

TIOREDOXINA REDUTASE DE *Aspergillus fumigatus* COMO ALVO PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIFÚNGICOS

Vitória Monteiro de Araújo Vilela (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Karina Mayumi Sakita (UEM) Franciele Abigail Vilugron Rodrigues-Vendramini (UEM), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça (Coorientadora), Érika Seki Kioshima (Orientador), e-mail: eskcotica@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: Microbiologia – Subárea: Micologia

Palavras-chave: proteína recombinante, *Aspergillus*, tiorredoxina

Resumo:

A flavoenzima tiorredoxina redutase (TRR1) é um alvo de droga promissor, que faz parte do sistema tiorredoxina, cuja proteção das células contra o estresse oxidativo é uma de suas principais funções. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar a expressão heteróloga de proteínas do sistema tiorredoxina: tiorredoxina redutase (AfTrr1p) e tiorredoxina (AftrxAp) de *Aspergillus fumigatus*. Para isso, realizou-se a produção das proteínas recombinantes, utilizando o sistema de expressão heteróloga *Escherichia coli* BL21(DE3). Várias condições foram avaliadas: diferentes clones, meios de cultura e temperaturas de indução para identificar a melhor condição para a produção da proteína. Para proteína AfTrr1p o melhor meio de cultura foi o Terrific Broth (TB) independentemente da temperatura (30°C e 37°C). Enquanto que AftrxAp o meio TB foi o selecionado na temperatura de 37°C e o LB à 30°C. A padronização das condições de expressão das proteínas recombinantes é indispensável para seguir no escalonamento da produção e dar continuidade aos testes na caracterização deste novo alvo terapêutico.

Introdução

Aspergillus é um fungo filamentosos, capaz de causar uma variedade de doenças infecciosas e alérgicas dependendo da imunidade do indivíduo, podendo levar a risco de vida em pessoas imunocomprometidos e também tem aumentado sua frequência em pacientes imunocompetentes (Tudesq, et al. 2019). Mesmo com esse cenário alarmante, os antifúngicos disponíveis comercialmente ficam restritos em três classes: azóis, poliênicos e equinocandinas, tendo diversas limitações em relação aos efeitos colaterais e frente ao combate de cepas resistentes (Ostrosky-Zeichner et al, 2017). Neste sentido, na biotecnologia, a bioinformática na identificação de alvos biológicos em potencial vem crescendo, tendo as técnicas computacionais e o avanço do hardware possibilitando os métodos *in silico* (Abadio et al, 2011). Um alvo promissor para drogas é a flavoenzima denominada

tio redoxina redutase (TRR1) que faz parte do sistema conhecido como tio redoxina, tendo como uma das principais funções a proteção das células contra o estresse oxidativo (Holmgren et al., 2000). A TRR1, está presente apenas em procariotos, plantas, alguns parasitas e fungos. Neste contexto, o objetivo principal do seguinte projeto é a otimização da expressão heteróloga da tio redoxina redutase de *A. fumigatus*, com foco na validação de novos compostos para o tratamento da Aspergilose Invasiva.

Materiais e métodos

Primeiramente, a sequência de aminoácidos das proteínas AfTrr1p e AftrxAp, que contém em sua sequência uma cauda de histidina, foram analisadas pelo software ProtParam ExPASy®. Para a construção do plasmídeo o gene foi sintetizado quimicamente usando códon preferencial de *Escherichia coli* e clonados no vetor pET21a (Novagen).

Usando cepas de *Escherichia coli* BL21 (DE3) realizou-se o protocolo de obtenção de células competentes e transformação bacteriana a fim de proporcionar a expressão das proteínas em pequena e em larga escala, e posteriormente a purificação da proteína. Além disso, foi realizado o *immunoblotting* para confirmar a identidade das proteínas recombinantes nas amostras. Sendo a proteína AfTrr1p analisadas em gel de poli acrilamida 12% e a proteína AftrxAp em gel Tricina-SDS-Page (Schägger H.)

Resultados e Discussão

Inicialmente, dois clones contendo o plasmídeo para expressão de AfTrr1p foram avaliados em Terrific Broth (TB) e Luria Bertani (LB), 37°C, em tempos de 0h, 4h e 6h, sendo o clone 1 selecionado para demais etapas. Como mostrado na Fig 1, este clone foi capaz de produzir a AfTrr1p em quantidade elevadas, independentemente do meio de cultura testado (TB, LB e 4YT) ou da temperatura avaliada (30 e 37°C). Todas as condições de expressão testadas proporcionaram a expressão da AfTrr1p na condição nativa, sendo o meio TB escolhido para indução em larga escala e posterior purificação (Fig 2A e B). A confirmação da presença da proteína foi realizada por immunoblotting (Fig. 2C).

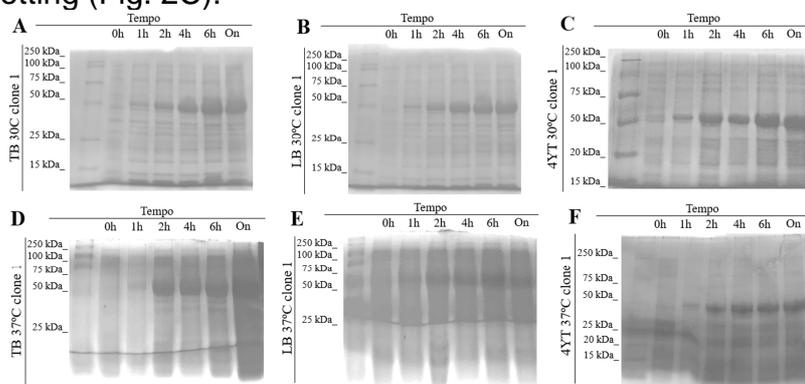


Figura 1 - Gel de poli acrilamida 1,0 mm da indução de AfTrrAp

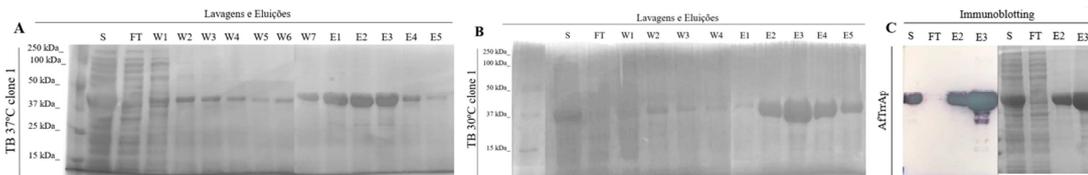


Figura 2 - Gel de poliacrilamida 1,0 mm da purificação e imunoblotting de AfTrAp

Já para a proteína AftrxAp apenas o clone 1 foi capaz de produzir a proteína recombinante, independentemente do meio de cultura ou temperatura testada (Fig 3). Uma quantidade significativa de AftrxAp foi produzida a partir das 2h de indução, independentemente da condição testada (Fig 4). Uma vez que todas as condições propiciaram uma produção da AftrxAp em condições nativas (dados não mostrados), o meio de cultura TB foi escolhido para dar continuidade nas etapas de purificação. Com é possível observar no SDS-PAGE, uma proteína de ~12KDa (Fig5A) foi obtida e confirmada por *immunoblotting* (Fig 5C).

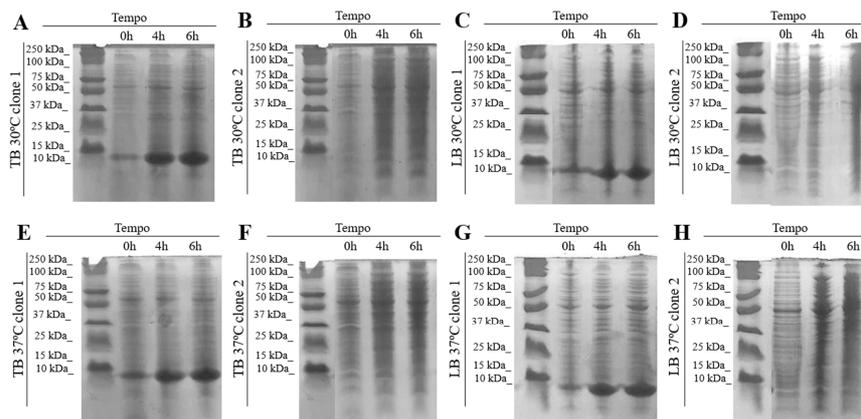


Figura 3 - Gel SDS-PAGE 1,0 mm análise entre clones de AftrxAp

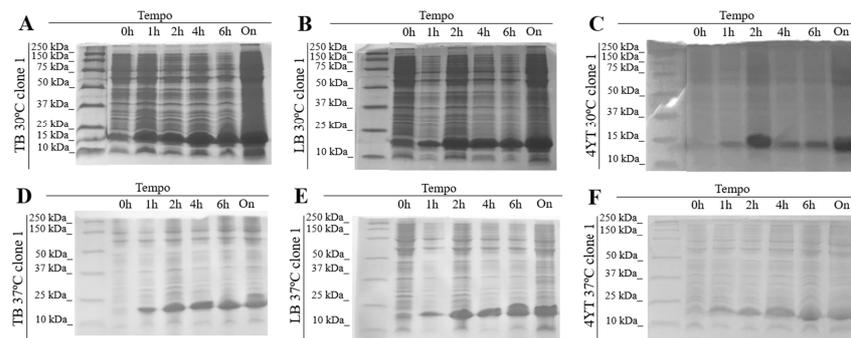


Figura 4 - Gel SDS-PAGE 1,0 mm da indução de Aftrx1p

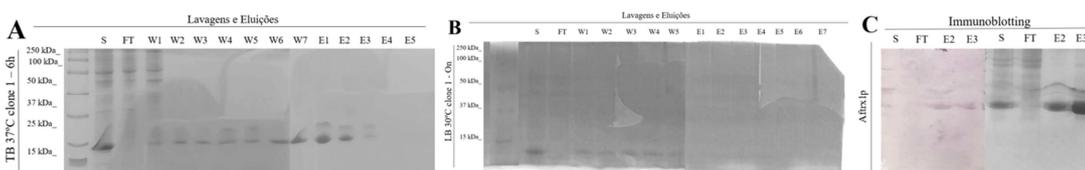


Figura 5 - Gel SDS-PAGE 1,0 mm da purificação e immunoblotting de Aftrx1p

Conclusões

A expressão e purificação de proteínas recombinantes com êxito é indispensável nos estudos de biotecnologia. Conclui-se que as proteínas recombinantes AfTrr1p e AftrxAp apresentam boa expressão nas condições de indução testadas, tendo uma melhor expressão a 37°C em meio TB, e a 30°C para AfTrr1p também em meio TB e para a proteína AftrxAp, em meio LB. Assim, os experimentos poderão seguir para caracterização de um novo alvo terapêutico.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo incentivo à pesquisa e a expansão da ciência.

Referências

ABADIO, Ana Karina R. et al. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2011.

HOLMGREN, Arne. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. **Antioxidants & redox signaling**, v. 2, n. 4, p. 811-820, 2000.

OSTROSKY-ZEICHNER, Luis; AL-OBAIDI, Mohanad. Invasive fungal infections in the intensive care unit. **Infectious Disease Clinics**, v. 31, n. 3, p. 475-487, 2017.

SCHÄGGER, Hermann. Tricine-sds-page. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

TUDESQ, Jean-Jacques et al. Invasive pulmonary aspergillosis in nonimmunocompromised hosts. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, 2019. p. 540-547.