

Tatiane Aparecida Buzanello Janku

**Expressão Heteróloga, Purificação, Caracterização e Estudos de
Modelagem Molecular das proteínas quinases: Piridoxal Quinase (PdxK) de
Trypanosoma cruzi e Quinase Dependente De Ciclina 10 (CDK10) humana**

São Carlos

2023

Tatiane Aparecida Buzanello Janku

Expressão Heteróloga, Purificação, Caracterização e Estudos de Modelagem Molecular das proteínas quinases: Piridoxal Quinase (PdxK) de *Trypanosoma cruzi* e Quinase Dependente De Ciclina 10 (CDK10) humana

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutora em Química.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Canduri

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Janku, Tatiane Aparecida Buzanello

Expressão heteróloga, purificação, caracterização e estudos de modelagem molecular das proteínas quinases: Piridoxal Quinase (PdxK) de *Trypanosoma cruzi* e Quinase dependente de Ciclina 10 (CDK10) humana / Tatiane Aparecida Buzanello Janku. — São Carlos, 2023.

140 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.

Edição revisada

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Canduri

1. Bioquímica. I. Título.



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vandréia e Estéfano, e à minha avó Diva (in memoriam) por todo carinho e apoio em cada momento de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado meus passos, ter me dado inúmeras bênçãos e muita força durante toda minha vida.

À Profa. Dra. Fernanda Canduri, por sua excelente orientação, apoio e amizade.

Aos meus pais e à minha irmã, por todo incentivo, compreensão e amor.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica Estrutural (*BioQEst*), Rebeqa, Fernanda, Diandra, Jéssyka, Thais, Beatriz, Isabel e Hélio, pelos momentos de incentivo e colaboração.

A todos do laboratório do Grupo de Química Medicinal e Biológica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), em especial ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, ao Prof. Dr. Andrei Leitão e à Fabiana Rosini.

Ao pessoal do serviço de pós-graduação do IQSC e à Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do IQSC, por todo trabalho e esforço realizado.

A todos os membros da banca, pelo tempo e dedicação na avaliação deste trabalho.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC).

Aos órgãos de fomento de pesquisa e à CAPES pela bolsa concedida;

A todos os meus amigos que me ajudaram nesta longa jornada, muito obrigada!

Música Geraldinho Correia / Missão Resgate

*Atraído por Tua Graça
Aqui cheguei
Em Ti encontrei
Coragem para recomeçar
Tua palavra me impulsiona
A prosseguir
Não desistir!*

*Tu me destes asas para Voar
Visão do eu serei
Provisão no que eu farei
E com alegria
Ao triunfo chegar*

*Eu vou voar como as Águias
No alto chegar
Renovo em Ti minhas forças
Vou confiar!*

*Aquilo que me espera
Aquilo que vem
É bem melhor que o passado
Pois Deus vai além*

EPÍGRAFE



*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe
e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve
e a vida é muito para ser insignificante.”*

(Augusto Branco)

RESUMO

As proteínas quinases são responsáveis pela regulação de diversos processos celulares e atuam por meio do mecanismo de fosforilação. Desta maneira, estas proteínas apresentam-se como bons candidatos a alvos farmacológicos. Neste trabalho foram estudadas duas proteínas quinases, a piridoxal quinase (PdxK) do protozoário *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e a quinase dependente de ciclina 10 (CDK10) humana. A PdxK de *T. cruzi* é uma enzima chave para a formação de piridoxal 5'-fosfato, que atua como cofator em diversas reações e é de fundamental importância para o metabolismo do protozoário, logo, é um interessante alvo farmacológico. Já a CDK10 humana, também conhecida como PISSLRE, pertence à família das quinases dependentes de ciclina e apresenta como parceira, a ciclina M. Estudos mostraram que a CDK10 participa da fosforilação do fator de transcrição ETS2, controlando sua estabilidade; é um fator de resistência a terapias endócrinas no câncer de mama e promove o crescimento celular, inibindo a apoptose em células de câncer colorretal. Como as duas proteínas quinases mencionadas (PdxK de *T. cruzi* e CDK10 humana) são pouco estudadas e candidatas potenciais a alvos terapêuticos, o objetivo deste trabalho consistiu na obtenção de ambas as proteínas por meio da expressão de proteínas recombinantes heterólogas em *Escherichia coli* (*E. coli*), seguido pela purificação e pela realização de estudos de caracterização. Além disso, ambas não possuem estrutura cristalográfica depositada em banco de dados até o momento, por isso outro objetivo foi realizar a modelagem molecular destas proteínas utilizando ferramentas de bioinformática, para estudos futuros de docagem molecular. Em relação aos resultados obtidos, foi possível expressar as duas proteínas em *E. coli*. Entretanto, não foram alcançados resultados satisfatórios em relação aos ensaios de purificação da CDK10 humana, e, portanto, não foi possível realizar estudos de caracterização da CDK10 humana; situação diferente em relação à PdxK, uma vez que os resultados foram satisfatórios. A partir de amostras de PdxK com alto grau de pureza foram realizados ensaios de atividade da enzima, confirmando que estava ativa. Por fim, foram obtidos os modelos das estruturas de cada proteína por modelagem molecular. Futuramente, os resultados obtidos poderão ser utilizados em estudos de docagem molecular com pequenas moléculas inibidoras.

Palavras-Chave: proteínas quinases, piridoxal quinase de *Trypanosoma cruzi*, CDK10 humana

ABSTRACT

Protein kinases are responsible for regulating various cellular processes and act through the mechanism of phosphorylation. Thus, these proteins are good candidates for pharmacological targets. In this study, two protein kinases were investigated: pyridoxal kinase (PdxK) from the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and human cyclin-dependent kinase 10 (CDK10). PdxK *T. cruzi* is a key enzyme for the formation of pyridoxal 5'-phosphate, which acts as a cofactor in several reactions and it is fundamental importance for the metabolism of the protozoan, making it an interesting pharmacological target. Human CDK10, also known as PISSLRE, belongs to the cyclin-dependent kinase family and partners with cyclin M. Studies have shown that CDK10 participates in the phosphorylation of the ETS2 transcription factor, controlling its stability; it is a factor in endocrine therapy resistance in breast cancer and promotes cell growth, inhibiting apoptosis in colorectal cancer cells. Both protein kinases (PdxK *T. cruzi* and human CDK10) are poorly studied and they are potential therapeutic targets. The objective of this study was to obtain both proteins using heterologous recombinant protein expression methodologies in *Escherichia coli* (*E. coli*), purify and perform characterization studies. In addition, neither of protein has a crystallographic structure deposited in the database to date, so another objective was to perform molecular modeling of these proteins using bioinformatics tools for future molecular docking studies. Regarding the results obtained, it was possible to express both proteins in *E. coli*. However, satisfactory results were not achieved for the human CDK10 purification assays, and therefore it was not possible to perform characterization studies of human CDK10; a different situation compared to PdxK, in which the results were satisfactory. Enzyme activity assays were performed on highly purified PdxK samples, confirming that it was active. Finally, structural models of each protein were obtained by homology molecular modeling. In the future, the results obtained can be used in molecular docking studies with small inhibitory molecules.

Keywords: protein kinases, pyridoxal kinase *Trypanosoma cruzi*, human CDK10

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo geral de fosforilação de proteínas regulado por proteínas quinases.....	21
Figura 2. Reação geral catalisada por proteínas quinases.....	22
Figura 3. Mapa das 518 quinases, mostrando os grupos principais.....	23
Figura 4. Diagrama da PKA co-cristalizada com ATP e um peptídeo inibidor.....	24
Figura 5. Principais características estruturais de um domínio quinase.....	25
Figura 6. Esquema do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	29
Figura 7. Cenário mundial dos casos de Doenças de Chagas.....	30
Figura 8. Estruturas químicas das drogas utilizadas para tratamento da Doença de Chagas.....	31
Figura 9. Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benzonidazol.....	32
Figura 10. Reações catalisadas pela PdxK.....	34
Figura 11. Interface dimérica de algumas PdxKs.....	35
Figura 12. Etapas do processo de expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	39
Figura 13. Mapa do plasmídeo pET23a(+)......	41
Figura 14. Transformação de DNA recombinante em células <i>E. coli</i> DH5 α	42
Figura 15. Resumo dos experimentos de expressão e purificação da PdxK de <i>T. cruzi</i> (Experimentos de 1 a 6)	47
Figura 16. As 4 etapas da modelagem molecular por homologia.....	51
Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida da expressão de PdxK em células de <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) em 100 mL de meio LB.....	54
Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de expressão do vetor pET23a utilizado como controle em células de <i>E. coli</i> Rosetta(DE3), em 100 mL de meio LB.....	55
Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de expressão do recombinante pET23-PdxK em células de <i>E. coli</i> Rosetta(DE3) em 100 mL de meio SOB e do teste de expressão do vetor pET23 como controle.....	56

Figura 20. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de lise.....	57
Figura 21. Condições ótimas para obtenção de PdxK recombinante de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 22. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste <i>salting out</i> com 30% de sulfato de amônio.....	59
Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de purificação em coluna Superdex 16/60.....	60
Figura 24. Cromatograma da etapa de purificação na coluna de Troca Iônica (<i>HiTrap™ Q FF</i>)	61
Figura 25. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações recolhidas na etapa de purificação por Troca Iônica.....	62
Figura 26. Cromatograma da etapa de purificação na coluna de Exclusão de Tamanho (<i>Superdex 200</i>)	63
Figura 27. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações recolhidas na etapa de purificação por Exclusão de Tamanho.....	64
Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras da purificação por Exclusão de Tamanho. À esquerda, SDS/PAGE (Gel desnaturante). À direita, Gel Nativo (Não Desnaturante)	65
Figura 29. Eletroforese em Gel Não Desnaturante das amostras da etapa de purificação por Exclusão de Tamanho, após 1 semana armazenada a 4 °C.....	66
Figura 30. Gráfico de elipsidade em função do comprimento de onda para as amostras de concentração 2, 4 e 6 µM.....	67
Figura 31. Gráfico dos dados obtidos do teste de atividade: absorbância (média de triplicata) em função do tempo.....	69
Figura 32. Estrutura do dímero a piridoxal quinase de <i>Trypanosoma brucei</i> em complexo com ATP.....	70
Figura 33. Sequência da proteína PdxK de <i>T. cruzi</i> NCBI – Código GenBank: RNC57787.1.....	71
Figura 34. Predição da estrutura secundária da PdxK de <i>T. cruzi</i> , utilizando a ferramenta online PSIPRED.....	71

Figura 35. Alinhamento realizado pelo ESPript 3.0 entre a sequência de aminoácidos do <i>template 2yxt</i> (PdxK humana), do <i>templates 3zs7</i> (PdxK do <i>Trypanosoma brucei</i>) e a PdxK do <i>T. cruzi</i>	73
Figura 36. A: Modelo obtido (verde). B: Modelo (verde) em comparação ao <i>template 3zs7</i> (azul).....	74
Figura 37. Gráfico de Ramachandran do modelo da PdxK de <i>T. cruzi</i>	75
Figura 38. Sobreposição dos modelos de estrutura da PdxK de <i>T. cruzi</i>	76
Figura 39. Superfície de potencial eletrostático do modelo molecular da PdxK de <i>T. cruzi</i>	77
Figura 40. Superfície hidrofóbica do modelo molecular da PdxK de <i>T. cruzi</i>	78
Figura 41. Diversidade Funcional de CDKs.....	83
Figura 42. Mapa do plasmídeo pET28a(+)......	88
Figura 43. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final)	100
Figura 44. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final) utilizando meio LB.....	101
Figura 45. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final) utilizando meio SOB.....	103
Figura 46. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final) utilizando IPTG na concentração final de 0,6 mM, em 100 mL de meio LB.....	104
Figura 47. Condições ótimas para obtenção de CDK10 humana recombinante na fração insolúvel.....	105
Figura 48. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de purificação de CDK10 recombinante em coluna de níquel.....	106
Figura 49. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de purificação da fração sobrenadante do teste de expressão em coluna de níquel.....	107
Figura 50. Sequência de DNA do domínio quinase da CDK10 humana. Sítio de <i>Bam</i> HI (azul). Sítio de <i>Xho</i> I (roxo), Códon de parada (vermelho).....	108

Figura 51. Gel de agarose 0,8%. da reação de PCR com gradiente de temperatura.....	109
Figura 52. Reação de PCR realizada na temperatura de 66,2°C e 200 µL de volume total de reação.....	110
Figura 53. Digestão das amostras de pET28-SUMO e do produto de PCR.....	110
Figura 54. PCR realizada para confirmação de clonagem.....	111
Figura 55. Resumo dos principais resultados da parte experimental envolvendo a CDK10....	112
Figura 56. Sequência da proteína CDK10 humana, NCBI – Código NP_443714.3.....	112
Figura 57. Predição da estrutura secundária da CDK10 humana, utilizando a ferramenta online PSIPRED.....	113
Figura 58. Alinhamento realizado pelo ESPript 3.0 entre a sequência de aminoácidos do <i>template</i> 1b38 (CDK2) e da CDK10 humana.....	115
Figura 59. A: <i>Template</i> 1b38 (rosa) e Modelo (verde); B. <i>Template</i> 3pxf (rosa) e modelo (azul).....	116
Figura 60. A: Sobreposição das estruturas <i>Template</i> 1b38 (roxo) com <i>Template</i> 3pxf (amarelo). B: Sobreposição das estruturas <i>Template</i> 1b38 (roxo), <i>Template</i> 3pxf (amarelo), Modelo gerado a partir do <i>template</i> 3pxf (azul) e Modelo gerado a partir do <i>template</i> 1b38 (verde).....	117
Figura 61. Gráfico de Ramachandran do modelo gerado a partir do <i>template</i> 1b38.....	118
Figura 62. Gráfico de Ramachandran do modelo gerado a partir do <i>template</i> 3pxf.....	119
Figura 63. Sobreposição dos modelos de estrutura da CDK10 humana.....	120
Figura 64. Superfície de potencial eletrostático do modelo molecular da CDK10 humana.....	121
Figura 65. Superfície hidrofóbica do modelo molecular da CDK10 humana.....	122
Figura 66. Superfície hidrofóbica das proteínas CDK10 humana (A) e PdxK de <i>T. cruzi</i> (B) para comparação.....	123
Figura 67. Comparação das sequências de aminoácidos da CDK10 humana e da PdxK de <i>T. cruzi</i>	124

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Concentrações de pET23a-PdxK obtidas a partir de *miniprep*.

Quadro 2. Porcentagem de estruturas secundárias determinadas pela deconvolução dos dados do dicroísmo circular para cada teste de concentração (2, 4 e 6 μM) e a média dos valores obtidos.

Quadro 3. Informações da PdxK de *T. cruzi*

Quadro 4. CDKs e suas principais funções.

Quadro 5. Componentes e quantidades utilizados para a reação de PCR com gradiente de temperatura.

Quadro 6. Concentrações de pET28a-CDK10 obtidas a partir de *miniprep*.

Quadro 7. *Primers* desenhados para amplificação do DNA do domínio quinase da CDK10

Quadro 8. Resumo das informações da CDK10 humana.

Quadro 9. Composição de aminoácidos da proteína CDK10 humana e da PdxK de *T. cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGC – Proteínas quinases relacionadas à família de proteínas quinases A, G e C (PKA, PKG e PKC)

ADP – Adenosina difosfato

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

CAMK – Quinase dependente de calmodulina

CD – Doença de Chagas

CDKs – Quinases dependentes de ciclina

CDK10 – Quinase dependente de ciclina 10

CK1 – Caseína quinase 1

CMGC – Proteínas relacionadas à família de proteínas CDK, MAPK, GSK e CDK-like

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

E. coli – *Escherichia coli*

FDA – *Food and Drug Administration*

LB – Luria Bertani

IPTG – isopropil β-D1-tio-galactopiranosídeo

IQSC – Instituto de Química de São Carlos

IFSC – Instituto de Física de São Carlos

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NaCl – Cloreto de Sódio

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDB – Protein Data Bank

PdxK – Piridoxal quinase

pI teórico – Ponto isoelétrico teórico

PL – Piridoxal

PLP – Piridoxal 5'-fosfato

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

pRb – Proteína do retinoblastoma

RGC – Receptor guanilil ciclase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS/PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

SOB – *Super Optimal Broth*

STE - Proteínas quinases relacionadas à STE7-, STE11- e STE20

SUMO - *Small Ubiquitin-like Modifier*

T. brucei – *Trypanosoma brucei*

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TEMED – N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina

TK – Tirosina quinase

TKL – Tirosina quinase-like

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	21
1. Introdução.....	21
1.1. Proteínas quinases	21
CAPÍTULO 2	28
2.1. Revisão bibliográfica	28
2.1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de Chagas	28
2.1.2. Piridoxal quinase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
2.2. Objetivos	37
2.3. Fundamentos teóricos	38
2.3.1. Produção de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	38
2.3.2. Modelagem Molecular	39
2.4. Metodologia	41
2.4.1. Propagação do DNA recombinante pET23a-PdxK.....	41
2.4.2. Experimentos de expressão e purificação da PdxK de <i>T. cruzi</i>	43
2.4.3. Experimentos de caracterização da PdxK de <i>T. cruzi</i> recombinante.....	48
2.4.4. Análise in silico da PdxK de <i>T. cruzi</i>	49
2.5. Resultados e Discussão	52
2.5.1. Propagação do DNA recombinante pET23a-PdxK.....	52
2.5.2. Experimentos de expressão e purificação da PdxK de <i>T. cruzi</i>	53
2.5.3. Experimentos de caracterização da PdxK de <i>T. cruzi</i> recombinante.....	67
2.5.4. Análise in silico da PdxK de <i>T. cruzi</i>	71
2.6. Conclusão	79
2.7. Perspectivas Futuras	80
CAPÍTULO 3	82
3.1. Revisão Bibliográfica	82
3.1.1. Quinases dependentes de ciclina.....	82
3.1.2. Quinase dependente de ciclina 10 humana	85
3.2. Objetivos	87
3.3. Metodologia	88
3.3.1. Propagação do DNA recombinante pET28a-CDK10.....	88
3.3.2. Experimentos de expressão e purificação da CDK10 humana recombinante.....	89
3.3.3. Experimentos de clonagem do domínio quinase da CDK10 humana	93
3.3.4. Análise in silico da CDK10 humana	95

3.4. Resultados e Discussão	96
3.4.1. Propagação do DNA recombinante pET28a-CDK10	96
3.4.2. Experimentos de expressão e purificação da CDK10 humana recombinante	96
3.4.3. Experimentos de clonagem do domínio quinase da CDK10 humana	108
3.4.4. Análise in silico da CDK10 humana	112
3.5. Conclusão	126
3.6. Perspectivas Futuras	127
CAPÍTULO 4	129
4.1. Referências Bibliográficas	129



CAPÍTULO 1



CAPÍTULO 1

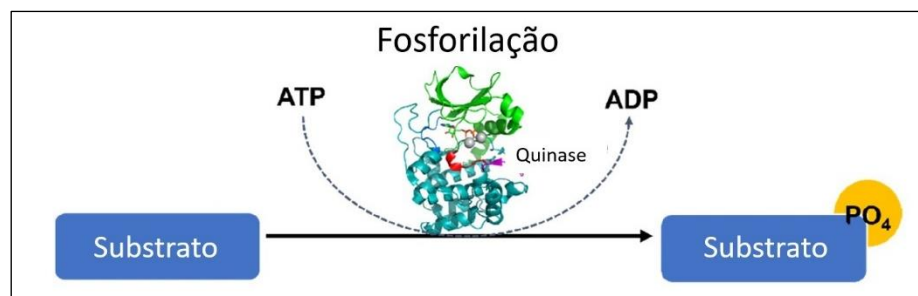
1. Introdução

1.1. Proteínas quinases

As proteínas quinases desempenham um papel fundamental na regulação de processos celulares, sendo enzimas responsáveis pela fosforilação de substratos. (SCHWARTZ; MURRAY, 2011). Elas são classificadas em dois grupos principais, o primeiro incluindo as proteínas quinases Ser/Thr, responsáveis por atuar na inserção de grupos fosfato nas hidroxilas presentes na cadeia lateral da serina e treonina dos substratos alvo e o segundo grupo compreendendo as quinases responsáveis pela inserção de grupos fosfato na hidroxila presente na cadeia lateral da tirosina do substrato alvo (CHIU et al., 2012; ESPOSITO et al., 2013; GOMES et al., 2013). A especificidade de fosforilação depende de vários fatores, os quais incluem o próprio resíduo (se é resíduo de serina, treonina ou tirosina), a sequência primária da proteína e a conformação do motivo a ser fosforilado (SCHWARTZ; MURRAY, 2011).

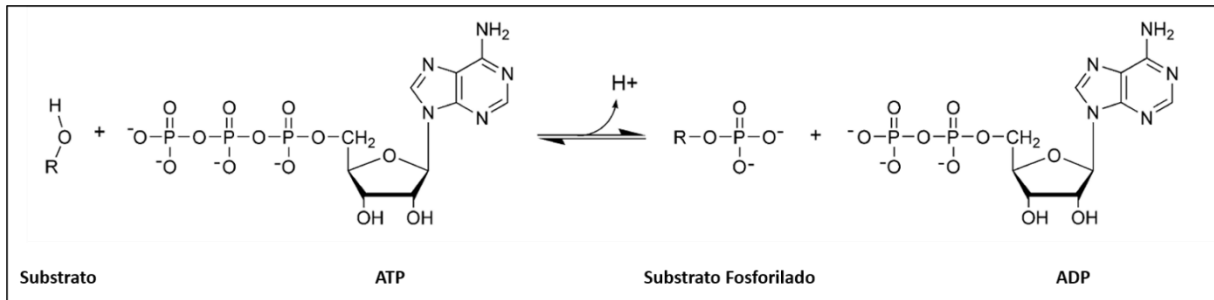
Sobre o mecanismo de fosforilação, ele envolve a transferência do fosfato terminal (γ) de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) para o grupo hidroxila de um resíduo de aminoácido do tipo serina, treonina ou tirosina, gerando um substrato fosforilado e uma molécula de adenosina difosfato (ADP) (Figuras 1 e 2) (SCHWARTZ; MURRAY, 2011). Com raras exceções, um cátion divalente como Mg^{2+} é necessário para que ocorra a reação (ROSKOSKI, 2015).

Figura 1. Mecanismo geral de fosforilação de substratos proteicos regulado por proteínas quinases.



Adaptado de (SEOK, 2021).

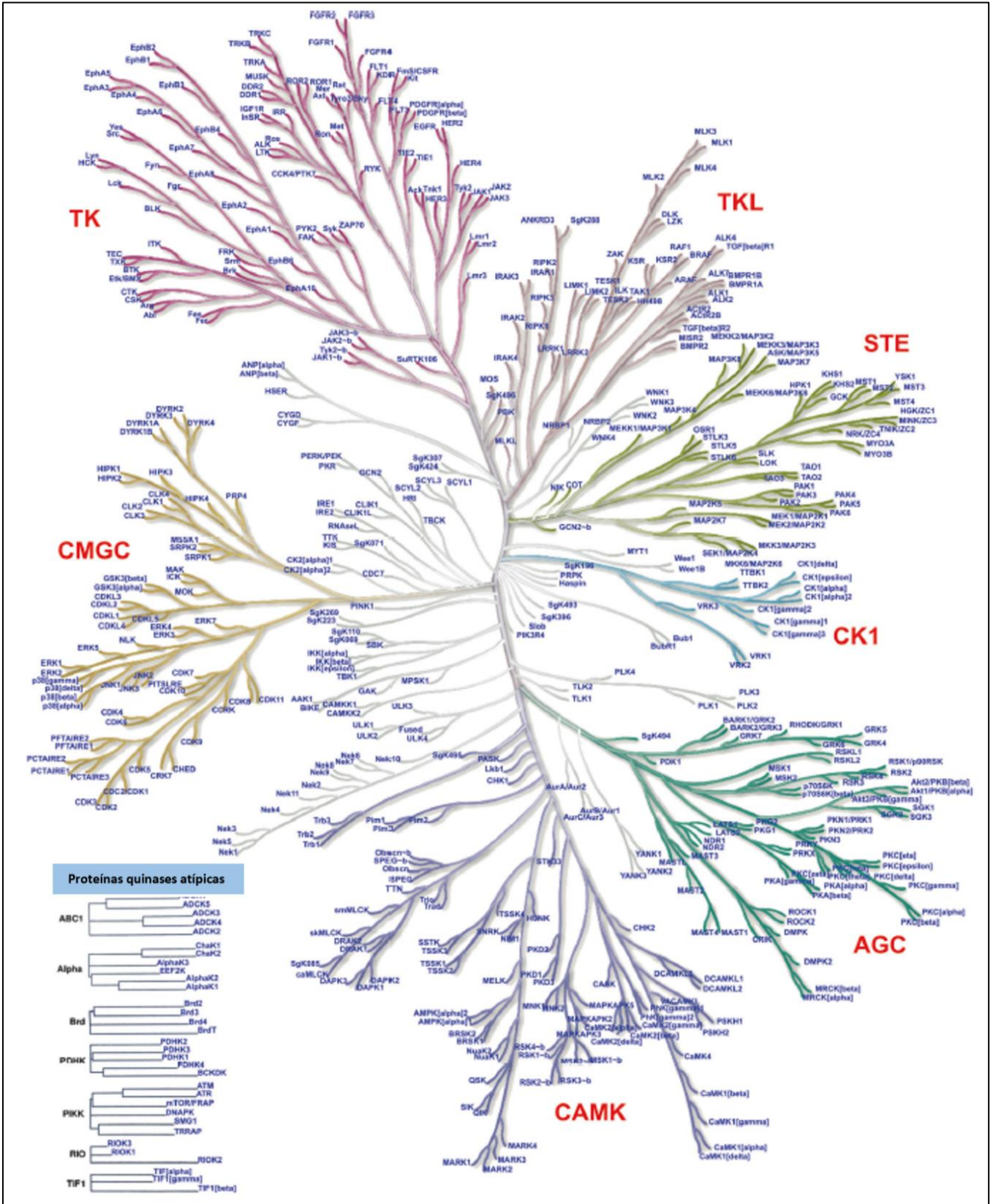
Figura 2. Reação geral catalisada por proteínas quinases.



Fonte: Adaptado de (SCHWARTZ; MURRAY, 2011).

As proteínas quinases e as lipídeo quinases constituem o quinoma humano, em um total de 518 proteínas que são divididas em 478 quinases típicas (contém domínio quinase e exibem atividade quinase) e 40 atípicas (não possuem domínio de atividade quinase, mas possuem atividade quinase). As quinases típicas são classificadas dentro de oito principais grupos: **TK** (tirosina quinase, contendo 90 membros), **TKL** (tirosina quinase-like, contendo 43 membros), **STE** (proteínas quinases relacionadas à STE7-, STE11- e STE20-, contendo 47 membros), **CK1** (caseína quinase 1, contendo 12 membros), **AGC** (proteínas quinases relacionadas à A/G/C, contendo 63 membros), **CAMK** (Ca²⁺/quinase dependente de calmodulina, contendo 74 membros), **RGC** (receptor guanilil ciclase, contendo 5 membros) e **CMGC** (proteínas relacionadas à CDK/MAPK/GSK/CDK-like, contendo 61 membros) (WANG et al., 2021). Estima-se que cerca de um em cada 40 genes humanos (518 genes de proteínas quinases em aproximadamente 20000 genes codificadores de proteínas humanas) codifica uma proteína quinase. Sendo assim, as quinases constituem cerca de 2,5% do genoma humano (ROSKOSKI, 2023). A Figura 3 apresenta o mapa das 518 quinases humanas, destacando-se os grupos principais acima mencionados.

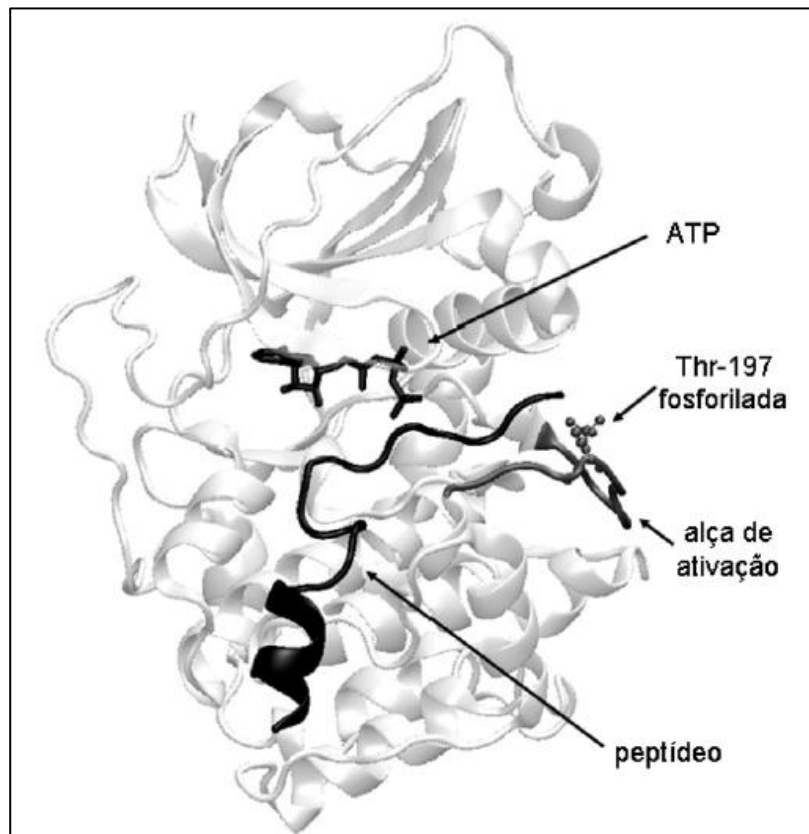
Figura 3. Mapa das 518 quinases, mostrando os grupos principais.



Fonte: Adaptado de (WANG et al., 2021)

A PKA foi a primeira proteína quinase que teve sua estrutura cristalográfica publicada em um artigo, isso mais de 30 anos atrás (ARTER et al., 2022; KNIGHTON et al.; 1991). Na Figura 4 é mostrada a estrutura da PKA complexada com ATP e um peptídeo inibidor.

Figura 4. Diagrama da PKA co-cristalizada com ATP e um peptídeo inibidor. Código PDB: 1atp. A alça de ativação e o resíduo fosforilado, fosfo-Thr-197 estão em cinza claro. O ATP e uma porção do peptídeo inibidor no sítio ativo estão em preto.



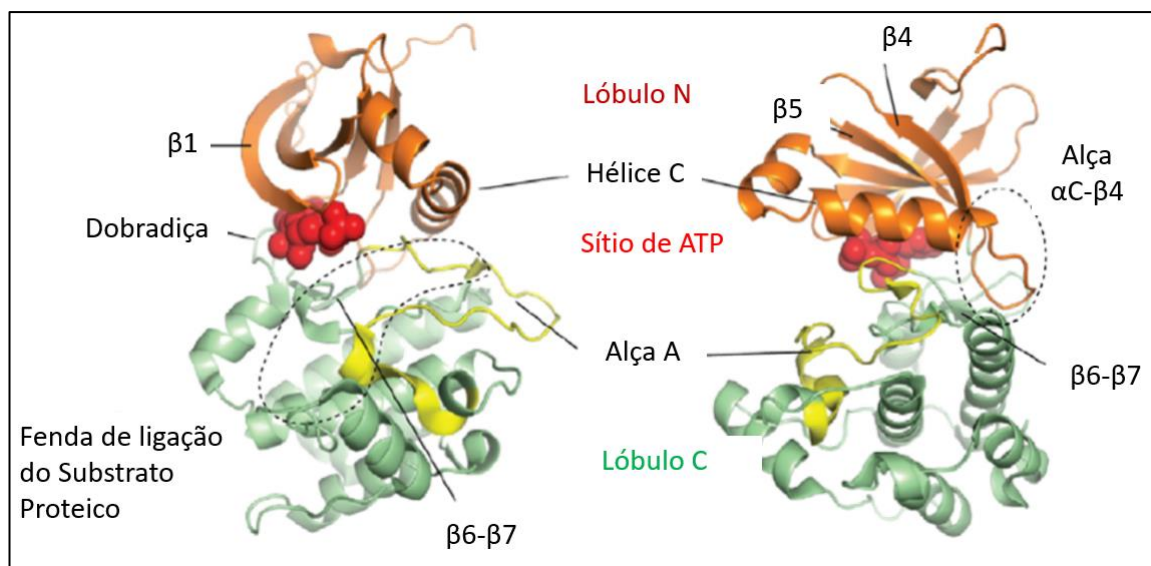
Fonte: (SILVA et al., 2009)

A descoberta da estrutura da PKA revelou um núcleo estrutural que é conservado em quinases, de modo que a convenção determina que as estruturas de quinases sejam nomeadas de acordo com a estrutura secundária da PKA. Assim, as α -hélices são nomeadas em ordem alfabética começando no terminal N da estrutura, e as cadeias β são numerados a partir do terminal N da proteína como $\beta 1$ (ARTER et al., 2022).

O núcleo estrutural conservado em quinases compreende um lóbulo N que possui uma folha β de 5 fitas ($\beta 1$ – $\beta 5$) e pelo menos uma α -hélice e um C-lóbulo que é principalmente α -helicoidal, mas com uma pequena folha β ($\beta 6$ – $\beta 7$). Adjacente ao sítio do ATP, a interface entre

os dois lóbulos é formada pela hélice C e a alça A, que faz parte do sítio de ligação do substrato da proteína. A molécula de ATP se localiza na interface entre os dois lóbulos, sendo que os fosfatos do ATP estão sob a alça rica em glicina que conecta $\beta 1$ e $\beta 2$, e interagem com um resíduo de lisina conservada em $\beta 3$; além disso, estão conectados ao lóbulo C através de um cátion bivalente, geralmente Mg^{2+} . Ainda, a interface é completada por uma alça estendida entre αC e $\beta 4$ do lóbulo N, que se acumula contra a folha β e a hélice αE do lóbulo C (ARTER et al., 2022). Na Figura 5 é possível observar as principais características que foram descritas acima.

Figura 5. Principais características estruturais de um domínio quinase. O domínio compreende um lóbulo N-terminal (laranja) e um lóbulo C-terminal (verde) conectado por uma sequência de dobradiças. O sítio de ligação de ATP (vermelho) está na interface dos dois lóbulos.



Fonte: Adaptado de (ARTER et al., 2022).

Ainda sobre o domínio quinase, ele se constitui de 200 a 300 resíduos de aminoácidos e podem ser subdivididos em outros domínios característicos. No lóbulo N terminal há presença de um motivo chamado Rossmann que apresenta a sequência consenso GxGxxG e está localizada na alça de ligação do fosfato que está dentro do bolsão de ligação do ATP.

Esta estrutura é muito importante porque têm papel na ancoragem dos grupos fosfato α e β , de modo que orientam o grupo fosfato γ para a catálise. Outro domínio conservado em quinases apresenta os resíduos de aminoácidos lisina (Lys 30) e aspartato (Asp125 ou Asp 143), é preciso destacar que esta numeração indica uma localização aproximada na maioria das sequências de quinases (DISSMEYER; SCHNITTGER, 2011).

Sobre a atividade catalítica das quinases, o processo de fosforilação é a chave reguladora de proteínas, que pode aumentar ou diminuir a atividade enzimática e alterar outros processos biológicos, tais como a transcrição e a tradução (ROSKOSKI, 2015). Quando o alvo da fosforilação é uma proteína reguladora, a fosforilação pode ativar/desativar uma via metabólica. A função reguladora das proteínas quinases é conhecida há várias décadas, mas a extensão deste mecanismo de controle só foi plenamente reconhecida pouco tempo atrás (GOMES et al., 2013; UBERSAX, FERRELL, 2007). Portanto, as proteínas quinases têm papel na regulação de inúmeros processos biológicos (ROSKOSKI, 2015), e a desregulação de vias de sinalização é encontrada em várias doenças, incluindo cânceres, doenças inflamatórias, degenerativas e infecciosas (WANG et al., 2021).

Por esta razão, as proteínas quinases se tornaram um dos alvos clínicos mais importantes e como consequência, o desenvolvimento de pesquisas relacionado à inibidores de quinases é de alta relevância na indústria farmacêutica (ARTER et al., 2022). Alguns inibidores de quinases já foram aprovados e estão sendo utilizados em tratamentos clínicos, e outros continuam sob estudos pré-clínicos (WANG et al., 2021). Entretanto, vários desses medicamentos aprovados não são específicos, o que implica em vantagens e desvantagens. As quinases por muitos anos foram alvos difíceis de atingir por causa da similaridade inerente do sítio de ligação do ATP e das concentrações milimolares de ATP na célula. A eficácia terapêutica de inibidores multiquinases podem resultar em inibição de mais de um alvo, que dependendo da situação pode ser benéfico, porém a inibição de enzimas fora do alvo pode contribuir com efeitos adversos e colaterais (ROSKOSKI, 2021; ROSKOSKI, 2015).

Devido à extrema relevância de proteínas quinases, este trabalho, por conseguinte, teve como alvo o estudo de duas proteínas quinases, ambas de organismos diferentes, a piridoxal quinase do *Trypanosoma cruzi* e a quinase dependente de ciclina 10 humana, de forma que cada proteína será abordada aqui em capítulos diferentes.



CAPÍTULO 2



CAPÍTULO 2

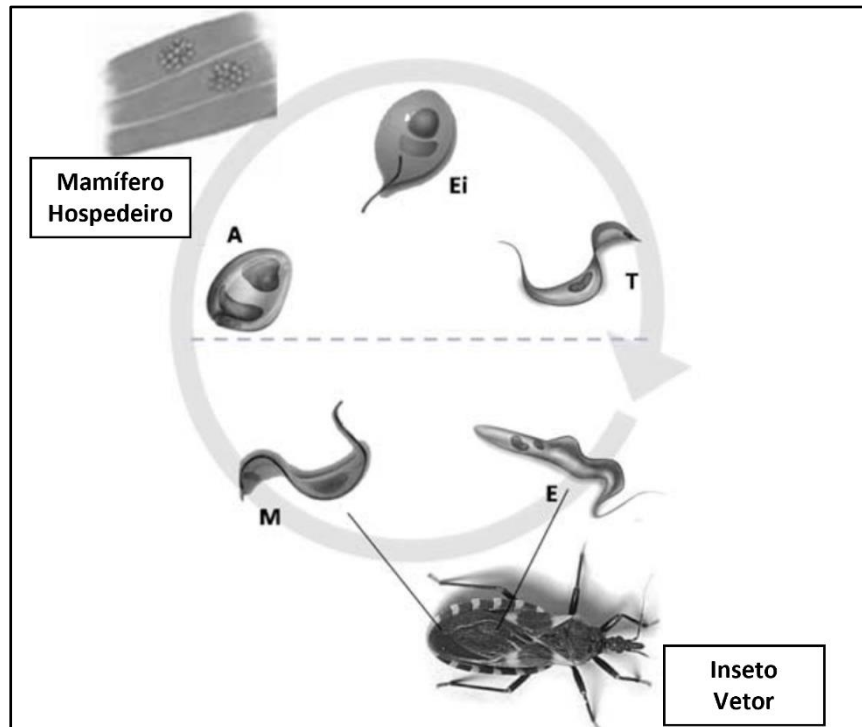
2.1. Revisão bibliográfica

2.1.1. *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A doença Tripanossomíase americana, mais conhecida como Doença de Chagas é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida bastante complexo, envolvendo dois hospedeiros intermediários (insetos triatomíneos e mamíferos, incluindo os humanos) e diferentes estágios de diferenciação, como é mostrado na Figura 6 (LIMA et al., 2010). Os insetos tornam-se infectados após ingestão de sangue de mamíferos infectados com a forma *tripomastigota (forma infecciosa do parasita, porém não divisível)*. Os tripomastigotas serão levados ao intestino médio do inseto, diferenciando-se *em epimastigota (forma não infecciosa, e com capacidade de divisão)*. Com a replicação da forma epimastigota, o parasita começa a colonizar a região do tubo digestivo do inseto, do meio para região distal. Neste local, há nova diferenciação e os epimastigotas diferenciam-se em *tripomastigoras metacíclicos (formas infecciosas, porém não divisível)*. Ao defecar, o inseto libera o parasita na forma tripomastigota metacíclico nas fezes, o que pode infectar novo hospedeiro via mucosa ou através de lesões cutâneas microscópicas. Já no hospedeiro mamífero, o parasita dentro da célula pode diferenciar-se em *amastigotas (forma replicativa e infecciosa)* (ALVES; COLLI, 2007; SILVA et al., 2011; TYLER; ENGMAN, 2001). Após replicação diferenciam-se em tripomastigotas, passando de modo transitório em um estágio semelhante ao *epimastigota (epimastigota intracelular)* (ALMEIDA-DE-FARIA et al., 1999; SILVA et al., 2011). Estes tripomastigotas são liberados das células hospedeiras, invadindo outras células no tecido infectado ou entrando na corrente sanguínea do mamífero hospedeiro, o que ocasionará infecção em outros órgãos. Desta forma, os *tripoastigotas podem ser transmitidos a um vetor não infectado*, completando-se assim o ciclo (SILVA et al., 2011).

Figura 6. Esquema do ciclo de vida do *T. cruzi*. O parasita passa por diferentes formas dentro do vetor e do mamífero hospedeiro. “A”: amastigota (fase de divisão intracelular); “Ei”: epimastigota intracelular (fase de divisão intracelular); “T”: tripomastigota (forma extracelular infecciosa que não se divide); “E”: epimastigota (Divisão da forma não infecciosa no intestino médio do inseto vetor); “M”: tripomastigota metacíclico (forma infecciosa não divisível derivada de epimastigotas no inseto vetor).



Fonte: Adaptado de (SILVA et al., 2011).

Sobre a Doença de Chagas, ela foi descrita em 1909 pelo Dr. Carlos Chagas (Biblioteca Virtual em Saúde – <https://bvsms.saude.gov.br/doenca-de-chagas-e-o-barbeiro-informacao-e-a-melhor-forma-de-erradicacao/>). Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou esta doença como uma “Doença Tropical Negligenciada” (MONTALVO-OCOTOXTLE et al., 2022; OMS). Durante muito tempo foi encontrada principalmente em áreas rurais pobres da América Latina, transmitida por meio de insetos triatomíneos hematófagos (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Entretanto, esse cenário epidemiológico modificou, e atualmente, a doença é encontrada também em áreas urbanas e tornou-se um problema mundial (Figura 7) (ABRAS et al., 2022). Segundo dados recentes, a Doença de Chagas afeta cerca de 6 milhões de pessoas em todo o mundo, com mais de 30.000 novos casos e 12.000 mortes por ano (Organização Pan-Americana da Saúde - <https://www.paho.org/pt>).

Figura 7: Cenário mundial dos casos de Doenças de Chagas. Em vermelho estão representadas as regiões endêmicas e em laranja, as regiões que não são endêmicas mas que têm casos da doença.



Adaptado de (DNDi, 2023).

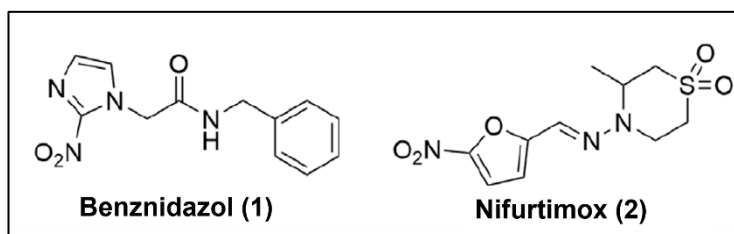
Nas áreas endêmicas, a doença pode ser causada pelo contato da urina ou fezes de um inseto triatomíneo hematófago que esteja infectado pelo *Trypanosoma cruzi* (conhecido como “barbeiro”) na pele não intacta ou mucosas (PÉREZ-MOLINA et al., 2021; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Em áreas não endêmicas, as formas de se contrair a doença é pela transmissão congênita, ou seja, durante a gravidez ou parto; (PÉREZ-MOLINA et al., 2021; HOWARD et al., 2013) além de transmissão pelo sangue (EL GHOUZZI et al., 2009; PÉREZ-MOLINA et al., 2021) ou transplante de órgãos (PÉREZ-MOLINA et al., 2021; PINAZO et al., 2011).

A Doença de Chagas apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. Após a infecção inicial, a maioria dos casos evolui para uma fase crônica assintomática, que pode evoluir para a forma crônica determinada da doença anos depois, com cerca de 30% dos pacientes apresentando danos irreversíveis ao coração e aos sistemas nervoso e digestivo (*World Health Organization* — [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))).

O tratamento da infecção por *T. cruzi* ainda depende de drogas que foram licenciadas mais de 50 anos atrás: o Nifurtimox (*N*-(3-Metil-1,1-dióxido-4-tiomorfolinil) -1-(5-nitro-2-furil) metanimina) que foi lançado em 1965 e o Benzonidazol (*N*-Benzil-2-nitro-1-imidazol-1-

acetamida) em 1971 (COURA; CASTRO, 2002; PÉREZ-MOLINA et al., 2021). A Figura 8 mostra a estrutura química dos dois medicamentos.

Figura 8. Estruturas químicas das drogas utilizadas para tratamento da Doença de Chagas. (1) Benzonidazol e (2) Nifurtimox.



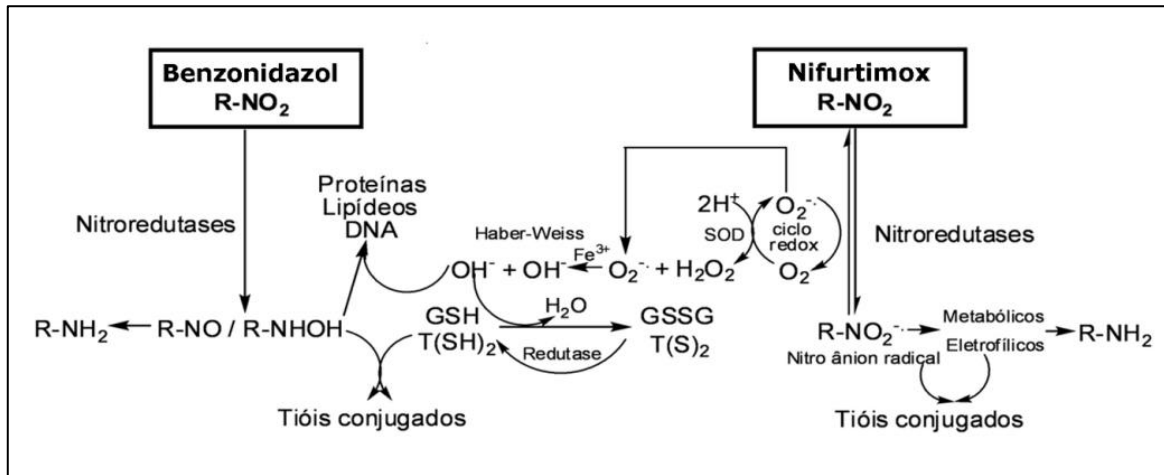
Fonte: (DE OLIVEIRA et al., 2021).

Ambos estão longe do ideal em segurança e eficácia. O nifurtimox tem perfil de maior toxicidade comparado ao benzonidazol. Por este motivo, nifurtimox foi descontinuado e a comercialização deste medicamento foi suspensa em vários países, incluindo Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, desde o início dos anos 1980. Apesar disso, quando há falta de alternativas ao tratamento, ou o benzonidazol apresenta falha ou toxicidade ao paciente, nestes casos o nifurtimox é indicado como tratamento. Além disso, há escassez de dados em relação à segurança do uso desses dois medicamentos durante gravidez (COURA; CASTRO, 2002; PÉREZ-MOLINA et al., 2021).

Estudos têm sugerido que os compostos nifurtimox e benzonidazol exercem sua atividade farmacológica por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos, como pode ser observado na Figura 9. Essas moléculas contêm o grupo nitro (NO_2) que é reduzido ao grupo amino (NH_2) pela ação de enzimas do tipo nitroredutases, as quais são específicas em sistemas moleculares do tipo R-NO_2 . No caso do nifurtimox, o radical reduz o oxigênio molecular (O_2) formando o íon superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e regenerando o grupo NO_2 em um processo conhecido como ciclo redox. O íon superóxido formado é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e é a esta espécie que tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi* (DIAS et al., 2009; MAYA et al., 2003). Por outro lado, o fármaco benzonidazol não atua através do ciclo redox e não depende diretamente de espécies reativas de oxigênio. Desta maneira, o radical nitro formado a partir do benzonidazol estaria

envolvido com seu efeito tripanocida através da formação de ligações covalentes com macromoléculas do *T. cruzi*, por exemplo o DNA e citocromo P450 (DIAZ DE TORANZO et al., 1988).

Figura 9. Mecanismo de ação proposto dos fármacos nifurtimox e benzonidazol.



Fonte: (DIAS et al., 2009).

No entanto, algumas proteínas do *T. cruzi* têm sido estudadas como alvos terapêuticos para a doença, tais como a cruzaina (DE SOUZA et al., 2020), o citocromo b (WALL et al., 2020) e a proteína quinase AEK1 (CHIURILLO; JENSEN; DOCAMPO, 2021). Porém até o momento, apesar dos esforços nas pesquisas com estes e outros alvos, poucos candidatos a fármacos progrediram desde os estágios de estudos iniciais à clínicos, e infelizmente os resultados não foram promissores. Alguns destes candidatos são os compostos fexinidazol, posaconazol e um pró-fármaco de ravuconazol, sendo que estes dois últimos têm como alvo a via de síntese de ergosterol (DE OLIVEIRA et al., 2021; MOLINA et al., 2014; MORILLO et al., 2015; TORRICO et al., 2018, *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi)).

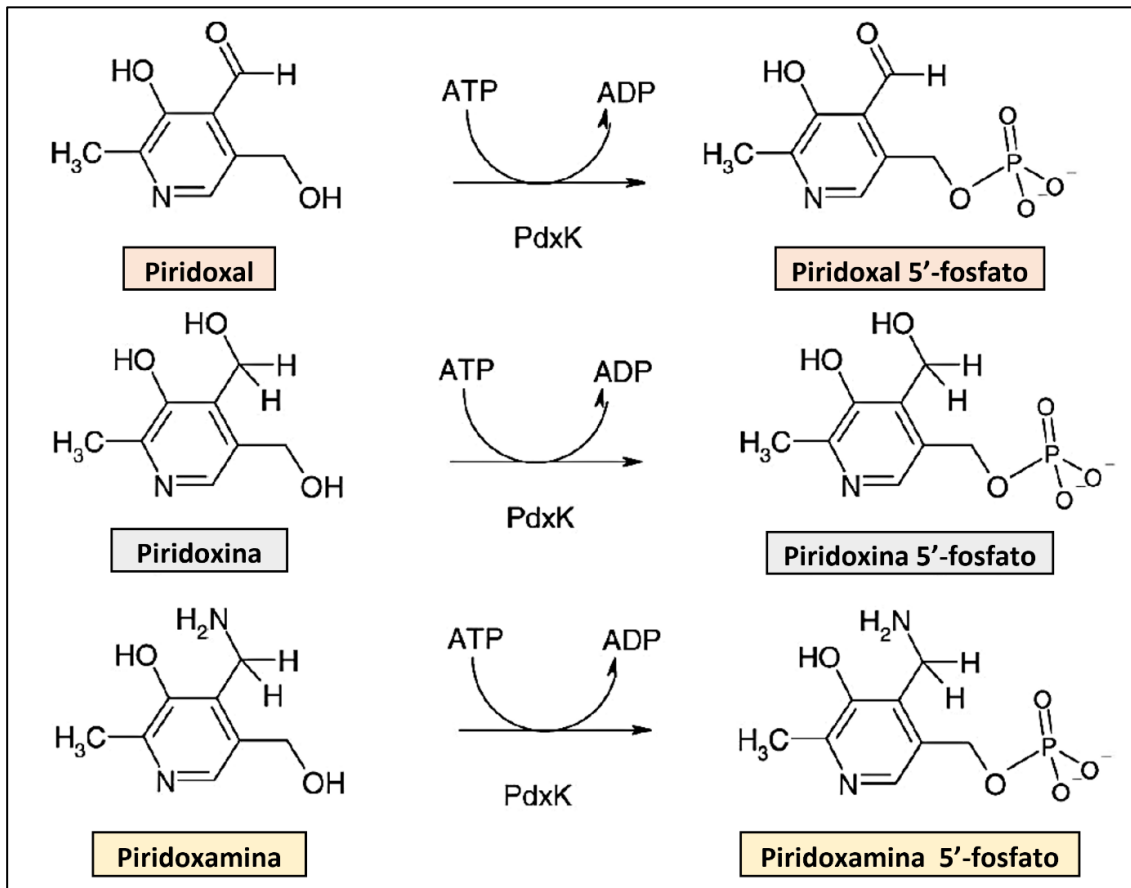
Em resumo, a Doença de Chagas é uma doença negligenciada, que tem sido pouco estudada, uma vez que os investimentos nas pesquisas sobre a doença ainda são baixos, dificultando o avanço no tratamento e cura da doença (DE OLIVEIRA et al., 2021). Considerando a importante prevalência da doença e as perdas humanas e sociais que provoca, tanto a prevenção quanto o tratamento da doença de Chagas ainda permanecem desafiadores, para a ciência e para as políticas públicas em países com a doença endêmica (TORRES et al., 2022). É fundamental investir em novas opções terapêuticas que possam tratar a fase aguda, com evidências sólidas de eficácia e segurança para eliminar o parasita com o mínimo de efeitos

colaterais (TORRES et al., 2022) e para garantir que as pessoas afetadas por esta doença possam ter acesso a tratamentos eficazes e seguros.

2.1.2. Piridoxal quinase de *Trypanosoma cruzi*

A piridoxal quinase (PdxK) (EC 2.7.1.35) (KUMAR et al., 2018) pertence à superfamília de enzimas riboquinase (DEKA et al., 2019) e catalisa a fosforilação de *piridoxal*, *piridoxina* e *piridoxamina* aos seus correspondentes 5'-fosfatos, *piridoxal 5'-fosfato*, *piridoxina 5'-fosfato* e *Piridoxamina 5'-fosfato*, como mostrado na Figura 10 (NEWMAN et al., 2006). A vitamina B6 compreende estes 6 compostos, porém a forma cataliticamente ativa é a molécula piridoxal 5'-fosfato (PLP), que atua como cofator em mais de 140 reações enzimáticas diferentes (HUANG et al., 2017), entre elas reações de transaminação, descarboxilação, racemização e eliminação ou reações de substituição de aminoácidos (ELIOT; KIRSCH, 2004), portanto a PdxK apresenta papel fundamental no metabolismo. Células de mamíferos são incapazes de sintetizar vitamina B6 pela via *de novo*, enquanto bactérias, plantas e fungos possuem uma via funcional de síntese de vitamina B6 (WRENGER et al., 2005).

Figura 10. Reações catalisadas pela PdxK. Fosforilação de piridoxal, piridoxina e piridoxamina aos seus correspondentes 5'-fosfatos.

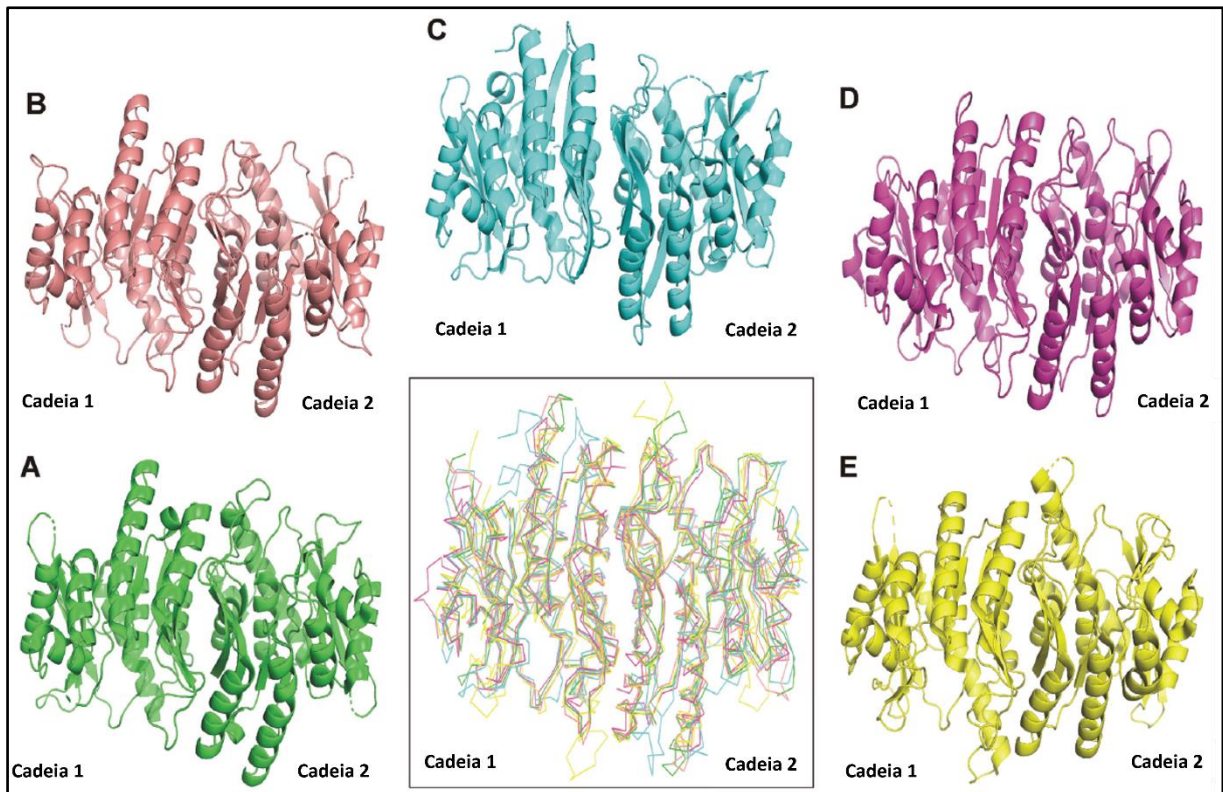


Fonte: Adaptado de (NEWMAN et al., 2006).

A respeito da parte estrutural da enzima PdxK, já foram obtidas as estruturas cristalográficas da PdxK de alguns organismos, tais como *Escherichia coli* (SAFO et al., 2004, 2006), *Ovis aries* (MARAS et al., 1999), *Bacillus subtilis* (NEWMAN et al., 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (KIM; HONG, 2016), *Staphylococcus aureus* (NODWELL et al., 2014), *Salmonella typhimurium* (DEKA et al., 2019), *Homo sapiens* (CAO et al., 2006) e *Trypanosoma brucei* (JONES et al., 2012).

Estudos comparativos da PdxK de organismos diferentes indicam que esta proteína é um homodímero com um único sítio ativo presente em cada subunidade (ARE et al., 2020b; GANDHI et al., 2012; GAO et al., 2019; JONES et al., 2012; SAINI; ARE; QURESHI, 2022; TARIQUE et al., 2020) e cada monômero consiste em folhas β centrais rodeadas por α -hélices (SAINI; ARE; QURESHI, 2022), como pode ser visualizado pela Figura 11, que mostra a interface dimérica de algumas piridoxal quinases.

Figura 11. Interface dimérica de algumas PdxKs. A: PdxK de *Leishmania donovani* (PDB ID: 6K8Z), B: PdxK de *Trypanosoma brucei* (PDB ID: 3ZS7), C: PdxK de *Plasmodium falciparum* (PDB ID: 6SU9), D: PdxK de *Entamoeba histolytica* (PDB ID: 4S1H), E: PdxK de *Homo sapiens* (PDB ID: 2YXU). A caixa central representa a sobreposição destas estruturas.



Fonte: Adaptado de (SAINI; ARE; QURESHI, 2022)

Além da semelhança estrutural, estas proteínas apresentam resíduos conservados na região catalítica da enzima (SAINI; ARE; QURESHI, 2022), apresentando sequências ricas em glicina (GxGD) que estão localizadas próximo ao sítio de piridoxal adenosina trifosfato, sugerindo que esta sequência pode estar envolvida na interação com o substrato (SAINI; ARE; QURESHI, 2022; SCOTT; PHILLIPS, 1997).

Sobre o mecanismo catalítico, o processo tem sido elucidado para enzimas PdxK não parasitárias, como a PdxK de *Escherichia coli* (SAFO et al., 2004, 2006) e de ovelhas (MARAS et al., 1999), sugerido como mecanismo de reação sequencial aleatório (SAINI; ARE; QURESHI, 2022). As reações sequenciais são aquelas nas quais todos os substratos devem se combinar com a enzima antes que a reação ocorra, resultando na liberação de produtos. Além disso, as reações sequenciais podem ser subclassificadas naquelas que têm uma ordem obrigatória de adição de substrato à enzima (mecanismo ordenado) e naquelas que não possuem

uma ordem preferencial para adição de substrato (mecanismo aleatório). Algumas quinases possuem mecanismo aleatório (VOET; VOET, 2013).

Diante da importância da molécula piridoxal 5'-fosfato como cofator, a remoção ou inibição da atividade da PdxK resulta em múltiplas catástrofes metabólicas. Logo, isto a torna um alvo potencial para tratamento de doenças, em especial, doenças parasitárias. (JONES et al., 2012). Alguns estudos da PdxK na presença de inibidores já foram realizados, levando-se em consideração bibliotecas de pequenas moléculas. No caso da Leishmaniose, quatro inibidores (ZINC15635530, ZINC15635539, ZINC40290597 e ZINC72198250) foram identificados através de análises in silico contra a PdxK de *Leishmania donovani* e mostraram baixa afinidade para a enzima humana (KUMAR et al., 2018; SAINI, ARE; QURESHI, 2022) também já foram investigados e novos quimioterápicos contra a parasita da malária humana *Plasmodium falciparum* (KIMURA et al., 2014; SAINI; ARE; QURESHI, 2022).

Diante deste cenário, a piridoxal quinase de *Trypanosoma cruzi* é uma proteína pouco estudada, não há estrutura cristalográfica depositada e/ou descrita na literatura e dada sua importância para o metabolismo do parasita, pode ser considerada um alvo bastante promissor para o tratamento da Doença de Chagas.

2.2. Objetivos

Diante da relevância do estudo da piridoxal quinase de *Trypanosoma cruzi* como alvo no combate à Doença de Chagas, os **objetivos gerais** desta parte trabalho incluíram:

- Obter a proteína recombinante PdxK de *T. cruzi* por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, purificar e realizar estudos de caracterização biofísica;
- Realizar estudos estruturais da PdxK de *T. cruzi* a partir de ferramentas de bioinformática;

De modo que os seguintes **objetivos específicos** foram estabelecidos:

- Realizar experimentos de expressão de modo a obter a melhor metodologia de superexpressão;
- Realizar testes de purificação com o intuito de maximizar o rendimento, e obter alto grau de pureza;
- Realizar ensaios de dicroísmo circular;
- Realizar ensaios de atividade entre a proteína recombinante PdxK obtida e o seu substrato principal, o piridoxal.
- Realizar outros experimentos de caracterização biofísica, tais como Calorimetria Diferencial de Varredura e Análise por Espectrofluorimetria, a fim de obter informações mais detalhadas sobre a PdxK;
- Realizar estudos de modelagem molecular, com a finalidade de encontrar um bom modelo molecular da estrutura da PdxK de *T. cruzi* para futuros estudos in silico de interação proteína-inibidor (docagem molecular).

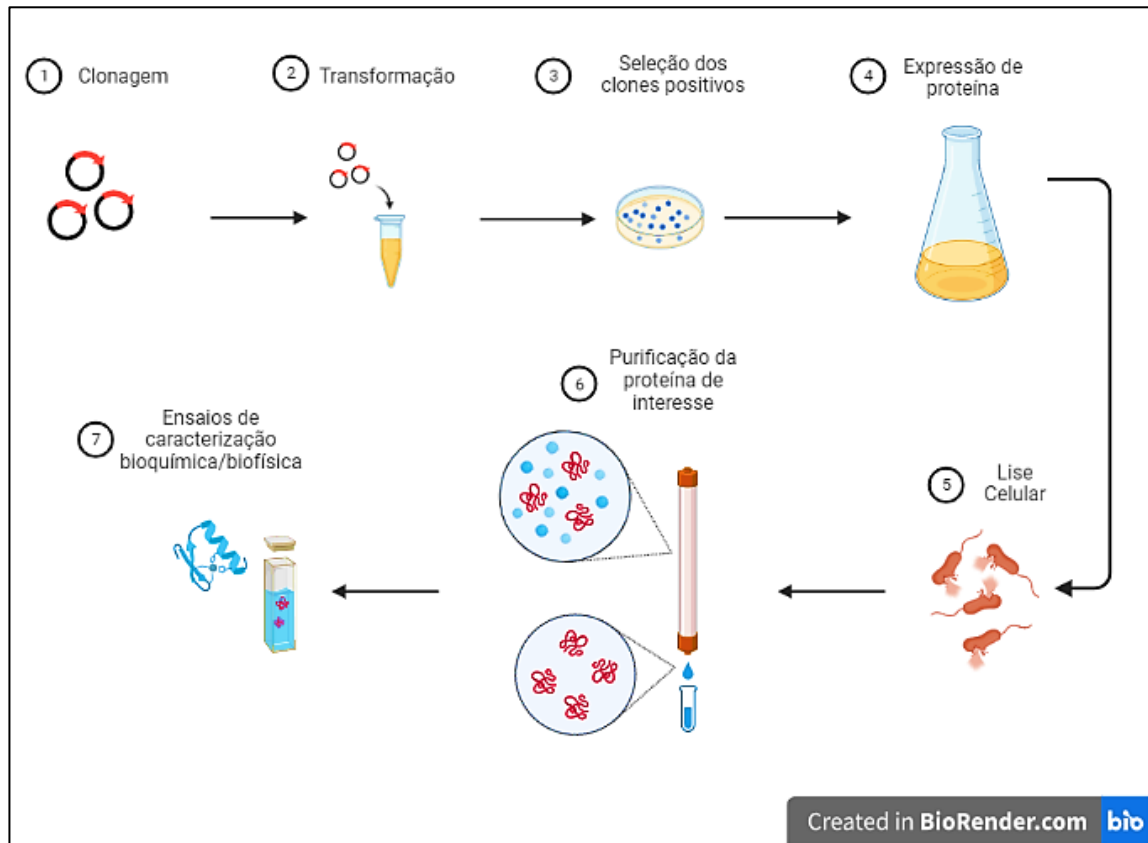
2.3. Fundamentos teóricos

2.3.1. Produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Os primeiros estudos envolvendo a produção de proteínas recombinantes datam de mais de 30 anos (PUETZ; WURM, 2019) e revolucionaram a bioquímica, já que a capacidade de expressar e purificar uma proteína recombinante em grande quantidade abre caminhos para estudos de caracterização bioquímica (ROSANO; CECCARELLI, 2014) e possibilidade de uso em processos industriais (indústria alimentícia, farmacêutica, química etc.) ou até mesmo para fins de pesquisa (PUETZ; WURM, 2019).

Existem vários hospedeiros para produção de proteínas recombinantes, tanto procarióticos quanto eucarióticos (FIRAT DUZENLI; OKAY, 2020). Diante disso, a *Escherichia coli* (sistema procariótico de expressão) é altamente utilizada na biotecnologia industrial pois apresenta diversas vantagens comparativamente a outros organismos, uma vez que a metodologia usando este sistema constitui-se em um procedimento fácil, barato e rápido (HAYAT et al., 2018). Ela compreende etapas simples em um nível teórico, sendo que podemos resumir na seguinte sequência: clonar o gene de interesse em um vetor de expressão, inserir o DNA recombinante dentro da célula hospedeira (processo chamado transformação), selecionar as células hospedeiras que contém este DNA recombinante (chamados de clones positivos), cultivar a bactéria em condições adequadas para induzir a produção da proteína de interesse, realizar a lise celular, purificar a proteína de interesse e, por fim, realizar ensaios de caracterização bioquímica/biofísica (ROSANO; CECCARELLI, 2014), de acordo com o esquema mostrado na Figura 12.

Figura 12. Etapas do processo de expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.



Fonte: Autoria própria, Criado por Biorender.

No entanto, durante a realização destas etapas na prática, diversos problemas podem acontecer, tais como baixo crescimento do hospedeiro, a formação de corpos de inclusão, baixa ou nenhuma expressão da proteína de interesse etc. (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Por isso, diversas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar o processo quando há problemas na expressão, como substituir o organismo hospedeiro, o vetor de expressão, os meios de cultura, entre outros (ZHANG et al., 2019).

2.3.2. Modelagem Molecular

A modelagem por homologia é uma metodologia computacional, dentro da área da biologia estrutural, com o objetivo de prever estruturas em 3D de proteínas. A base do método é utilizar uma estrutura de proteína em alta resolução para gerar um modelo de estrutura 3D de uma outra proteína que não possui estrutura determinada e que apresenta similaridade com

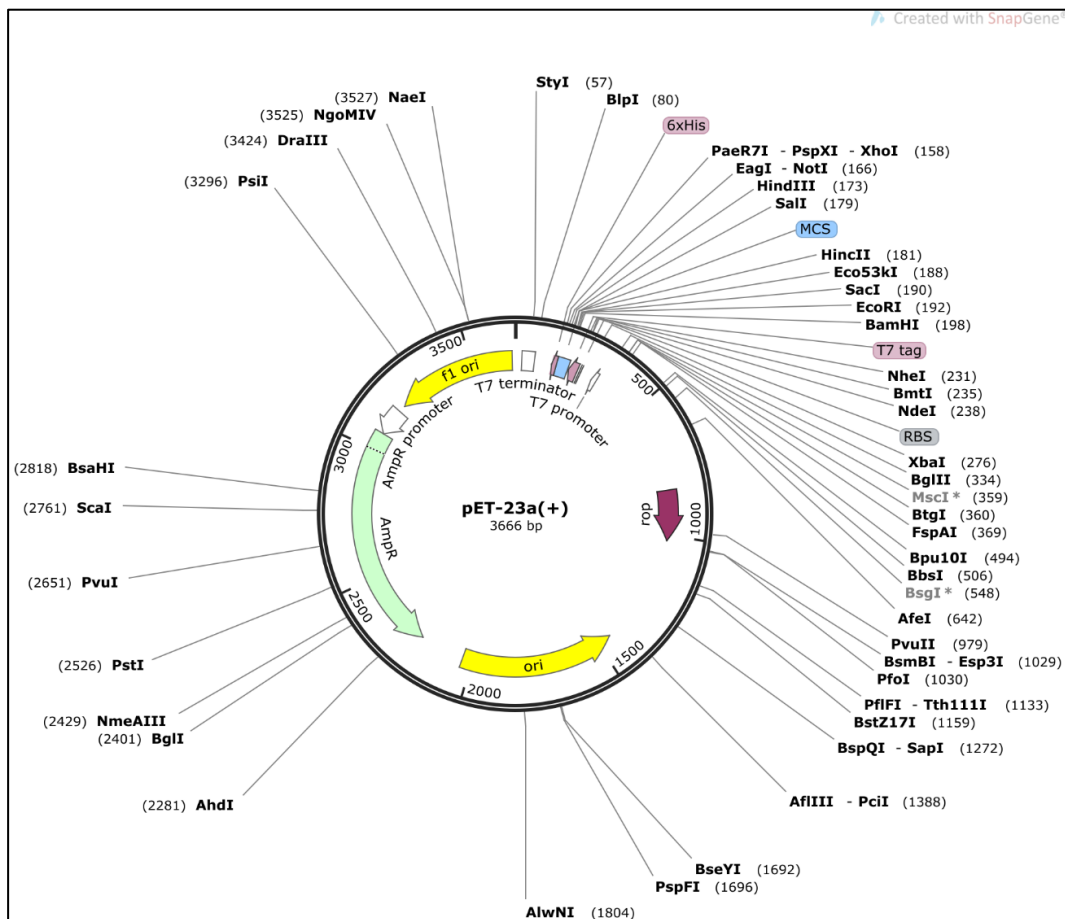
proteína conhecida. Isto pode ser possível, uma vez que a conformação estrutural de uma proteína é mais conservada do que sua sequência de aminoácidos, ou seja, proteínas de uma mesma família estão relacionadas evolutivamente, além disso, compartilham sequências e estruturas similares. Ela apresenta um papel importante no design de medicamentos, quando a estrutura 3D de uma proteína com relevância terapêutica não está disponível (BISHOP; DE BEER; JOUBERT, 2008). Recentemente, o campo da biologia estrutural computacional tem sido revolucionado pelo uso de ferramentas computacionais que realizam a previsão de ângulos de torção e inserção de átomos por meio de cálculos matemáticos e estatísticos (SILVA et al., 2021). O *AlphaFold* tornou-se uma revolução no campo da bioinformática depois de ser capaz de prever coordenadas 3D da estrutura de proteínas únicas e de complexos de proteínas (ISMI et al., 2022).

2.4. Metodologia

2.4.1. Propagação do DNA recombinante pET23a-PdxK

O DNA recombinante pET23a-PdxK já havia sido obtido e utilizado por outros alunos no Laboratório de Bioquímica Molecular e Estrutural (*BioQEst*), sendo que neste trabalho continuou-se os estudos com este recombinante. A sequência da PdxK de *T. cruzi* está entre os sítios de *NdeI* e *EcoRI* no pET23a-PdxK. O mapa do plasmídeo pET23a(+) é mostrado na Figura 13.

Figura 13. Mapa do plasmídeo pET23a(+).

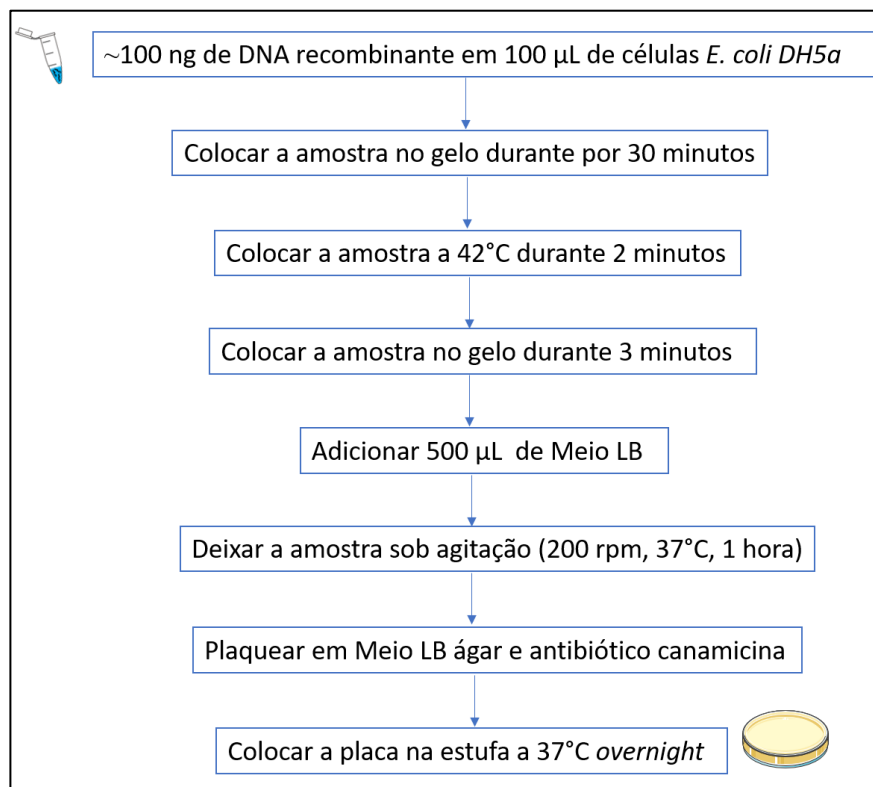


Fonte: Snapgene

Para propagação do DNA recombinante pET23a-PdxK foi realizada transformação deste DNA em células de *Escherichia coli* DH5α (*E. coli* DH5α). Em um microtubo contendo 100 μL de células competentes foram adicionados aproximadamente 100 ng de pET23a-PdxK.

Incubou-se durante 30 minutos no gelo, em seguida foi realizado o choque térmico à 42°C durante 2 minutos. Após o choque térmico, a mistura voltou ao gelo por mais 3 minutos. Após essa etapa, foram adicionados 500 µL de meio Luria-Bertani (LB) (10g de triptona, 5g de extrato de levedura e 10g de NaCl em 1L de água deionizada, pH 7,0) ao microtubo, sendo este colocado no shaker (*MAXQ500 – Thermo Fisher Scientific*) nas seguintes condições: agitação de 200 rpm, à 37°C, durante 1 hora. Posteriormente, o conteúdo do microtubo foi centrifugado e o excesso de meio LB foi descartado. As células foram ressuspensas no meio LB restante, adicionados à uma placa de Petri, contendo 20 mL de meio LB ágar (10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl e 15g de ágar em 1L de água deionizada, pH 7,0) e antibiótico ampicilina na concentração final de 25 µg/mL. A placa foi mantida na estufa a 37°C durante 16 horas (*overnight*) para crescimento de colônias (Figura 14). A partir de colônias crescidas na placa foram preparados dois pré-inóculos (37°C, 200 rpm, *overnight*) e a extração de pET23a-PdxK foi feita com o uso do kit *GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific)*, seguindo-se as instruções do fabricante, e as amostras de DNAs obtidas foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro *DS-11+ (De Novix)* do laboratório do Grupo de Química Medicinal do Instituto de Química de São Carlos (IQSC); posteriormente armazenadas a -20°C.

Figura 14. Transformação de DNA recombinante em células *E. coli* DH5α.



2.4.2. Experimentos de expressão e purificação da PdxK de *T. cruzi*

Nesta seção estão descritos os procedimentos experimentais realizados para obtenção e purificação da PdxK de *T. cruzi*. Como foram testadas diferentes condições de ensaios, cada experimento está numerado e detalhado para facilitar a compreensão do desenvolvimento deste trabalho.

Experimento 1 - Teste de expressão em meio LB

Inicialmente, o recombinante pET23a-PdxK e o plasmídeo pET23a(+) foram transformados em células da linhagem *E. coli* Rosetta(DE3), obedecendo a mesma metodologia descrita em 2.4.1, porém adicionando além de ampicilina na concentração de 25 µg/mL, o antibiótico cloranfenicol, na concentração final de 34 µg/mL. No dia seguinte, após o crescimento de colônias, foram preparados dois pré-inóculos contendo 5 mL de meio LB em cada, contendo os mesmos antibióticos e nas concentrações anteriormente mencionadas. Estes pré-inóculos foram deixados sob agitação no *shaker*, a 200 rpm e 37°C, *overnight*. Além disso, outro pré-inóculo foi preparado a partir de um estoque de células de *E. coli* Rosetta(DE3) transformado com pET23a(+) que já se encontrava no laboratório e estava armazenado no freezer a -80°C.

Foram realizados dois testes de expressão de PdxK de *T. cruzi* e um teste de expressão controle. Deste modo, cada pré-inóculo foi adicionado em um erlenmeyer contendo 100 mL de meio LB e os antibióticos ampicilina e cloranfenicol, nas concentrações finais de 25 µg/mL e 34 µg/mL, respectivamente. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 200 rpm e 37°C até que a D.O. entre 0,4 e 0,6 de cada fosse atingida. Adicionou-se isopropil β-D1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,6 mM, deixando-os sob agitação de 200 rpm, a 20°C durante 17 horas. Ao final do experimento, os meios de cultura foram centrifugados a 9000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Os meios de cultura foram descartados e os sedimentos bacterianos obtidos foram estocados a -20°C. Alíquotas antes da adição de IPTG e ao final do experimento foram recolhidas para posterior análise em eletroforese em gel de poli-acrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE) 15% de acrilamida. O preparo das amostras foi feito adicionando-se 20 µL de amostra e 20 µL de tampão de amostra 2X (100 mM Tris pH 6,8; 0,2% (peso/volume) bromofenol blue; 20% glicerol, 4% (peso/volume) SDS; 200mM Ditiotreitól (DTT)), seguido de aquecimento a 95°C durante 5 minutos. Somente 10 µL de cada amostra preparada foram adicionados em cada poço do gel. Em relação do padrão de massa

molecular, foram utilizados 7 μ L do padrão *Pierce™ Unstained Protein MW Marker – Thermo Scientific™*. A corrida foi iniciada a 90V até atingir o gel de resolução e depois mudou-se a voltagem para 120V até atingir o final da corrida. O gel foi corado com solução *Comassie Blue* (40% metanol, 20% de ácido acético, 0,5% *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 39,5% Água deionizada) e descorado com solução descorante (40% Metanol, 20% Ácido Acético, 40% Água deionizada). Todas as análises de eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE) mencionadas neste trabalho foram realizadas conforme descrito neste parágrafo (LAEMMLI, 1970).

Experimento 2 -Teste de expressão em meio SOB

No experimento 2 foram realizados um teste de expressão de PdxK e um teste controle, mudando apenas o meio de crescimento das bactérias, mantendo-se as condições do experimento 1. O meio de cultura utilizado foi o *Super Optimal Broth (SOB)* (2g de Triptona, 0,5g de Extrato de Levedura, 0,05g de NaCl, 1 mL de solução KCl 250 mM, 1 mL de solução MgCl₂ 1 M, em 100 mL de água deionizada, pH 7,0). Este meio de cultura é rico em nutrientes para o cultivo de *E. coli*, sendo frequentemente utilizado para fornecer alta eficiência de transformação (<https://www.teknova.com/sob-medium>). Alíquotas antes da adição de IPTG e ao final do experimento foram recolhidas para posterior análise em SDS/PAGE.

Experimento 3- Lise dos sedimentos bacterianos

Neste experimento foram realizados dois testes de lise com os sedimentos bacterianos obtidos anteriormente da expressão de PdxK (um deles preparado com o meio LB e o outro com o meio SOB). O protocolo de lise foi realizado de acordo com as informações descritas no parágrafo abaixo.

A cada 1 g de sedimento bacteriano foram adicionados 5 mL de tampão de lise (Tris HCl 20 mM, NaCl 150 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM, glicerol 10% v/v, 2-mercaptoetanol 0,05%). A mistura foi homogeneizada com auxílio de uma pipeta, e adicionados fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, lisozima 0,5 mg/mL e 0,5 U de DNase. Posteriormente, a mistura foi incubada no gelo durante 30 minutos, e o conteúdo foi sonificado em 7 pulsos de 30 segundos com intervalos de 59,9 segundos para dissipação do calor

numa amplitude de 20% no sonicador *Sonic Dirmembratos Model 500 (Thermo Fisher Scientific)* laboratório do Grupo de Química Medicinal e Biológica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Por fim, as amostras foram centrifugadas a 4°C a 14000rpm por 30 minutos para separar a fração insolúvel (*pellet*-precipitado) do sobrenadante.

Experimento 4 - Teste de *salting out*

A amostra de sobrenadante obtida ao final do experimento 3 (da expressão realizada em meio SOB) foi dividida em alíquotas de 1 mL. Cada alíquota recebeu uma determinada porcentagem de sulfato de amônio com o objetivo de precipitar a proteína de interesse (10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%). Em seguida, cada amostra foi incubada durante 15 minutos no gelo e depois centrifugada a 15090 rpm por 15 minutos, a 4°C. As amostras de sobrenadante e precipitado foram separadas e analisadas por SDS/PAGE.

Experimento 5 - Teste de purificação por cromatografia de exclusão de tamanho

O experimento 5 foi a continuação do processo de purificação. Após etapa de lise e precipitação por sulfato de amônio, a amostra do experimento anterior foi ressuspendida em 7 mL de tampão (Tris 20 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5). Em seguida, foi aplicada na coluna *Superdex 200 16/600 – GE Healthcare* acoplada ao equipamento *AKTA Purifier GE Healthcare*, e eluída com o mesmo tampão, no fluxo de 1mL por minuto. As alíquotas obtidas na eluição foram numeradas e analisadas por SDS/PAGE.

Experimento 6 - Teste de purificação em três etapas: *salting out*, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão de tamanho

No experimento 6 foi realizada a expressão de PdxK de *T. cruzi* em células *E. coli* Rosetta(DE3) e prosseguiu-se com a lise, seguindo todo o protocolo descrito anteriormente. Após a etapa de lise, para obter a proteína recombinante com alto índice de pureza, três etapas de purificação foram realizadas. A primeira por precipitação com sulfato de amônio, e as duas seguintes serão por cromatografia utilizando o equipamento *AKTA Purifier GE Healthcare*. Ao conteúdo total da fração sobrenadante obtida após a lise, foi adicionado a porcentagem de 30%

de sulfato de amônio. Em seguida, esta amostra foi incubada no gelo sob agitação durante 15 minutos e por fim, foi centrifugada a 19000 rpm por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o precipitado obtido foi ressuspendido em tampão Tris (20 mM, 25 mM NaCl pH 7,4) e submetido à diálise contra tampão Tris (20 mM, 25 mM NaCl pH 7,4) sob agitação, à 4°C, durante 16 horas. Após, a amostra dialisada foi centrifugada a 19000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Depois, foi purificada no equipamento *AKTA Purifier GE Healthcare* na coluna *HiTrap™ Q FF 5 mL* de troca aniônica. Foi eluída em gradiente de tampão Tris (Tris 20 mM, 1M NaCl, pH 7,4), com fluxo de 1 mL por minuto. As alíquotas obtidas na eluição foram numeradas e analisadas por SDS/PAGE. Após visualização do resultado da eletroforese, as amostras que continham a proteína de interesse foram misturadas e concentradas em um concentrador *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit*, depois a amostra foi novamente centrifugada a 19000 rpm a 4°C durante 10 minutos para remover qualquer precipitado e foi purificada utilizando o equipamento *AKTA Purifier GE Healthcare* na Coluna *HiLoad™ 16/600 Superdex 200*, sendo eluída com tampão Tris (Tris 20 mM e NaCl 150 mM, pH 7,4) com fluxo de 1 mL por minuto. As alíquotas obtidas na eluição foram numeradas, e as frações de mesmo pico foram misturadas, concentradas no concentrador *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit* e analisadas tanto por SDS/PAGE como por eletroforese em gel não desnaturante. Além disso, estas amostras de proteínas purificadas foram quantificadas a 280 nm, utilizando o espectrofotômetro *DS-11+ (De Novix)* do laboratório do Grupo de Química Medicinal e Biológica do IQSC. O resultado do gel desnaturante foi utilizado no programa *ImageJ* para análise de porcentagem de pureza das amostras obtidas.

Para melhor compreensão da sequência de experimentos, a Figura 15 apresenta um resumo dos experimentos de 1 a 6 desta seção.

Figura 15. Resumo dos experimentos de expressão e purificação da PdxK de *T. cruzi* (Experimentos de 1 a 6).



Fonte: Autoria própria.

2.4.3. Experimentos de caracterização da PdxK de *T. cruzi* recombinante

Nesta seção estão descritos os procedimentos experimentais para determinação da estrutura secundária utilizando a técnica de dicroísmo circular e na sequência, a metodologia utilizada para determinação da atividade enzimática da PdxK recombinante de *T. cruzi*.

- **Determinação do conteúdo de estrutura secundária por dicroísmo circular**

A técnica de dicroísmo circular é baseada no fenômeno de diferença de absorção entre a luz polarizada circularmente à direita e à esquerda, que surge após a radiação passar através de uma molécula opticamente ativa, ou seja, quiral. No espectro de dicroísmo circular de uma substância, as pequenas diferenças na absorção entre estes dois componentes da luz são medidas em função do comprimento de onda (KUMAGAI; ARAUJO; LOPES, 2017).

A espectroscopia ultravioleta (UV) de dicroísmo circular é amplamente utilizada como uma técnica analítica para investigar o enovelamento de proteínas e acompanhar as mudanças conformacionais na estrutura secundária. Na região do UV distante (190-250nm), a ligação peptídica é um dos principais cromóforos a serem monitorados. A técnica apresenta diversas vantagens, entre as quais estão: fácil preparação de amostra (as proteínas são diluídas em um tampão apropriado ou depositadas em filmes desidratados), pequena quantidade de proteína é suficiente (a concentração usual de proteína é na faixa de 0,1- 0,15 mg/mL), é um teste não destrutivo (após medição pode-se recuperar a amostra), é um teste rápido (a coleta de um espectro tem uma duração aproximada de 10 minutos) e fácil interpretação das bandas espectrais em termos de conformação de proteínas (todos os tipos de estruturas canônicas têm bandas em posições bem definidas dentro da região UV) (KUMAGAI; ARAUJO; LOPES, 2017). (WALLACE, JANES, 2009).

Os testes de dicroísmo circular foram realizados com três concentrações diferentes de proteína 2 μ M, 4 μ M e 6 μ M diluídas no tampão 2mM Tris pH7,4, 5mM NaCl, 0,5% glicerol e 0,5% β -mercaptoetanol. Os experimentos foram realizados no espectrômetro Jasco J-815 da Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), usando comprimento de onda UV/visível (250-190 nm), com data pitch de 0,5nm, scanning speed de 100nm/min, D.I.T de 0.5 sec, band with de 1.00nm e os gráficos foram gerados pelo programa Origin. Para estimar o conteúdo de estruturas secundárias para obter as porcentagens de hélice- α e folha- β foi utilizado o programa CDNN Deconvolution® (ATKINS e PAULA, 2011).

- **Teste de atividade enzimática**

O protocolo desenvolvido neste trabalho para o teste de atividade enzimática para a PdxK recombinante de *T. cruzi* foi baseado em experimentos realizados para outras PdxKs, uma vez que o piridoxal 5'-fosfato tem absorvância máxima a 388 nm com coeficiente de extinção de $4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a pH 7,0, enquanto o piridoxal não absorve neste comprimento de onda (ARE et al., 2020; DI SALVO; HUNT; SCHIRCH, 2004; JONES et al., 2012; KASARAGOD et al., 2020; KUMAR et al., 2018; MISSNER et al., 2009; PARK et al., 2004; SCOTT; PHILLIPS, 1997; WRENGER et al., 2005).

Para isto, foram utilizados Tampão Fosfato 70 mM pH 7,0, MgCl_2 2 mM, ATP 1 mM, Piridoxal 300 μL e 20 μg de enzima em um volume total de 200 μL . Os testes de atividade foram realizados à temperatura ambiente. As amostras de enzima testadas foram as obtidas na última etapa de purificação do experimento 6 descrita na seção anterior. A adição da amostra de enzima se deu por último, e logo em seguida foi contabilizado o tempo reacional. Foram retiradas alíquotas de 1 μL e realizada as medidas a absorvância a 388 nm no espectrofotômetro *DS-11+* (*De Novix*) nos seguintes tempos: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min e 1 hora. O tubo controle (branco) foi preparado sem a adição de enzima. Os dados de absorvância foram plotados em um gráfico no software Origin2022. Foram realizadas triplicatas destes experimentos e após 4 dias que a amostra de enzimas estava armazenada a 4°C, as mesmas foram testadas novamente para verificar se ainda apresentavam atividade enzimática. Além disso, foi realizado o experimento de atividade enzimática levando em consideração o dobro de substrato, mantendo-se as outras condições anteriormente mencionadas.

2.4.4. Análise in silico da PdxK de *T. cruzi*

- **Informações gerais**

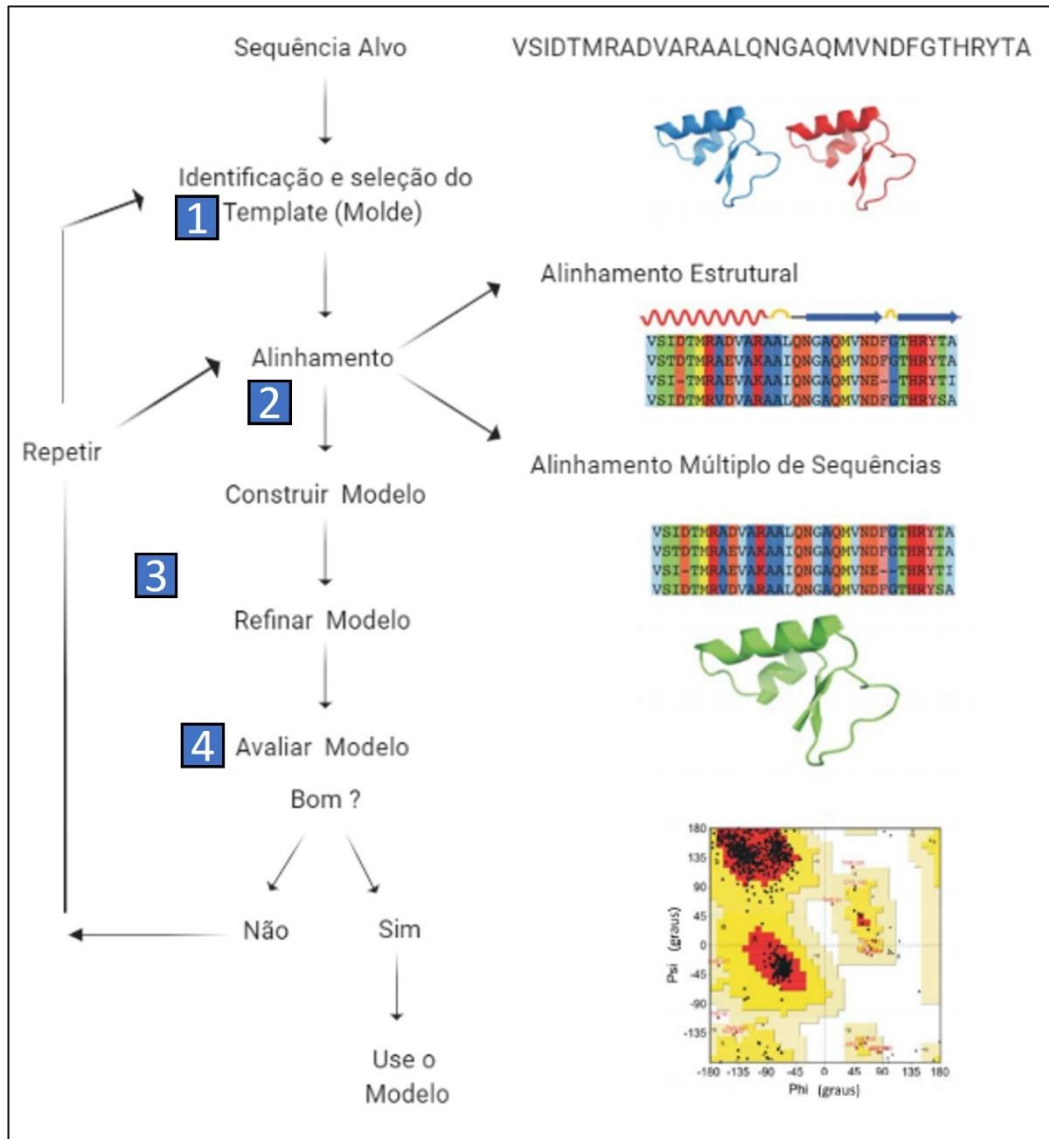
Alguns parâmetros teóricos a respeito de proteínas, tais como predição de estrutura secundária, ponto isoelétrico teórico (pI teórico) e massa molecular podem ser encontrados a partir da sequência de aminoácidos da proteína. Desta forma, primeiramente foi realizada uma busca no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para encontrar a sequência de aminoácidos da proteína PdxK de *T. cruzi*.

A predição da estrutura secundária foi realizada pela ferramenta online *PSIPRED* disponível em <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>; a predição de massa molecular, pI teórico, índice alifático e Grande média de Hidropatia - GRAVY foram obtidos pelo uso da ferramenta online *Expasy-Protparam* disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>, utilizando a sequência de aminoácidos da PdxK disponível no NCBI de código *GenBank*: RNC57787.1.

- **Modelagem Molecular**

O método de modelagem molecular por homologia é dividido em quatro etapas: identificação do molde, alinhamento, construção de modelos e aperfeiçoamento, e validação, conforme ilustrado na Figura 16, sendo que cada passo pode ser realizado com diferentes ferramentas computacionais. Inicialmente, é necessário identificar um molde, que deverá ser semelhante à sequência-alvo. Para isso, pode-se submeter a sequência alvo na ferramenta online BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências encontradas podem ser consideradas candidatas a moldes, entretanto o ideal é identificar os moldes com maior identidade percentual com o alvo, que apresente alta resolução e que esteja com (ou sem) os ligantes e/ou cofatores (BISHOP; DE BEER; JOUBERT, 2008). A próxima etapa é fazer um alinhamento da sequência alvo com a(s) estrutura(s) molde selecionada(s). Para a construção do modelo, vários programas de modelagem com diferentes formas de construir as estruturas 3D estão disponíveis. O método mais comum é das restrições espaciais. Ele garante que a estereoquímica do modelo gerado seja válida e usa também técnicas de otimização para atender às restrições espaciais. A ferramenta mais utilizada é o programa *Modeller* (<https://salilab.org/modeller/>). O último passo é a validação do modelo. Uma ferramenta que pode ser utilizada é o SAVES v5.0 (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>). Alguns modelos devem ser refinados, por isso a Figura 16 mostra que se o modelo não apresentar bons parâmetros, haverá um ciclo entre a construção, a validação do modelo e o refinamento. Ajustes de alinhamento podem ajudar no refinamento do modelo construído (BISHOP; DE BEER; JOUBERT, 2008).

Figura 16. As 4 etapas da modelagem molecular por homologia.



Fonte: Adaptado de (BISHOP; DE BEER; JOUBERT, 2008)

Desta forma, para obtenção do modelo molecular foi realizada uma busca de estruturas depositadas no Banco de Dados *Protein Data Bank* (PDB) a partir da sequência de aminoácidos da PdxK de *T. cruzi* utilizando a ferramenta “*Basic Local Alignment Search Tool*” (BLAST) disponível em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para selecionar os *templates* apropriados. Em seguida, as sequências de aminoácidos dos *templates* escolhidos e da PdxK de *T. cruzi* foram inseridas na ferramenta online ESPript (<https://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) para identificar estruturas secundárias similares. Foram realizados dois testes de modelagem molecular no software *Modeller* (*Program for Comparative Protein Structure Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints*) na Versão 9.22. No teste inicial, a estrutura da PdxK de

Trypanosoma brucei (PDB: 3zs7) foi usada como *template*, enquanto no segundo teste, dois *templates* foram usados simultaneamente (PDBs: 3zs7 e 2yxt [Piridoxal humana]) e a sequência-alvo utilizada em ambos os testes foi a sequência do código RNC57787.1.

Em cada teste foram gerados 100 modelos, que posteriormente foram analisados de acordo com a menor energia e pelos gráficos de Ramachandram (obtidos a partir da utilização da ferramenta online *SAVES* v. 6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>)) para escolha do modelo ideal. Os modelos selecionados em cada teste foram comparados e, apenas um foi escolhido para continuar com as análises de potencial de superfície eletrostática e superfície hidrofóbica. A visualização das estruturas obtidas, dos *templates* e estudos de superfícies hidrofóbicas e eletrostáticas, foi realizada com o software *Pymol* Versão 2.5. Além disso, foi utilizado o *AlphaFold*, uma ferramenta online disponível em <https://alphafold.ebi.ac.uk/>, para investigar a estrutura da proteína PdxK com o código A0A2V2WJX1. O modelo obtido pelo *AlphaFold* foi comparado com um dos modelos gerados pelo *Modeller*.

2.5. Resultados e Discussão

2.5.1. Propagação do DNA recombinante pET23a-PdxK

Conforme o protocolo descrito na seção 2.4.1. foi realizada a extração (*Miniprep*) de pET23a-PdxK, a partir de dois pré-inóculos contendo 5 mL de meio cada. As concentrações obtidas de cada extração estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Concentrações de pET23a-PdxK obtidas a partir de *miniprep*.

Amostra	Concentração de pET23a-PdxK
Microtubo-1	56,6 ng/μL
Microtubo-2	61,5 ng/μL

Fonte: Autoria própria.

2.5.2. Experimentos de expressão e purificação da PdxK de *T. cruzi*

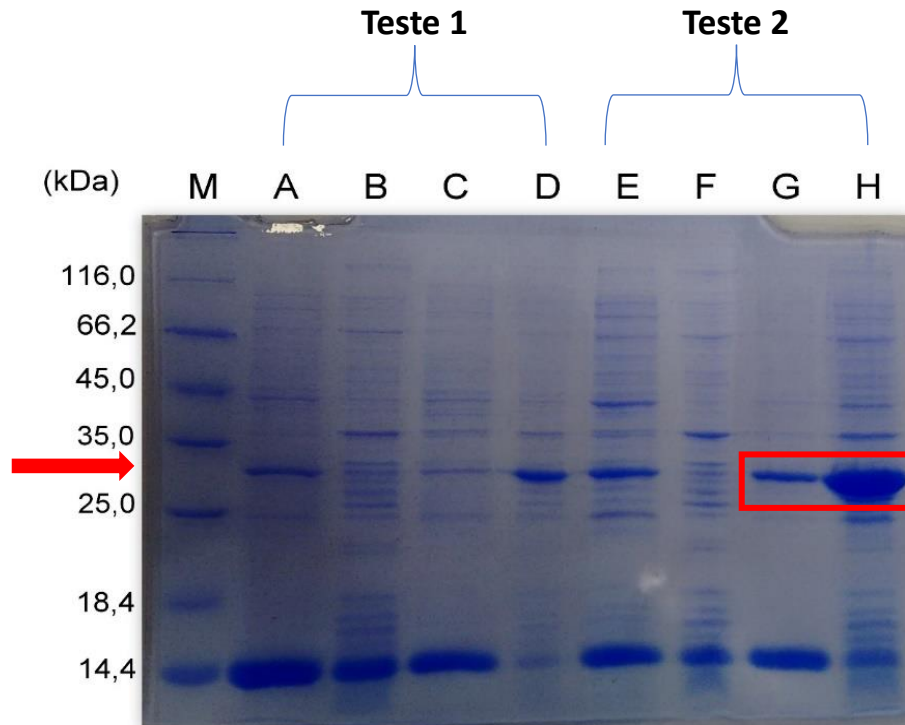
Com o intuito de facilitar a compreensão do andamento deste trabalho, os resultados são apresentados de acordo com os experimentos numerados na seção 2.4.2.

Experimento 1- Teste de expressão em meio LB

Há alguns anos, uma aluna do grupo do Laboratório de Bioquímica Estrutural, sob orientação da Profa. Dra. Fernanda Canduri, trabalhou com o recombinante pET23a-PdxK, com o propósito de otimizar a expressão da PdxK de *T. cruzi* em *E. coli*. Desta maneira, ela estudou diferentes linhagens de *E. coli*, e a melhor condição de expressão foi obtida com o uso da linhagem Rosetta(DE3). Sendo assim, a metodologia estabelecida por ela foi repetida, uma vez que havia bastante tempo que a amostra do recombinante estava estocada. Várias enzimas piridoxal quinases de mamíferos têm sido expressas em *E. coli*, estudos já realizados têm mostrado que estas proteínas expressas exibem as mesmas características bioquímicas que as proteínas nativas em vários tecidos de mamíferos (GAO et al., 1998; LEE et al., 2000; LUM; KWOK; LO, 2002).

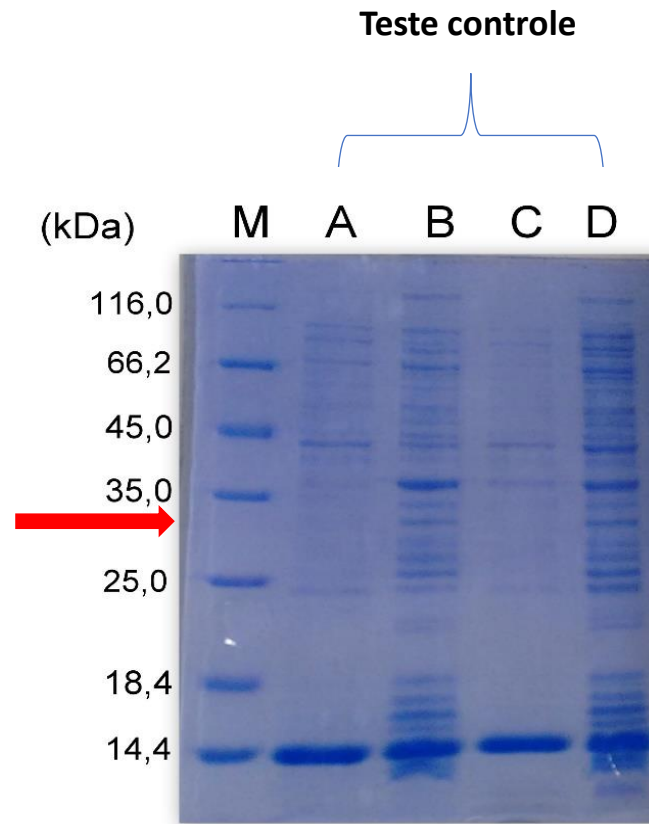
A Figura 17 mostra a análise por SDS/PAGE 15% das amostras retiradas antes da adição de IPTG (T0) e ao final do experimento (TF) dos dois testes de expressão. A PdxK de *T. cruzi* apresenta massa de 33,4 kDa. Logo abaixo é mostrada a Figura 18, relativa ao teste de expressão controle.

Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% da expressão de PdxK em células de *E. coli* Rosetta(DE3) em 100 mL de meio LB. M: Marcador de massa molecular. T0: amostras retiradas antes da adição de IPTG. TF: amostras retiradas ao final do experimento. De A até D: Análises de amostras correspondentes ao teste 1. De E até H: Análises de amostras correspondentes ao teste 2. A: T0 sobrenadante; B: T0 precipitado; C: TF sobrenadante; D: TF precipitado; E: T0 sobrenadante; F: T0 precipitado; G: TF sobrenadante; H: TF precipitado.



Fonte: Autoria própria.

Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do teste de expressão do vetor pET23a utilizado como controle em células de *E. coli* Rosetta(DE3), em 100 mL de meio LB. M: Marcador de massa molecular. T0: amostras retiradas antes da adição de IPTG. TF: amostras retiradas ao final do experimento. A: T0 sobrenadante; B: T0 precipitado; C: TF sobrenadante; D: TF precipitado.



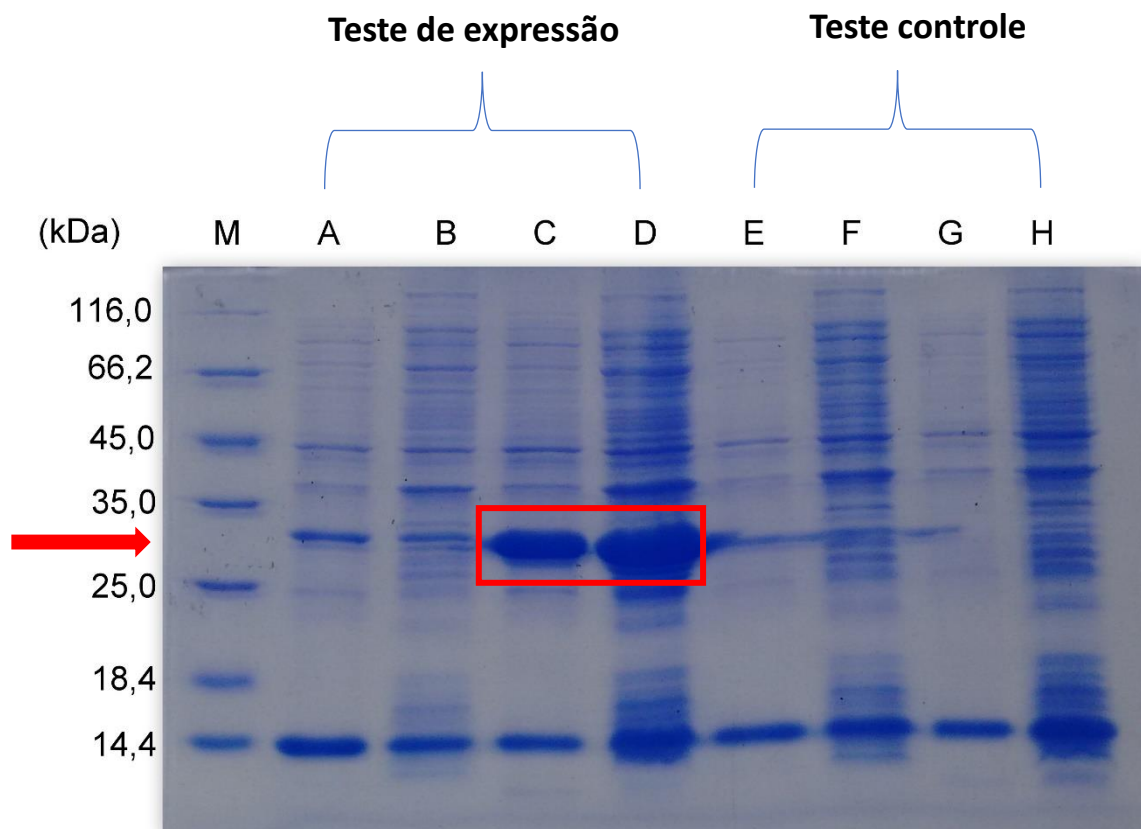
Fonte: Autoria própria.

De acordo com a análise da Figura 17, os dois testes de expressão revelam bandas próximas a 33,4 kDa, indicando que a PdxK foi expressa. Ainda, é possível observar pelo retângulo destacado que uma parte se encontra na fração solúvel e outra, na insolúvel (precipitado), sob a forma de corpos de inclusão. Com relação ao teste controle, na Figura 18 é possível observar que não há bandas na região de 33,4 kDa em nenhuma das amostras recolhidas no experimento.

Experimento 2 - Teste de expressão em meio SOB

O experimento 2 foi realizado com o intuito de verificar se a mudança de meio de cultura ajudaria na otimização da obtenção da PdxK. Na Figura 19 é mostrado a análise das amostras feita por SDS/PAGE. É possível verificar no retângulo em destaque que a PdxK foi expressa e está nas frações solúvel e insolúvel.

Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do teste de expressão do recombinante pET23-PdxK em células de *E. coli* Rosetta(DE3) em 100 mL de meio SOB e do teste de expressão do vetor pET23 como controle. M: Marcador de massa molecular. T0: amostras retiradas antes da adição de IPTG. TF: amostras retiradas ao final do experimento. De A até D: Análises de amostras correspondentes à expressão do plasmídeo recombinante. De E até H: teste de expressão controle. A: T0 sobrenadante; B: T0 precipitado; C: TF sobrenadante; D: TF precipitado; E: T0 sobrenadante; F: T0 precipitado; G: TF sobrenadante; H: TF precipitado.

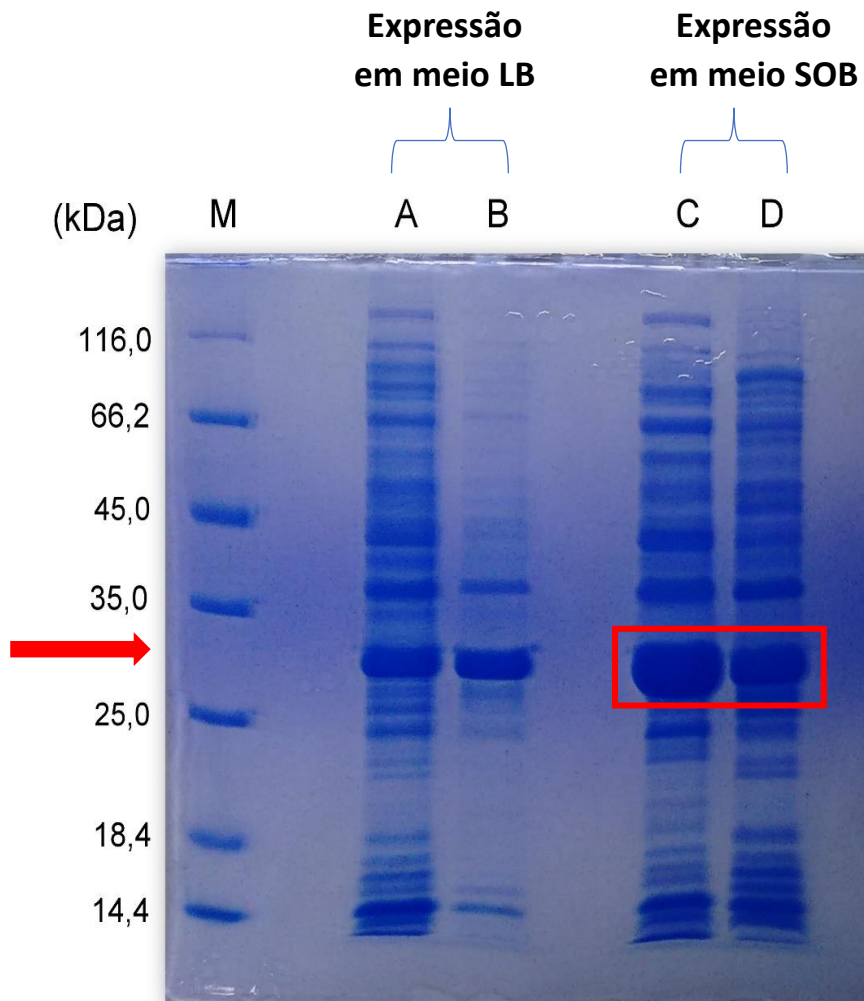


Fonte: Autoria própria.

Experimento 3 - Lise dos sedimentos bacterianos

Neste experimento foram realizados dois testes de lise mecânica, com os sedimentos bacterianos obtidos anteriormente da expressão de PdxK, um deles preparado com o meio LB e o outro com o meio SOB. A Figura 20 mostra o resultado obtido. Pode-se observar na raia C, uma banda intensa, indicando grande quantidade de proteína na fração solúvel no meio SOB.

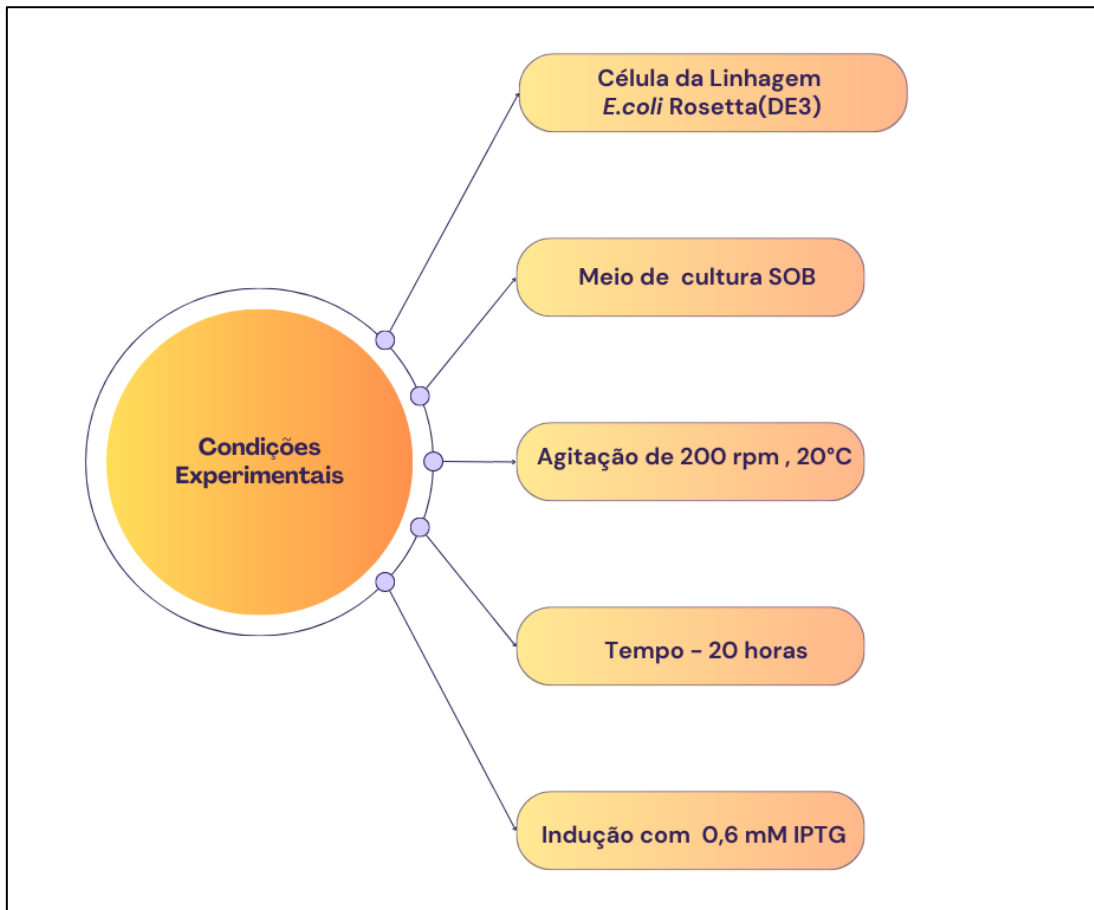
Figura 20. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de lise. M: Marcador de massa molecular. A e B são amostras de lisado do experimento de expressão de PdxK em meio LB, enquanto as raias C e D são referentes às amostras de lisado do experimento de expressão de PdxK em meio SOB. A: Sobrenadante; B: precipitado; C: sobrenadante; D: precipitado.



Fonte: Autoria própria.

Desta forma, as condições ideais para obtenção de grande quantidade de PdxK recombinante de *T. cruzi* por expressão heteróloga em *Escherichia coli* foram determinadas, e estão destacadas na Figura 21:

Figura 21. Condições ótimas para obtenção de PdxK recombinante de *T. cruzi*.



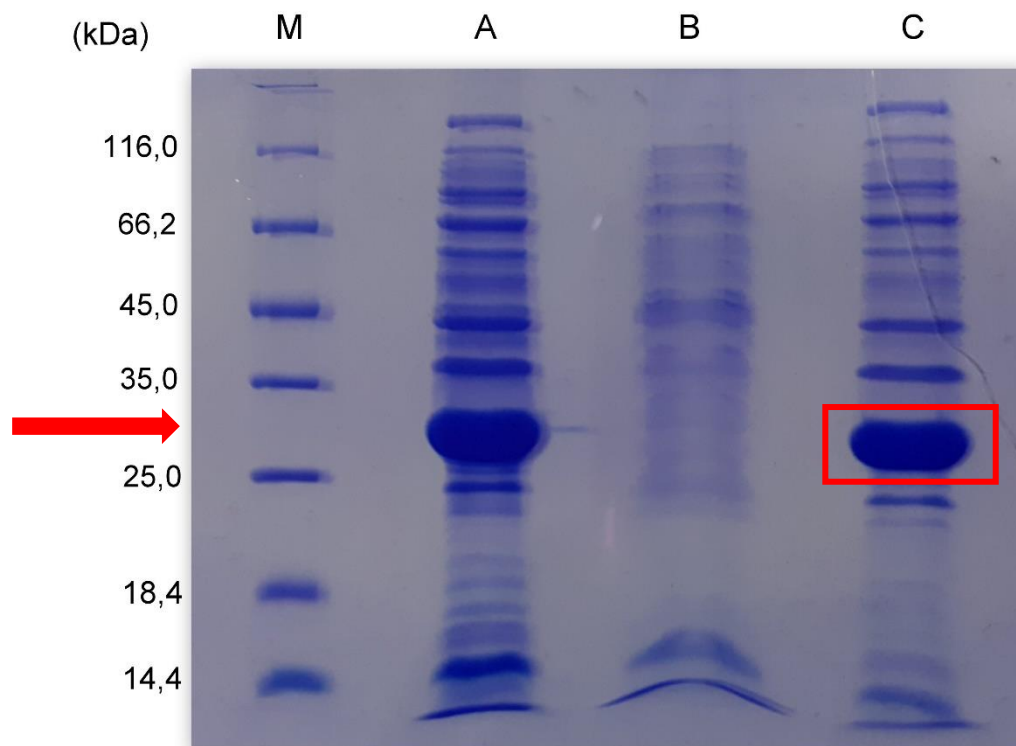
Fonte: Autoria própria com uso da ferramenta online Canva.com.

Experimento 4 - Teste de *salting out*

Neste experimento foi realizado o procedimento de *salting out* com adição de 30% de sulfato de amônio para precipitar a proteína de interesse e ajudar posteriormente nos procedimentos de purificação. Foram testadas outras porcentagens de adição de sulfato de amônio (dados não mostrados), e a melhor condição foi a porcentagem de 30%. A análise das

amostras realizadas por SDS/PAGE é mostrada na Figura 22. É possível notar que o conteúdo de proteínas PdxK precipita totalmente, portanto essa porcentagem foi considerada a melhor para a continuidade dos experimentos.

Figura 22. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste *salting out* com 30% de sulfato de amônio. M: Marcador de massa molecular. A: Amostra antes de realizar o *salting out*. B: fração sobrenadante após *salting out*. C: fração precipitado após *salting out*.



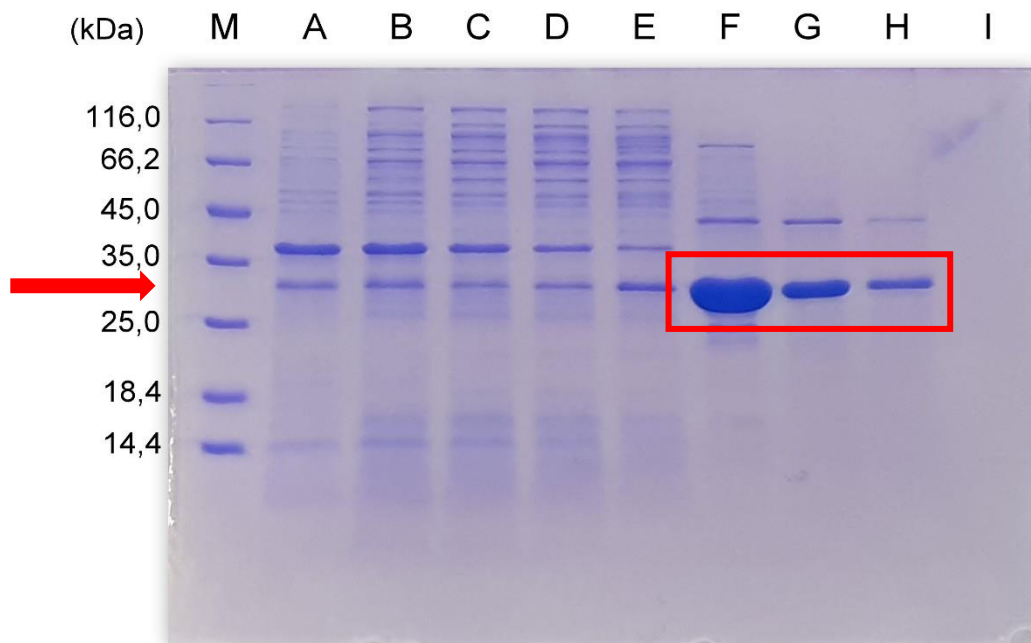
Fonte: Autoria própria.

Experimento 5 - Teste de purificação por cromatografia de exclusão de tamanho

Dando continuidade aos experimentos de purificação, uma vez que o teste de *salting out* foi o primeiro passo, a segunda etapa consistiu em adicionar a amostra contendo as proteínas precipitadas na coluna *Superdex 16/60* – Gel Filtração. De acordo com o cromatograma obtido (dado não mostrado), as frações recolhidas foram numeradas e a análise foi realizada por SDS/PAGE. De acordo com a Figura 23 é observado que uma grande quantidade de proteína

foi recolhida na fração 22 (Raia F), entretanto existem outras proteínas que estão presentes nesta amostra. Já na fração 26 (Raia H) existem poucos contaminantes, porém a PdxK é obtida em pequena quantidade se compararmos o tamanho das bandas na faixa de 33,4 kDa entre as raias F e H.

Figura 23. Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras retiradas ao longo do teste de purificação em coluna Superdex 16/60, numeradas de acordo com os picos do cromatograma obtido durante a purificação. M: Marcador de massa molecular.. A: Amostra 14; B: Amostra 15; C: Amostra 16; D: Amostra 17; E: Amostra 18; F: Amostra 22; G: Amostra 25; H: Amostra 26; I: Amostra 51.



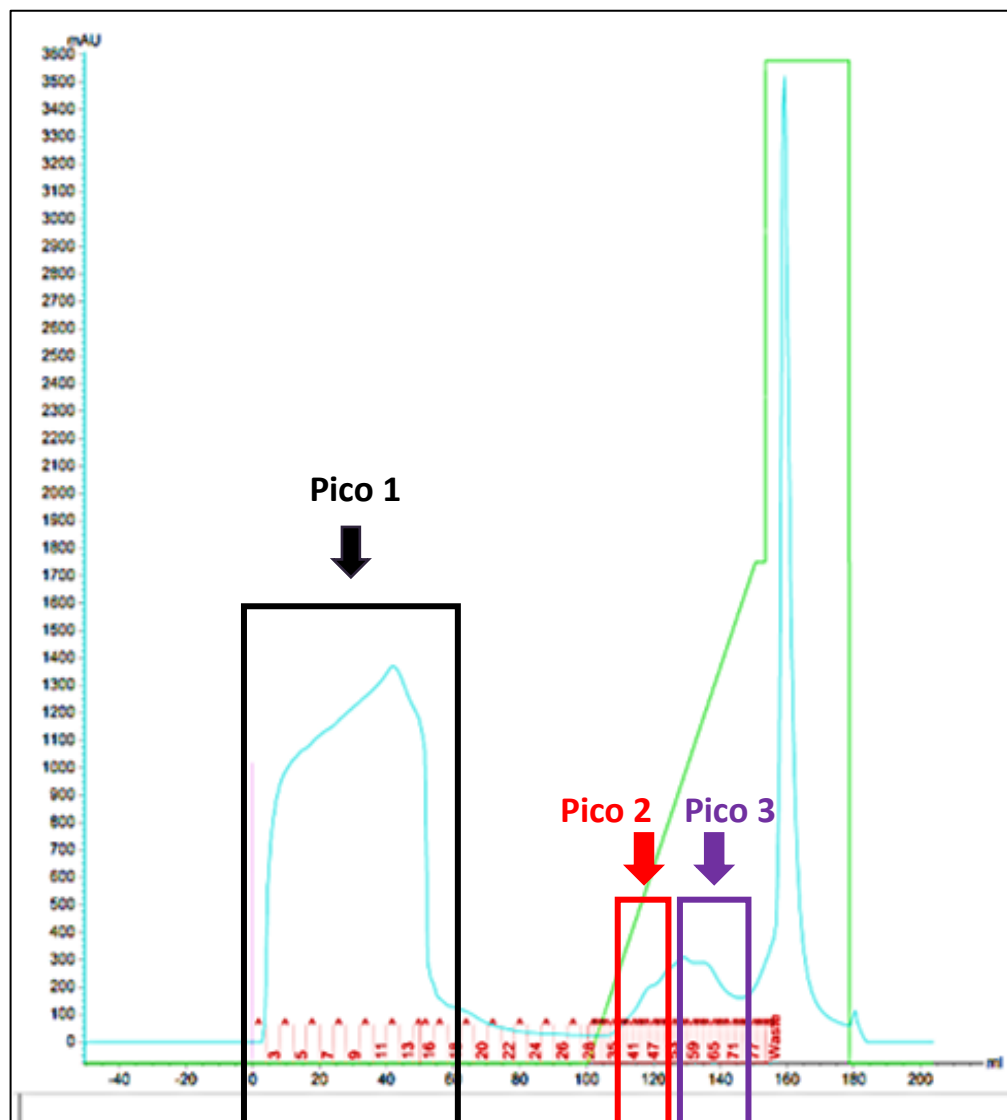
Fonte: Autoria própria.

Consequentemente, com este resultado conclui-se que o método de purificação não foi satisfatório. Portanto, novos testes deveriam ser realizados com outra coluna a fim de alcançar a fração de proteína com alto grau de pureza.

Experimento 6 - Teste de purificação em três etapas: *salting out*, cromatografia de troca iônica e cromatografia de exclusão de tamanho

No experimento 6 foi realizado novo ensaio de expressão, lise e purificação de PdxK. Após a primeira etapa de purificação, a amostra foi dialisada e purificada em uma segunda etapa pela cromatografia por troca aniônica. O cromatograma obtido nesta etapa é apresentado na Figura 24.

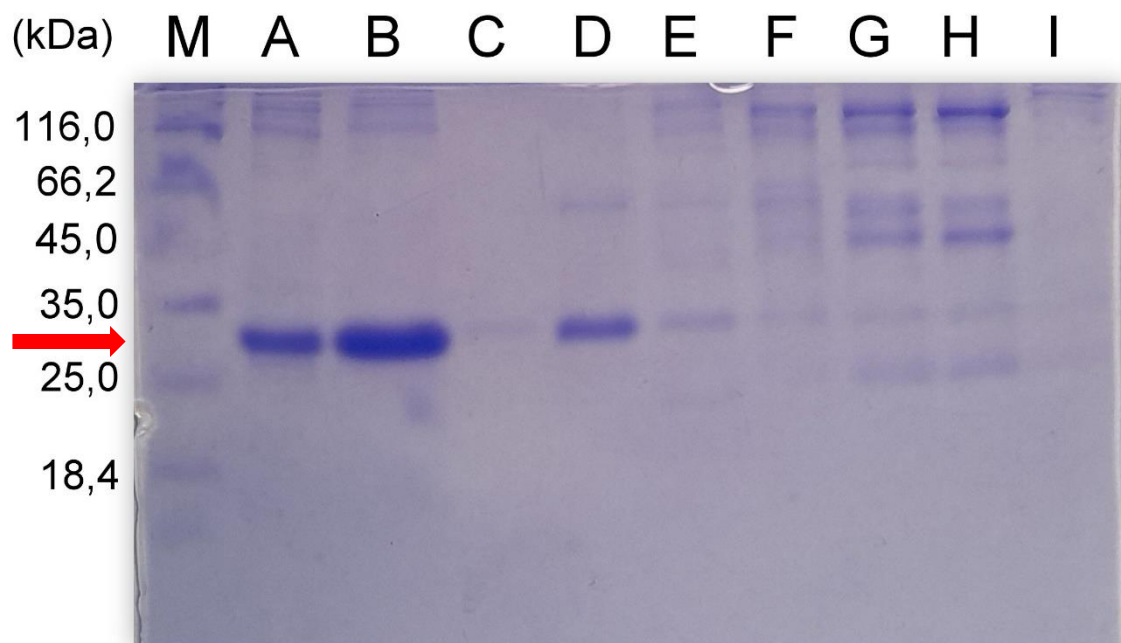
Figura 24. Cromatograma da etapa de purificação na coluna de Troca Iônica (*HiTrap™ Q FF*). No cromatograma são destacados os principais picos (pico 1, 2 e 3).



Fonte: Autoria própria.

A partir da análise dos picos do gráfico, as frações 8, 12, 24, 47, 53, 58, 63, 65 e 75 foram recolhidas e analisadas em eletroforese SDS/PAGE 15%. O resultado é apresentado na Figura 25.

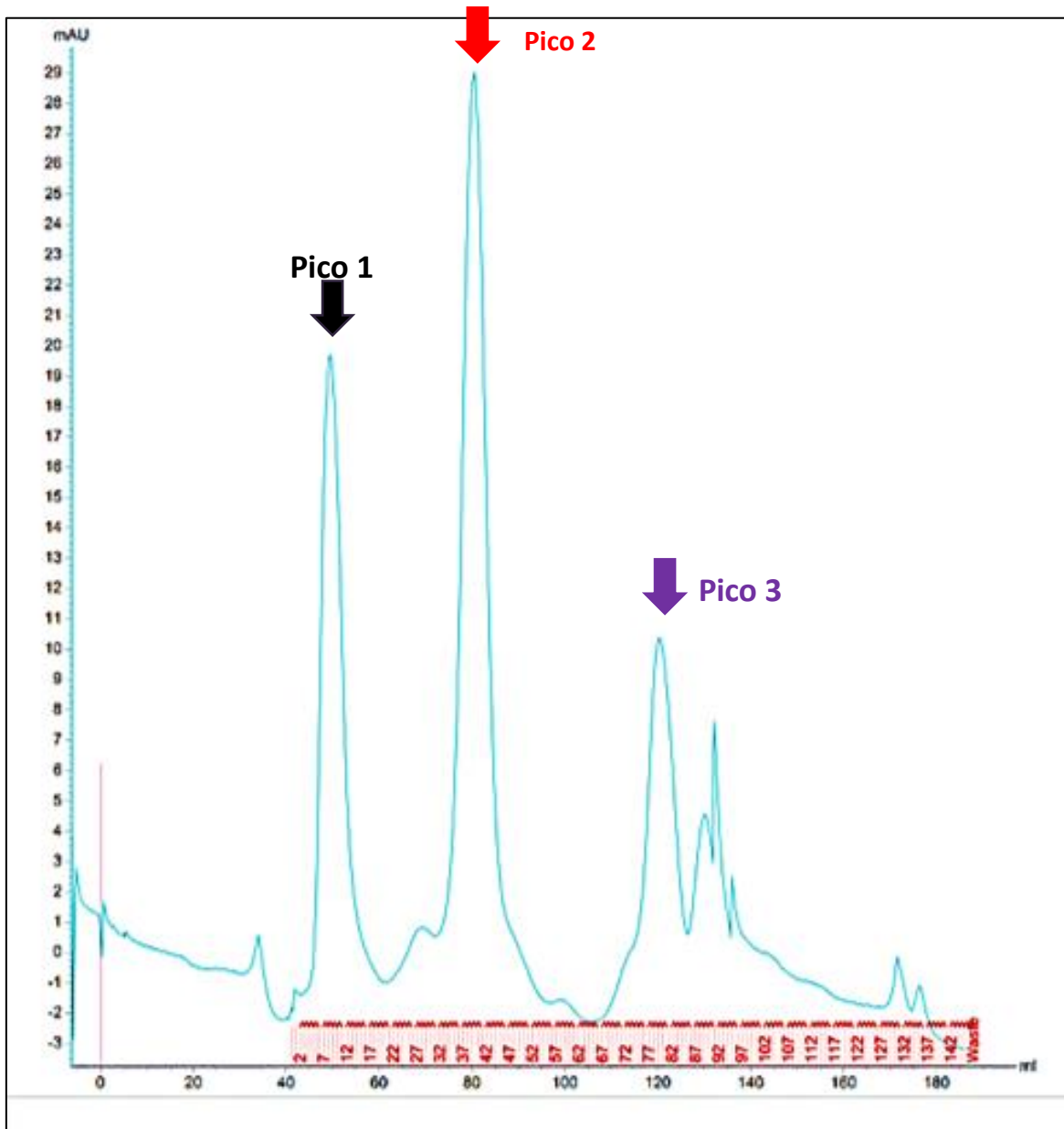
Figura 25. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações recolhidas na etapa de purificação por Troca Iônica. M: Marcador de massa molecular. A: Amostra 8; B: Amostra 12; C: Amostra 24; D: Amostra 47; E Amostra 53; F: Amostra 58; G: Amostra 63; H: Amostra 65; I: Amostra 75.



Fonte: Autoria própria.

As amostras dos tubos 37 ao 50 foram misturadas e concentradas, e o conteúdo final foi purificado por cromatografia de Exclusão de Tamanho (Gel Filtração). O cromatograma desta etapa é apresentado na Figura 26.

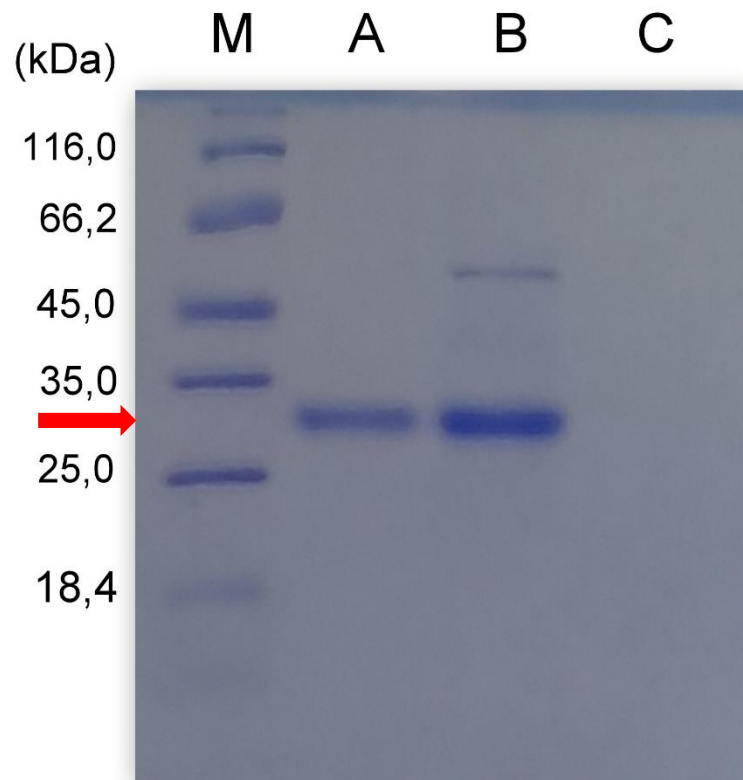
Figura 26. Cromatograma da etapa de purificação na coluna de Exclusão de Tamanho (Superdex 200). No cromatograma são destacados os principais picos (pico 1, 2 e 3).



Fonte: Autoria própria.

Após análise dos picos do cromatograma, observou-se que a absorbância em mAu foi baixa, o que implica em baixa concentração de amostra. Portanto, optou-se por juntar as frações recolhidas de mesmo pico e concentrá-las, para que então pudessem ser analisadas por eletroforese em SDS/PAGE. O resultado é apresentado na Figura 27.

Figura 27. Eletroforese em gel de poliacrilamida das frações recolhidas na etapa de purificação por Exclusão de Tamanho. M: Marcador de massa molecular. A: Amostra pico 1; B: Amostra pico 2; Amostra pico 3.

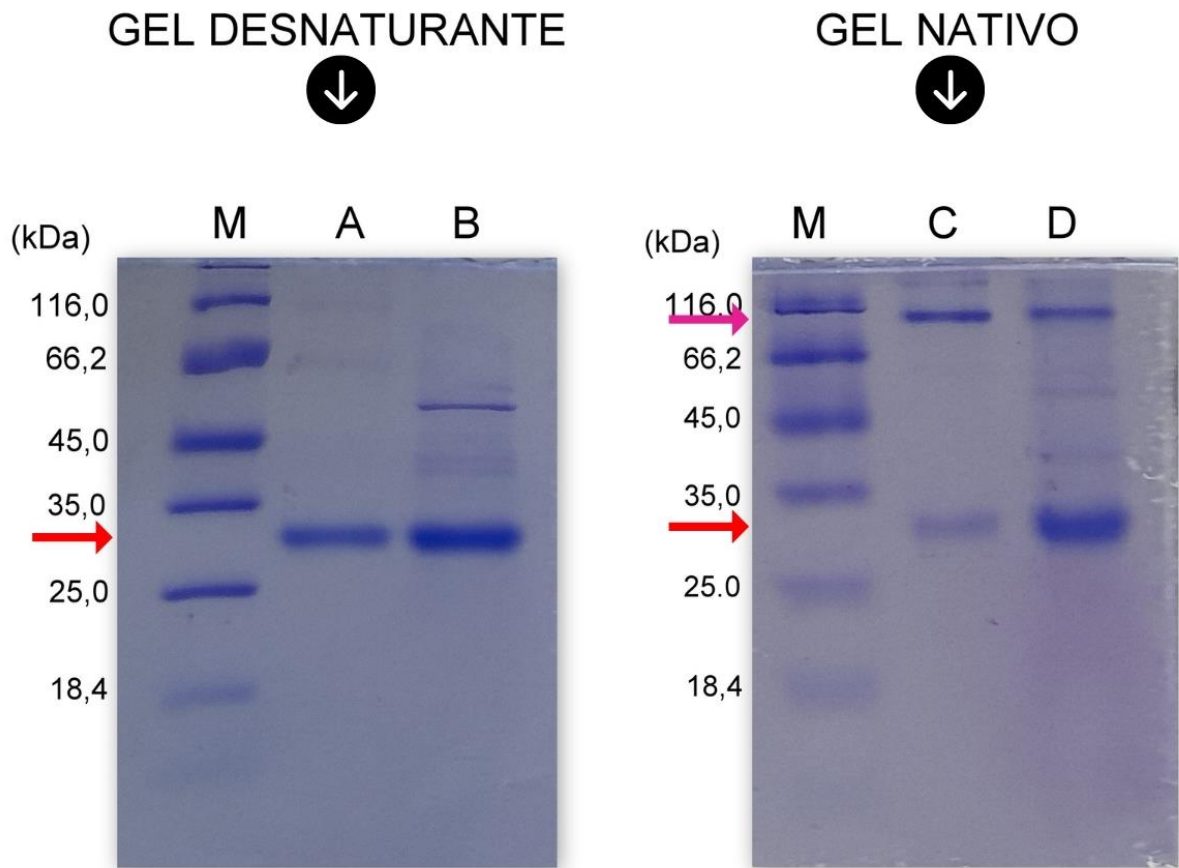


Fonte: Autoria própria.

A imagem deste gel foi analisada no Software *ImageJ*, e os seguintes dados de pureza foram obtidos: Raia A - 80,7% de pureza e Raia B - 74,9% de pureza. A Raia C visivelmente não apresenta bandas e, portanto, a amostra do pico 3 foi descartada. Conclui-se por este resultado que foi alcançado alto grau de pureza nas amostras após terceira etapa de purificação. A concentração obtida para a amostra do pico 1 foi de 0,434 mg/mL e para a amostra do pico 2 foi de 1,002 mg/mL.

Para verificar se as amostras do pico 1 e do pico 2 apresentavam a PdxK de *T. cruzi* recombinante na forma de monômero ou dímero, uma vez que pela coluna ser de exclusão de tamanho e que foi observada bandas logo no início da eluição, foi realizada a eletroforese em gel não desnaturante, cujo resultado é apresentado na Figura 28, fazendo uma comparação entre o resultado do gel desnaturante (mesmo da Figura 27) e gel não desnaturante (nativo).

Figura 28. Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras da purificação por Exclusão de Tamanho. À esquerda, SDS/PAGE (Gel desnaturante). À direita, Gel Nativo (Não Desnaturante). M: Marcador de massa molecular. A e C: Amostra pico 1. B e D: Amostra pico 2.

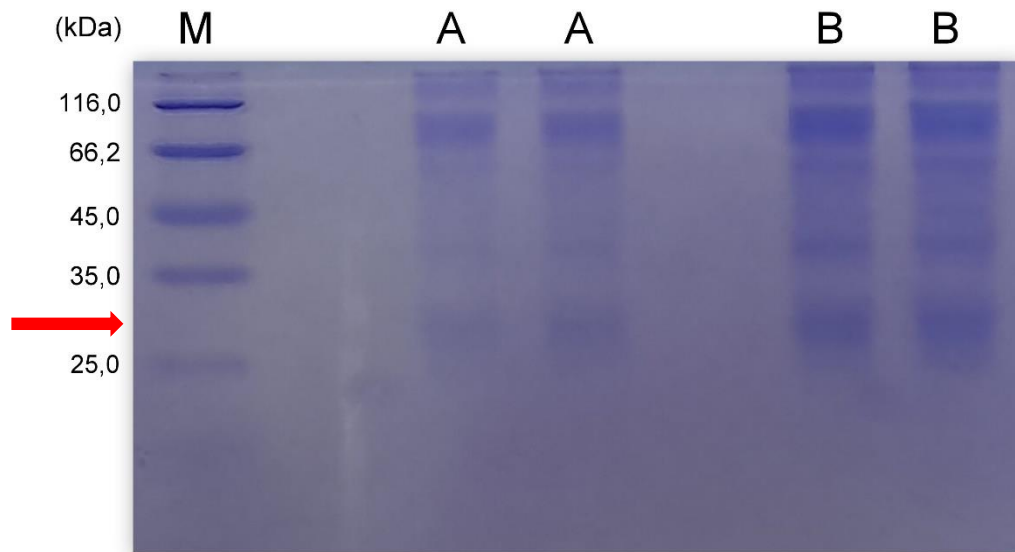


Fonte: Autoria própria.

A partir da comparação entre os dois géis na Figura 28, fica evidente que a amostra do pico 1 apresenta dímeros em solução com alguns monômeros também presentes em solução, uma vez que aparece uma banda na região de 70kDa. No caso da amostra do pico 2 nota-se que existe uma banda mais intensa na região de 33,4kDa, indicando maior presença de monômero, no entanto ainda sim, existe uma pequena quantidade de dímero presente na amostra.

Ainda, para verificar a estabilidade do dímero em solução, após 4 dias de armazenamento a 4°C, uma nova eletroforese em gel não desnaturante foi realizada e o resultado é apresentado na Figura 29.

Figura 29. Eletroforese em Gel Não Desnaturante das amostras da etapa de purificação por Exclusão de Tamanho, após 1 semana armazenada a 4 °C. M: Marcador de Massa Molecular. . A: Amostra pico 1; B: Amostra pico 2.



Fonte: Autoria própria.

Nota-se pela Figura 29 que a tendência é a dimerização, pois é notável a diminuição da intensidade da banda na região de 33,4kDa e aumento de intensidade na região de 70kDa.

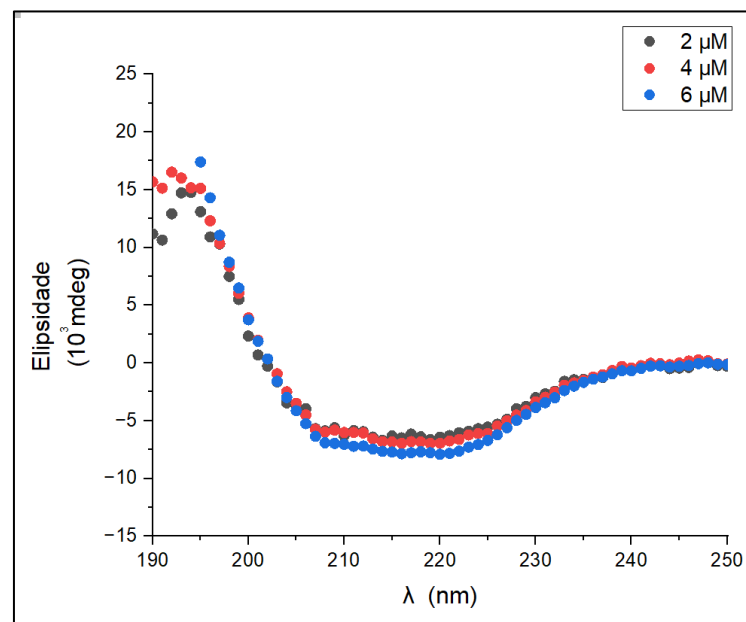
2.5.3. Experimentos de caracterização da PdxK de *T. cruzi* recombinante

Nesta seção estão mostrados os resultados obtidos a partir dos ensaios realizados utilizando dicroísmo circular e na sequência, os dados obtidos para os testes de atividade da PdxK recombinante.

- **Determinação da estrutura secundária por dicroísmo circular**

Os ensaios utilizando dicroísmo circular foram realizados com três concentrações diferentes de proteína 2 μ M, 4 μ M e 6 μ M, e os dados são apresentados no gráfico abaixo (Figura 30). Nota-se um perfil característico de alfa-hélice.

Figura 30. Gráfico de elipsidade em função do comprimento de onda para as amostras de concentração 2, 4 e 6 μ M.



Fonte: Autoria própria.

O Quadro 2 apresenta as porcentagens de estruturas secundárias obtidas a partir da deconvolução realizada a partir dos dados de dicroísmo circular. Foi também feito uma média

dos valores, indicando que a porcentagem de alfa-hélice na amostra é de 72,5%, folhas β é 14,8% (somatório de 1,1% + 2,8% + 10,9%) e 12,5% de regiões não ordenadas.

Quadro 2. Porcentagem de estruturas secundárias determinadas pela deconvolução dos dados do dicroísmo circular para cada teste de concentração (2, 4 e 6 μM) e a média dos valores obtidos.

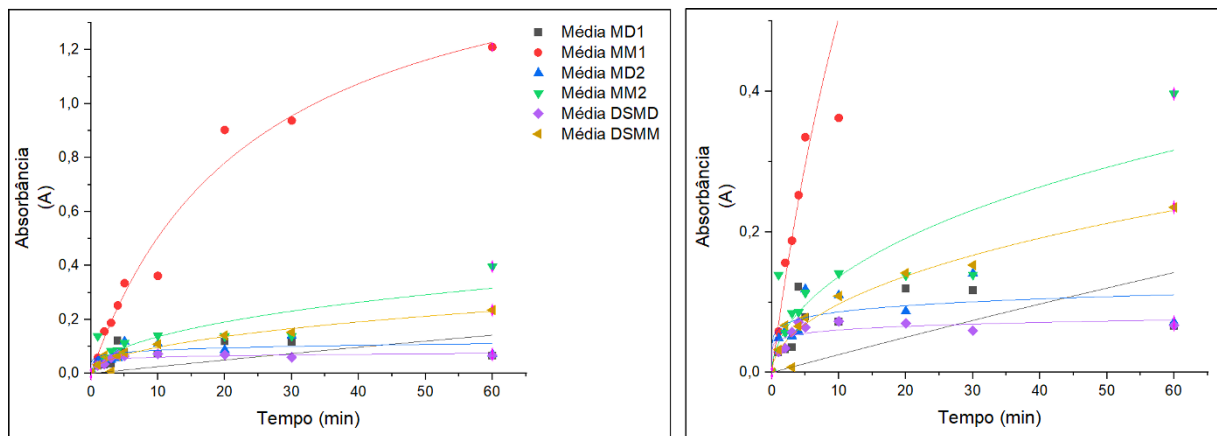
(195-260 nm)	Amostra 2 μM	Amostra 4 μM	Amostra 6 μM	Média
Hélice	67,5%	70,8%	79,3%	72,5%
Antiparalela	1,5%	1,1%	0,7%	1,1%
Paralela	3,2%	3,0%	2,1%	2,8%
Volta beta	11,7%	11,1%	9,9%	10,9%
Coil Randômica	14,3%	14,1%	9,8%	12,7%
Total	98,3%	100,1%	101,7%	100%

Fonte: Autoria própria.

- **Teste de atividade enzimática**

O teste de atividade enzimática foi realizado com as amostras obtidas no experimento 6, as amostras do pico 1 e pico 2, e o substrato piridoxal. Para facilitar o entendimento, a amostra do pico 1 foi chamada de dímero e a amostra do pico 2 foi chamada de monômeros. Foram realizados os testes de atividade com estas amostras, em dois momentos, por isso uma amostra está como “1”, indicando experimento inicial e “2” indicando o experimento que foi realizado 4 dias após o primeiro teste. Além disso, os experimentos foram realizados em triplicata e os dados usados na construção do gráfico foi a média obtida em cada experimento. A Figura 31 mostra o gráfico dos dados obtidos para o teste de atividade enzimática.

Figura 31. Gráfico dos dados obtidos do teste de atividade absorbância (média de triplicata) em função do tempo. Para facilitar o entendimento dos diversos experimentos realizados, a amostra do pico 1 foi chamada de dímero e a amostra do pico 2 foi chamada de monômero. Os índices 1 e 2 referem-se ao experimento com a amostra de proteínas logo após purificação (1) e experimento realizado com a amostra de proteínas após 4 dias armazenada (2). MD1: Amostra Dímero 1; MM1: Amostra Monômero 1; MD2: Amostra Dímero 2; MM2: Amostra Monômero 2; DSMD: Amostra Dímero - Experimento feito com dobro de substrato; DSMM: Amostra Monômero – Experimento feito com dobro de substrato. À direita temos o gráfico em escala de 0 a 0,4 para facilitar a visualização dos pontos sobrepostos no gráfico à esquerda.

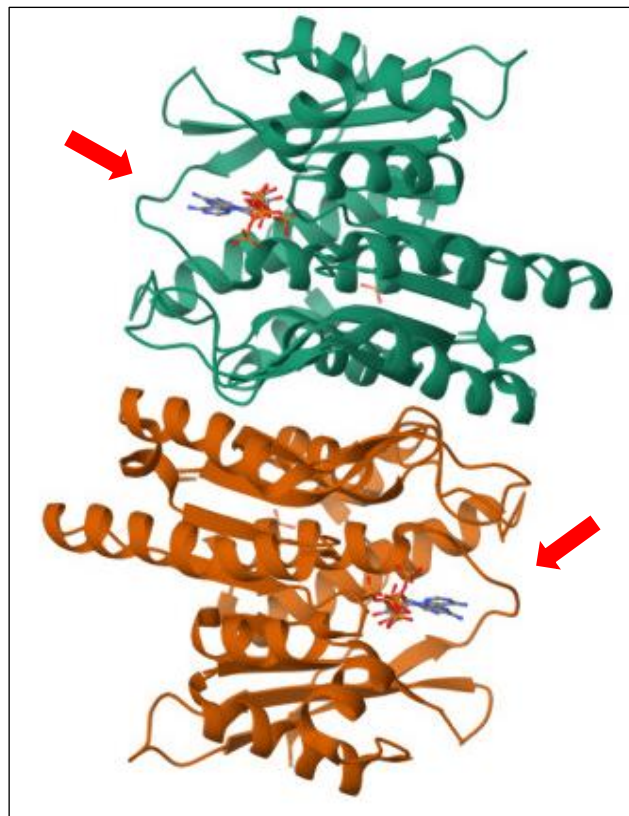


Fonte: Autoria própria.

A análise do gráfico permite a observação sobre o comportamento diferente de monômero e dímero quanto à atividade. Nota-se que em um primeiro momento, a fração que contém o monômero exibe maior atividade frente à que tem dímero. Em um segundo momento, é notável que a atividade do monômero diminui e fica parecida com os valores da atividade da fração que contém o dímero. Estas observações juntamente com o gel nativo após 4 dias, sugere que o monômero tem tendência a se tornar dímero conforme o tempo, no entanto, a atividade do dímero é menor em comparação ao do monômero. As proteínas PdxK estão descritas na literatura como dímeros. Lum e colaboradores (2002) expressaram a proteína recombinante PdxK de *Arabidopsis thaliana* em *E. coli*, purificaram e realizaram estudos de caracterização. Estes estudos revelaram que ela é uma proteína dimérica consistindo de duas subunidades idênticas, e cada subunidade tem uma massa de aproximadamente 35kDa. (LUM; KWOK; LO, 2002). Estudos cristalográficos de PdxK de *Leishmania donovani* com ligantes sugere que a proteína existe como um dímero na unidade assimétrica, similar à enzima correspondente em *E. coli*, ovelha e a humana (LI et al., 2002; MCCOY et al., 2007; SAFO et al., 2006). Além

disso, a estrutura dimérica obtida também está de acordo com seu estado oligomérico observado em solução e os resultados mostraram que a proteína tem maior atividade próximo ao pH fisiológico (ARE et al., 2020). Gao e colaboradores (2019) determinaram a estrutura cristalográfica da PdxK de *Plasmodium falciparum* (PDB: 6SU9). Cada unidade assimétrica contém uma molécula, e dois monômeros formam um dímero pelo eixo cristalográfico duplo. Cada monômero possui um sítio ativo independente, sem contribuições do monômero oposto (GAO et al., 2019). Também é observado nos estudos de JONES e colaboradores (2012) que a PdxK de *T. brucei* apresenta-se como dímero e cada monômero apresenta seu sítio ativo independente; além disto, os sítios ativos estão localizados em lados opostos, como pode ser observado na Figura 32. Isto indica que os resultados obtidos para a PdxK de *T. cruzi* recombinante são plausíveis, pois ambas as proteínas apresentam alta homologia entre si e desta maneira, podemos inferir que os monômeros da PdxK apresentam sítios independentes e estão distantes, um em relação ao outro, na dimerização, não interferindo na atividade um do outro.

Figura 32. Estrutura do dímero da piridoxal quinase de *Trypanosoma brucei* em complexo com ATP, retirada do PDB, código 3sz7. As setas vermelhas indicam os sítios ativos e estão localizados em lados opostos.



2.5.4. Análise in silico da PdxK de *T. cruzi*

- **Informações gerais**

A sequência encontrada no banco de dados NCBI para a PdxK de *Trypanosoma cruzi* é mostrada na Figura 33. A sequência foi copiada na ferramenta PSIPRED, que gerou a predição de estrutura secundária mostrada na Figura 34.

Figura 33. Sequência da proteína PdxK de *T. cruzi* NCBI – Código GenBank: RNC57787.1.

```
>RNC57787.1 pyridoxal kinase [Trypanosoma cruzi]
MSEEEKTILSIQSYVTHGYVGNKAASFPLQLHGFDVDGVNTVSLSNHSGYPIIRGHRMDLQYETLMEGMR
ANNFLPGYRYIITGYINNADIVRRIRDTVKEIRTLREKEGKLTFFCDPVMGDDGIMYCKQEVLEAYREL
IQCADVATPNYYEASLLSGVNVDTMTTALQATDWFHAQGTQNVIIKSFRTKEDPQNLHFLFSTMATGGKT
PQRFTGVVPYHEGRYTGTGDLFAASLLAFSHQHPMEVAVGIAMGVLQDVILATRNEGGDGTSSLMNRELR
VTKSVQSLNPNANVAEVRPM
Fonte: NCBI**
```

Figura 34. Predição da estrutura secundária da PdxK de *T. cruzi*, utilizando a ferramenta online PSIPRED (Disponível em <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). O número total de resíduos de aminoácidos é 300.



Fonte: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.

As informações da PdxK de *T. cruzi*, obtidas por meio da análise de Banco de Dados e nas outras ferramentas de Bioinformática mencionadas na Metodologia, são apresentadas no quadro a seguir.

Quadro 3. Informações da PdxK de *T. cruzi*.

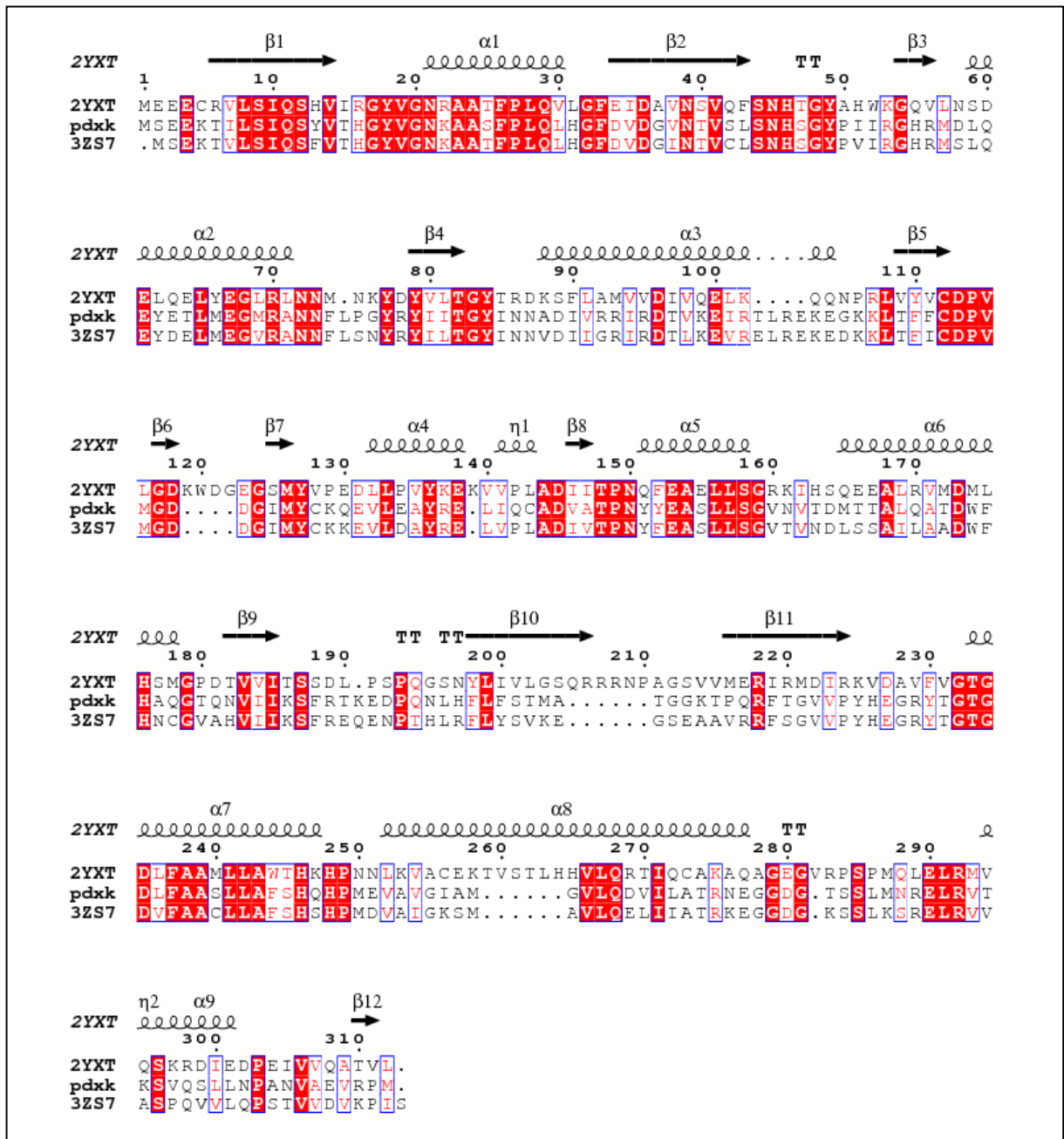
Informações da Pdxk de <i>T. cruzi</i>	
UniprotKB ID	Não encontrado
Número de Resíduos de aminoácidos	300
Massa molecular	~33,4 kDa
pI teórico	5,99
Índice alifático	82,20
Grande média de Hidropatia - GRAVY	-0.247

Fonte: Autoria própria.

- **Modelagem Molecular por Homologia**

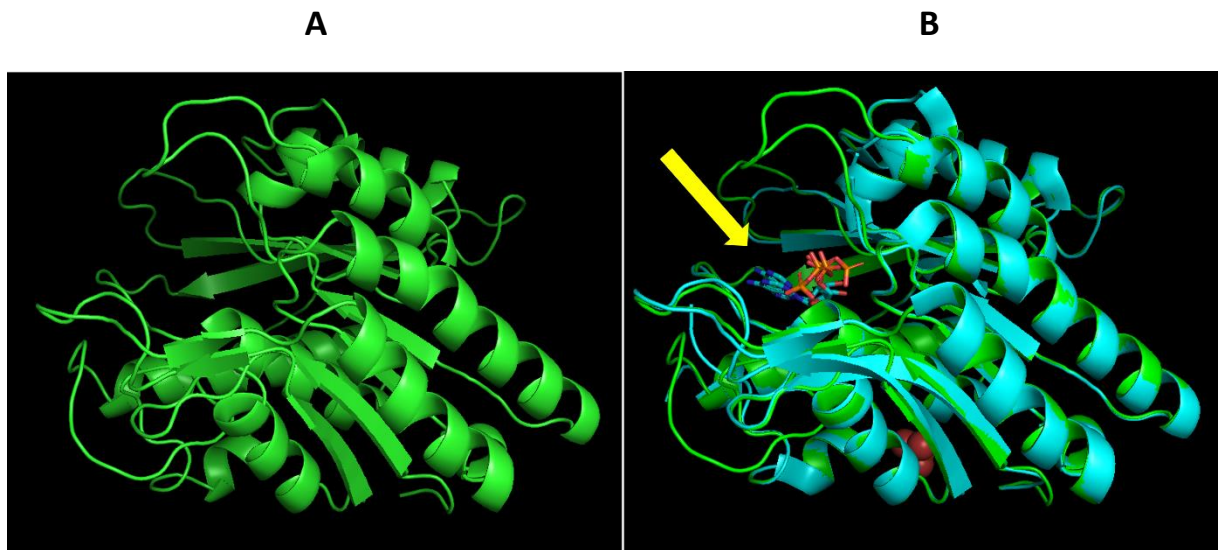
Foram realizadas duas modelagens por homologia. A partir da análise dos 100 modelos gerados para cada tipo de modelagem, ficou evidente que por questões de identidade principalmente, o modelo a ser escolhido para dar continuidade aos experimentos de docagem molecular é o melhor modelo obtido a partir da modelagem realizada com 1 *template 3zs7*. A Figura 35 mostra o alinhamento entre as sequências de aminoácidos da PdxK de *T. cruzi*, a de *T. brucei* (3zs7) e a humana (2yxT) realizado pelo ESPript 3.0 e na sequência, a Figura 36 mostra o modelo obtido e em comparação ao *template 3zs7*.

Figura 35. Alinhamento realizado pelo ESPrpt 3.0 entre a sequência de aminoácidos do *template* 2yxt (PdxK humana), do *templates* 3zs7 (PdxK do *Trypanosoma brucei*) e a PdxK do *T. cruzi*. Os aminoácidos idênticos estão destacados em vermelho.



Fonte: Autoria própria.

Figura 36. A: Modelo obtido (verde). B: Modelo (verde) em comparação ao *template* 3zs7 (azul), também é mostrada a posição do ligante do *template* (ATP) e a seta amarela indica o sítio ativo.

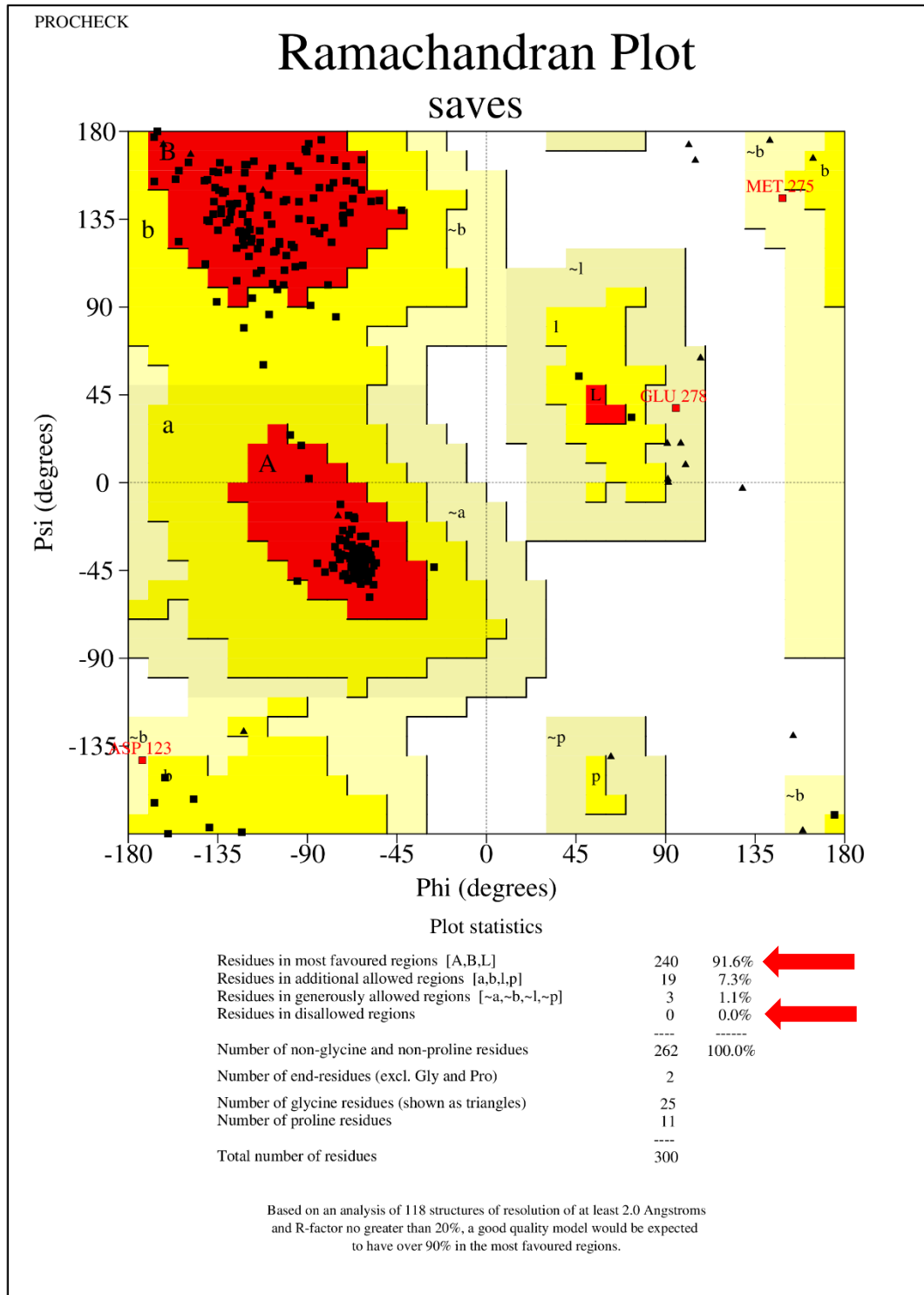


Fonte: Autoria própria.

Nota-se pelo modelo obtido que a proteína contém várias alfa hélices e também apresenta algumas folhas beta, e que comparativamente, a porcentagem das estruturas secundárias obtidas pelo dicroísmo circular neste trabalho mostram que há mais alfa-hélices e menos folhas β (alfa-hélice na amostra é de 72,5%, folhas β é 14,8% (somatório de 1,1%+ 2,8%+ 10,9%) e 12,5% de regiões não ordenadas).

Na Figura 37 é mostrado o gráfico de Ramachandran do modelo, as setas vermelhas destacam que não há resíduos em regiões não permitidas, e que há mais de 90% de resíduos em regiões mais favorecidas, ou seja, isto indica que é um bom modelo.

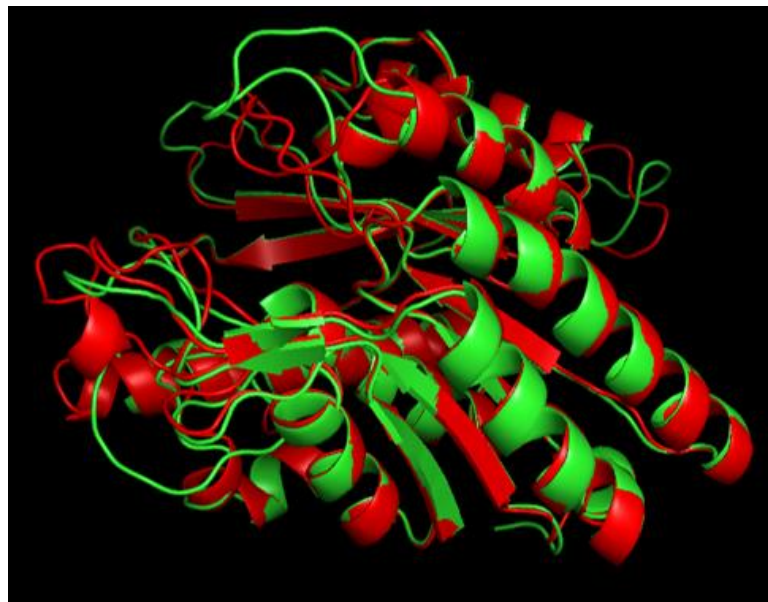
Figura 37. Gráfico de Ramachandran do modelo da PdxK de *T. cruzi*. As setas em vermelho indicam as porcentagens de resíduos de aminoácidos nas regiões permitidas (em vermelho, no gráfico) e não permitidas (em branco, no gráfico).



Fonte: Disponível em <https://saves.mbi.ucla.edu>

Além da modelagem pelo software *Modeller*, foi realizada a busca pela estrutura da PdxK de *T. cruzi* no *AlphaFold*, e os dois modelos foram sobrepostos no *Pymol* e são mostrados na Figura 38. Observa-se que os dois modelos são bastante semelhantes e que, portanto, a modelagem realizada pelo *Modeller* foi satisfatória e coerente já que apresenta semelhança com o modelo do *AlphaFold*.

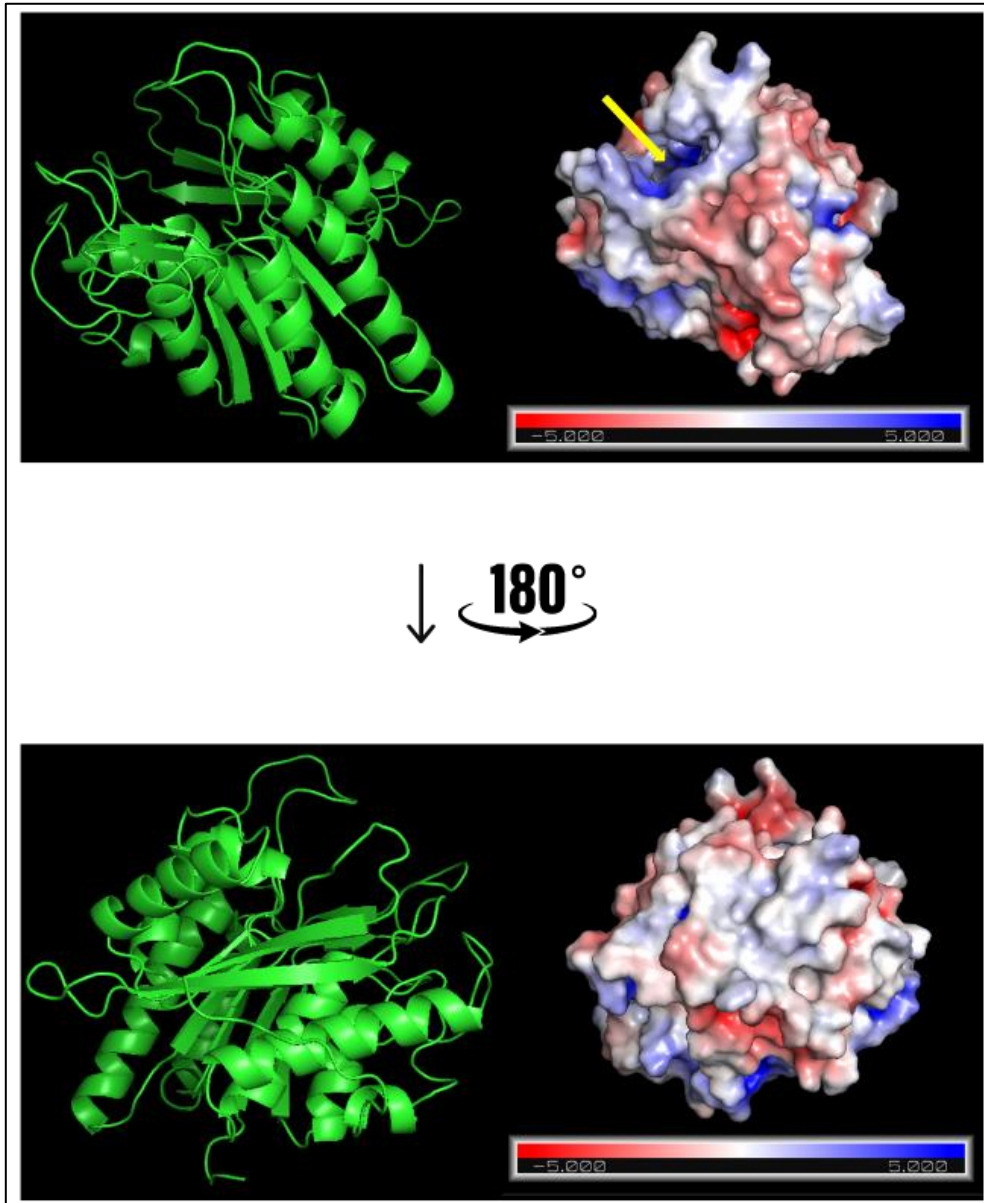
Figura 38. Sobreposição dos modelos de estrutura da PdxK de *T. cruzi*. Em verde, modelo gerado pelo *Modeller*. Em vermelho, modelo gerado pelo *AlphaFold*.



Fonte: Autoria própria

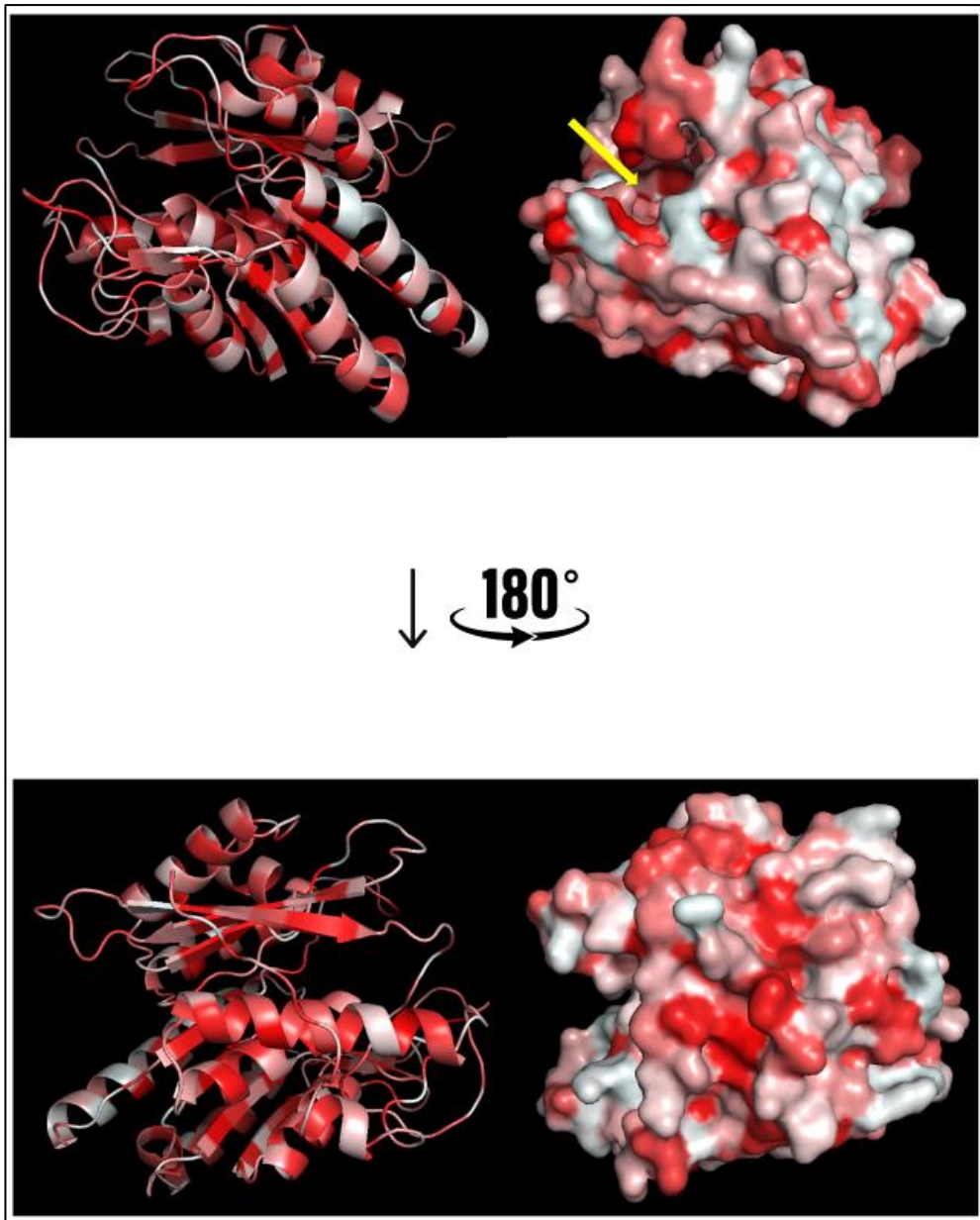
Ainda, utilizando o software *Pymol* foram obtidas as superfícies de potencial eletrostático e a superfície hidrofóbica do modelo molecular da PdxK de *T. cruzi*, mostradas nas Figuras 39 e 40, respectivamente.

Figura 39. Superfície de potencial eletrostático do modelo molecular da PdxK de *T. cruzi*. À esquerda, em verde, é mostrado o modelo molecular e à direita, nas cores vermelho e azul, a superfície eletrostática do modelo. As duas faces do modelo são mostradas após um giro de 180° na interface do *Pymol*. A seta amarela indica o sítio ativo.



Fonte: Autoria própria.

Figura 40. Superfície hidrofóbica do modelo molecular da PdxK de *T. cruzi*. À esquerda, é mostrado o modelo molecular já com as cores representativas da superfície hidrofóbica. e à direita, a superfície eletrostática do modelo. As duas faces do modelo são mostradas após um giro de 180° na interface do *Pymol*. Regiões vermelhas indicam alto índice hidrofóbico.



Fonte: Autoria própria.

2.6. Conclusão

Os resultados desta parte do trabalho foram bastante satisfatórios, pois a proteína PdxK de *T. cruzi* foi obtida por expressão em sistema bacteriano; além disso, foi alcançada quantidade significativa de proteína na forma solúvel, o que é necessário para estudos de caracterização funcional e estrutural. Os testes de atividade e dicroísmo circular forneceram evidências sólidas de que a proteína expressa está estruturada e possui atividade catalítica. Além disso, os dados obtidos para dicroísmo foram consistentes com as estruturas dos modelos obtidas por modelagem molecular. Estes resultados são de alta relevância, pois fornecem uma base sólida para estudos futuros sobre a função e atividade da proteína PdxK de *T. cruzi*, bem como abre caminho para pesquisas mais aprofundadas sobre seu potencial como alvo terapêutico contra a Doença de Chagas.

2.7. Perspectivas Futuras

As perspectivas futuras em relação à proteína PdxK de *T. cruzi* são promissoras, uma vez que ainda existem uma série de experimentos de caracterização que podem ser realizados para investigar a proteína em questão. Ensaaios de fluorescência do triptofano, testes de atividade em pH ótimo, estudos sobre a estabilidade da proteína, além de experimentos para obtenção da estrutura cristalográfica da PdxK de *T. cruzi*. Em relação à parte in silico, estudos de docagem molecular com pequenas moléculas podem ser interessantes de serem realizados utilizando o modelo obtido neste trabalho. Enfim, existe um amplo caminho a percorrer no estudo da PdxK de *T. cruzi*, um caminho importante a ser trilhado na pesquisa em busca de um tratamento contra a Doença de Chagas.



CAPÍTULO 3



CAPÍTULO 3

3.1. Revisão Bibliográfica

3.1.1. Quinases dependentes de ciclina

As quinases dependentes de ciclina (do inglês, *cyclin-dependent kinases*, *CDKs*) são proteínas quinases do tipo serina/treonina, e sua atividade depende de uma subunidade reguladora, que é chamada de ciclina (MALUMBRES, 2014).

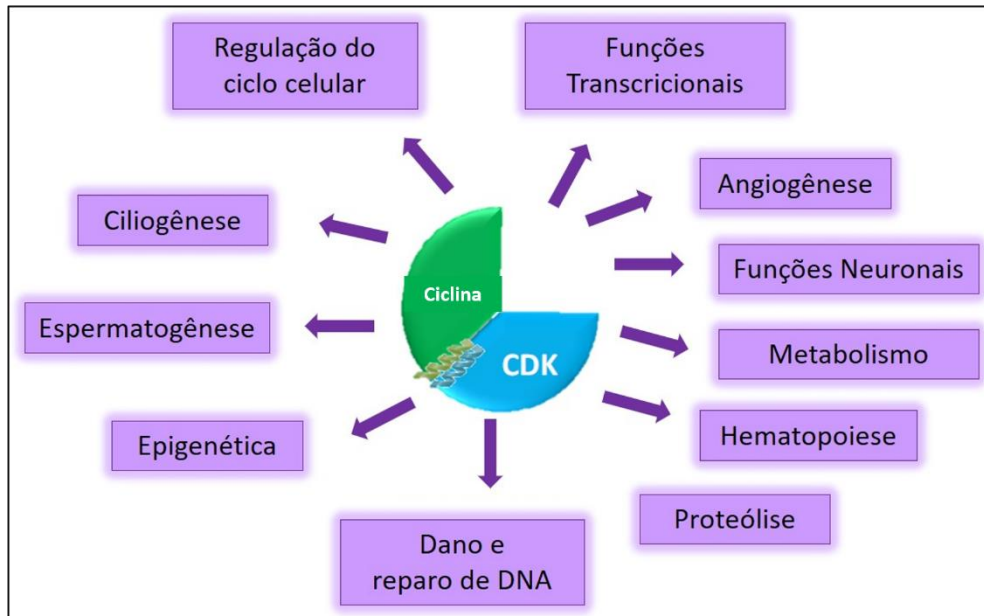
Existem atualmente 20 membros da família CDK conhecidos, e para facilitar na nomenclatura e análise, as proteínas pertencentes a esta família são nomeadas de CDK1 a CDK20 (MALUMBRES, 2014; MALUMBRES et al., 2009). Em relação às ciclinas, são 29 atualmente conhecidas que estão presentes nas células durante a proliferação celular (KNOCKAERT et al., 2002; ŁUKASIK; ZAŁUSKI; GUTOWSKA, 2021). Estas proteínas são nomeadas “ciclinas”, porque a concentração varia ciclicamente durante o ciclo celular, sendo que a síntese e a degradação dessas proteínas dependem das diferentes fases do ciclo de divisão celular (FUNG; POON, 2005; ŁUKASIK; ZAŁUSKI; GUTOWSKA, 2021).

As quinases dependentes de ciclina interagem com as ciclinas em uma região altamente conservada de 16 resíduos de aminoácidos, denominada motivo PSTAIRE (JEFFREY et al., 1995) facilitando o rearranjo conformacional das posições dos resíduos que se ligam aos grupos fosfato do ATP (JEFFREY et al., 1995).

As CDKs foram descobertas inicialmente como proteínas que participam do ciclo de divisão celular (CDK 1/2/3/4/6/7/8/10). Posteriormente, outras CDKs foram encontradas desempenhando papéis regulatórios e funções diversas, incluindo o controle da transcrição gênica (CDK 7/8/9/10/12), atividade neuronal (CDK 5/16), metabolismo (CDK 5/8), hematopoiese, angiogênese, proteólise e dano e reparo de DNA (CDK1/3/9/12), epigenética (CDK 1/2/4) e espermatogênese (CDK16) (ROSKOSKI, 2016; PEYRESSATRE et al., 2015).

A Figura 41 mostra um esquema sobre a diversidade funcional das CDKs.

Figura 41. Diversidade Funcional de CDKs.



Fonte: Adaptado de (PEYRESSATRE et al., 2015).

A desregulação de qualquer fase do ciclo celular ou transcrição conduz à apoptose, porém se não corrigido, pode resultar em doenças, tais como câncer, doenças neurodegenerativas (Doença de Alzheimer ou Parkinson) e acidente vascular cerebral (ŁUKASIK; ZAŁUSKI; GUTOWSKA, 2021; OSUGA et al., 2000; PATRICK et al., 1999; PINES, 1995). Adicionalmente, as CDKs também possuem papel fundamental na disseminação de algumas infecções virais, incluindo o HIV (ŁUKASIK; ZAŁUSKI; GUTOWSKA, 2021; WANG; FISCHER, 2008).

Devido a atuação em diversos processos biológicos, as CDKs apresentam-se como bons biomarcadores e são alvos farmacológicos bastante atrativos no desenvolvimento de terapias anticâncer (PEYRESSATRE et al., 2015) e para outras doenças. Como se trata de uma família de proteínas que desempenham diferentes funções, o quadro a seguir (Quadro 4) apresenta um resumo das principais atividades de cada uma das CDKs.

Quadro 4. CDKs e suas principais funções.

CDK	Funções Putativas
CDK1	Regula a transição da fase G2/M do ciclo celular
CDK2	Promove a transição da fase G1/S do ciclo celular
CDK3	Envolvido na transição G0/G1 via fosforilação de pRb (proteína do retinoblastoma)
CDK4	Regula a transição do ciclo celular da fase G1/S por meio da fosforilação de Rb
CDK5	Nenhuma função conhecida no ciclo celular. Está envolvida no desenvolvimento do cérebro e diferenciação neuronal
CDK6	Regula a transição do ciclo celular da fase G1/S por meio da fosforilação de Rb
CDK7	Ativa CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 via fosforilação de sítio específico de treonina; Forma complexo com TFIIF para regular a transcrição de RNA polimerase II
CDK8	Regula a expressão do gene por meio da fosforilação da RNA polimerase II
CDK9	Facilita o alongamento da transcrição por meio da fosforilação da RNA polimerase II
CDK10	Fosforilação de ETS2 resultando na degradação de ETS2
CDK11	Envolvido na regulação de splicing pré-mRNA
CDK12	Regula a expressão do gene por meio da fosforilação da RNA polimerase II
CDK13	Envolvido na regulação da transcrição e splicing pré-mRNA
CDK14	Ativador da via de sinalização Wnt
CDK15	Inibe a apoptose induzida por TRAIL via fosforilação de survivina
CDK16	Promove a miogênese esquelética e a espermatogênese
CDK17	Envolvido na diferenciação neuronal
CDK18	Impede o acúmulo de danos ao DNA e instabilidade genômica
CDK19	Envolvido na regulação da transcrição da RNA polimerase II
CDK20	Promove a transição da fase G1 para a fase S por meio da fosforilação de CDK2

Fonte: Adaptado de (BAZZI; TAI, 2021).

3.1.2. Quinase dependente de ciclina 10 humana

A quinase dependente de ciclina 10 (CDK10) é uma quinase relacionada à Cdc2 (CDK1), é também conhecida por PISSLRE (MALUMBRES, 2014) e está envolvida na regulação da transição de fase G2/M do ciclo celular (LI et al., 1995). A análise da sequência de aminoácidos mostrou de 38 a 45% de identidade com outras CDKs, e a localização cromossômica do gene que codifica a CDK10 foi determinado como 16q24.3 (GRAÑA et al., 1994). O gene da CDK10 contém 13 éxons, dentro de aproximadamente 15000 pares de base de DNA genômico (BAZZI; TAI, 2021).

A CDK10, mencionada pela primeira vez em 1994 (GRAÑA et al., 1994), recebeu pouco interesse até os estudos de IORNS et al. em 2008, quando demonstraram que a CDK10 é um fator determinante crítico de resistência ao tamoxifeno para o tratamento de câncer de mama, combinado com terapia endócrina. A partir de estudos de silenciamento da CDK10, eles obtiveram como resultado um aumento da transcrição de c-RAF que é guiado pelo fator de transcrição ETS2, isso promoveu a ativação da via MAPK, conduzindo à perda de dependência das células tumorais à sinalização de estrogênio (IORNS et al., 2008).

Outros estudos mostraram que a CDK10 se liga à ciclina M, participando da fosforilação do fator de transcrição ETS2, controlando a sua estabilidade (GUEN et al., 2013). Na ausência de CDK10, os níveis de proteína ETS2 endógena estão aumentados. A superexpressão de ETS2 foram implicados nas características fisiopatológicas de síndrome de Down, e alterações em sua expressão em camundongos resultaram em mal formações da coluna (ŁUKASIK; ZAŁUSKI; GUTOWSKA, 2021; SIMPSON; WOODWORTH; DIPAOLO, 1997). Outros estudos também demonstraram que mutações no gene de CDK10 levam à síndrome de Al Kaissu, uma desordem de desenvolvimento autossômica recessiva caracterizada por retardo no crescimento e mal formação da coluna, particularmente a coluna cervical (ŁUKASIK et al., 2021; IORNS et al., 2008).

Um método de regulação da CDK10 é descrito por *splicing* alternativo de transcritos de pré-RNA mensageiro. Diversas isoformas de CDK10 têm sido identificadas, porém apenas duas produzem proteínas funcionais: o transcrito completo, que codifica uma proteína de 360 aminoácidos e outra que codifica uma variante truncada de 272 aminoácidos. A isoforma menor não interage com ETS2, se liga fracamente à ciclina M e não contém o domínio de ligação de ATP, sendo assim, é enzimaticamente inativa (BAZZI; TAI, 2021; GUEN et al.,

2013). Dadas essas observações, sugere-se que o *splicing* alternativo é um método importante de regulação da atividade da CDK10 (BAZZI; TAI, 2021). Também tem sido demonstrado que a expressão de CDK10 é diminuída em carcinoma nasofaríngeo e a superexpressão de CDK10 suprime fortemente o crescimento e a metástase de células cancerígenas (YOU et al., 2013).

Pesquisas desenvolvidas por WEISWALD et al., (2017) demonstraram que a modulação da expressão da CDK10 em linhagens celulares de câncer colorretal promoveu crescimento celular, além da redução da quimiossensibilidade e inibição da apoptose por meio da regulação positiva da expressão de Bcl-2, indicando um papel importante na doença, sendo então considerado um potencial alvo terapêutico para tratamento (WEISWALD et al., 2017).

Robert e colaboradores estudaram alguns dos mais conhecidos inibidores de CDKs para inibir o complexo CDK10/CycM in vitro, entre os quais SNS-032 clinicamente testado, riviciclib, flavopiridol, dinaciclib, AZD4573 e AT7519 (ROBERT et al., 2020). Estes estudos abrem margens para novos desafios na área de química farmacêutica, pois devem ser projetados inibidores de CDK10 que não inibem (ou que inibem menos) outras CDKs. Pesquisas conduzidas por CAI e colaboradores (2021) sugerem que a expressão de CDK10 é positivamente regulada na doença vitiligo, o que implica na redução do risco associado a essa condição. Desta forma, a CDK10 pode ter papel significativo no desenvolvimento desta doença (CAI et al., 2021). Além disso, pesquisas realizadas por FREDI e colaboradores (2023) demonstraram que a expressão gênica de CDK10 e CDK11 teve aumento estatisticamente significativo no grupo de pacientes com Doença de Alzheimer e que o aumento ocorreu principalmente no cerebelo (FREDI et al., 2023). Apesar do progresso nas pesquisas, as funções biológicas da CDK10 ainda são bastante desconhecidas e a sua estrutura cristalográfica ainda não foi descrita na literatura.

3.2. Objetivos

Tendo em vista a importância dos estudos estruturais da CDK10 humana para posteriores pesquisas que levam em consideração esta quinase como alvo de drogas em determinadas doenças, nesta parte do trabalho os *objetivos gerais* incluíram também:

- Obter a proteína recombinante CDK10 humana por expressão heteróloga em *Escherichia coli*, purificar e realizar estudos de caracterização biofísica;
- Realizar estudos estruturais da CDK10 humana a partir de ferramentas de bioinformática.

Para isto, os seguintes *objetivos específicos* foram determinados:

- Fazer testes de expressão de modo a obter a melhor metodologia de superexpressão;
- Realizar ensaios de purificação com o intuito de obter alta porcentagem de pureza;
- Realizar ensaios de dicroísmo circular e outros experimentos de caracterização biofísica afim de obter informações sobre a estrutura da CDK10;
- Conduzir estudos de modelagem molecular, para desenvolver um modelo molecular preciso da estrutura da CDK10 humana, visando futuramente realizar simulações de interação proteína-inibidor (docagem molecular).

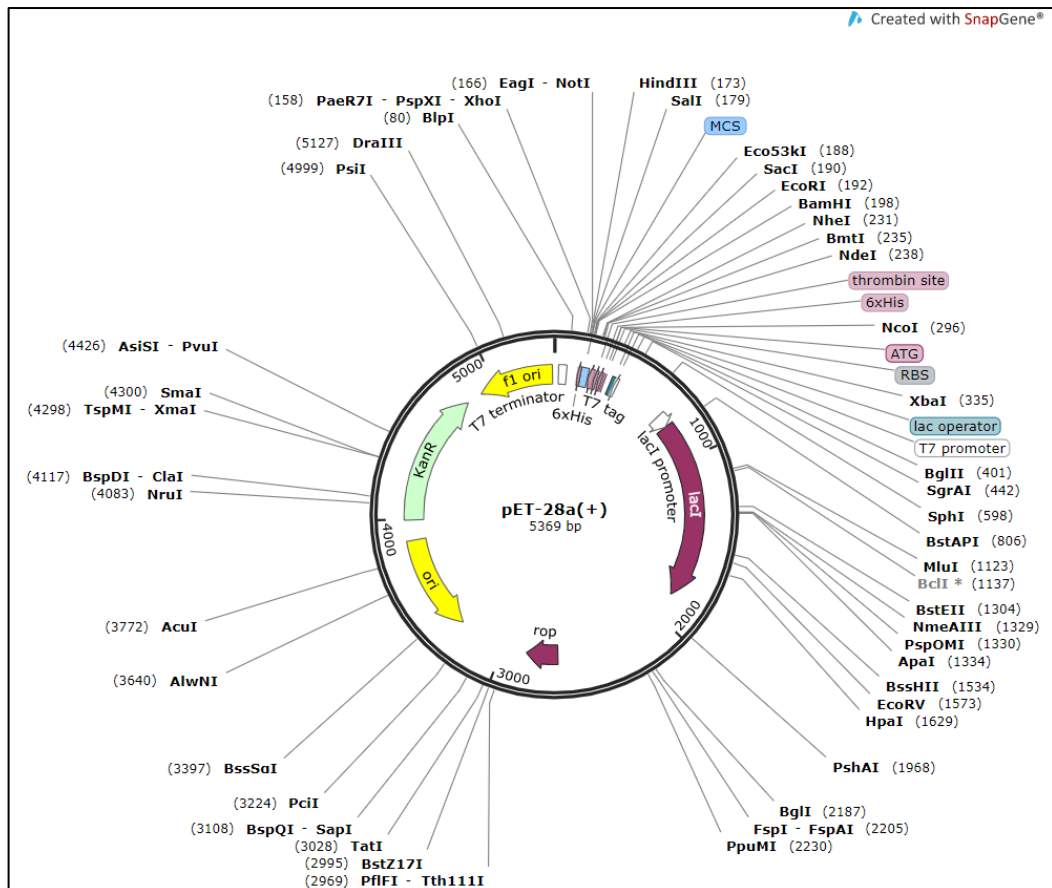
3.3. Metodologia

3.3.1. Propagação do DNA recombinante pET28a-CDK10

O DNA recombinante pET28a-CDK10 foi sintetizado e adquirido pela empresa “*Epoch Life Science*” e já se encontrava disponível no laboratório. Alguns estudantes já haviam trabalhado com este DNA recombinante em experimentos de expressão, mas não obtiveram resultados interessantes.

A sequência da CDK10 presente neste DNA recombinante é a da isoforma 1 da CDK10 humana e está entre os sítios de *BamHI* e *SalI*. O mapa do plasmídeo pET28a(+) é mostrado na Figura 42.

Figura 42. Mapa do plasmídeo pET28a(+).



Fonte: *Snapgene*.

Para propagação do DNA recombinante pET28a-CDK10 foi realizada transformação deste DNA em células de *E. coli* DH5 α , de acordo com o protocolo descrito na seção 2.4.1., porém utilizando canamicina como antibiótico, na concentração final de 30 μ g/mL.

A partir das colônias que cresceram na placa, foram realizados 2 pré-inóculos, cada um em 10 mL de meio LB e antibiótico canamicina na concentração final de 30 μ g/mL. Estes pré-inóculos foram deixados sob agitação no shaker, a 200 rpm e 37°C, *overnight*. A extração e purificação de pET28a-CDK10 foi realizada também utilizando o kit *GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific)* de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado pelo espectrofotômetro *DS-11+ (De Novix)* do laboratório do Grupo de Química Medicinal e Biológica do IQSC e estocado a -20°C.

3.3.2. Experimentos de expressão e purificação da CDK10 humana recombinante

Os procedimentos experimentais utilizados para obter e purificar a CDK10 recombinante humana são descritos nesta seção. Diversas condições de ensaio foram avaliadas, e da mesma maneira como na seção 2.4.2., cada experimento está numerado e detalhado para simplificar a compreensão do desenvolvimento deste trabalho.

- **Experimento 1 – Teste de expressão com adição de etanol ao meio de cultura**

Este experimento de expressão de CDK10 humana recombinante foi feito de acordo com o protocolo estabelecido pelo estudo de *Chhetri e colaboradores (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015)*, utilizando 3% de adição de etanol ao meio de cultura para otimizar a expressão de proteínas recombinantes. Foram preparados dois testes de expressão, sendo um deles considerado o controle (sem adição de etanol) e o outro, o teste de expressão (com adição de etanol). Inicialmente foi realizada a transformação de pET28a-CDK10 em células da linhagem de expressão *E. coli* Rosetta(DE3), mantendo-se as mesmas condições do experimento descrito para a propagação de pET28a-CDK10. A partir de colônias crescidas na placa de Petri, foram preparados pré-inóculos, da mesma maneira como descrito na seção anterior, porém com 5 mL de meio em cada. Procedeu-se adicionando o conteúdo dos pré-inóculos em erlenmeyers contendo 500 mL de meio LB e antibiótico canamicina na

concentração final de 30 µg/mL. Estes erlenmeyers foram colocados sob agitação de 200 rpm no shaker a 37°C. A densidade óptica (D.O.) à 600 nm foi monitorada ao longo do tempo no espectrofotômetro *Biomate3* (*Thermo Fisher Scientific*). Quando a D.O. atingiu valor entre 0,4 e 0,6 foi modificada a temperatura dos ensaios para 20°C e adicionado isopropil β-D1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) na concentração final de 0,6 mM e 3% de etanol em um deles. Em seguida, os erlenmeyers foram colocados novamente sob agitação a 200 rpm a 20°C, *overnight*. Ao final da indução, o conteúdo dos erlenmeyers foi centrifugado a 9000 rpm e 4°C por 30 minutos, com o uso da centrífuga *CR 21GII* (*HITACHI*). Foram retiradas amostras antes da indução, denominadas de T0 (Tempo Inicial) e ao final do experimento, denominadas de TF (Tempo Final) para posterior análise em eletroforese SDS/PAGE.

- **Experimento 2 – Teste de expressão em meio LB**

Neste experimento, inicialmente foi realizada a transformação de pET28a-CDK10 (para teste de expressão de CDK10 recombinante) e pET28a(+) (para teste de expressão controle), em células da linhagem de expressão *E. coli* BL21(DE3), mantendo-se as mesmas condições descritas no procedimento de transformação de pET28a-CDK10 em células DH5α.

A partir de colônias crescidas na placa de Petri, foram preparados pré-inóculos, cada um contendo 5 mL de meio LB. Para ambos os ensaios, procedeu-se adicionando o conteúdo dos pré-inóculos em erlenmeyers contendo 100 mL de meio LB e antibiótico canamicina na concentração final de 30 µg/mL. Estes erlenmeyers foram deixados sob agitação de 200 rpm a 37°C, sendo que a D.O. foi monitorada e quando atingiu valor entre 0,4 e 0,6, foi adicionado IPTG na concentração final de 0,1 mM. Após adição de IPTG, os erlenmeyers retornaram aos shaker, sob agitação de 200 rpm a 37 °C durante 5 horas. Foram retiradas amostras antes e ao final da indução para posterior análise em eletroforese SDS/PAGE. Depois de 5 horas de indução, os meios de cultura foram centrifugados a 9000 rpm a 4°C por 30 minutos. Os extratos bacterianos foram armazenados no freezer a -20°C.

- **Experimento 3 – Teste de expressão em meio SOB**

Este ensaio foi realizado de maneira análoga ao experimento 2, variando-se somente o meio de cultura. Ao invés de meio LB, foi utilizado o meio *Super Optimal Broth* (SOB) (2g de Triptona, 0,5g de Extrato de Levedura, 0,05g de NaCl, 1 mL de solução KCl 250 mM, 1 mL de solução MgCl₂ 1 M, em 100 mL de água deionizada, pH 7,0).

- **Experimento 4 – Teste de expressão com variação na concentração de IPTG**

As condições experimentais foram mantidas semelhantes ao experimento 2, porém foi modificada a concentração final de IPTG para 0,6 mM.

- **Experimento 5 – Teste de purificação por reenovelamento com SDS**

Novos experimentos de expressão foram realizados em maior quantidade de meio de cultura LB (500 mL de meio), seguindo-se o protocolo descrito para o experimento 2. De forma resumida, foram feitos vários testes de lise e purificação em coluna de níquel *HisPur Ni-NTA* (*Thermo Fisher*) com gradiente de imidazol, seguindo-se o protocolo de reenovelamento com 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) de HE & OHNISHI (2017). A *cauda de histidina* introduzida pelo vetor pET28(a)+ permite que seja empregada essa estratégia de isolamento da proteína por afinidade ao níquel, ligado à resina.

Os sedimentos bacterianos foram lisados com Tampão de Lise (15 mM de Tris Base, 100 mM de NaCl, 10 mM de MgCl₂·6H₂O, 10 % de glicerol, pH 7,4), de modo que a cada 1g de sedimento, 5 mL de tampão de lise eram adicionados. Após a ressuspensão no tampão, foram adicionados Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), DNase e lisozima (concentrações finais de 1mM, 0,1U/mL e 0,1mg/mL, respectivamente), e em seguida foram incubados no gelo por 30 minutos. Após esse período, as amostras lisadas foram sonicadas no sonicador *Sonic Dirmembratos Model 500* (*Thermo Fisher Scientific*), em 10 pulsos de 30 segundos com intervalos de 59,9 segundos para dissipação do calor numa amplitude de 20%. Este

procedimento foi realizado no laboratório do Grupo de Química Medicinal e Biológica do IQSC. Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas a 14000 rpm a 4°C por 30 minutos.

Os precipitados obtidos nessa etapa de lise foram lavados com 10 mL de Tampão de Lavagem (15 mM de Tris Base pH 7,4) e centrifugados a 11000 rpm a 4°C por 10 minutos. O procedimento de lavagem foi repetido três vezes. As frações obtidas no precipitado foram solubilizadas com 7 mL de tampão de ressuspensão (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 5 mM de imidazol, 2 % de SDS, pH 7,4) deixando-se sob agitação por aproximadamente 24 horas. Após esse período, as amostras foram sonicadas em 5 pulsos de 30 segundos com intervalos de 59,9 segundos em uma amplitude de 20% e em seguida foram deixadas de repouso por 20 minutos a 4°C. Depois, as amostras foram centrifugadas a 11000 rpm a 4°C por 10 minutos. As frações sobrenadantes foram adicionadas na coluna de níquel que estava previamente equilibrada com Tampão de ligação (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 5 mM de imidazol, 10% de glicerol, pH=7,4), e eluídas em gradiente de imidazol, utilizando tampão de ligação contendo concentrações variando de 15 a 500 mM de imidazol.

- **Experimento 6 – Teste de purificação da fração solúvel**

No experimento 6 foram realizados dois testes de expressão de CDK10, sendo que em um deles foi utilizado o meio LB, 0,1mM IPTG, 5 horas de indução, 37°C a 200 rpm de agitação e no outro, meio SOB como meio de cultivo, 0,1mM IPTG, 20 horas de indução, 12°C a 200 rpm de agitação. Os sedimentos bacterianos obtidos foram lisados conforme já mencionado anteriormente, e as frações sobrenadante dos dois testes de expressão foram analisados em eletroforese SDS/PAGE. Além disso, a fração sobrenadante obtida da expressão com meio LB foi utilizada na sequência para um novo ensaio de purificação em coluna de níquel *HisPur Ni-NTA* (Thermo Fisher). Primeiramente a coluna de níquel foi equilibrada com Tampão de ligação (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 5 mM de imidazol, 10% de glicerol, pH=7,4), e as frações foram eluídas em gradiente de imidazol, utilizando o tampão de ligação contendo concentrações variando de 15 a 500 mM de imidazol.

3.3.3. Experimentos de clonagem do domínio quinase da CDK10 humana

- **Amplificação da sequência de DNA do domínio quinase da CDK10 humana**

Para amplificação, inicialmente foram desenhados os *primers* correspondentes às bases que compõem o domínio quinase adicionando os sítios de restrição de *BamHI* e *XhoI*, e posteriormente foram adquiridos pela empresa Sigma Aldrich. De posse dos primers, uma reação de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada de acordo com as quantidades descritas no Quadro 5, com gradiente de temperatura (59,9°C, 62,6°C, 66,2°C, 69,0°C) e protocolo conforme as instruções da polimerase utilizada. A amostra de DNA *template* de CDK10 utilizada foi a miniprep de pET28-CDK10 microtubo-1 obtida na seção 3.3.1. O resultado foi analisado em eletroforese utilizando gel de agarose 0,8%.

Quadro 5. Componentes e quantidades utilizados para a reação de PCR com gradiente de temperatura.

Componente	Quantidade para 50 μ L de reação de PCR
Água deionizada autoclavada	32 μ L
5X <i>Phusion</i> HF - Tampão	10 μ L
10 mM dNTPs	1 μ L
<i>Primer Forward</i> 10 mM	2,5 μ L
<i>Primer Reverse</i> 10 mM	2,5 μ L
<i>Template</i>	1 μ L
<i>Phusion</i> TM <i>High-Fidelity</i> DNA Polymerase 2U/ μ L	0,5 μ L
MgCl ₂ 25 mM	0,5 μ L

Fonte: A autoria própria.

Depois do teste de temperatura de anelamento, foi realizada uma reação de PCR de acordo com as quantidades proporcionais descritas no Quadro 6, em um volume de 200 μ L de reação total, na temperatura de 66,2°C. Ao final da reação, todo o conteúdo foi adicionado no gel de agarose 0,8% e após a eletroforese, a banda referente ao DNA amplificado foi recortada

do gel e purificada com o kit *GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific)*, seguindo as instruções do fabricante e posteriormente a amostra final foi quantificada.

- **Clonagem do domínio quinase da CDK10 humana**

Para realizar a clonagem, a amostra de PCR purificada foi digerida com as enzimas de restrição *BamHI (Thermo Scientific)* e *XhoI (Biolabs)* seguindo o protocolo estabelecido para as enzimas. Posteriormente foi realizada eletroforese em gel de agarose e a banda correspondente foi recortada do gel e purificada com o uso do Kit *GeneJET Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific)*. Por fim, a amostra obtida foi quantificada.

O plasmídeo utilizado para clonagem foi o pET28 modificado com a adição do gene da proteína SUMO (*Small Ubiquitin-like Modifier*), a qual quando expressa como proteína de fusão, pode ajudar a proteína alvo a enovelar-se. A SUMO protease é utilizada para hidrolisar a proteína de fusão (SUMO), após a expressão. Este vetor foi cedido gentilmente pelo Instituto de Física de São Carlos (IFSC) ao nosso grupo de pesquisa. O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *XhoI*, em seguida a amostra foi purificada após eletroforese em gel de agarose com o uso do KIT de extração e posteriormente o DNA foi quantificado, do mesmo modo descrito no parágrafo anterior. A reação de ligação foi realizada em um volume total de 20µL com as amostras de pET28-SUMO e o produto de PCR digeridas e purificadas utilizando a enzima *T4 DNA Ligase Thermo Scientific*, seguindo-se as instruções para a referida enzima.

Dos 20 µL de reação de ligação preparados, foram transformados 10µL em células DH5α, utilizando a canamicina como antibiótico na concentração final de 30µg/mL. A partir de colônias crescidas na placa, foram preparados pré-inóculos de 5 mL de meio LB cada (37°C, 200 rpm, *overnight*) para posterior extração do DNA plasmidial com uso do *kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific)*.

Para confirmação da clonagem do *pET28-SUMO-CDK10-domínioquinase* foi realizada uma reação de PCR, utilizando as mesmas condições anteriormente descritas, porém utilizando como *template* as amostras de DNAs obtidas a partir das *minipreps* das colônias que cresceram nas placas após a transformação com o produto de ligação. E por fim, as amostras foram

preparadas e enviadas para sequenciamento no laboratório do Grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” da Universidade de São Paulo.

3.3.4. Análise in silico da CDK10 humana

- **Informações gerais**

Para obter algumas informações a respeito da CDK10 humana, inicialmente foi realizada uma busca no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) para obter a sequência de aminoácidos da proteína. Depois de encontrada a sequência, ela foi utilizada na ferramenta online *PSIPRED* disponível em <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> para predição de estrutura secundária da CDK10 humana e na ferramenta online *Expasy/Protparam*, disponível em <https://web.expasy.org/protparam/>, para predição da massa molecular, pI teórico, índice alifático e Grande média de Hidropatia – GRAVY.

- **Modelagem Molecular por Homologia**

Para obtenção do modelo molecular da proteína CDK10 humana foi utilizado o *software Modeller* na versão 9.22. Para escolha dos moldes (*templates*), foi realizada uma busca de estruturas depositadas no banco de dados PDB a partir da sequência completa de aminoácidos da CDK10 humana, utilizando a ferramenta BLAST. Duas estruturas foram escolhidas como *templates*. Além disso, somente com um dos *templates* foi realizado o alinhamento entre a sequência de aminoácidos e da CDK10 humana na ferramenta online ESPript 3.0 para verificar similaridade de estruturas secundárias entre as sequências. Semelhante ao descrito na seção 2.4.4., para cada *template* foi realizado um teste de modelagem, aqui utilizando somente o domínio quinase da CDK10 como sequência-alvo, gerando 100 modelos. Posteriormente, estes modelos foram analisados para seleção do modelo ideal para cada teste, de acordo com os valores de energia e pela análise dos gráficos de Ramachandran, obtidos a partir do uso da ferramenta online SAVES v. 6.0. Depois de selecionados, apenas um dos modelos foi escolhido para estudo de superfície hidrofóbica e eletrostática. Além disso, foi feita uma pesquisa no *AlphaFold* sobre a estrutura da CDK10 humana. Os dois modelos obtidos pelo *Modeller* foram comparados com o modelo obtido pelo *AlphaFold*. Para visualizar todas as estruturas obtidas, bem como os *templates* e para os estudos de superfícies hidrofóbicas e eletrostáticas, utilizou-se o *software Pymol* Versão 2.5.

3.4. Resultados e Discussão

3.4.1. Propagação do DNA recombinante pET28a-CDK10

Conforme o protocolo descrito na seção 3.1.1. foi realizada a extração de pET28a-CDK10, a partir de dois pré-inóculos contendo 10 mL de meio cada. As concentrações de pET28a-CDK10 obtidas são descritas no Quadro 6.

Quadro 6. Concentrações de pET28a-CDK10 obtidas a partir de *miniprep*.

Amostra	Concentração de pET28a-CDK10
Microtubo-1	97,58 ng/ μ L
Microtubo-2	138,50 ng/ μ L

Fonte: Autoria própria.

3.4.2. Experimentos de expressão e purificação da CDK10 humana recombinante

O avanço na tecnologia do DNA recombinante permitiu a fusão da combinação desejada de extensões de aminoácidos no N- ou C-terminais da proteína de interesse, uma estratégia que facilita a purificação de proteínas, pois essas caudas associam-se a uma matriz (resina) de afinidade definida, permitindo o isolamento e a purificação da proteína com cauda (MISHRA, 2020). As características mais desejáveis das caudas que conferem afinidade incluem a flexibilidade de uso (ou seja, uso no N- ou C- terminais da proteína), possibilidade de clivagem, detecção por anticorpos (imunodetectabilidade) e custo-efetividade (LICHTY et al., 2005). A cauda de polihistidina, mais conhecida como *His-tag*, possui estes atributos. Além disso, ela pode ser utilizada em condições não desnaturantes ou desnaturantes, o que a torna interessante em protocolos que envolvem o reenovelamento de proteínas (DASHIVETS et al., 2009; MISHRA, 2020). Outra cauda bastante utilizada é a “*Small ubiquitin-related modifier*” (SUMO) que contribui no aumento do nível de expressão de proteínas recombinantes e melhora a solubilidade da proteína (MISHRA, 2020; ZUO et al., 2005).

A *Escherichia coli* é o hospedeiro muito utilizado para superexpressão de proteínas recombinantes por apresentar algumas características interessantes, como fácil manuseio, rápido cultivo e por ser um método barato em comparação a outros, resultando em altos níveis de proteínas. No entanto, inúmeras proteínas formam corpos de inclusão quando superexpressas em *E. coli*, precisando ser solubilizadas e reenoveladas para que sejam proteínas funcionais (DE BERNARDEZ CLARK, 1998; IDICULA-THOMAS; BALAJI, 2005).

Diversos fatores têm sido sugeridos como colaboradores para a formação de corpos de inclusão em *E. coli*: a alta concentração local da proteína superexpressa; um ambiente redutor no citoplasma devido aos altos níveis de glutatona que impedem a formação de ligação dissulfeto (DE BERNARDEZ CLARK, 1998; MAKRIDES, 1996); a falta de modificações pós traducionais, por exemplo, a glicosilação que pode contribuir para melhorar a solubilidade da proteína (ZHANG et al., 1998) ; interações não específicas com chaperonas e outras proteínas que participam do processo de enovelamento (MOGK; MAYER; DEUERLING, 2002); o aumento da agregação de intermediários enovelados devido à solubilidade limitada , entre outros (IDICULA-THOMAS; BALAJI, 2005). Idicula-Thomas e Balaji (2005) estudaram a relação entre a estrutura primária e a solubilidade na superexpressão, e seus resultados mostraram uma correlação positiva entre a termoestabilidade e solubilidade de proteínas, e uma inversa correlação entre o tempo de meia vida de proteínas *in vivo* e solubilidade. A composição dos aminoácidos asparagina, treonina e tirosina e a frequência do tripeptídeo na proteína também influenciam na solubilidade na superexpressão. Ainda, seus resultados mostraram que os aminoácidos que estão presentes em alta frequência em corpos de inclusão têm alta propensão a formar a estrutura secundária folha beta, ao contrário dos aminoácidos mais encontrados em proteínas solúveis, que por sua vez tem alta propensão a formar estrutura secundária alfa-hélice (IDICULA-THOMAS; BALAJI, 2005).

Após a expressão, a proteína pode não ter a possibilidade de formar uma estrutura terciária nativa. Neste caso, é formada uma massa de proteínas conhecida como “corpo de inclusão” que se acumula no interior da célula bacteriana na forma de partículas (HASHEMZADEH et al., 2021; PARK et al., 2018). O nível de agregação dos corpos de inclusão está associado ao grau de hidrofobicidade inerente da proteína, e maior taxa de hidrofobicidade aumenta a possibilidade de acúmulo de áreas hidrofóbicas e assim, maiores taxas de precipitação de proteínas (BANEYX, 1999; HASHEMZADEH et al., 2021; QIN et al., 2017; SWARTZ, 2001). A superfície de uma proteína pode apresentar uma distribuição heterogênea de cargas e hidrofobicidade que podem influenciar sua solubilidade, estabilidade e

funcionalidade em diferentes ambientes (CHAO; MA; STADTMAN, 1997; FACCIO, 2018; FRANCO; ANDREWS; ASENJO, 2000). Desta maneira, as características da superfície de uma proteína desempenham um papel crucial na estabilidade conformacional das proteínas e interação com outras biomoléculas (FACCIO, 2018).

A expressão de proteínas recombinantes na forma de corpos de inclusão apresenta alguns benefícios, dentre os quais podemos citar: alta expressão de proteína até mais de 30% em alguns casos, método fácil de separação dos corpos de inclusão de células devido a diferenças em seu tamanho geral e densidade em comparação com outras proteínas expressas na célula, baixo nível de proteínas expressas degradadas na forma de corpos de inclusão, resistência a ataques proteolíticos de proteases celulares, e altos graus de homogeneidade nos corpos de inclusão, que reduzem o número de etapas para obter uma proteína pura (EHGARTNER et al., 2017; HASHEMZADEH et al., 2021; HOFFMANN et al., 2018; JÜRGEN et al., 2010; WALSH, 2014).

No entanto, também existem algumas desvantagens, e a principal é o dobramento incompleto da proteína nativa e a mudança na estrutura conformacional, o que resulta em falta de bioatividade. Para contornar o problema, existem metodologias de reenovelamento que conseguem reverter os corpos de inclusão em proteínas enoveladas em sua forma correta e que possuam atividade biológica (HASHEMZADEH et al., 2021).

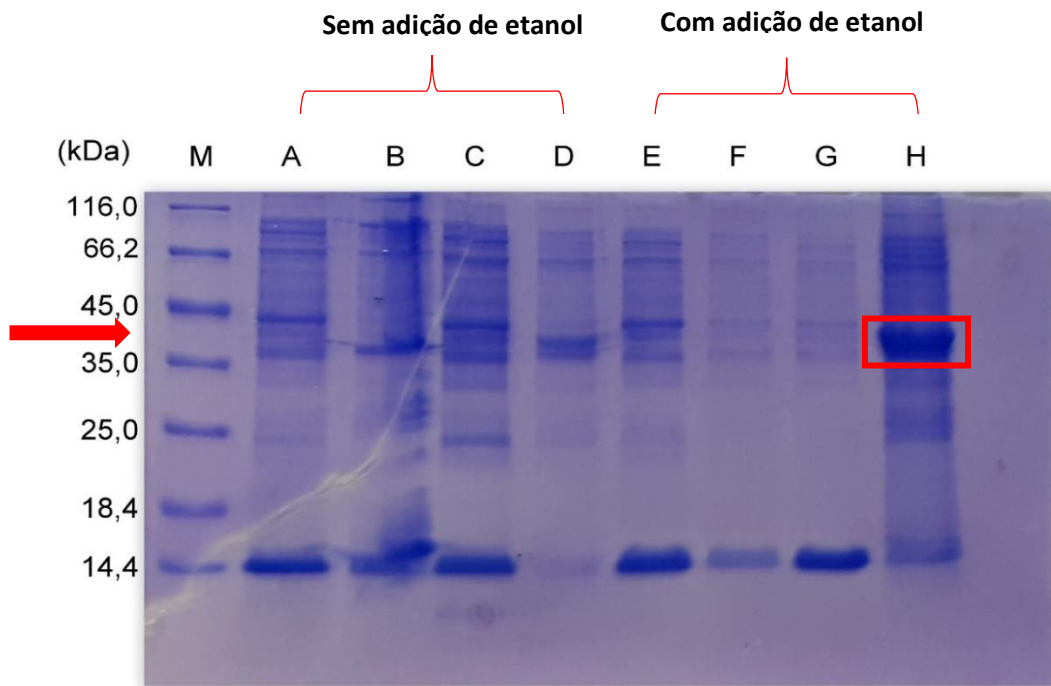
Os corpos de inclusão são insolúveis e podem ser precipitados e isolados em uma centrífuga simples (10000-14000 rpm, 5-20 minutos). Após centrifugação, devem serem submetidos a uma série de etapas, incluindo a lavagem e purificação, solubilização em tampão adequado, reenovelamento e recuperação da estrutura nativa e funcional (HASHEMZADEH et al., 2021; KHAN et al., 1998; PANDA, 2003; PATRA et al., 2000a, 2000b; RAINA et al., 2004), pois as proteínas recombinantes expressas como corpos de inclusão possuem uma estrutura secundária nativa, no entanto, a estrutura terciária é parcialmente enovelada (dobrada) (HASHEMZADEH et al., 2021; SLOUKA et al., 2018).

- **Experimento 1 - Teste de expressão com adição de etanol ao meio de cultura**

Com o intuito de testar outros protocolos de obtenção da proteína CDK10 recombinante na forma solúvel, uma vez que em nosso laboratório já haviam sido testadas anteriormente algumas condições de expressão desta proteína, porém sem sucesso, foi realizado um experimento que teve como base um estudo realizado por CHHETRI e colaboradores (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015), que utiliza 3% de adição de etanol com o objetivo de otimizar a expressão de proteínas recombinantes. No trabalho publicado de CHHETRI e colaboradores (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015) supõe-se que o aumento da expressão de proteínas recombinantes sob a influência do etanol pode ser explicado pelo fato de o etanol ser uma molécula anfipática, que pode provocar alterações na fluidez e composição da membrana, sendo que essas mudanças podem influenciar processos celulares, como a replicação de DNA, aumentando a síntese de DNA, que resultaria em um aumento da síntese de proteínas que são induzíveis em células tratadas com etanol (CHHETRI; KALITA; TRIPATHI, 2015).

O resultado da análise por eletroforese SDS/PAGE é mostrado na Figura 43. A CDK10 recombinante humana possui massa de 41 kDa, e de acordo com a análise do gel, foi possível obter a CDK10 no ensaio com adição de etanol, porém a proteína é encontrada na fração precipitado (*pellet*), ou seja, a CDK10 recombinante foi expressa e está sob a forma de corpos de inclusão. A partir deste resultado, outros experimentos foram realizados a fim de obter proteína recombinante CDK10 em grande quantidade e na forma solúvel.

Figura 43. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final). M: Marcador de massa molecular. Raias de A até D são relativas ao experimento sem adição de etanol. Raias de E até H são relativas ao experimento com adição de etanol. Raias: A: T0 sobrenadante, B: T0 precipitado, C: TF sobrenadante, D: TF precipitado, E: T0 sobrenadante, F: T0 precipitado, G: TF sobrenadante, H: TF precipitado.

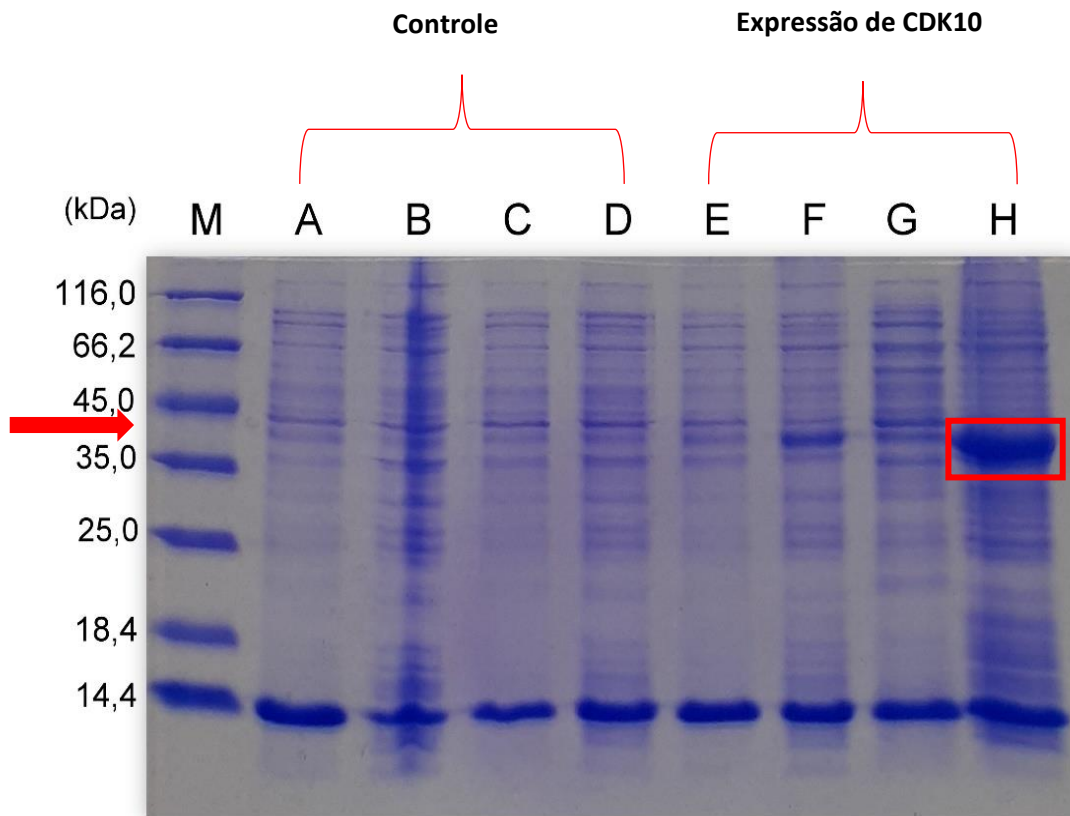


Fonte: Autoria própria.

- **Experimento 2 - Teste de expressão em meio LB**

O experimento de expressão 2 foi preparado comparando-se dois ensaios, um controle realizado a partir do plasmídeo pET28a(+) e um teste de expressão de CDK10, utilizando o plasmídeo recombinante pET28a-CDK10. As condições para ambos os ensaios foram a utilização da linhagem de expressão *E. coli* BL21(DE3), em meio LB, durante 5 horas de indução a 37 °C, sob agitação de 200 rpm e com adição de 0,1 mM de IPTG. A análise das amostras recolhidas no experimento é mostrada na Figura 44..

Figura 44. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final) utilizando meio LB. M: Marcador de massa molecular. Raias de A até D são relativas ao experimento controle. Raias de E até H são relativas ao experimento de expressão de CDK10. Raias: A: T0 sobrenadante, B: T0 precipitado, C: TF sobrenadante, D: TF precipitado, E: T0 sobrenadante, F: T0 precipitado, G: TF sobrenadante, H: TF precipitado.



Fonte: Autoria própria.

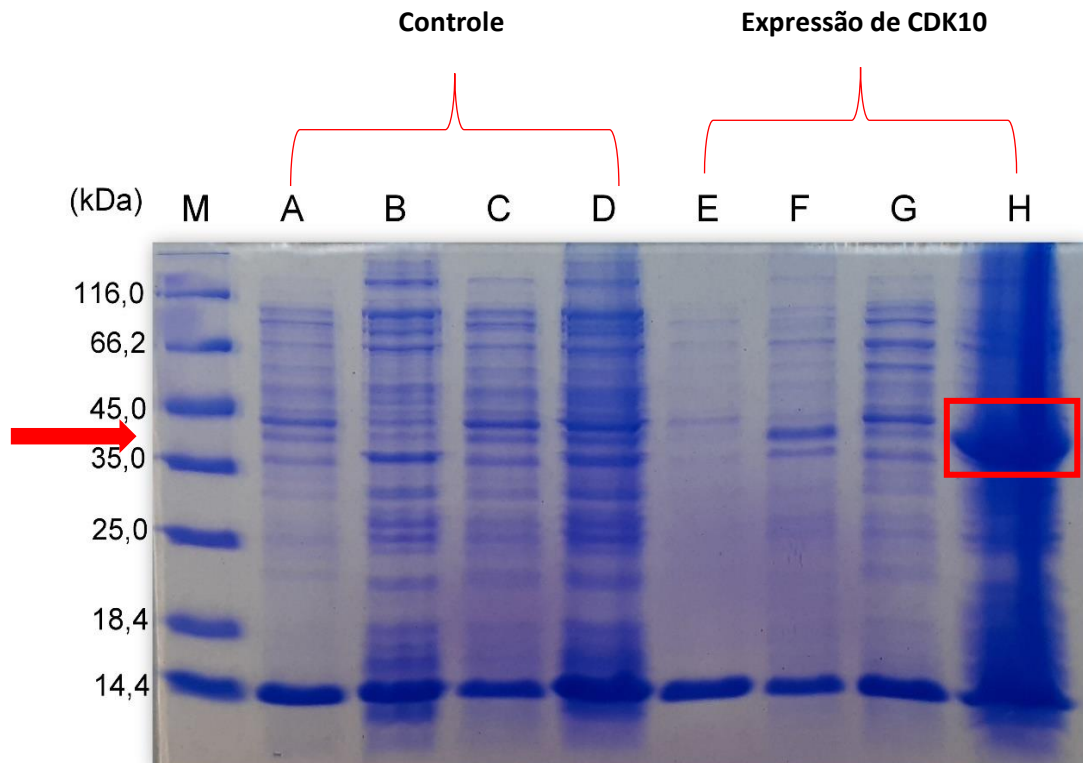
Nota-se que nas raias referentes ao controle não há expressão de proteína na faixa da massa molecular da CDK10 recombinante humana, que é de 41 kDa. Entretanto, nas raias F e H é possível verificar a presença de bandas mais intensas nesta região, indicando que a CDK10 começa a ser expressa antes da adição de IPTG, porém está sob a forma de corpos de inclusão, pois aparece na fração precipitado da amostra retirada antes da indução (raia F – T0 precipitado). Já na raia H, a banda na região de 41 kDa é bastante intensa, indicando que há um aumento de expressão de CDK10 após a adição de IPTG, contudo continua sob a forma de corpos de inclusão (Raia H – TF precipitado).

Experimento 3 - Teste de expressão em meio SOB

Ainda com o objetivo de conseguir a superexpressão de CDK10 na forma solúvel, o experimento 3 foi realizado comparando os perfis de expressão de pET28a(+) e o recombinante pET28a-CDK10, mantendo-se as condições do experimento 2, porém utilizando meio de cultura SOB ao invés do meio LB. Entretanto, durante a execução dos ensaios foi observado que a densidade óptica do teste de expressão controle apresentava valor maior em relação ao teste de expressão de CDK10, no mesmo intervalo de tempo, ou seja, para atingir valor ideal de densidade óptica para indução, o teste de expressão demora muito mais tempo do que o teste controle (dados não mostrados). Ainda, fazendo um paralelo com o experimento 2, notou-se que somente com o meio SOB houve lentidão no crescimento bacteriano, tanto no teste controle quanto no teste de expressão da CDK10. Apesar do crescimento mais lento, o experimento foi concluído e a análise das amostras retiradas antes da indução e ao final dos testes é mostrada na Figura 45.

Observa-se que a CDK10 recombinante humana é expressa, porém sob a forma de corpos de inclusão, pois a banda mais intensa na região de 41 kDa está presente na raia H (TF-precipitado) e que não há bandas nesta faixa de tamanho para o teste controle. Novas tentativas de experimentos foram realizadas mantendo o objetivo de superexpressão da CDK10 recombinante na forma solúvel.

Figura 45. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final) utilizando meio SOB. M: Marcador de massa molecular. Raias de A até D são relativas ao experimento controle. Raias de E até H são relativas ao experimento de expressão de CDK10. Raias: A: T0 sobrenadante, B: T0 precipitado, C: TF sobrenadante, D: TF precipitado, E: T0 sobrenadante, F: T0 precipitado, G: TF sobrenadante, H: TF precipitado.

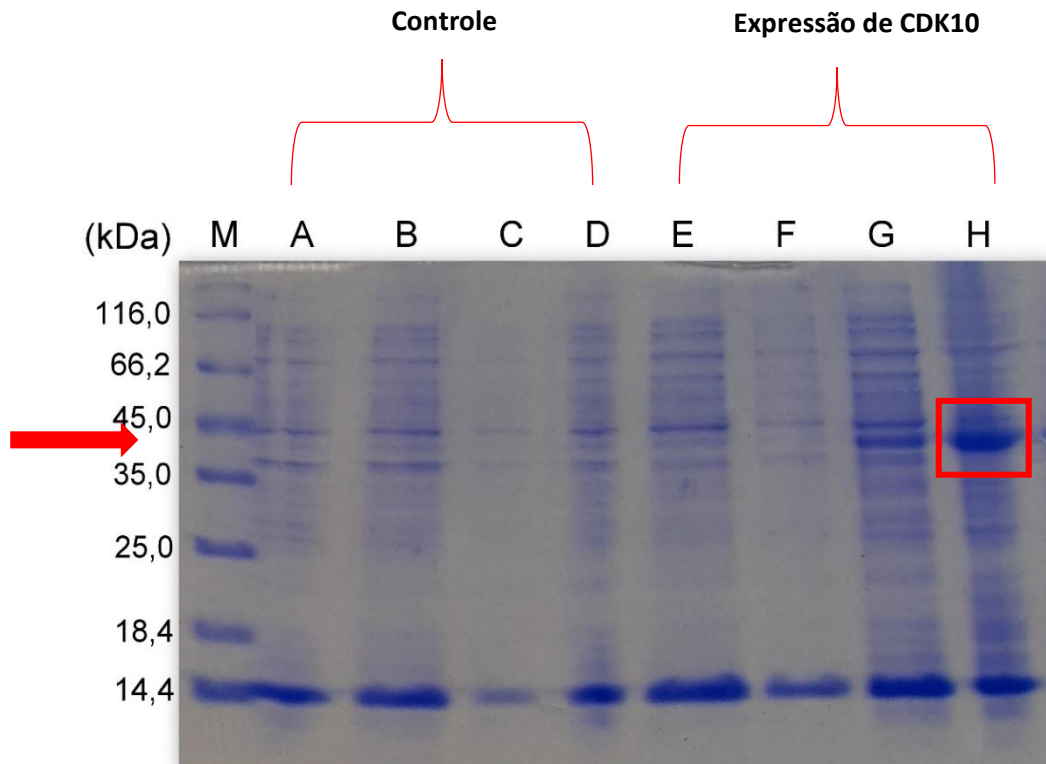


Fonte: Autoria própria.

- **Experimento 4 - Teste de expressão com variação na concentração de IPTG**

Este ensaio manteve as condições experimentais dos testes anteriores realizados em meio LB, porém aumentou-se a quantidade de IPTG a fim de verificar se ocorreria superexpressão da proteína recombinante de interesse. O resultado da análise feita por SDS/PAGE é apresentado na Figura 46.

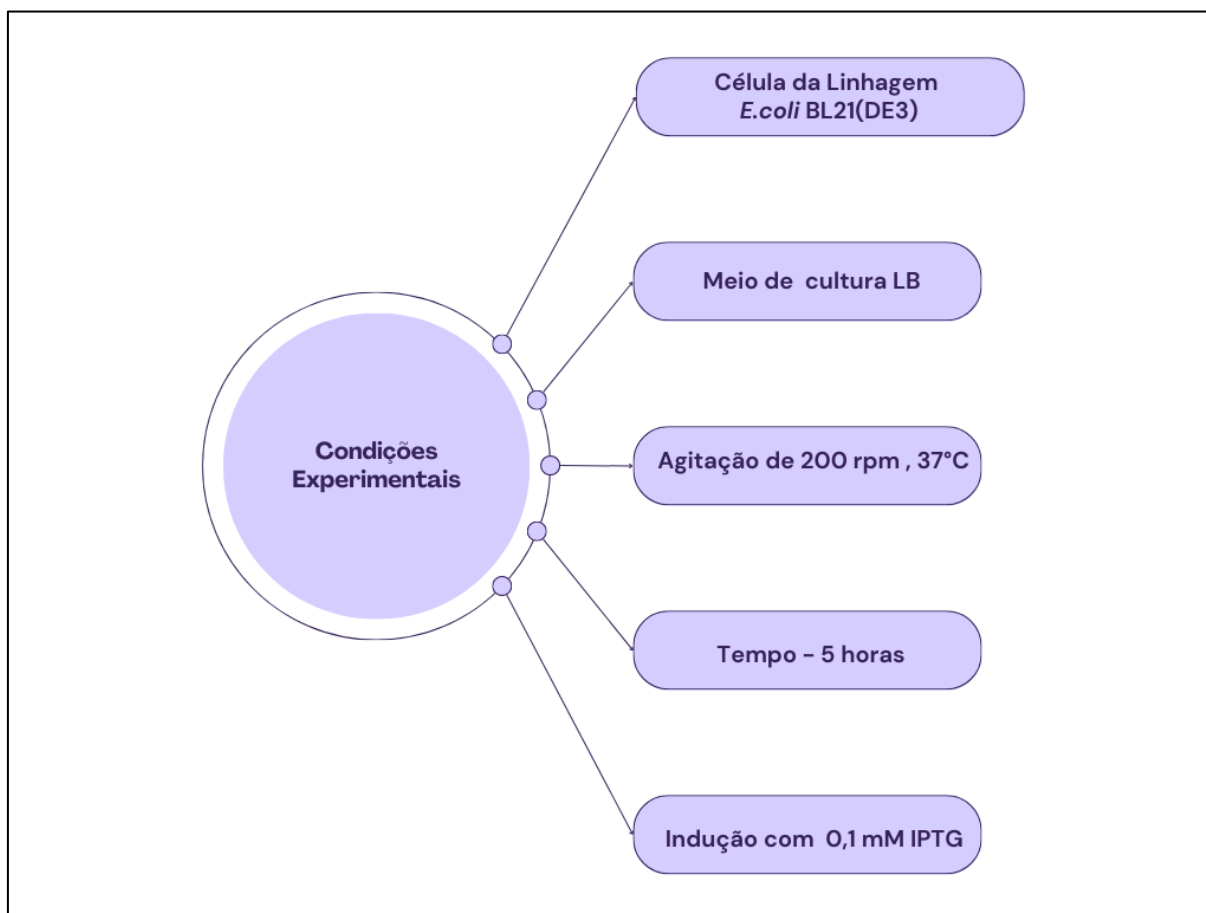
Figura 46. Gel de eletroforese SDS-PAGE 15% das alíquotas retiradas antes da indução (T0 – Tempo Inicial) e ao término dos experimentos (TF – Tempo Final) utilizando IPTG na concentração final de 0,6 mM, em 100 mL de meio LB. M: Marcador de massa molecular. Raias de A até D são relativas ao experimento de expressão controle. Raias de E até H são relativas ao experimento de expressão de CDK10. Raias: A: T0 sobrenadante, B: T0 precipitado, C: TF sobrenadante, D: TF precipitado, E: T0 sobrenadante, F: T0 precipitado, G: TF sobrenadante, H: TF precipitado.



Fonte: Autoria própria.

Observa-se que a CDK10 ainda é expressa na forma de corpos de inclusão. Apesar de ser possível visualizar uma banda na raia G (TF – sobrenadante), ela apresenta-se com menos intensidade em comparação à banda H na mesma região de massa molecular. A partir destes resultados, padronizou-se neste trabalho as condições experimentais para superexpressão da CDK10 humana recombinante (obtida sob a forma de corpos de inclusão), a partir do pET28a-CDK10 em *E. coli*, mostrado na Figura 47.

Figura 47. Condições ótimas para obtenção de CDK10 humana recombinante na fração insolúvel.



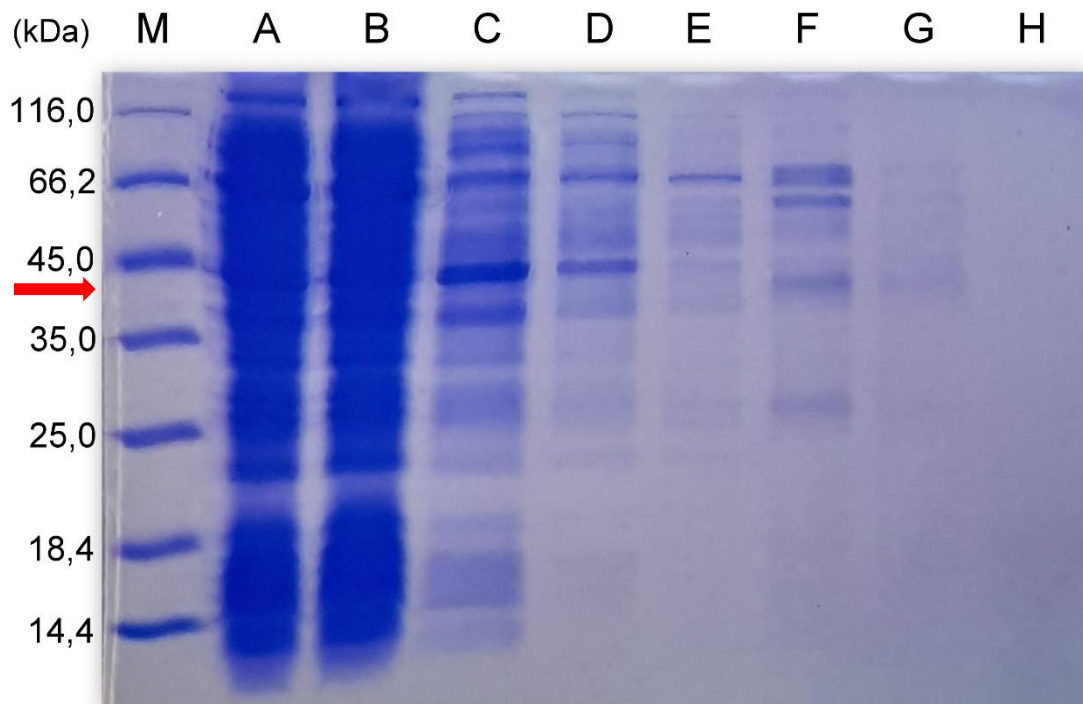
Fonte: Autoria própria com uso da ferramenta online Canva.com.

- **Experimento 5 - Teste de purificação por reenovelamento com SDS**

Estudos realizados por outros alunos do grupo, com outras CDKs, mostraram que o protocolo de solubilização com SDS (HE, OHNISHI; 2017) é eficiente na recuperação de diferentes CDKs a partir de corpos de inclusão, e é capaz de promover o reenovelamento pela sua remoção durante a etapa de purificação. Desta forma, vários testes de lise e purificação foram realizados, entretanto não foi possível purificar a CDK10 recombinante. Em todos os testes houve perda de proteína logo após a amostra passar pela coluna, ou seja, a proteína não interage com a coluna. O resultado de um dos testes é apresentado na Figura 48. Como não foi possível a purificação da CDK10, uma possível explicação é de que a proteína esteja se reenovelando de uma maneira que esconda a cauda de histidina impedindo a interação com a

coluna de níquel (<https://info.gbiosciences.com/blog/his-tagged-protein-expressing-but-not-binding-your-ni-nta-column>).

Figura 48. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de purificação de CDK10 recombinante em coluna de níquel. M: Marcador de massa molecular. A: Sobrenadante após retirada de SDS, B: Não ligado sem tampão, C: Não ligado com tampão, D: 15 mM imidazol, E: 30 mM imidazol, F: 350 mM imidazol, G: 500 mM imidazol, H: Água de lavagem.



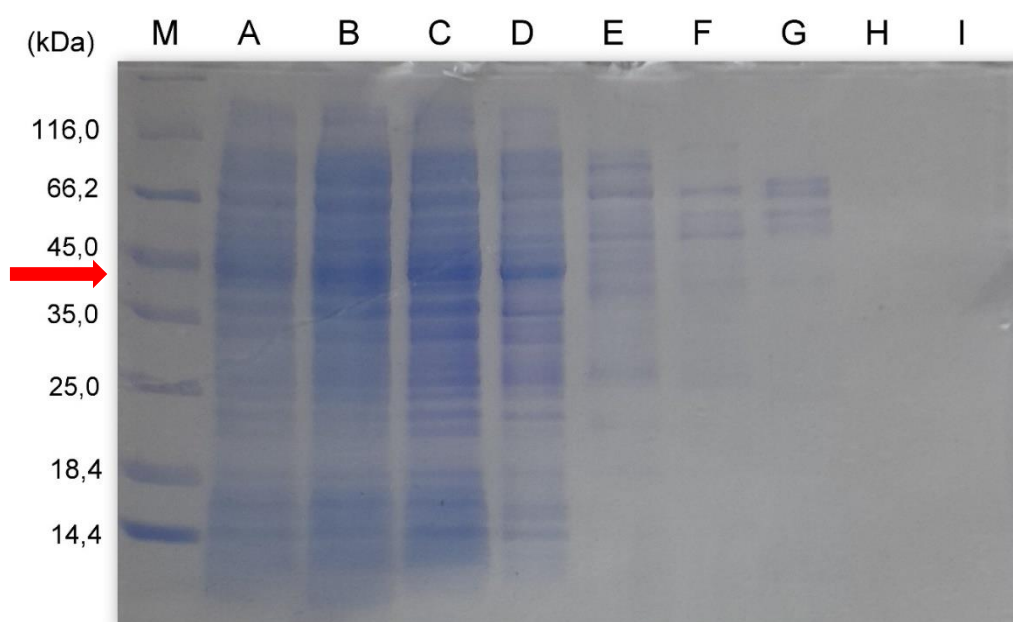
Fonte: Autoria própria.

- **Experimento 6 - Teste de purificação da fração solúvel**

Neste experimento foram analisadas duas condições de cultivo diferentes, ainda com intuito de verificar a presença da CDK10 recombinante na fração solúvel. Na Figura 49, as raias A e B correspondem a estes dois testes, o primeiro com meio LB (raia A) e o segundo com meio SOB (raia B). Pode-se observar o mesmo padrão de bandas, apenas um pouco mais forte na raia B, o que pode ser em função do tempo maior de indução, que no caso foram 20 horas, além disso, por este resultado infere-se que a temperatura menor não ajudou a superexpressar a CDK10 recombinante na fração solúvel.

Aproveitando-se do material já lisado, o conteúdo da amostra de sobrenadante após lise do cultivo com meio LB foi utilizada em um teste posterior de purificação em coluna de níquel, e as amostras retiradas durante o processo de purificação foram analisadas por SDS/PAGE, e o resultado é mostrado na Figura 49, nas raias de C até I.

Figura 49. Eletroforese em gel de poliacrilamida do teste de purificação da fração sobrenadante do teste de expressão em coluna de níquel. M: Marcador de massa molecular. A: sobrenadante após lise (cultivo meio LB), B: sobrenadante após lise (cultivo meio SOB), C: Não ligado sem tampão, D: Não ligado com tampão, E: 15 mM imidazol, F: 30 mM imidazol, G: 350 mM imidazol, H: 500 mM imidazol, I: Água de lavagem.



Fonte: Autoria própria.

O resultado da purificação da fração solúvel mostrou padrão semelhante ao processo de purificação por renovelamento, como pode ser observado nas Figura 46. Esta semelhança sugere que a proteína CDK10 foi expressa em pequena quantidade na forma solúvel. Além disso, foi possível verificar que o protocolo de renovelamento obteve sucesso, visto que a proteína desnovelada se renovelou adequadamente e, provavelmente, a cauda de histidina ficou localizada no interior da proteína, sem interagir com o metal níquel e desta forma, não foi possível purificá-la pela cromatografia de afinidade.

No entanto, devido à baixa quantidade de CDK10 expressa na forma solúvel, não é vantajoso utilizar esse método para obter grandes quantidades de proteína para outros estudos de caracterização, já que seria necessário cultivar muitos litros de cultura e o processo de purificação por níquel não é eficiente, sendo necessário adotar outros métodos de purificação por cromatografia líquida fazendo-se necessário padronizar todo o processo, o que demandaria mais tempo e custo na pesquisa.

Para superar essas limitações, foi considerada uma alternativa - clonar a CDK10 em outro vetor com o objetivo de superexpressá-la na forma solúvel.

3.4.3. Experimentos de clonagem do domínio quinase da CDK10 humana

As quinases formam redes de sinalização complexas que apresentam redundância e loops de feedback; assim, a atividade quinase é tipicamente verificada com domínios quinase purificados *in vitro* ou com biossensores projetados (ENZLER et al., 2020; JEHLE et al., 2022; SCHMITT; MEHTA; ZHANG, 2020; SHULTS et al., 2005; ZHANG; ALLEN, 2007). Então, depois da análise da estrutura secundária da CDK10 pela ferramenta PSIPRED, que mostrou a presença de regiões desornadas no N- e C- terminais, optou-se por clonar somente a região correspondente ao domínio quinase da proteína CDK10 humana (isoforma 1).

A sequência de bases referente ao domínio quinase da CDK10 humana é mostrado na Figura 50. Também estão destacados os sítios de restrição de *Bam*HI e *Xho*I. O tamanho total de pares de bases é de 918 pb.

Figura 50. Sequência de DNA do domínio quinase da CDK10 humana. Sítio de *Bam*HI (azul). Sítio de *Xho*I (roxo), Códon de parada (vermelho).

```
GGATCCAGTGTGAAGGAGTTTGAGAAGCTGAACCGCATTGGAGAGGGTACCTACGGCATTGTGTATCGGGCCCCGG
GACACCCAGACAGATGAGATTGTCGCACTGAAGAAGGTGCGGATGGACAAGGAGAAGGATGGCATCCCCATCAGC
AGCTTGCGGGAGATCACGCTGCTGCTCCGCCTGCGTCATCCGAACATCGTGGAGCTGAAGGAGGTGGTTGTGGGG
AACCACCTGGAGAGCATCTTCCTGGTGATGGGTTACTGTGAGCAGGACCTGGCCAGCCTCCTGGAGAATATGCCA
ACACCCCTTCTCGGAGGCTCAGGTCAAGTGCATCGTGCTGCAGGTGCTCCGGGGCCTCCAGTATCTGCACAGGAAC
TTCATTATCCACAGGGACCTGAAGGTTTCCAACCTTGCTCATGACCGACAAGGGTTGTGTGAAGACAGCGGATTTT
GGCCTGGCCCCGGCCTATGGTGTTCCAGTAAAGCCAATGACCCCCAAGGTGGTCACTCTCTGGTACCGAGCCCCT
GAACTGCTGTTGGGAACCACCACGCAGACCACCAGCATCGACATGTGGGCTGTGGGCTGCATACTGGCCGAGCTG
CTGGCGCACAGGCCTCTTCTCCCCGGCACTTCCGAGATCCACCAGATCGACTTGATCGTGCAGCTGCTGGGCACG
CCCAGTGAGAACATCTGGCCGGGCTTTTCCAAGCTGCCACTGGTTCGGCCAGTACAGCCTCCGGAAGCAGCCCTAC
AACAACTGAAGCACAAGTTCCCATGGCTGTCCGAGGCCGGGCTGCGCCTGCTGCACTTCCTGTTCATGTACGAC
CCTAAGAAAAGGGCGACGGCCGGGGACTGCCTGGAGAGCTCCTATTTCAAGGAGAAGCCCCCTACCCTGTGAGCCG
GAGCTCATGTGACTCGAG
```

Fonte: Autoria própria.

Os *primers* desenhados para amplificar a sequência de DNA do domínio quinase da CDK10 humana são mostrados no Quadro 7:

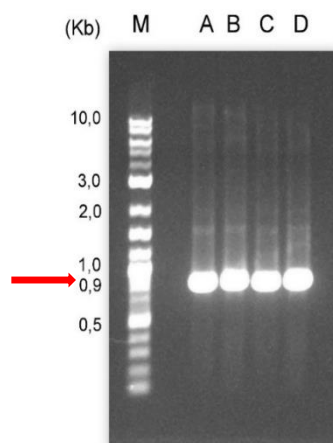
Quadro 7. *Primers* desenhados para amplificação do DNA do domínio quinase da CDK10.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
<i>Forward</i>	5'- AGCGGATCCAGTGTGAAGGAGTTTGAGAAG
<i>Reverse</i>	5'-ATACTCGAGTCACATGAGCTCCGGCTCAC

Fonte: Autoria própria.

Na Figura 51 é mostrada a análise do resultado de PCR realizado com gradiente de temperatura. É possível observar que o DNA de interesse foi amplificado em todas as temperaturas.

Figura 51. Gel de agarose 0,8%. da reação de PCR com gradiente de temperatura. M: marcador de pares de bases. A: 59,9°C, B: 62,6 °C, C: 66,2°C D: 69,0°C.

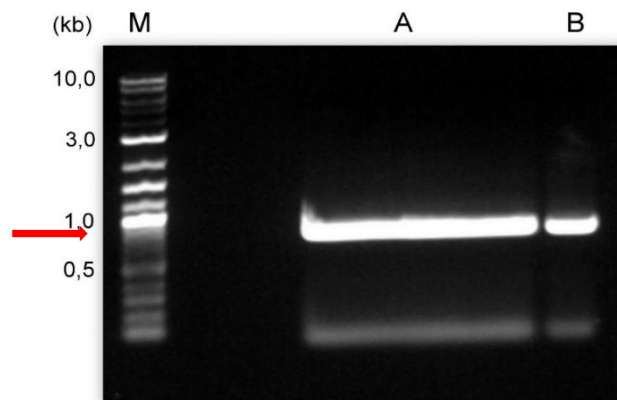


Fonte: Autoria própria.

- **Clonagem do domínio quinase da CDK10 humana**

Uma vez que o DNA de interesse foi amplificado em todas as temperaturas testadas, a temperatura de 66,2°C foi selecionada para dar continuidade aos experimentos. Assim, uma reação com maior volume foi realizada nesta temperatura e o resultado pode ser observado na Figura 52.

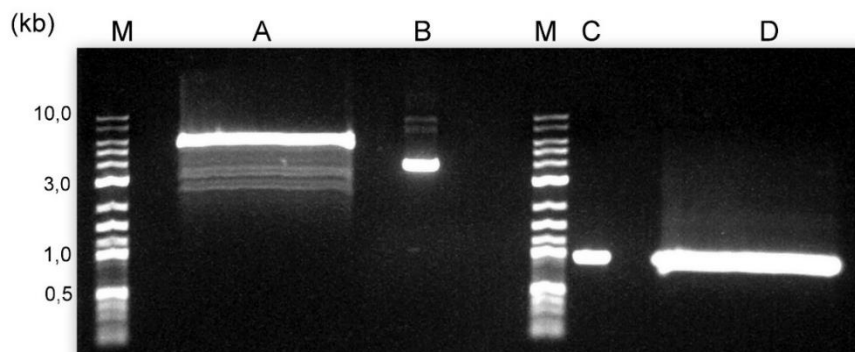
Figura 52. Reação de PCR realizada na temperatura de 66,2°C e 200 µL de volume total de reação. M: marcador de pares de bases. A e B: Produto de PCR (amostras iguais).



Fonte: Autoria própria.

A digestão das amostras de pET28-SUMO e do produto de PCR foi realizada e a análise por eletroforese em gel de agarose é mostrada na Figura 53.

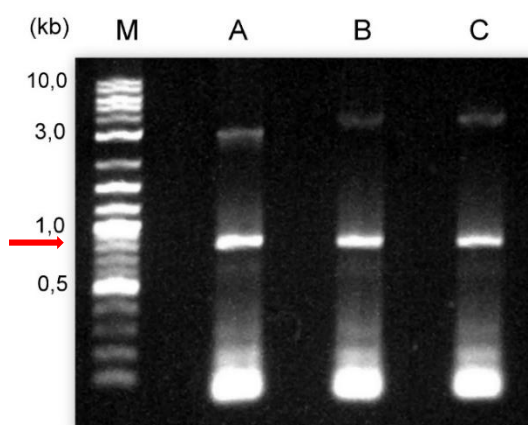
Figura 53. Digestão das amostras de pET28-SUMO e do produto de PCR. M: Marcador de pares de bases. A: pET28-SUMO digerido, B: pET28-SUMO não digerido; C: produto de PCR não digerido; D: produto de PCR digerido.



Fonte: Autoria própria.

Foi realizada a transformação do produto de ligação em células de *E. coli* DH5 α , crescendo apenas três colônias. De cada colônia foi extraído o DNA plasmidial e posteriormente utilizado como *template* em uma reação de PCR para confirmação da clonagem. O resultado é apresentado na Figura 54. É possível observar que em todas as amostras foram amplificados o DNA de interesse no tamanho de aproximadamente 918 pb. No entanto, após análise do sequenciamento destas amostras, verificou-se que em nenhuma delas o DNA recombinante foi realmente obtido (dados não mostrados).

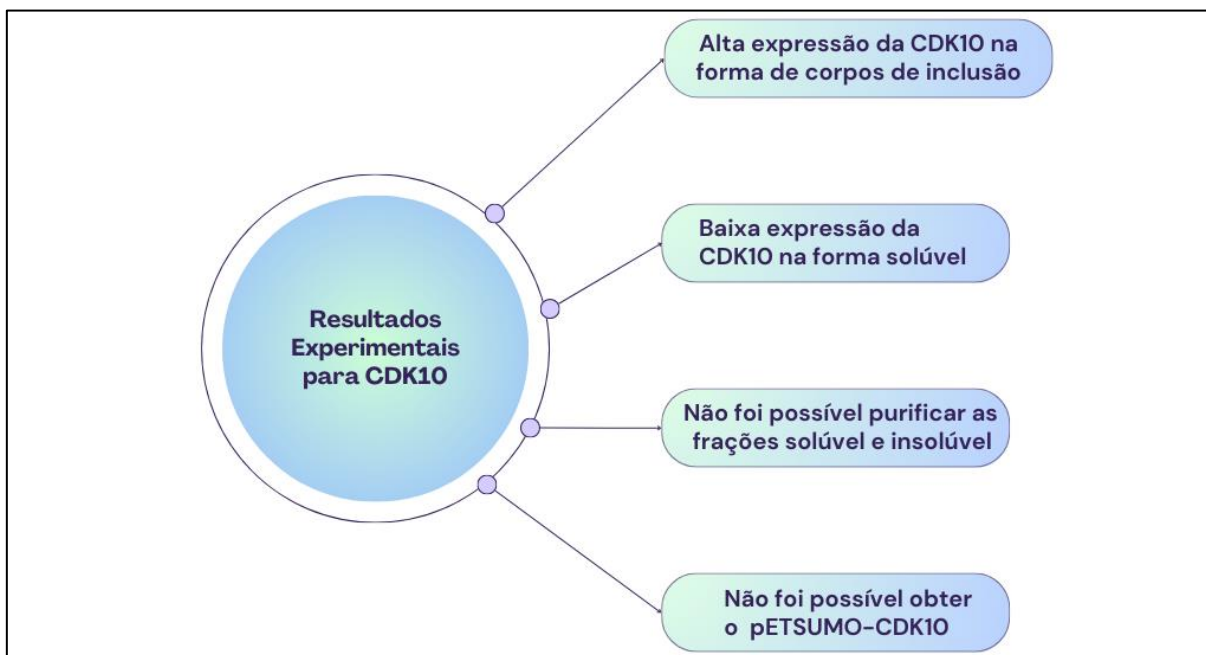
Figura 54. PCR realizada para confirmação de clonagem. A, B, e C são os produtos das reações de PCR utilizando como *template* os DNAs obtidos a partir da extração de DNA plasmidial das colônias 1, 2 e 3 respectivamente.



Fonte: Autoria própria.

Em relação à parte experimental do trabalho envolvendo a proteína CDK10, ela foi conduzida até a etapa de sequenciamento, porém, devido à falta de obtenção do DNA recombinante, não foi possível prosseguir com os experimentos. Posto isto, a Figura 55 apresenta um resumo dos principais resultados obtidos nesta parte do trabalho.

Figura 55. Resumo dos principais resultados da parte experimental envolvendo a CDK10.



Fonte: Autoria própria com uso da ferramenta online Canva.com.

3.4.4. Análise in silico da CDK10 humana

- **Informações gerais**

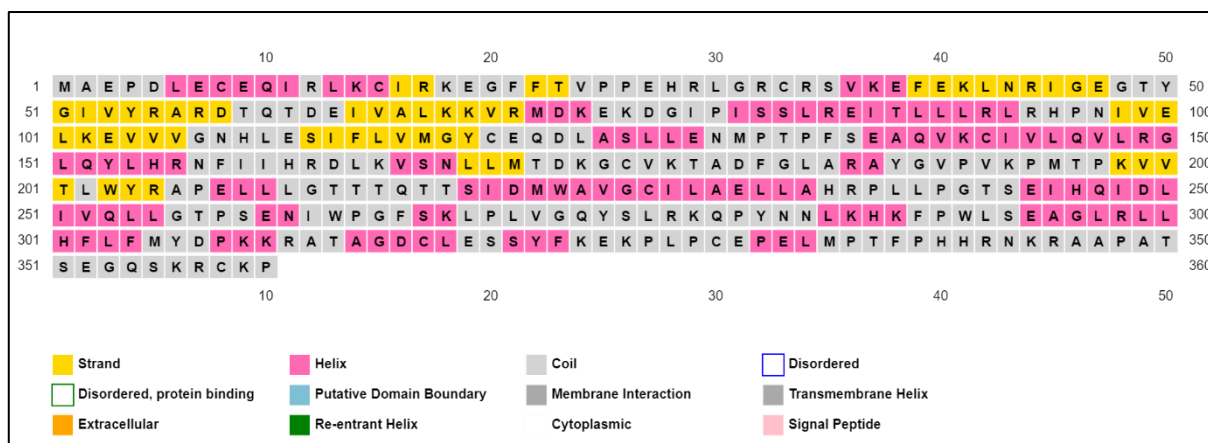
A sequência encontrada no banco de dados NCBI para a CDK10 humana é mostrada na Figura 56 e os dados de predição de estrutura secundária fornecidos pela ferramenta *PSIPRED* estão mostrados na Figura 57.

Figura 56. Sequência da proteína CDK10 humana, NCBI – Código NP_443714.3.

```
>NP_443714.3 cyclin-dependent kinase 10 isoform a [Homo sapiens]
MAEPDLECEQIRLKCIRKEGFFTVPPPEHRLGRCRSVKEFEKLNRIEGEGTYGIVYRARDTQTDEIVALKKV
RMDKEKDGIPISLREITLLLRRLRHPNIVELKEVVVGNHLESIFLVMGYCEQDLASLLENMPTPFSEAQV
KCIVLQVLRGLQYLHRNFIHRDLKVSNLLMTDKGCVKTADFGLARAYGVPVKPMTPKVVTLWYRAPELL
LGTTTQTTSIDMWAVGCILAEELLAHRPLLPGTSEIHQIDLIVQLLGTPESENIWPGFSLKPLVVGQYSLRKQ
PYNLKHKFPWLSEAGLRLHFLFMYDPKKRATAGDCLESSYFKEKPLPCEPELMPTFPHHRNKRAAPAT
SEGQSKRCKP
```

Fonte: NCBI*

Figura 57. Predição da estrutura secundária da CDK10 humana, utilizando a ferramenta online PSIPRED (Disponível em <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). O número total de resíduos de aminoácidos é 360.



Fonte: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>.

O Quadro 8 contém informações da CDK10 humana, obtidas pelo Banco de Dados e pela ferramenta *ExPASy ProtParam*.

Quadro 8. Resumo das informações da CDK10 humana.

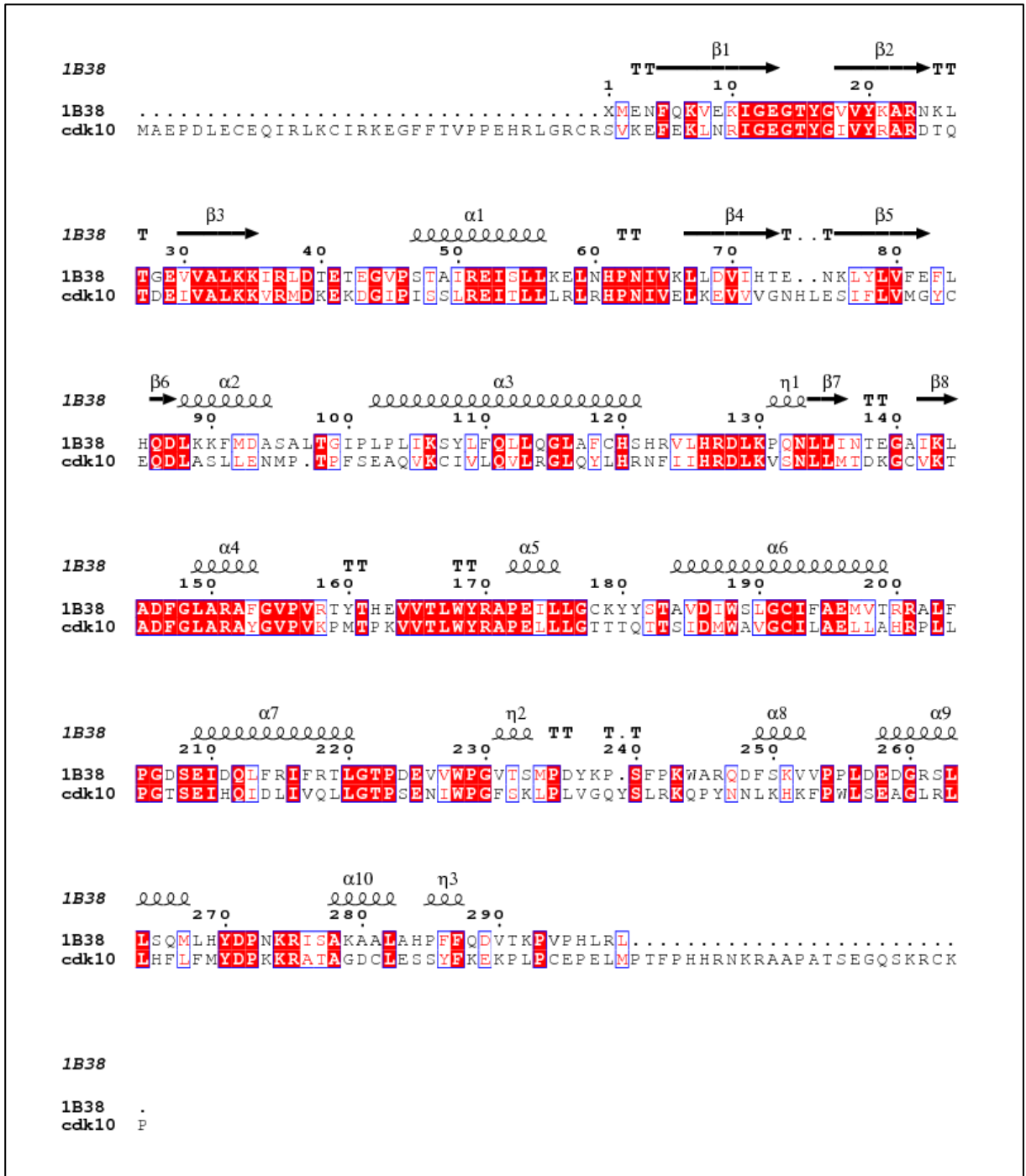
Informações da CDK10 humana	
UniprotKB ID	Q15131
Número de Resíduos de aminoácidos	360
Domínio quinase	39-323
Massa molecular	~41 kDa
pI teórico	9,06
Índice alifático	95,31
Grande média de Hidropatia - GRAVY	-0,235

Fonte: Autoria própria.

- **Modelagem Molecular por Homologia**

Após a realização de uma busca no BLAST, foram selecionados dois *templates* para a execução dos testes de modelagem molecular: PDB 3pxf (CDK2 humana em complexo com duas moléculas de 8-anilino-1-naftaleno sulfonato) e 1b38 (CDK2 humana com ATP e magnésio). A estrutura 3pxf apresenta uma identidade de 45,13% com a CDK10 humana, possui 1.80 Å de resolução e está bem definida, enquanto a estrutura 1b38 apresenta uma identidade de 45,36%, 2.00 Å de resolução e apresenta regiões não definidas. Já que ambos os templates são da CDK2, foi realizado o alinhamento pelo ESPript 3.0 somente com a sequência de aminoácidos de um dos templates (1b38), sendo observada uma alta homologia entre as sequências, conforme apresentado na Figura 58.

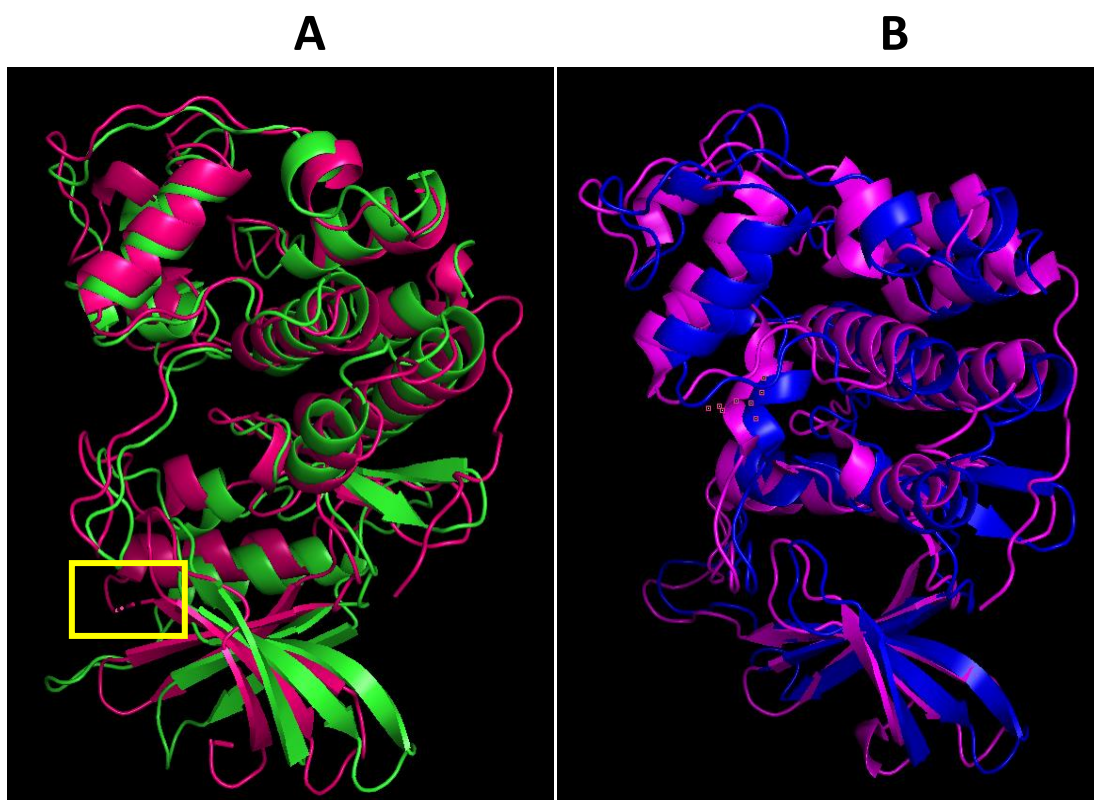
Figura 58. Alinhamento realizado pelo ESPrift 3.0 entre a sequência de aminoácidos do *template* 1b38 (CDK2) e da CDK10 humana. Os aminoácidos idênticos estão destacados em vermelho.



Fonte: ESPrift 3.0.

Foram gerados 100 modelos em cada teste de modelagem utilizando os *templates* 1b38 e 3pxf. O melhor modelo de cada teste foi selecionado e ambos são apresentados na Figura 59, cada um alinhado com seu respectivo *template*.

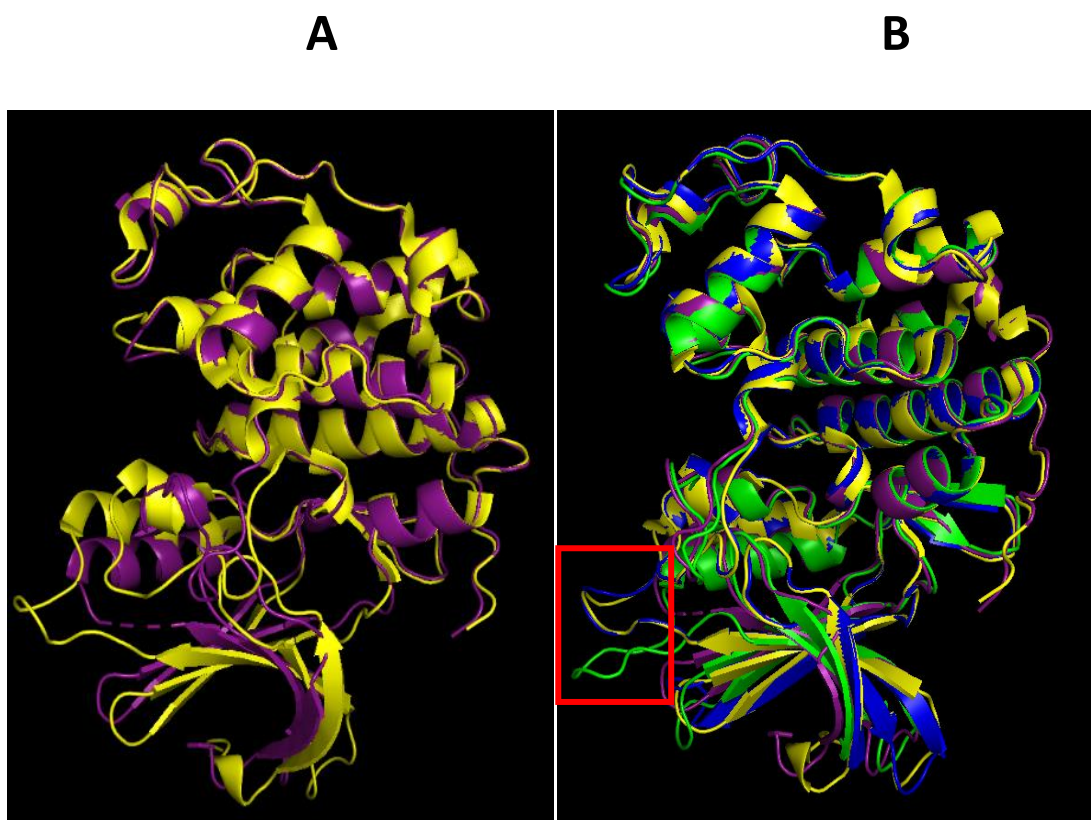
Figura 59. A: *Template* 1b38 (rosa) e Modelo (verde); B. *Template* 3pxf (rosa) e modelo (azul). O retângulo amarelo mostra uma região não definida no *template* 1b38.



Fonte: Autoria própria.

Na Figura 60 é possível observar pela sobreposição dos modelos gerados com os dois *templates* (3pxf e 1b38) que todas as estruturas são muito semelhantes. Entretanto, considerando que o *template* 1b38 possui uma região não resolvida e maior resolução, conclui-se que o melhor modelo é o obtido a partir do *template* 3pxf. Entretanto, apesar das diferenças de posição na alça indicada pelo retângulo vermelho na Figura 60.B, ambos os modelos poderão ser utilizados para os estudos futuros de docagem molecular, justamente porque irão fornecer informações relevantes de interações com ligantes.

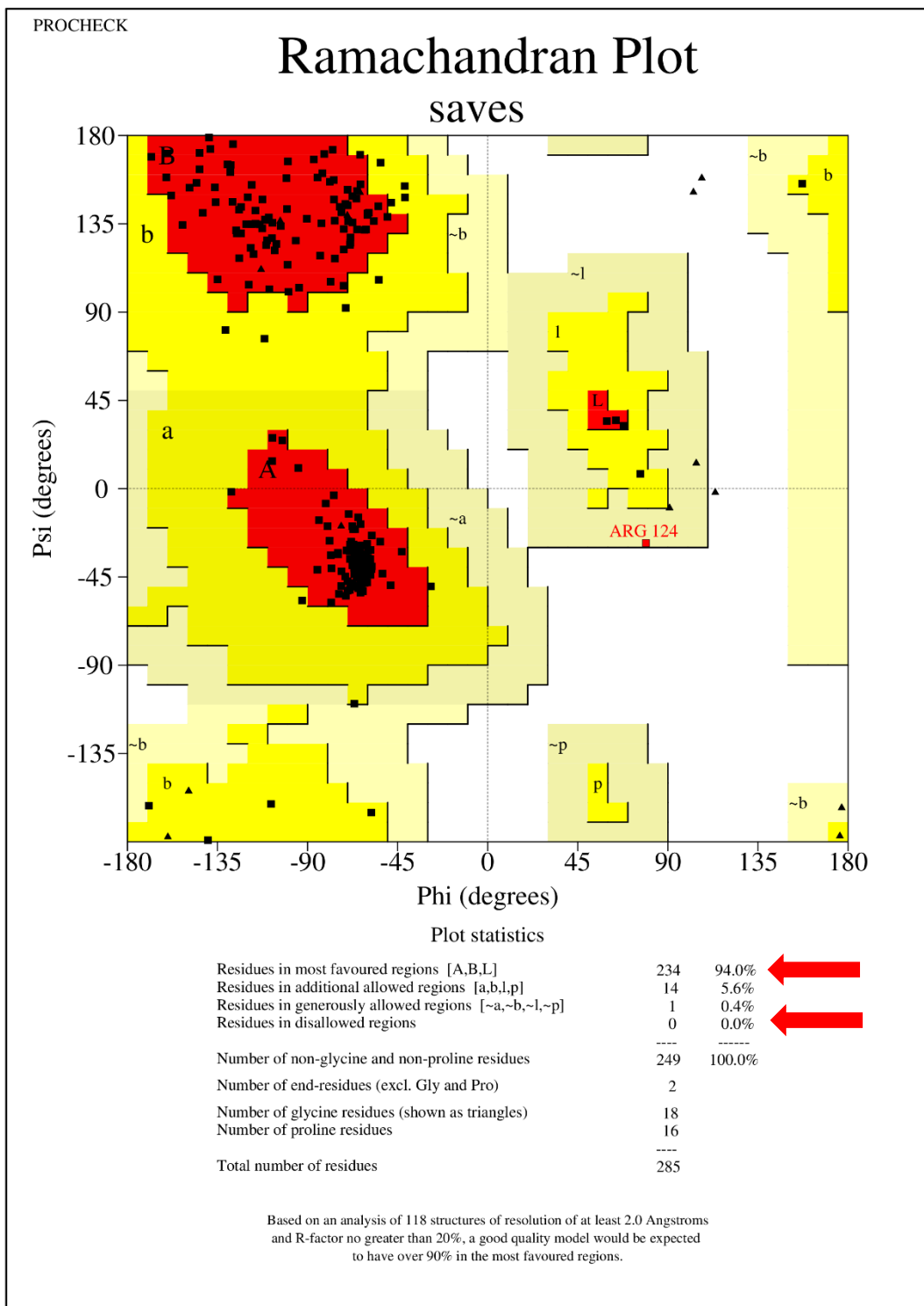
Figura 60. A: Sobreposição das estruturas *Template* 1b38 (roxo) com *Template* 3pxf (amarelo). B: Sobreposição das estruturas *Template* 1b38 (roxo), *Template* 3pxf (amarelo), Modelo gerado a partir do *template* 3pxf (azul) e Modelo gerado a partir do *template* 1b38 (verde). O retângulo vermelho indica a diferença de posição das alças nos dois modelos obtidos.



Fonte: Autoria própria.

Nas figuras seguintes, Figuras 61 e 62, são mostrados os gráficos de Ramachandran dos modelos obtidos a partir dos *template* 1b38 e 3pxf, respectivamente. Observa-se em ambos os gráficos que não há resíduos em regiões não permitidas e nas regiões mais favorecidas há mais de 90% de resíduos. Além disso, foram verificadas as posições dos resíduos indicados em regiões não favorecidas no modelo obtido a partir do *template* 3pxf, observando-se que estes resíduos que estão presentes em regiões adicionalmente permitidas do gráfico pertencem a alças flexíveis da proteína, pela análise da estrutura no *Pymol* e desta forma, optou-se por conduzir as outras análises a partir do modelo obtido pelo *template* 3pxf, que possui maior resolução em relação ao 1b38.

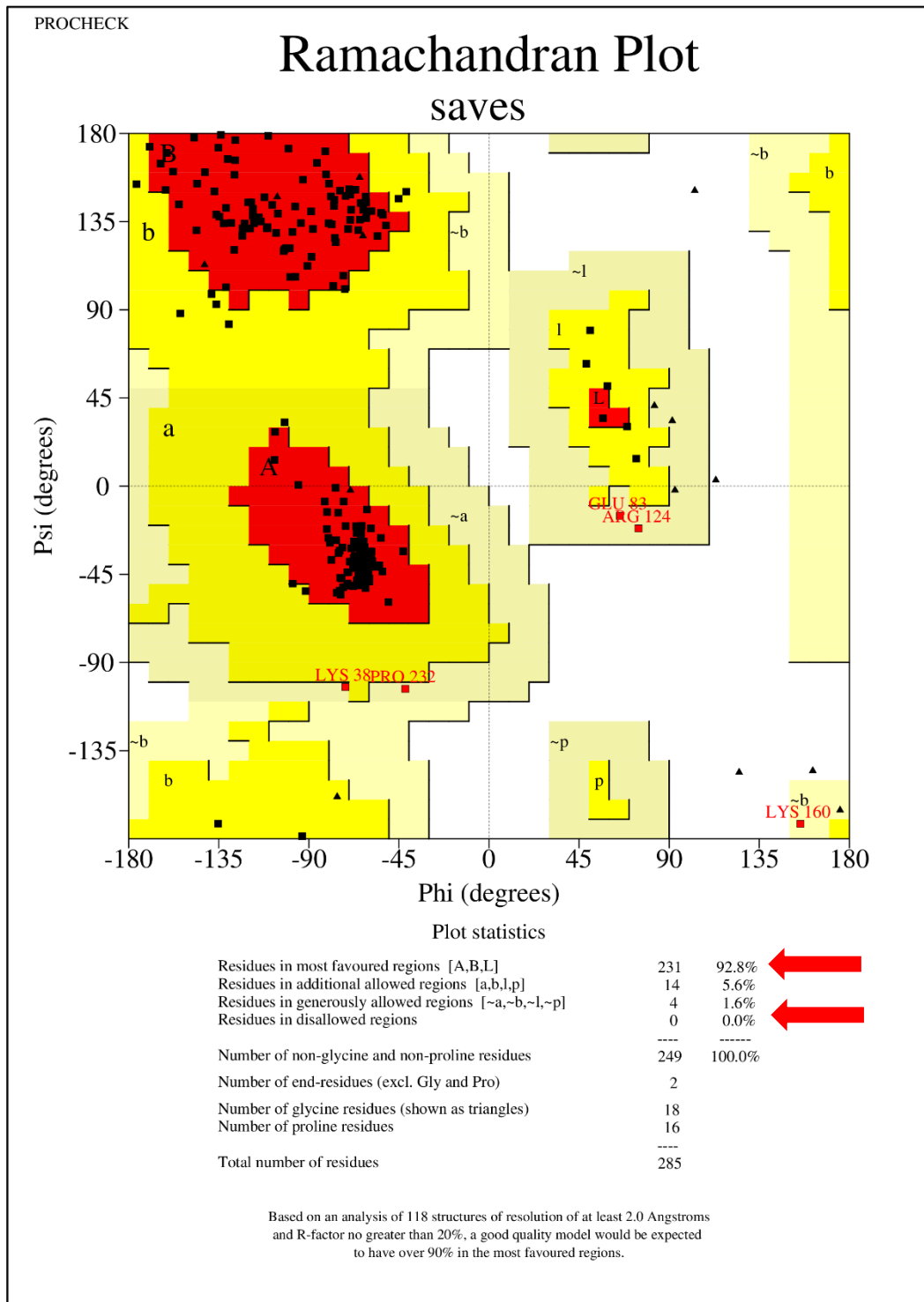
Figura 61. Gráfico de Ramachandran do modelo gerado a partir do *template* 1b38. As setas em vermelho indicam as porcentagens de resíduos de aminoácidos nas regiões permitidas (em vermelho) e não permitidas (em branco) do gráfico.



saves_01.ps

Fonte: Disponível em <https://saves.mbi.ucla.edu/>

Figura 62. Gráfico de Ramachandran do modelo gerado a partir do *template* 3pxf. As setas em vermelho indicam as porcentagens de resíduos de aminoácidos nas regiões permitidas (em vermelho) e não permitidas (em branco) do gráfico.

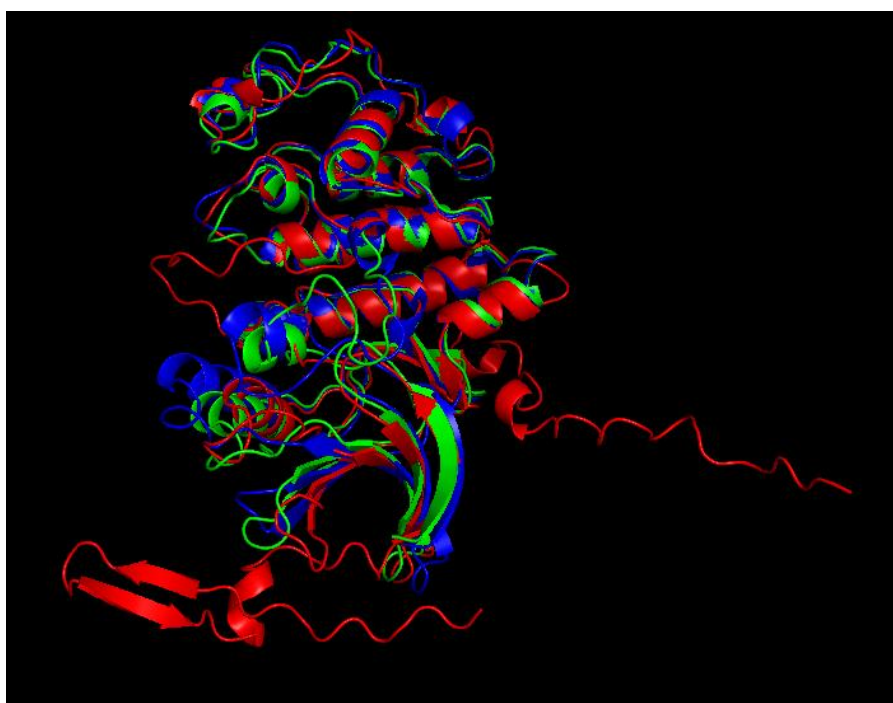


saves_01.ns

Fonte: Disponível em <https://saves.mbi.ucla.edu/>

O modelo obtido para a CDK10 humana Q15131 no *AlphaFold*, disponível em <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q15131>, foi comparado com os modelos gerados a partir do *templates* 1b38 e 3pxf e a Figura 63 mostra a sobreposição dos três modelos. Nota-se que o modelo obtido pelo *AlphaFold* apresenta tamanho maior e regiões de N- e C- terminais bastante desordenadas. No entanto, em relação ao domínio quinase, os três modelos se sobrepõem de modo similar em todas as hélices α e fitas β . Esse resultado sugere que as abordagens de modelagem molecular adotadas tanto pelo *Modeller* quanto pelo *AlphaFold* produzem resultados consistentes e apresentam uma concordância significativa, ou seja, resultados semelhantes entre si.

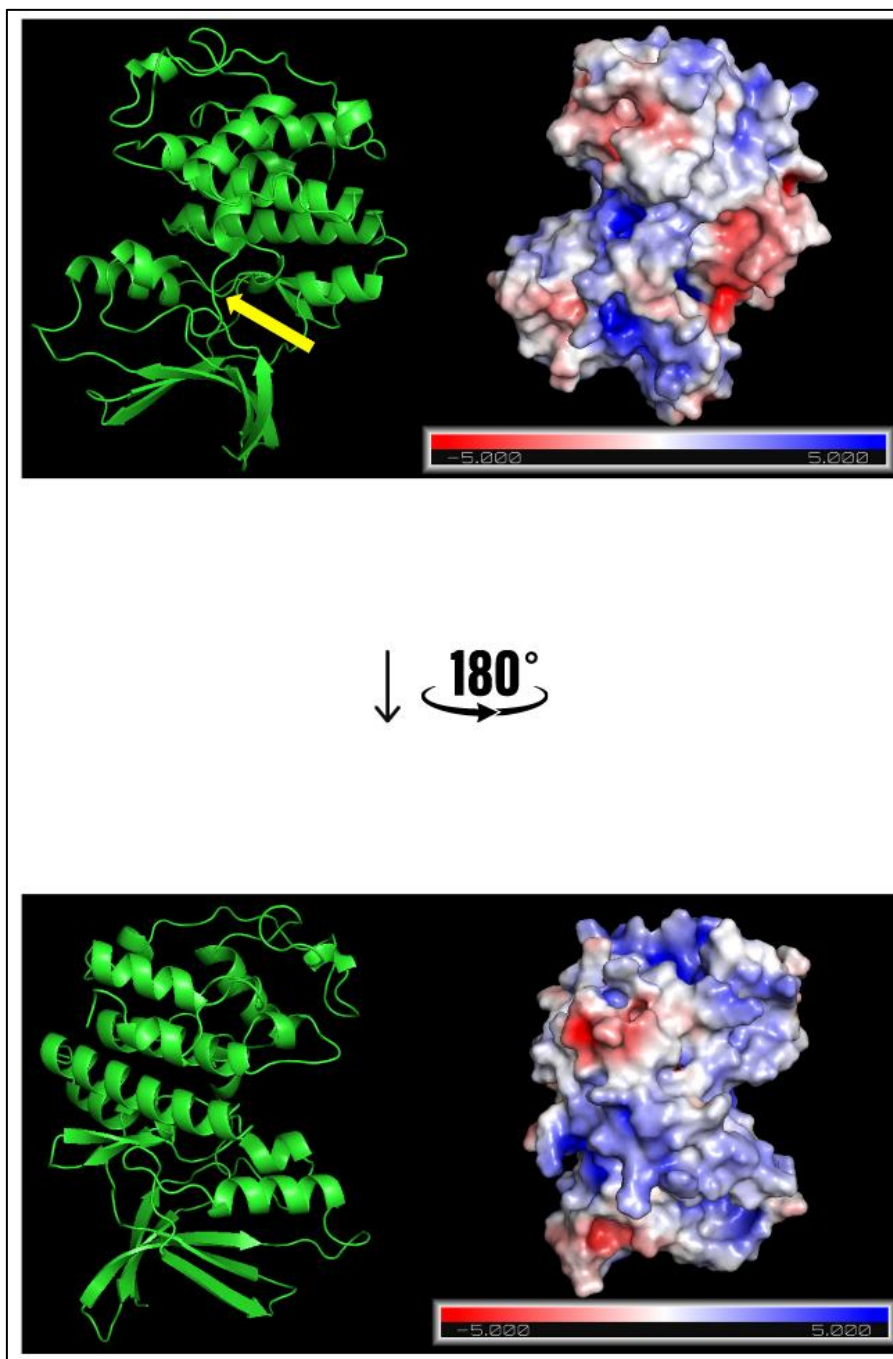
Figura 63. Sobreposição dos modelos de estrutura da CDK10 humana. Em verde, modelo gerado pelo *Modeller* a partir do *template* 1b38. Em azul, modelo gerado pelo *Modeller* a partir do *template* 3pxf. Em vermelho, modelo gerado pelo *AlphaFold*.



Fonte: Autoria própria

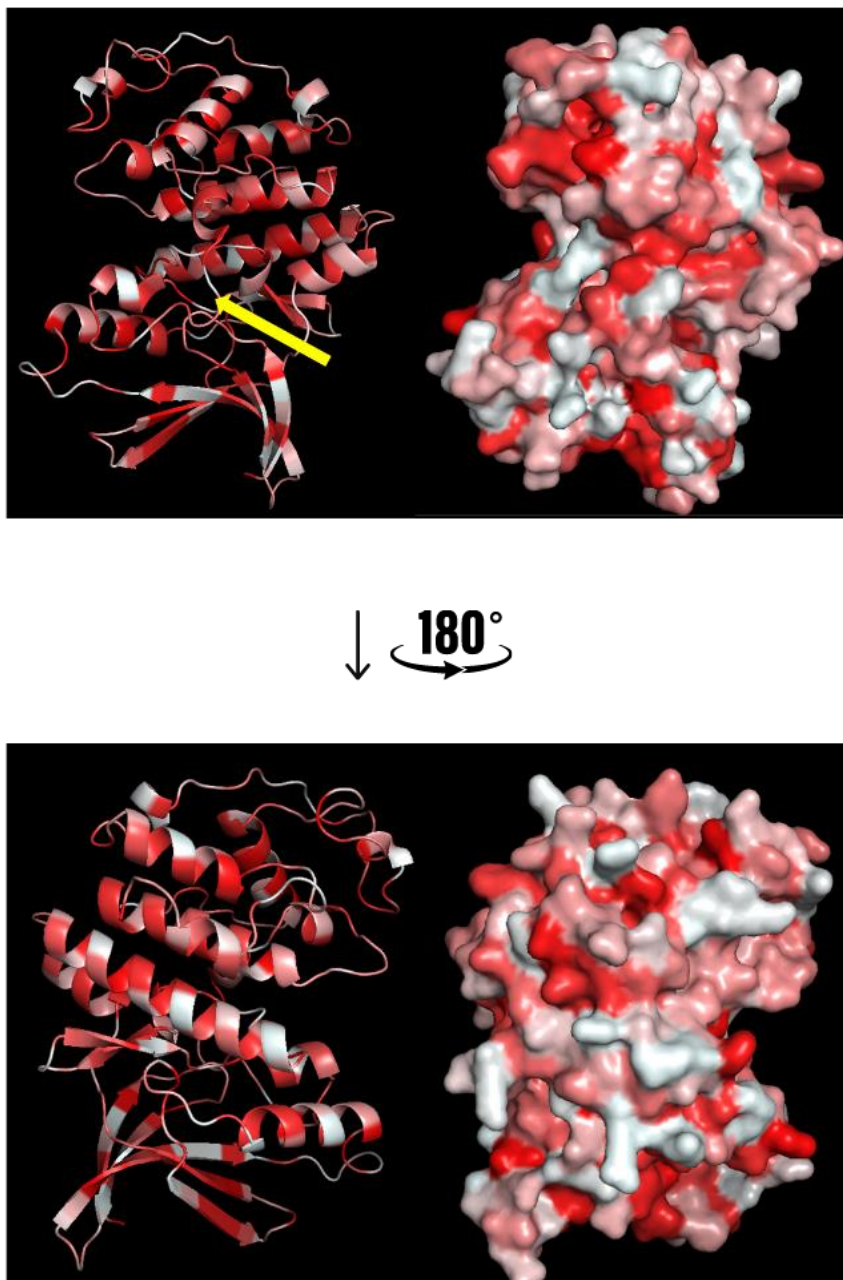
Para aprofundar a análise da CDK10, utilizando o modelo gerado pelo *template* 3pxf, foram obtidas no *Pymol* a superfície de potencial eletrostático e a superfície hidrofóbica do modelo, que são apresentadas nas Figuras 64 e 65, respectivamente

Figura 64. Superfície de potencial eletrostático do modelo molecular da CDK10 humana. À esquerda, em verde, é mostrado o modelo molecular e à direita, nas cores vermelho e azul, a superfície eletrostática do modelo. As duas faces do modelo são mostradas após um giro de 180° na interface do *Pymol*. A seta amarela indica o sítio ativo.



Fonte: Autoria própria.

Figura 65. Superfície hidrofóbica do modelo molecular da CDK10 humana. À esquerda, é mostrado o modelo molecular já com as cores representativas da superfície hidrofóbica e à direita, a superfície eletrostática do modelo. As duas faces do modelo são mostradas após um giro de 180° na interface do *Pymol*. Regiões vermelhas indicam alto índice hidrofóbico. A seta amarela indica o sítio ativo.

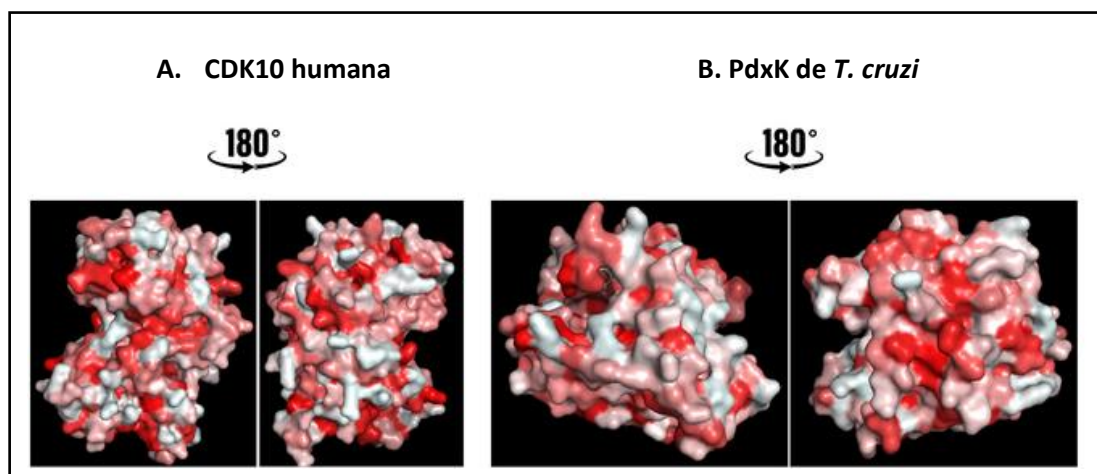


Fonte: Autoria própria

Interessante observar as diferenças entre superfície hidrofóbica da PdxK de *T. cruzi* e da CDK10 humana. A composição da superfície das proteínas determina afinidade e especificidade de interações proteína-proteína. A correspondência precisa entre regiões hidrofóbicas e grupos carregados em ambos os locais da interface são cruciais para garantir a especificidade (HAGEMANS et al., 2015).

A Figura 66 apresenta ambas as superfícies para efeito de comparação. É possível notar que na CDK10 humana há presença de muitas regiões hidrofóbicas na superfície, tanto em uma das faces mostradas quanto na outra face. Já na PdxK de *T. cruzi*, é observado que a maior parte das regiões hidrofóbicas se apresentam em uma das faces e a outra possui mais regiões coloridas entre cinza e rosa claro, demonstrando ser menos hidrofóbica.

Figura 66. Superfície hidrofóbica das proteínas CDK10 humana (A) e PdxK de *T. cruzi* (B) para comparação.



Fonte: Autoria própria.

Uma análise comparativa sobre os tipos de aminoácidos (Grupos R carregados positivamente, Grupos R carregados negativamente, Grupos R alifáticos Apolares, Grupos R aromáticos, Grupos R polares não carregados) foi realizada e está mostrada na Figura 67. Além disso, o Quadro 9 mostra as porcentagens encontradas de cada aminoácido nas duas proteínas. O índice alifático é de 95,31 para a CDK10 e 82,20 para a PdxK de *T. cruzi*. Estes dados são relevantes para compreender sobre o processo de obtenção das duas proteínas em *E. coli*, uma vez que a CDK10 foi obtida em sua maior parte na fração insolúvel, enquanto a PdxK de *T. cruzi* foi obtida majoritariamente na fração solúvel.

Figura 67. Comparação das seqüências de aminoácidos da CDK10 humana e da PdxK de *T. cruzi*. As cores identificam os tipos de aminoácidos. *Rosa*: Grupos R carregados positivamente; *Cinza* - Grupos R carregados negativamente; *Amarelo* - Grupos R alifáticos apolares; *Azul* - Grupos R aromáticos; *Verde* – Grupos R polares não carregados.

```

>sp|Q15131|CDK10 HUMAN Cyclin-dependent kinase 10 OS=Homo sapiens
MAEPDLECEQIRLKCIRKEGFFTPPEHRLGRCRSVKEFEKLNRI GEGTYGIVYRARDTQ
TDEIVALKIVMDKEDGIPISLREITLLLRLRHPNIVELKEVVVGNHLESIFLVMGYC
EQDLASLLENMPTPFSEAQVKCIVLQVLRGLQYLHRNFIIHRDLKVSNLLMTDKGVKTA
DFGLARAYGVPVKPMIPKVVILWYRPELLLGGTTQTTSIDMWAVGCI LAELLAHRPLLP
GTSEIHQIDLIVQLLGTPEENIWPGFSLPLVGOYSLRKQPYNNLKHKFPWLSEAGRLRL
HFLFMYDPKRRATAGDCLESSYFREKPLPCEPELMPITFPHHRNKRAAPATSEGOSKRCKP

>RNC57787.1 pyridoxal kinase [Trypanosoma cruzi]
MSEETILSIQSYVTHGYVGNKAASFPLQLHGFDDVGVNTVSLNHSGYPIIRGHRMDLQEYETLMEGMR
ANNFLPGYRIITGYINNADIVRRIIDIVKEIRTLREKEGKLIFFCDPVMGDDGIMYCKQEVLEAYREL
IQCADVATPNYYEASLLSGVNVIDMTIALQATDWFHAOGTONVIIKSFRTKEDPONLHFLFSTMATGGKT
PQRFITGVVPYHEGRTYIGTGLFAASLLAFSHQHPMEVAVGIAMGVLDVILATRNEGGDGTSSIMNREL
VTKSVQSLNPNANVAEVRPM

```

Fonte: Autoria própria.

Quadro 9. Composição de aminoácidos da proteína CDK10 humana e da PdxK de *T. cruzi*.

Aminoácidos	Presença na CDK10 humana	Presença na PdxK de <i>T. cruzi</i>
Grupos R alifáticos, apolares		
Glicina	5,8%	8,3%
Alanina	5,0%	6,7%
Prolina	7,2%	3,7%
Valina	6,1%	7,7%
Leucina	13,3%	8,3%
Isoleucina	5,3%	5,3%
Metionina	2,5%	4,0%
Total	45,2%	44,0%
Grupos R aromáticos		
Fenilalanina	3,6%	4,0%
Tirosina	2,8%	4,3%
Triptofano	1,1%	0,3%
Total	7,5%	8,6%
Grupos R polares, não carregados		
Serina	4,7%	5,7%
Treonina	5,6%	8,0%
Cisteína	2,8%	1,0%
Asparagina	2,8%	5,0%
Glutamina	3,3%	4,3%
Total	19,2%	24%
Grupos R carregados positivamente		
Lisina	7,2%	3,7%
Histidina	3,1%	3,0%
Arginina	6,7%	5,7%
Total	17%	12,4%
Grupos R carregados negativamente		
Aspartato	3,6%	5,0%
Glutamato	7,5%	6,0%
Total	11,1%	11%

Fonte: Autoria própria

3.5. Conclusão

Em conclusão, foi possível obter a proteína recombinante CDK10 por meio da expressão em um sistema bacteriano. No entanto, a proteína em questão foi obtida majoritariamente em corpos de inclusão, e uma pequena fração foi obtida no sobrenadante do lisado. Os testes de purificação usando coluna de níquel para ambas as frações apresentaram o mesmo resultado, ou seja, a CDK10 não se liga a coluna de afinidade ao níquel, sugerindo que a CDK10 possivelmente esconde a cauda de histidina, impossibilitando a interação com o níquel presente na coluna. O fato de ambas as frações (solúvel e a solubilizada e reenovelada na presença do SDS 2%) não se ligarem à coluna, sugere que o reenovelamento foi realmente alcançado, e a proteína se comporta tal qual a proteína obtida na fração solúvel. Estes resultados mostram que será necessário otimizar o protocolo para obtenção da CDK10, principalmente na fração solúvel do lisado, e utilizar outros métodos para a purificação da proteína, a fim de viabilizar os estudos de caracterização da CDK10 humana.

3.6. Perspectivas Futuras

As perspectivas futuras sobre o estudo da proteína CDK10 humana são desafiadoras, uma vez que, ao contrário da PdxK, são necessários mudanças nas condições de cultivo e ajuste de parâmetros para otimizar o processo de obtenção da CDK10 recombinante. No entanto, são passos possíveis de serem alcançados, demonstrados pelos resultados obtidos até aqui, que poderão, em um futuro próximo, colaborar para a realização de estudos mais aprofundados, e fornecer informações estruturais e funcionais mais detalhadas sobre a CDK10.



CAPÍTULO 4



CAPÍTULO 4

4.1. Referências Bibliográficas

- ABRAS, A.; BALLART, C.; FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A.; PINAZO, M. J.; GASCÓN, J.; MUÑOZ, C.; GÁLLEGO, M. Worldwide control and management of Chagas Disease in a new era of globalization: a close look at congenital *Trypanosoma cruzi* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 35, n. 2, e0015221, 2022.
- ALMEIDA-DE-FARIA, M.; FREYMÜLLER, E.; COLLI, W.; ALVES, M. J. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Experimental parasitology**, Maryland Heights, v. 92, n. 4, p. 263–274.
- ALVES, M. J.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. **IUBMB Life**, Chichester, v. 59, n. 4, p. 274–279, 2007.
- ARE, S.; GATREDDI, S.; JAKKULA, P.; QURESHI, I. A. Structural attributes and substrate specificity of pyridoxal kinase from *Leishmania donovani*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 152, p. 812–827, 2020.
- ARTER, C.; TRASK, L.; WARD, S.; YEOH, S.; BAYLISS, R. Structural features of the protein kinase domain and targeted binding by small-molecule inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 298, n. 8, p. 102247, 2022.
- BANEYX F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 10, n. 5, p. 411–421, 1999.
- BAZZI, Z. A.; TAI, I. T. CDK10 in gastrointestinal cancers: dual roles as a tumor suppressor and oncogene. **Frontiers in oncology**, Lausanne, v. 11, n. 655479, 2021.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **Doença de Chagas e o barbeiro**: informação é a melhor forma de erradicação. Disponível em <https://bvsm.s.saude.gov.br/doenca-de-chagas-e-o-barbeiro-informacao-e-a-melhor-forma-de-erradicacao/>. Acesso em: 21 jun. 2023.
- BISHOP, A. Ö. T.; DE BEER, T. A. P.; JOUBERT, F. Protein homology modelling and its use in South Africa. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 104, n. 1–2, p. 2–6, 2008.
- CAI, M.; YUAN, T.; HUANG, H.; GUI, L.; ZHANG, L.; MENG, Z.; WU, W.; SHENG, Y.; ZHANG, X. Integrative analysis of omics data reveals regulatory network of CDK10 in vitiligo risk. **Frontiers in genetics**, Lausanne, v. 12, n. 634553, 2021.
- CAO, P.; GONG, Y.; TANG, L.; LEUNG, Y. C.; JIANG, T. Crystal structure of human pyridoxal kinase. **Journal of Structural Biology**, Philadelphia, v. 154, n. 3, p. 327–332, 2006.
- CHAO, C. C.; MA, Y. S.; STADTMAN, E. R. Modification of protein surface hydrophobicity and methionine oxidation by oxidative systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, n. 7, p. 2969–2974, 1997.
- CHHETRI, G.; KALITA, P.; TRIPATHI, T. An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in *Escherichia coli*. **MethodsX**, Amsterdam, v. 2, p. 385–391, 2015.

- CHIU, S. C.; CHEN, S. P.; HUANG, S. Y.; WANG, M. J.; LIN, S.Z.; HARN, H. J.; PANG, C. Y. Induction of apoptosis coupled to endoplasmic reticulum stress in human prostate cancer cells by n-butylidenephthalide. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n.3, e33742, 2012.
- CHIURILLO, M. A.; JENSEN, B. C.; DOCAMPO, R. Drug target validation of the protein Kinase *AEK1*, essential for proliferation, host cell invasion, and intracellular replication of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 9, n. 2, e0073821, 2021.
- CLARK, E. D. B. Refolding of recombinant proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 157–163, 1998.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A Critical review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.
- DASHIVETS, T.; WOOD, N.; HERGERSBERG, C.; BUCHNER, J.; HASLBECK, M. Rapid matrix-assisted refolding of histidine-tagged proteins. **ChemBiochem**, Weinheim, v. 10, n. 5, p. 869–876, 2009.
- DE OLIVEIRA, R. G.; CRUZ, L. R.; MOLLO, M. C.; DIAS, L. C.; KRATZ, J. M. Chagas Disease drug discovery in Latin America—a mini review of antiparasitic agents explored between 2010 and 2021. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 9, n. 771143, 2021.
- DE SOUZA, M. L., DE OLIVEIRA, R. J. C.; FERREIRA, R. S.; ESPINOZA, C. R. M.; FERREIRA, L. L. G.; SLAFER, B. W.; MAGALHÃES, L. G.; KROGH, R.; OLIVA, G.; CRUZ, F. C.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Discovery of potent, reversible, and competitive cruzain inhibitors with Trypanocidal activity: a structure-based drug design approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 60, n. 2, p. 1028–1041, 2020.
- DEKA, G.; KALYANI, J. N.; JAHANGIR, F. B.; SABHARWAL, P.; SAVITHRI, H. S.; MURTHY, M. R. N. Structural and functional studies on *Salmonella typhimurium* pyridoxal kinase: the first structural evidence for the formation of Schiff base with the substrate. **The FEBS Journal**, Chichester, v. 286, n. 18, p. 3684–3700, 2019.
- DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. V. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.9, p. 2444–2457, 2009.
- DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, London, v.44, p.880. 1988.
- DI SALVO, M. L.; HUNT, S.; SCHIRCH, V. Expression, purification, and kinetic constants for human and *Escherichia coli* pyridoxal kinases. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 36, n. 2, p. 300–306, 2004.
- DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. The age of protein kinases. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 779, p. 7–52, 2011.
- DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE. **What is Chagas disease?** Geneva: DNDi, 2023. Disponível em: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>. Acesso em: 18 set. 2023.

DUZENLI, O. F.; OKAY, S. Promoter engineering for the recombinant protein production in prokaryotic systems. **AIMS Bioengineering**, Springfield, v. 7, n. 2, p. 62–81, 2020.

EHGARTNER, D.; SAGMEISTER, P.; LANGEMANN, T.; MEITZ, A.; LUBITZ, W.; HERWIG, C. A novel method to recover inclusion body protein from recombinant *E. coli* fed-batch processes based on phage Φ X174-derived lysis protein E. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 101, n. 14, p. 5603–5614, 2017.

EL GHOZZI, M. H.; BOIRET, E.; WIND, F.; BROCHARD, C.; FITTERE, S.; PARIS, L.; MAZIER, D.; SANSONETTI, N.; BIERLING, P. Testing blood donors for Chagas disease in the Paris area, France: first results after 18 months of screening. **Transfusion**, Hoboken, v. 50, n. 3, p. 575–583, 2010.

ELIOT, A. C.; KIRSCH, J. F. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 73, n. 1, p. 383–415, 2004.

EMBL-EBI. **Clustal omega**. Cambridge: EMBL-EBI, 2023. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>. Acesso em: 21 jun. 2023.

ENZLER, F.; TSCHAIKNER, P.; SCHNEIDER, R.; STEFAN, E. KinCon: cell-based recording of full-length kinase conformations. **IUBMB Life**, Chichester, v. 72, n. 6, p. 1168–1174, 2020.

ESPOSITO, L.; INDOVINA, P.; MAGNOTTI, F.; CONTI, D.; GIORDANO, A. Anticancer therapeutic strategies based on CDK inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 19, n. 30, p. 5327-32, 2013.

FACCIO, G. From protein features to sensing surfaces. **Sensors**, Basel, v. 18, n. 4, p. 1204, 2018.

FRANCO, T. T.; ANDREWS, A. T.; ASENJO, J. A. Use of chemically modified proteins to study the effect of a single protein property on partitioning in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 49, n. 3, p. 300–308, 2000.

FREDI, B. M.; DE LABIO, R. W.; RASMUSSEN, L. T.; CHAGAS, E. F. B.; CHEN, E. S.; TURECKI, G.; SMITH, M. A. C.; PAYÃO, S. L. M. CDK10, CDK11, FOXO1, and FOXO3 gene expression in Alzheimer's Disease Encephalic Samples. **Cellular and Molecular Neurobiology**, New York, v. 43, p. 2953-2962, 2023.

FUNG, T. K.; POON, R. Y. C. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 16, p. 335–342, 2005.

GANDHI, A. K.; DESAI, J. V.; GHATGE, M. S.; DI SALVO, M. L.; DI BIASE, S.; DANSO-DANQUAH, R.; MUSAYEV, F. N.; CONTESTABILE, R.; SCHIRCH, V.; SAFO, M. K. Crystal structures of human pyridoxal kinase in complex with the neurotoxins, ginkgotoxin and theophylline: insights into pyridoxal kinase inhibition. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. e40954, 2012.

GAO, K.; WANG, W.; KRONENBERGER, T.; WRENGER, C.; GROVES, M.R. The crystal structure of the *Plasmodium falciparum* PdxK provides an experimental model for pro-drug activation. **Crystals**, Basel, v. 9, n. 10, 2019.

GAO, Z. G.; LAU, C. K.; LO, S. C.; CHOI, S. Y.; CHURCHICH, J. E.; KWOK, F. Porcine pyridoxal kinase c-DNA cloning, expression and confirmation of its primary sequence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 30, n. 12, p.1379–1388, 1998.

G-BIOSCIENCES. **His-tagged protein expressing but not binding your NI-NTA column?** Saint Louis: G-Biosciences. Disponível em: <https://info.gbiosciences.com/blog/his-tagged-protein-expressing-but-not-binding-your-ni-nta-column>. Acesso em: 19 jun. 2023.

GOMES, H.; ROMEIRO, C. N.; BRAZ, G. R. C.; DE OLIVEIRA, E. A. G.; RODRIGUES, C.; DA FONSECA, R. N.; GITHAKA, N.; ISEZAKI, M.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; VAZ, I. S.; LOGULLO, C. MORARES, J. Identification and structural-functional analysis of cyclin-dependent kinases of the cattle tick rhipicephalus (boophilus) microplus. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 10, e76128, 2013.

GUEN, V. J.; GAMBLE, C.; FLAJOLET, M.; UNGER, S.; THOLLET, A.; FERANDIN, Y.; SUPERTI-FURGA, A.; COHEN, P. A.; MEIJER, L.; COLAS, P. CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 48, p. 19525–19530, 2013.

HAGEMANS, D.; BELZEN, I. A. E. M.; LUENGO, T. M.; RUDIGER, S. G. D. A script to highlight hydrophobicity and charge on protein surfaces. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Lausanne, v. 2, n. 56, p. 1-11., 2015.

HASHEMZADEH, M. S.; MOHAMMADI, M.; GHALEH, H. E. G.; SHARTI, M.; CHOOPANI, A.; PANDA, A. K. Expression, solubilization, refolding and final purification of recombinant proteins as expressed in the form of “Classical Inclusion Bodies” in *E. coli*. **Protein & Peptide Letters**, Sharjah, v. 28, n. 2, p. 122–130, 2021.

HAYAT, S. M. G.; FARAHANI, N.; GOLICHENARI, B.; SAHEBKAR, A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 24, n. 6, p. 718–725, 2018.

HOFFMANN, D.; EBRAHIMI, M.; GERLACH, D.; SALZIG, D.; CZERMAK, P. Reassessment of inclusion body-based production as a versatile opportunity for difficult-to-express recombinant proteins. **Critical Reviews in Biotechnology**, Philadelphia, v. 38, n. 5, p. 729–744, 2018.

HUANG, S.; LIU, Z.; MA, Z.; ZHANG, J.; HUANG, L. Isolation and characterization of the 5'-flanking region of the human PDXK gene. **Gene**, Amsterdam, v. 628, p. 218–223, 2017.

IDICULA-THOMAS, S.; BALAJI, P. V. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. **Protein Science**, Hoboken, v. 14, n. 3, p. 582–592, 2005.

ISMI, D. P.; PULUNGAN, R.; AFIAHAYATI. Deep learning for protein secondary structure prediction: pre and post alphafold. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, Lausanne, v.20, p. 6271–6286, 2022.

JEFFREY, P. D.; RUSSO, A. A.; POLYAK, K.; GIBBS, E.; HURWITZ, J.; MASSAGUÉ, J.; PAVLETICH, N. P. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. **Nature**, London, v. 376, n. 6538, p. 313–320, 1995.

- JEHLE, S.; KUNOWSKA, N.; BENLASFER, N.; WOODSMITH, J.; WEBER, G.; WAHL, M. C.; STELZL, U. A human kinase yeast array for the identification of kinases modulating phosphorylation-dependent protein-protein interactions. **Molecular Systems Biology**, Heidelberg, v. 18, n. 3, p. e10820, 2022.
- JONES, D. C.; ALPHEY, M. S.; WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Chemical, genetic and structural assessment of pyridoxal kinase as a drug target in the African trypanosome. **Molecular Microbiology**, Chichester, v. 86, n. 1, p. 51–64, 2012.
- JÜRGEN, B.; BREITENSTEIN, A.; URLACHER, V.; BÜTTNER, K.; LIN, H.; HECKER, M.; SCHWEDER, T.; NEUBAUER, P. Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 9, n. 1, p. 41, 2010.
- KASARAGOD, V. B.; PACIOS-MICHELENA, A.; SCHAEFER, N.; ZHENG, F.; BADER, N.; ALZHEIMER, C.; VILLMANN, C.; SCHINDELIN, H. Pyridoxal kinase inhibition by artemisinin down-regulates inhibitory neurotransmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 117, n. 52, p. 33235–33245, 2020.
- KHAN, R. H.; RAO, K. B.; ESHWARI, A. N.; TOTTEY, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, Hoboken, v. 14, n. 5, p. 722–728, 1998.
- KIM, M. IL; HONG, M. Crystal structure and catalytic mechanism of pyridoxal kinase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Philadelphia, v. 478, n. 1, p. 300–306, 2016.
- KIMURA, T.; SHIRAKAWA, R.; YAOITA, N.; HAYASHI, T.; NAGANO, K.; HORIUCHI, H. The antimalarial drugs chloroquine and primaquine inhibit pyridoxal kinase, an essential enzyme for vitamin B6 production. **FEBS Letters**, Oxford, v. 588, n. 20, p. 3673–3676, 2014.
- KNOCKAERT, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. **Trends in Pharmacological Sciences**, Cambridge, v. 23, n. 9, p. 417–425, 2002.
- KUMAGAI, P. S.; ARAUJO, A. P. U.; LOPES, J. L. S. Going deep into protein secondary structure with synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. **Biophysical Reviews**, Heidelberg, v. 9, n. 5, p. 517–527, 2017.
- KUMAR, V.; SHARMA, M.; RAKESH, B. R.; MALIK, C. K.; NEELAGIRI, S.; NEERUPUDI, K. B.; GARG, P.; SINGH, S. Pyridoxal kinase: a vitamin B6 salvage pathway enzyme from *Leishmania donovani*. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 119, p. 320–334, 2018.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LEE, H. S.; MOON, B. J.; CHOI, S. Y.; KWON, O. S. Human pyridoxal kinase: overexpression and properties of the recombinant enzyme. **Molecules and Cells**, Seoul, v. 10, n. 4, p. 452–459, 2000.
- LI, M. H.; KWOK, F.; CHANG, W. R.; LAU, C. K.; ZHANG, J. P.; LO, S. C.; JIANG, T.; LIANG, D. C. Crystal structure of brain pyridoxal kinase, a novel member of the ribokinase superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 277, n. 48, p. 46385–46390, 2002.

- LICHTY, J. J.; MALECKI, J. L.; AGNEW, H. D.; MICHELSON-HOROWITZ, D. J.; TAN, S. Comparison of affinity tags for protein purification. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 41, n. 1, p. 98–105, 2005.
- LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, n. 6, p. 837–843, 2010.
- ŁUKASIK, P.; ZAŁUSKI, M.; GUTOWSKA, I. Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development-review. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 22, n. 6, p. 2935, 2021.
- LUM, H. K.; KWOK, F.; LO, S. C. Cloning and characterization of *Arabidopsis thaliana* pyridoxal kinase. **Planta**, Heidelberg, v. 215, n. 5, p. 870–879, 2002.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, n. 3, p. 512–538, 1996.
- MALUMBRES, M.; HARLOW, E.; HUNT, T.; HUNTER, T.; LAHTI, J. M.; MANNING, G.; MORGAN, D. O.; TSAI, L. H.; WOLGEMUTH, D. J. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. **Nature Cell Biology**, London, v. 11, n. 11, p. 1275–1276, 2009.
- MALUMBRES, M. Cyclin-dependent kinases. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 6, p. 1–10, 2014.
- MARAS, B.; VALIANTE, S.; ORRU, S.; SIMMACO, M.; BARRA, D.; CHURCHICH, J. E. Structure of pyridoxal kinase from sheep brain and role of the tryptophanyl residues. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 18, n. 3, p. 259–268, 1999.
- MAYA, J. D.; BOLLO, S.; NUÑEZ-VERGARA, L. J.; SQUELLA, J.A.; REPETTO, Y.; MORELLO, A.; PÉRIÉ J.; CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurantoin derivatives. **Biochemical Pharmacology**, Kansas, v. 65, p. 999–1006, 2003.
- MCCOY, A. J.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; ADAMS, P. D.; WINN, M. D.; STORONI, L. C.; READ, R. J. *Phaser* crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, Chichester, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.
- MISHRA, V. Affinity tags for protein purification. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah, v. 21, n. 8, p. 821–830, 2020.
- MISSNER, E.; BAHR, I.; BADOCK, V.; LÜCKING, U.; SIEMEISTER, G.; DONNER, P. Off-target decoding of a multitarget kinase inhibitor by chemical proteomics. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 10, n. 7, p. 1163–1174, 2009.
- MOGK, A.; MAYER, M. P.; DEUERLING, E. Mechanisms of protein folding: molecular chaperones and their application in biotechnology. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 3, n. 9, p. 807–814, 2002.
- MOLINA, I.; GÓMEZ I PRAT, J.; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MONTALVO-OCOTOXTLE, I. G.; ROJAS-VELASCO, G.; RODRÍGUEZ-MORALES, O.; ARCE-FONSECA, M.; BAEZA-HERRERA, L. A.; ARZATE-RAMÍREZ, A.; MELÉNDEZ-RAMÍREZ, G.; MANZUR-SANDOVAL, D.; LARA-ROMERO, M. L.; REYES-ORTEGA, A.; ESPINOSA-GONZÁLEZ, P.; PALACIOS-ROSAS, E. Chagas heart disease: beyond a single complication, from asymptomatic disease to heart failure. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 11, n. 24, p.7262, 2022.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A. JR; ROSAS, F.; VILLENA, E.; QUIROZ, R.; BONILLA, R.; BRITTO, C.; GUHL, F.; VELAZQUEZ, E.; BONILLA, L.; MEEKS, B.; RAO-MELACINI, P.; POGUE, J.; MATTOS, A.; LAZDINS, J.; RASSI, A.; CONNOLLY, S. J.; BENEFIT INVESTIGATORS. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 373, n. 14, p. 1295–1306, 2015.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Basic local alignment search tool**. Bethesda: NLM, 2023. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 21 jun. 2023.

NEWMAN, J. A.; DAS, S. K.; SEDELNIKOVA, S. E.; RICE, D. W. Cloning, purification and preliminary crystallographic analysis of a putative pyridoxal kinase from *Bacillus subtilis*. **Acta Crystallographica Section F: structural biology and crystallization communications**, Hoboken, v. 62, n. 10, p. 1006–1009, 2006.

NODWELL, M. B.; KOCH, M. F.; ALTE, F.; SCHNEIDER, S.; SIEBER, S. A. A Subfamily of bacterial ribokinases utilizes a hemithioacetal for pyridoxal phosphate salvage. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 136, n. 13, p. 4992–4999, 2014.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Chagas disease**. Washington: PAHO, [202-?]. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>. Acesso em: 21 set. 2023.

OSUGA, H.; OSUGA, S.; WANG, F.; FETNI, R.; HOGAN, M. J.; SLACK, R. S.; HAKIM, A. M.; IKEDA, J. E.; PARK, D. S. Cyclin-dependent kinases as a therapeutic target for stroke. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 18, p. 10254–10259, 2000.

PANDA, A. K. Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, New York, v. 85, p. 43–93, 2003.

PARK, A. R.; JANG, S. W.; KIM, J. S.; PARK, Y. G.; KOO, B. S.; LEE, H. C. Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in *E. coli*. **PloS One**, San Francisco, v. 13, n. 7, p. e0201060, 2018.

PARK, J. H.; BURNS, K.; KINSLAND, C.; BEGLEY, T. P. Characterization of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 5, p. 1571–1573, 2004.

PATRA, A. K.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHIJA, R.; KRISHNAN, A.; GARG, L. C.; PANDA, A. K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 18, n. 2, p. 182–192, 2000a.

- PATRA, A. K.; GAHLAY, G. K.; REDDY, B. V.; GUPTA, S. K.; PANDA, A. K. Refolding, structural transition and spermatozoa-binding of recombinant bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-C expressed in *Escherichia coli*. **European Journal of Biochemistry**, Chichester, v. 267, n. 24, p. 7075–7081, 2000b.
- PATRICK, G. N.; ZUKERBERG, L.; NIKOLIC, M.; DE LA MONTE, S.; DIKES, P.; TSAI, L. H. Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. **Nature**, London, v. 402, n. 6762, p. 615–622, 1999.
- PÉREZ-MOLINA, J. A.; CRESPILO-ANDÚJAR, C.; BOSCH-NICOLAU, P.; MOLINA, I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 39, n. 9, p. 458–470, 2021.
- PEYRESSATRE, M.; PRÉVEL, C.; PELLERANO, M.; MORRIS, M. C. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. **Cancers**, Basel, v. 7, n. 1, p. 179–237, 2015.
- PINAZO, M. J., MIRANDA, B., RODRÍGUEZ-VILLAR, C., ALTCLAS, J., BRUNET SERRA, M., GARCÍA-OTERO, E. C., DE ALMEIDA, E. A., DE LA MATA GARCÍA, M., GASCON, J., GARCÍA RODRÍGUEZ, M., MANITO, N., MORENO, C. A.; OPPENHEIMER, F., PUENTE, P. S., RIARTE, A.; SALAS, C. J., SALAVERT, L. M.; SANZ, G. F.; TORRICO, F.; TORRÚS, T. D.; USSETTI, P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. **Transplantation Reviews**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 91–101, 2011.
- PINES, J. Cyclins, CDKs and cancer. **Seminars in Cancer Biology**, London, v. 6, n. 2, p. 63–72, 1995.
- PUETZ, J.; WURM, F. M. Recombinant proteins for industrial versus pharmaceutical purposes: a review of process and pricing. **Processes**, Basel, v. 7, n. 8, p. 476, 2019.
- QIN, H. M.; WANG, J. W.; GUO, Q.; LI, S.; XU, P.; ZHU, Z.; SUN, D.; LU, F. Refolding of a novel cholesterol oxidase from *Pimelobacter simplex* reveals dehydrogenation activity. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 139, p. 1–7, 2017.
- RAINA, K.; PANDA, A. K.; ALI, M. M.; TALWAR, G. P. Purification, refolding, and characterization of recombinant LHRH-T multimer. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 37, n. 1, p. 8–17, 2004.
- RASSI JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p.1388-1402, 2010.
- RCSB PDB. 3ZS7: **Crystal structure of pyrodoxal kinase from Trypanosoma brucei**. [S. l.]: RCSB PDB, 2023. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/3zs7>. Acesso em: 22 jun. 2022.
- ROBERT, T.; JOHNSON, J. L.; GUICHAOUA, R.; YARON, T. M.; BACH, S.; CANTLEY, L. C.; COLAS, P. Development of a CDK10/CycM in vitro kinase screening assay and identification of first small-molecule inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, Lausanne, v. 8, n. 147, 2020.
- ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, 2014.

ROSKOSKI JUNIOR, R. A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. **Pharmacological Research**, London, v. 100, p. 1–23, 2015.

ROSKOSKI JUNIOR, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2023 update. **Pharmacological Research**, London, v. 187, p. 106552, 2023.

SAFO, M. K.; MUSAYEV, F. N.; HUNT, S.; DI SALVO, M. L.; SCARSDALE, N.; SCHIRCH, V. Crystal structure of the PdxY protein from *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 186, n. 23, p. 8074–8082, 2004.

SAFO, M. K.; MUSAYEV, F. N.; DI SALVO, M. L.; HUNT, S.; CLAUDE, J. B.; SCHIRCH, V. Crystal structure of pyridoxal kinase from the *Escherichia coli* *pdxK* gene: implications for the classification of pyridoxal kinases. **Journal of Bacteriology**, Washington, 188, n. 12, p. 4542–4552, 2006.

SAINI, M.; ARE, S.; QURESHI, I. A. Pyridoxal kinase of disease-causing human parasites: structural and functional insights to understand its role in drug discovery. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah, v. 23, n. 4, p. 271–289, 2022.

SCHMITT, D. L.; MEHTA, S.; ZHANG, J. Illuminating the kinome: visualizing real-time kinase activity in biological systems using genetically encoded fluorescent protein-based biosensors. **Current Opinion in Chemical Biology**, Oxford, v. 54, p. 63–69, 2020.

SCHWARTZ, P. A.; MURRAY, B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. **Bioorganic Chemistry**, Maryland Heights, v. 39, n. 5–6, p. 192–210, 2011.

SCOTT, T. C.; PHILLIPS, M. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* pyridoxal kinase: purification, gene isolation and expression in *Escherichia coli*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 88, n. 1-2, p.1-11, 1997.

SEOK, S. Structural insights into protein regulation by phosphorylation and substrate recognition of protein kinases/phosphatases. **Life**, Basel, v. 11, n. 9, p. 957, 2021.

SHULTS, M. D.; JANES, K. A.; LAUFFENBURGER, D. A.; IMPERIALI, B. A multiplexed homogeneous fluorescence-based assay for protein kinase activity in cell lysates. **Nature Methods**, London, v. 2, n. 4, p. 277–284, 2005.

SILVA, P. L.; MANTILLA, B. S.; BARISÓN, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: opportunities to target new drugs against chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, Sharjah, v. 17, n. 20, p. 2074–2099, 2011.

SILVA, B. V.; HORTA, B.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO, A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SILVA, L.; BASTOS, L.; SANTOS, L. **Modelagem computacional de proteínas**. Bioinfo, Lagoa Santa, 2021. Disponível em: bioinfo.com.br/modelagem-computacional-de-proteinas/. Acesso em: 21 set. 2023.

SIMPSON, S.; WOODWORTH, C. D.; DIPAOLO, J. A. Altered expression of Erg and Ets-2 transcription factors is associated with genetic changes at 21q22.2-22.3 in immortal and cervical carcinoma cell lines. **Oncogene**, London, v. 14, n. 18, p. 2149–2157, 1997.

SLOUKA, C.; KOPP, J.; HUTWIMMER, S.; STRAHAMMER, M.; STROHMER, D.; EITENBERGER, E.; SCHWAIGHOFER, A.; HERWIG, C. Custom made inclusion bodies: impact of classical process parameters and physiological parameters on inclusion body quality attributes. **Microbial Cell Factories**, London, v. 17, n. 1, p. 148, 2018.

SWARTZ, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 195–201, 2001.

TARIQUE, K. F.; DEVI, S.; TOMAR, P.; ALI, M. F.; REHMAN, S. A. A.; GOURINATH, S. Characterization and functional insights into the *Entamoeba histolytica* pyridoxal kinase, an enzyme essential for its survival. **Journal of Structural Biology**, Philadelphia, v. 212, n. 3, p. 107645, 2020.

TEKNOVA. **SOB and SOC media**. Hollister: TEKNOVA, [202-?]. Disponível em: <https://www.teknova.com/en/products/category-page.html/microbial-culture-media/bacterial-culture-media/sob-and-soc-media.html>. Acesso em: 21 jun. 2023.

TORRES, R. M.; CORREIA, D.; NUNES, M. C. P.; DUTRA, W. O.; TALVANI, A.; SOUZA, S. A.; MENDES, F. S. N. S.; SCANAVACCA, M. I.; PISANI, C.; MOREIRA, M. C. V.; SOUZA, D. S. M.; JUNIOR, W. O.; MARTINS, S. M.; DIAS, J. C. P. Prognosis of chronic Chagas heart disease and other pending clinical challenges. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 117, e210172, 2022.

TORRICO, F.; GASCON, J.; ORTIZ, L.; ALONSO-VEGA, C.; PINAZO, M. J.; SCHIJMAN, A.; ALMEIDA, I. C.; ALVES, F.; STRUB-WOURGAFT, N.; RIBEIRO, I.; E1224 STUDY GROUP. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 18, n. 4, p. 419–430, 2018.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

UBERSAX, J. A.; FERRELL, J. E. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. **Reviews Molecular Cell Biology**, London, v.8, n.7, p. 530–541, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 1504 p.

WALL, R. J.; CARVALHO, S.; MILNE, R.; BUEREN-CALABUIG, J. A.; MONIZ, S.; CANTIZANI-PEREZ, J.; MACLEAN, L.; KESSLER, A.; COTILLO, I.; SASTRY, L.; MANTHRI, S.; PATTERSON, S.; ZUCCOTTO, F.; THOMPSON, S.; MARTIN, J.; MARCO, M.; MILES, T. J.; DE RYCKER, M.; THOMAS, M. G.; FAIRLAMB, A. H.; GILBERT, I. H.; WYLLIE, S. The Q_i Site of Cytochrome *b* is a promiscuous drug target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. **ACS Infectious Diseases**, Washington, v. 6, n. 3, p. 515–528, 2020.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature Biotechnology**, New York, v. 32, n. 10, p. 992–1000, 2014.

WANG, B.; WU, H.; HU, C.; WANG, H.; LIU, J.; WANG, W.; LIU, Q. A. An overview of kinase downregulators and recent advances in discovery approaches. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, New York, v. 6, n. 1, p. 423, 2021.

WANG, S.; FISCHER, P. M. Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology. **Trends in Pharmacological Sciences**, Cambridge, v. 29, n. 6, p. 302–313, 2008.

WEISWALD, L. B.; HASAN, M. R.; WONG, J. C. T.; PASILIAO, C. C.; RAHMAN, M.; REN, J.; YIN, Y.; GUSSCOTT, S.; VACHER, S.; WENG, A. P.; KENNECKE, H. F.; BIÈCHE, I.; SCHAEFFER, D. F.; YAPP, D. T., TAI, I. T. Inactivation of the kinase domain of CDK10 prevents tumor growth in a preclinical model of colorectal cancer, and is accompanied by downregulation of Bcl-2. **Molecular Cancer Therapeutics**, Philadelphia, v. 16, n. 10, p. 2292–2303, 2017.

WHO. **Chagas disease (also know as American trypanosomiasis)**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 21 jun. 2023.

WRENGER, C.; ESCHBACH, M. L.; MÜLLER, I. B.; WARNECKE, D.; WALTER, R. D. Analysis of the vitamin B6 biosynthesis pathway in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 280, n. 7, p. 5242–5248, 2005.

YOU, Y.; YANG, W.; WANG, Z.; ZHU, H.; LI, H.; LIN, C.; RAN, Y. Promoter hypermethylation contributes to the frequent suppression of the CDK10 gene in human nasopharyngeal carcinomas. **Cellular oncology**, Dordrecht, v. 36, n. 4, p. 323–331, 2013.

ZHANG, J.; ALLEN, M. D. FRET-based biosensors for protein kinases: illuminating the kinome. **Molecular BioSystems**, Cambridge, v. 3, n. 11, p. 759–765, 2007.

ZHANG, W.; YANG, Y.; LIU, X.; LIU, C.; BAI, Z. Development of a secretory expression system with high compatibility between expression elements and an optimized host for endoxylanase production in *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 18, n. 1, p. 72, 2019.

ZHANG, Y.; OLSEN, D. R.; NGUYEN, K. B.; OLSON, P. S.; RHODES, E. T.; MASCARENHAS, D. Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, Maryland Heights, v. 12, n. 2, p. 159–165, 1998.

ZUO, X.; LI, S.; HALL, J.; MATTERN, M. R.; TRAN, H.; SHOO, J.; TAN, R.; WEISS, S. R.; BUTT, T. R. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli*. **Journal of Structural and Functional Genomics**, Dordrecht, v. 6, n. 2–3, p. 103–111, 2005.

FIM