

## Clonagem do gene TcPEPCK e expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) de *Trypanosoma cruzi* em *Escherichia coli*

Beatriz N. M. de Miranda \*<sup>1</sup> (IC), Kátia C. S. Correa<sup>1</sup> (IC), Mônica R. C. Iemma<sup>1</sup> (PG), Dulce H. F. de Souza<sup>1</sup> (PQ). beatriz.ufscar@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. Departamento de Química. Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular. Rod. Washington Luis, Km 235. Monjolinho, São Carlos, SP  
. Cx. Postal 676, CEP 13565-905

Palavras Chave: *Trypanosoma cruzi*, fosfoenolpiruvato carboxiquinase.

### Introdução

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, afeta aproximadamente 20 milhões de pessoas e é uma das chamadas doenças negligenciadas. Um dos caminhos para o desenvolvimento de novas drogas contra a doença de Chagas é explorar o fato de que a forma infectante de *T. cruzi* depende exclusivamente da via glicolítica como fonte de energia. Portanto, compostos que bloqueiem a glicólise podem ser utilizados como drogas para combater a doença. A enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) é a enzima da via glicolítica que catalisa reversivelmente a carboxilação do fosfoenolpiruvato e sua desfosforilação, com formação de oxaloacetato (OAA)<sup>1</sup>.

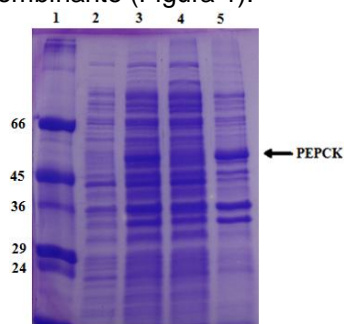
Em estudos anteriores a enzima PEPCK de *T. cruzi* teve sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia<sup>2</sup>. O protocolo utilizado para a obtenção da enzima não pode ser reproduzido pelo fato de que resinas utilizadas para a purificação foram descontinuadas. Portanto para estudo de busca de inibidores da PEPCK foi necessária a realização da produção da enzima recombinante utilizando-se outra construção genética. O objetivo deste trabalho foi a expressão e co-expressão da enzima PEPCK em *E. coli* para purificação e busca de potenciais inibidores. Para isso, foi realizada a clonagem do gene TcPEPCK no vetor pET Duet-1 que permite a inserção de duas cópias do gene para a co-expressão da enzima na mesma célula, na tentativa de se aumentar o número de monômeros da enzima otimizando a formação da enzima dimérica ativa. Nesta construção a enzima é produzida em fusão com uma seqüência de 6 resíduos de histidina no N-terminal e uma seqüência de 11 aminoácidos com afinidade a resina de agarose no C-terminal, para posterior purificação por cromatografia de afinidade.

Uma vez obtida a enzima pura serão realizados os estudos dos parâmetros cinéticos da mesma para posterior utilização na busca de inibidores naturais e sintéticos.

### Resultados e Discussão

Promoveram-se estudos das condições de expressão da PEPCK recombinante em *E. coli* BL21 transformadas com o plasmídeo pETDuetPEPCK-2. A temperatura de indução de 20°C, com 0,5mM de IPTG, foi a melhor condição

encontrada até o momento, para a expressão da PEPCK recombinante (Figura 1).



**Figura 1:** Gel SDS-PAGE de expressão da PEPCK recombinante de *T. cruzi* (PEPCK) em *E. coli*. Expressão foi realizada a 20°C por 12 horas, 0,5mM de IPTG. Poço 1: Padrão de massa molecular; Poço 2 e 3: Conteúdo proteico antes e depois da indução, respectivamente; Poço 4: Fração solúvel do lisado celular; Poço 5: Fração insolúvel do lisado celular.

Esta sendo realizada, ainda, a clonagem do gene TcPEPCK no vetor pET 28a para um estudo comparativo da expressão, utilizando-se os dois sistemas. A próxima etapa será a padronização das condições de purificação e dos ensaios de atividade.

### Conclusões

Até o momento, as clonagens no vetor pET Duet-1 já foram realizadas com sucesso, observando-se uma boa expressão da enzima. As condições de solubilidade estão sendo avaliadas para a obtenção de uma maior quantidade de enzima solúvel, pura e com atividade. A clonagem do gene TcPEPCK no vetor pET 28a já foi iniciada. O melhor sistema de expressão será, então, escolhido, levando em consideração a solubilidade e purificação. Finalmente, serão promovidos estudos cinéticos da enzima e, então, o desenvolvimento de ensaios de inibição.

### Agradecimentos

FAPESP, INBEQMeDI-INCT/CNPq

<sup>1</sup> Trapani, S. Tese de doutorado, Instituto de Física de São Carlos, USP, 2001.

<sup>2</sup> Trapani S.; Linss J.; Goldenberg S.; Fisher H.; Craievich A.F.; Oliva G. *J Mol Biol.* 313(5): 2001, 1059-72.