

Universidade de São Paulo Instituto de Física de São Carlos

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos

13^a edição

Livro de Resumos

São Carlos
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos
(13: 21-25 ago.: 2023: São Carlos, SP.)

Livro de resumos da XIII Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo / Organizado por Adonai Hilário da Silva [et al.]. São Carlos: IFSC, 2023.
358p.

Texto em português.

1.Física. I. Silva, Adonai Hilário da, org. II. Título.

ISSN: 2965-7679

PG143

Clonagem e expressão da quinase plasmodial CLK3

OLIVEIRA, Gabriela¹; GODOY, Andre Schutzer de¹; GUIDO, Rafael Victório Carvalho¹

gabrielaslvvr@usp.br

¹Instituto de Física de São Carlos - USP

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium ssp.*. Apesar do sucesso significativo do combate à doença nas duas últimas décadas, em 2020 houve uma estimativa de 241 milhões de casos e 627000 óbitos devido à malária. O surgimento de parasitos resistentes aos antimaláricos padrões contribui para a persistência desses quadros endêmicos. Dessa forma, é de extrema importância a descoberta de compostos potentes e com mecanismos de ação inovadores. Para isso, a estratégia de modulação das vias de sinalização mediada por proteínas quinases tem sido explorada para inibir o desenvolvimento do parasito e combater a infecção. (1) A proteína quinase 3 ciclina-dependente (CLK3) é um alvo validado, sendo essencial para múltiplos estágios do parasito *P. falciparum*, incluindo o estágio sanguíneo, hepático e sexual. Essa enzima catalisa reações de fosforilação de proteínas ricas em serina-arginina, responsáveis na regulação de splicing alternativos impactando no processamento pós-traducional do RNA do parasito. Nesse sentido, selecionamos a quinase CLK3 para a elucidação estrutural e a descoberta de inibidores como candidatos a compostos líderes para a malária. (2) Assim, o objetivo central deste trabalho é o estudo estrutural de um alvo validado e a análise da relação entre estrutura e atividade de compostos para a descoberta de novos inibidores de classes moleculares diversas. Para isso, foi realizado o estudo da estrutura e função enzimática através dos relatos na literatura e dos bancos de dados *PlasmoDB*, *AlphaFoldDB* e *InterPro*. A partir disso, selecionamos duas partes da sequência do gene *Pf.CLK3* (PF3D71114700), uma referente a proteína inteira (CLK3) e outra somente do domínio catalítico (CLK3 truncada). Para isolar a sequência desses genes, foi realizado o cultivo in vitro da cepa sensível 3D7 do parasito *P. falciparum* e purificado seu RNA total para a confecção de uma biblioteca de cDNA do estágio de trofozoítos. Em seguida, utilizando a técnica de biologia molecular Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram isolados e clonados os genes CLK3 e CLK3-truncada em vetores para a expressão em *E. coli* (pET-M11/LIC e pET-Trx/LIC, ambas com a Histag) e em *S. cerevisiae* (pBTEV, que possui a enzima GFP fusionada no C-terminal). Posteriormente, foram realizados diversos testes de expressão com as cepas bacterianas BL21, Rosetta 2, Rosetta Gami Plyss. A análise da expressão foi feita pela identificação das bandas proteicas em gel de poliacrilamida e análise com *Western Blot*, utilizando anticorpos Anti-His, mostrando a inexistência de expressão de ambas as proteínas nesse sistema heterólogo. Consecutivamente, foi realizado o teste de expressão em *S. cerevisiae*, selecionando 24 colônias positivas, analisando a expressão por meio do sinal de fluorescência da GFP. Nesse último teste, foram identificadas colônias cuja expressão heteróloga mostrou-se promissora. A partir disso, será estudada a otimização da expressão proteica, para em seguida realizar a purificação, cristalização, resolução da estrutura e estudos computacionais para encontrar possíveis inibidores dessa quinase.

Palavras-chave: CLK3. Biologia molecular. *Plasmodium falciparum*.**Agência de fomento:** CAPES (88887.719605/2022-00)

Referências:

- 1 ARENDSE, L. B. *et al.* *Plasmodium*.kinases as potential drug targets for Malaria: challenges and opportunities. **ACS Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 518-534, 2021.
- 2 ALAM, M. M. *et al.* Validation of the protein kinase PfCLK3 as a multistage cross-species malarial drug target. **Science**, v. 365, n. 6456, p. eaau1682-1-eaau1682-8, 2019.