

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DA GLUTATIONA REDUTASE DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* COM FOCO NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIFÚNGICOS

Maria Eduarda Gobara de Moura (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Vitoria Monteiro de
Araújo Vilela, Franciele Abigail Vilugron Rodrigues Vendramini, Karina
Mayumi Sakita, Isis Regina Grenier Capoci, Érika Seki Kioshima
(Orientador), e-mail: eskcotica@uem.br

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

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS III / Microbiologia - Micologia

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*, glutathione reductase, antifungos

Resumo:

A aspergilose invasiva (AI) é uma doença causada pelo fungo do gênero *Aspergillus spp*, sendo a espécie *A. fumigatus* o principal agente. O tratamento disponível para AI apresenta efeitos colaterais, toxicidade e o surgimento de cepas resistentes. Com o advento da biotecnologia, estudos com proteínas recombinantes têm se mostrado vantajosos para pesquisas de alvos para novos antifúngicos. A glutathione reductase (AfGLR) e glutathione reductase (AfGrx) são foco desta pesquisa, já que estas são responsáveis pela proteção das células do estresse oxidativo, e essenciais para a sobrevivência do fungo. O objetivo deste trabalho foi otimizar a expressão heteróloga da glutathione reductase e glutathione reductase de *A. fumigatus* com foco no desenvolvimento de novos antifúngicos. A expressão heteróloga dessas proteínas foi otimizada sendo as melhores condições para a AfGLR (52kDa) meio TB a 30°C por 6h e para AfGrx (12kDa), meio LB a 30°C *Overnight*. Desta forma, essas proteínas agora poderão seguir para os ensaios enzimáticos e validação de novas moléculas selecionadas como candidatas a antifúngicos contra AI.

Introdução

Aspergillus fumigatus é o principal agente da aspergilose invasiva (AI), doença cuja manifestações clínicas comumente atingem o pulmão, contudo também são capazes de afetar outros órgãos (JENKS; HOENIGL, 2018). *A. fumigatus* ocupa o segundo lugar entre os agentes infecciosos fúngicos mais prevalentes no Brasil (BACHUR; NEPOMUCENO, 2021). Os antifúngicos disponíveis para tratamento são restritos, podem causar efeitos adversos, alta toxicidade, além de cepas resistentes (LATGÉ, 1999). Com o avanço da biotecnologia e sequenciamento genômico dos fungos, uma

alternativa é a pesquisa de alvos terapêuticos. Dentre eles, a glutatona redutase (GLR), uma enzima integrante do sistema com glutarredoxina (Grx), juntamente com glutatona (GSH) e NADPH. Esse sistema desempenha o papel de antioxidante de tiol das células, auxilia na proteção do estresse oxidativo, neutralizando as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são produzidas durante o metabolismo das células fúngicas (HERRERO et al., 2006). Estudos já indicaram a correlação entre o desequilíbrio no sistema glutatona com defeitos no crescimento fúngico (SATO et al., 2009). Sendo assim, as proteínas poderiam ser alvos na seleção de novas moléculas que futuramente poderiam atuar como novos antifúngicos para tratamento da AI.

Materiais e métodos

Análise de bioinformática

O software ProtParam ExPASy® foi utilizado para análise do peso molecular das proteínas de *A. fumigatus*: AfGLR (Glutathione reductase) e AfGrx (Glutarredoxina).

Padronização das condições de expressão das proteínas recombinantes

A *Escherichia coli* BL21(DE3) foi transformada com o plasmídeo contendo os genes AfGLR e AfGrx inserido no plasmídeo pET21a, independentes. Após a transformação, dois clones de cada foram selecionados. A expressão das proteínas foi induzida por IPTG (1mM), e diferentes condições de expressão foram analisadas: temperaturas (30°C e 37°C), meios de cultura LB, Terrific Broth (TB) e 4YT, e tempos de indução (0h, 1h, 2h, 4h, 6h e Overnight). O pellet foi coletado por centrifugação e suspenso em tampão de amostra para SDS-PAGE (2X). A indução em larga escala foi realizada em 120mL do meio de cultura escolhido. Após, as amostras passaram pelo processo de sonicação em banho de gelo. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade. As amostras foram analisadas em gel de SDS-PAGE 12% (AfGLR) ou de tricina-SDS-PAGE-Herrmann Schagger (AfGrx). A confirmação da expressão das proteínas recombinantes foi feita por *Western Blotting*.

Resultados e Discussão

As predições físico-químicas do ProtParam ExPASy®, revelaram o peso molecular estimado das proteínas que foram usados para comparação na eletroforese: AfGLR (52kDa) e AfGrx (12kDa). De acordo com os resultados do SDS-PAGE foram selecionados para prosseguir um clone para cada proteína, sendo o clone 1 para AfGLR e clone 2 para AfGrx (dados não mostrados). Dentre as condições avaliadas para produção das proteínas recombinantes, os resultados verificados nas bandas expressas em eletroforese em gel, mostraram que para AfGLR as condições ideais de

expressão foram em meio TB, a 30°C por 6h, e para AfGrx em meio LB 30°C em Overnight. (Figura 1 e Figura 2). Também, foi verificada a solubilidade das proteínas, e comprovamos sua presença no sobrenadante, o que concordou com Sato et al. (2009). Definidas as condições, as proteínas passaram pela etapa de purificação. Para lavagens foi utilizado o tampão de wash com 80mM de Imidazol, e para eluições o tampão de eluição com 250mM de Imidazol (Figura 3), obtendo as proteínas mais puras nas eluições 2 e 3 para AfGLR e AfGrx. Para confirmar a expressão da proteína recombinante, o *Western blotting* foi realizado com anticorpo Anti-His. As amostras testadas nesse método foram cultivadas em meio TB a 37°C, e como podemos observar na Figura 4, as proteínas AfGLR e AfGrx foram expressas significativamente.

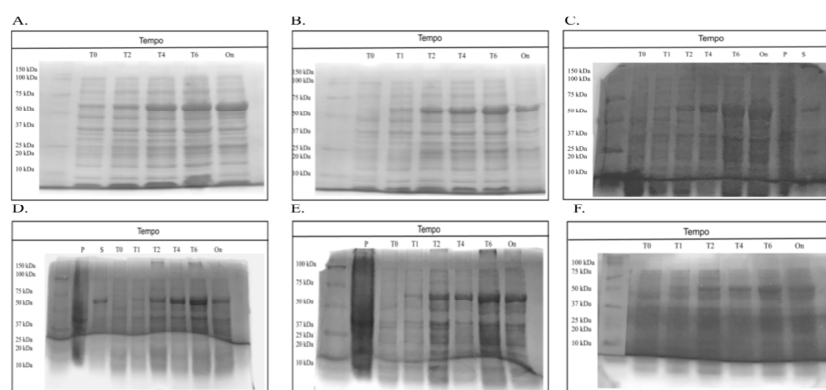


Figura 1: Seleção das melhores condições para indução da proteína AfGLR: Tempos de indução: T0; T2 (2h); T4 (4h); T6 (6h) e On (*overnight*). Pellet (P); Sobrenadante (S). A: AfGLR em meio TB 30°C; B: AfGLR em meio LB 30°C; C: AfGLR em meio 4YT 30°C. D: AfGLR em meio TB 37°C; E: AfGLR em meio LB 37°C; F: AfGLR em meio 4YT 37°C.

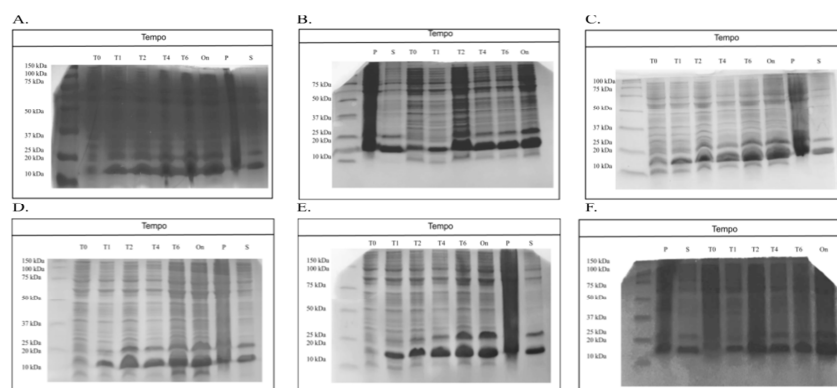


Figura 2: Seleção dos meios de cultura, tempos e temperatura de indução para proteína AfGrx: Tempos de indução: T0; T2 (2h); T4 (4h); T6 (6h) e On (*overnight*). Pellet (P); Sobrenadante (S). A: AfGrx em meio TB 30°C; B: AfGrx em meio LB 30°C; C: AfGrx em meio 4YT 30°C. D: AfGrx em meio TB 37°C; E: AfGrx em meio LB 37°C; F: AfGrx em meio 4YT 37°C.

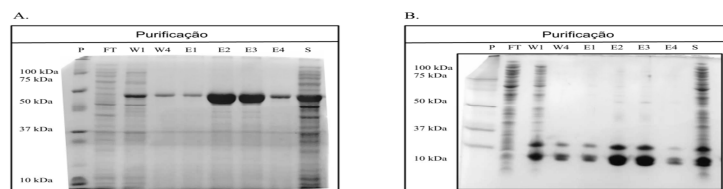


Figura 3: Purificação das proteínas AfGLR e AfGrx. FT (*flow-trough*); W1 e W4 (*wash*); E1 a E4 (eluições 1, 2, 3 e 4); S (sobrenadante). A: AfGLR em meio TB a 37°C; B: AfGrx em meio TB a 37°C

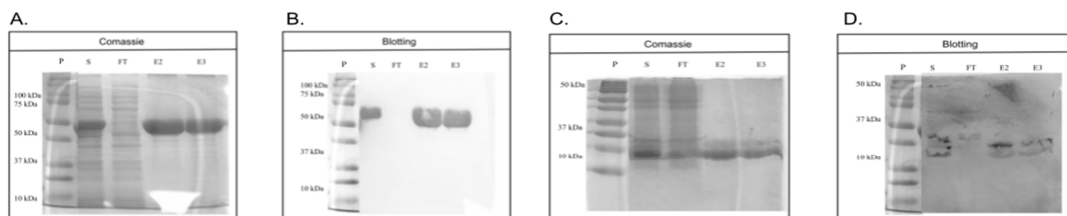


Figura 4: Western Blotting. S(sobrenadante); FT (flow-trough); E2 (eluição 2); E3 (eluição 3); P (padrão). A: Gel de AfGLR corado com Comassie; B: *Western Blotting* de AfGLR; C: Gel de AfGrx corado com Comassie; D: *Western Blotting* de AfGrx.

Conclusões

A expressão heteróloga das proteínas recombinantes glutathione redutase e glutaredoxina foram otimizadas e poderão auxiliar nos avanços do desenvolvimento de novos antifúngicos para tratar AI.

Agradecimentos

CNPQ, Capes e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

Referências

1. BACHUR T.; Nepomuceno D. **Doenças infecciosas e parasitárias no contexto brasileiro**. v.2. Campina Grande: Ampla, 2021.
2. HERRERO, E. et al. Glutaredoxins in fungi. **Photosynth Res**, v.89, p.127–140, Ago, 2006.
3. JENKS, J.; HOENIGL, M. Treatment of Aspergillosis. **Journal of Fungi**, n.4(3) 98, Ago, 2018.
4. LATGÉ JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*, v.12, p.310-350, Abr, 1999.
5. SATO I. et al. The Glutathione System of *Aspergillus nidulans* Involves a Fungus-specific Glutathione S-Transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, p.8042-8053, Mar, 2009.