. Foi obtido sequência para LicSRPK no qual foi amplificada através da técnica de PCR e pode ser observado na figura 2.3, onde apresentou marcação entre 2000 e 3000pb através de técnica de eletroforese em gel de agarose 1%. A sequência buscada apresentava 748 resíduos de aminoácidos que representa 2224pb. Desta forma a marcação no gel de eletroforese ficou dentro dos valores previstos. Pela presença do resultado esperado no gel e por ser um resultado que teve origem a partir de *Leishmania infantum chagasi*, fica evidenciado a presença do gene no parasita.



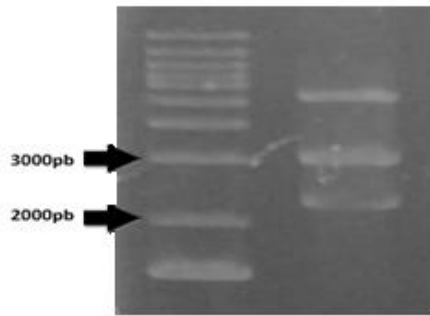
**Figura 2.3: Resultado de PCR em gel de agarose 1%** LicSRPK apresentou bandas entre 2000pb e 3000pb, onde esperava-se que fosse obtido 2244pb previstos, confirmando que o resultado está dentro do esperado. Canaleta 1 marcador, canaletas 2,3 e 4 amostras resultado da PCR.

O produto do gene de cDNA foi ligado em vetor pGEM-T *easy* e transformado em *Escherichia coli* DH5  $\alpha$ . Após multiplicação desta células em crescimento bacteriano a 37°C, os plasmídeos foram obtidos através de técnica de *miniprep* e confirmado a presença do gene de SRPK com aparecimento de pares de bases 5000pb, levando a evidencia da presença do gene, como pode ser observado na figura 2.4.



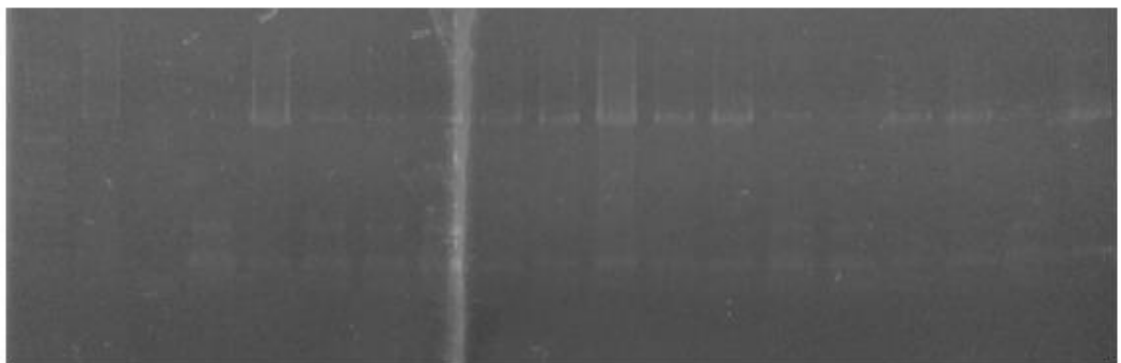
**Figura 2.4 . Resultado positivo para a presença do gene de SRPK no vetor pGEM-T *easy*.** Resultado de PCR contendo o gene de SRPK no plasmídeo com bandas 5000pb após transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Canaleta 1: marcador e canaletas de 2 a 12: clones obtidos no vetor de clonagem.

Depois, foi realizado uma reação de digestão do vetor com as enzimas *XhoI* e *NdeI* onde buscava-se encontrar valores de pares de bases relacionados a presença do gene de SRPK no vetor. A digestão foi realizada e evidenciado a presença do gene como verificado na figura 2.5. Onde foi encontrado a marcação entre 2000pb e 3000pb para o gene em questão e pode-se observar também a presença de uma marcação em torno de 3000pb correspondendo ao pGEM -T *easy*.



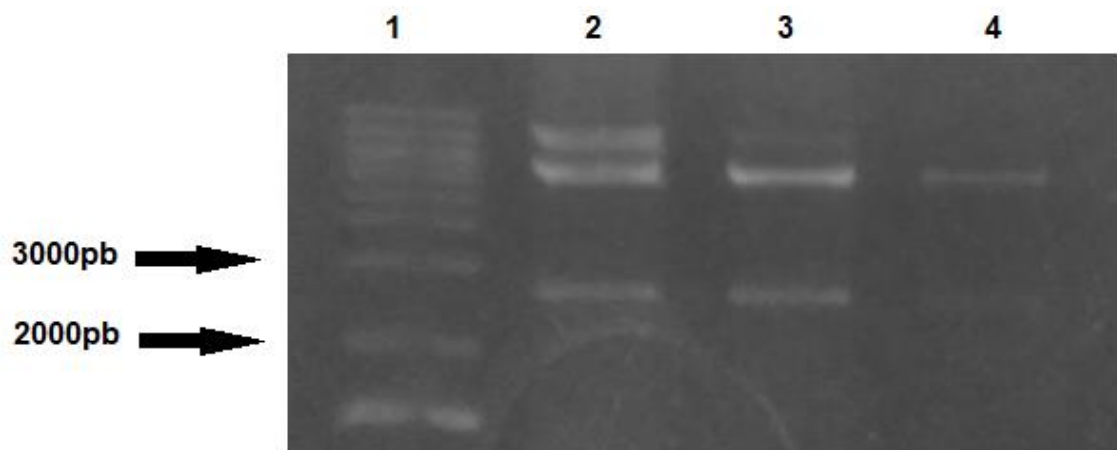
**Figura 2.5 : Resultado da digestão pelas enzimas *XhoI* e *NdeI*** Observa-se a presença de pb entre 2000 e 3000 confirmando a presença do gene no plasmídeo. Neste caso observa-se também outra banda com 3000pb correspondente ao pGEM-T easy.

Com o objetivo de realizar uma clonagem no vetor de expressão foi realizado uma ligação do gene em pET28a e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Na figura 2.6 observa-se a presença de pares de base entre 2000 a 3000 pb em resultado de PCR confirmando a presença do gene de LicSRPK no pET28a transformado em *E. coli* DH5 $\alpha$ .



**Figura 2.6: Resultado de PCR do gene em vetor de expressão pET28a.** Resultado da clonagem do gene de LicSRPK em pET28a com bandas entre 2000 e 3000 pb, confirmando a presença do gene.

Na figura 2.7 foi realizado uma reação de digestão do pET28a, com as enzimas *XhoI* e *NdeI*, no qual obteve-se a presença do gene de interesse com marcação no gel entre 2000pb e 3000 pb e pode-se observar a presença de uma marcação em torno de 5000pb representando o vetor pET28a.



**Figura 2.7: Resultado da digestão do vetor pET 28a.** Confirmação da presença de pb entre 2000 e 3000 representando o gene de LicSRPK e outra banda com 5000pb representando o pET28a. Canaleta 1: marcador e canaletas 2,3 e 4 amostras resultantes da digestão do vetor pET28 $\alpha$ .

Outros experimentos com a LicSRPK clonada estão em andamento. Está previsto a realização de sequenciamento para confirmação do gene e posteriormente será realizado testes para purificação e padronização das melhores condições de estabilidade da enzima.

## 2.5 Conclusão

Durante os testes foi possível realizar a clonagem de LicSRPK predita nas análises de bioinformática em *Leishmania infantum chagasi*, assim como realizar o alinhamento entre as sequencias de aminoácidos entre diferentes espécies. Assim foi possível obter a clonagem tanto no pGEM-T easy quanto no pet28a. Como as SRPKs já foram encontradas e caracterizadas em outros protozoários, pode-se iniciar novos estudos com o objetivo de caracterizar essa enzima em *Leishmania infantum chagasi* e buscar novas estudos para descrever seu papel na patologia causada pelo parasita.

## 2.6 Referências

Clustal Omega. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> acesso em: 03/01/2019.

Dixit, A., P. K. Singh. PfSRPK1, a novel splicing-related kinase from Plasmodium falciparum. *J Biol Chem*, v.285, n.49, Dec 3, p.38315-23. 2010.

Endicott, J. A., M. E. M. Noble e L. N Johnson. The Structural Basis for Control of Eukaryotic Protein Kinases. *Annual Review of Biochemistry* 81:587–613. 2012.

Jang, S. W, Liu X, Fu H., Rees H., Yepes M., Levey A & Ye K. Interaction of Akt-phosphorylated SRPK2 with 14-3-3 Mediates Cell Cycle and Cell Death in Neurons. *The Journal of Biological Chemistry* 284: 24512– 24525. 2009.

Jones, Nathaniel G., Carolina M. C. Catta-Preta; Ana Paula C. A. Lima; Jeremy C. Mottram; ACS Genetically Validated Drug Targets in Leishmania: Current Knowledge and Future Prospects. *ACS Infectious Diseases*. 4 (4), 467-477 DOI: 10.1021/acsinfecdis.7b00244. 2018.

Mair, G., H. Shi, H. Li, A. Djikeng, H. O. Aviles, J. R. Bishop, F. H. Falcone, C. Gavrilescu, J. L. Montgomery, M. I. Santori, L. S. Stern, Z. Wang, E. Ullu, and C. Tschudi. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. *RNA* 6:163–169. 2000.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> acesso em 03/01/2019

Nakagawa O., Arnold M., Nakagawa M., Hamada H., Shelton J. M., Kusano H., Harris T. M., Childs G., Camp-bell K. P., Richardson J. A., Nishino I., Olson E. Centronuclear myopathy in mice lacking a novel muscle-specific pro-teín kinase transcriptionally regulated by MEF2. *GenesDev* 19, 2066–2077. 2005.

Pfam. Disponível em: <https://pfam.xfam.org/search/sequence>. Acesso em 03/01/2019.

Portal D.; Lobo G. S.; Kadener S.; Prasad J.; Espinosa J. M.; Pereira C. A.; Tang Z.; Lin R.J.; Manley J. L.; Kornblihtt A. R.; Flawia M. M.; Torres H. N. Trypanosoma cruzi TcSRPK, the first protozoan member of the SRPK family, is biochemically and functionally conserved with metazoan SR protein-specific kinases. *Mol Biochem Parasitol*.127:9–21. doi: 10.1016/S0166-6851(02)00299-2. 2003

Sharp, Phillip A. "The discovery of split genes and RNA splicing." *Trends in biochemical sciences* 30.6: 279-281. 2005.

TriTrypDB. Disponível em: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/> Acesso em: 03/01/2019.

Wang, H. Y, Lin W., Dyck J. A., Yeakley J. M., Songyang Z., Cantley L. C. & Fu X. D. SRPK2: A Differentially Expressed SR Protein-specific Kinase Involved in Mediating the Interaction and Localization of Pre-mRNA Splicing Factors in Mammalian Cells. *The Journal of Cell Biology* 140: 737-750. 1998.

Wahl, M. C, Luhrmann R. SnapShot: spliceosome dynamics I. *Cell* - 161:1474–14e1. 471. 2015.

Xiao, S. H e Manley J. L. Phosphorylation of theASF/SF2 RS domain affects both protein-protein and protein-RNA interactions and is necessary for splicing. *Genes Dev*11, 334–344. 1997.