

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA TIORREDOXINA COM FOCO NA RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL

Maria Eduarda Iori Santos, Caroline Franco Domingues da Silva, Jéssica Cristina Zoratto Romoli, Karina Mayumi Sakita, Isis Regina Grenier Capoci, Érika Seki Kioshima. E-mail: eskcotica@uem.br

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

Microbiologia, Biologia e Fisiologia dos Microorganismos/Micologia

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose; tiorredoxina; cristalização

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides spp.*, cujo tratamento farmacológico atual apresenta limitações. Nesse cenário, a enzima tiorredoxina redutase (TRR1) surge como um alvo promissor para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas. Estudos in silico identificaram o composto LMM6 como potencial inibidor da TRR1, demonstrando atividade fungicida e características favoráveis de segurança e eficácia. Contudo, ainda não está totalmente elucidado o modo de interação entre LMM6 e a TRR1. Assim, o presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições de purificação das proteínas do sistema tiorredoxina (TRR1 e tiorredoxina) de *Paracoccidioides lutzii*. Os resultados mostraram que ambas as proteínas foram expressas em quantidade significativa, com predominância na fração solúvel. A purificação por cromatografia de afinidade demonstrou maior eficiência utilizando imidazol a 80 mM, condição que resultou em proteínas com maior pureza. As condições de expressão e purificação foram padronizadas estabelecendo um protocolo reprodutível que permite a obtenção de amostras adequadas para ensaios de cristalização. Esses achados representam um avanço fundamental para a determinação da estrutura tridimensional da Trx e TRR1 e sua interação com o composto LMM6, contribuindo para o desenvolvimento racional de novos antifúngicos seletivos e eficazes contra a PCM.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, causada por fungos do gênero *Paracoccidioides spp.*, com alta prevalência no Brasil. Apesar da disponibilidade de terapias antifúngicas, o tratamento da PCM ainda apresenta limitações importantes, incluindo nefrotoxicidade, uso prolongado e baixa eficácia no controle das sequelas pulmonares (Kioshima et al. 2021). A carência de opções terapêuticas reforça a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, especialmente diante do reconhecimento da PCM como Doença Tropical Negligenciada (WHO, 2020). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi

otimizar as condições de purificação das proteínas do sistema tiorredoxina de *P. lutzii* para a posterior determinação da estrutura tridimensional e o planejamento de novos antifúngicos potentes e seletivos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Expressão e purificação por afinidade da proteína recombinante tiorredoxina redutase e tiorredoxina de *Paracoccidioides lutzii*

Para a expressão da proteína recombinante TRR1 e Trx foi selecionada a cepa de *E. coli* BL21 DE3. A indução da expressão iniciou-se com a adição de 1mM de IPTG a 25°C e teve duração de 6 horas. Para a extração das proteínas, o pellet foi lisado por sonicação em tampão de lise (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; imidazol 10 mM). A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade (HisTrap de alto desempenho - Cytiva). Para a etapa de lavagem, duas concentrações diferentes de imidazol foram testadas (50 mM e 80 mM). Posteriormente, a eluição foi realizada em cinco frações de 1 mL com tampão de eluição (NaH_2PO_4 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; imidazol 250 mM). A pureza da proteína foi verificada por gel de Tricina SDS. A proteína foi dialisada e concentrada utilizando filtros Amicon Ultra 30 kDa (TRR1) e 3 kDa (Trx). Para determinar a concentração da proteína, a absorbância da proteína foi medida a 280 nM (Trx) e a 450 nM (TRR1) e aplicada a lei de Beer-Lambert.

2. Gel filtração por cromatografia por exclusão de tamanho

As frações eluídas obtidas na purificação por afinidade ao níquel foram concentradas e submetidas a cromatografia por exclusão de tamanho (SEC, sigla em inglês) no aparelho ÄKTA Purifier (GE Healthcare) acoplado a coluna HiloLoad 16/600 Superdex 200, pré-equilibrada com tampão para SEC (25 mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH7.4). As principais frações de picos foram coletadas e concentradas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, podemos observar que boa parte da proteína encontra-se na fração solúvel (sobrenadante), e por isso, utilizamos essa fração para realizar as etapas de purificação subsequentes. A presença de proteínas na fração solúvel representa um ótimo indicativo do correto dobramento e, consequente atividade biológica, já que a presença em corpos de inclusão dificulta a expressão de genes heterólogos, devido a conformação não natural assumida pelo arranjo proteico (GRABARZ, 2021).

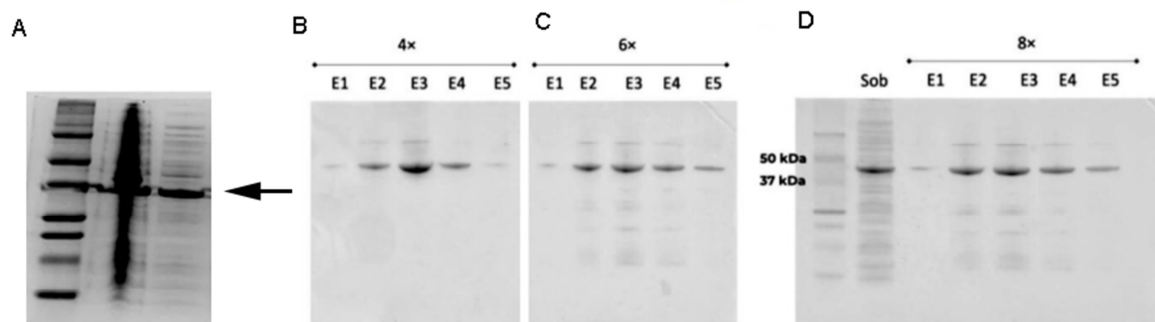


Figura 1 - Análise da TRR1 em gel de poliacrilamida. (A) com frações pellet (P) e sobrenadante (S) após lise. (B) purificação por afinidade em níquel da proteína recombinante TRR1 PI contendo as 5 eluições do lisado bacteriano (E1, E2, E3, E4 e E5) após 4 lavagens com tampão Wash a 80 mM, (C) 6 lavagens com tampão Wash a 50 mM e, (D) 8 lavagens com concentração de 50 mM de imidazol (Figura 2 C).

Para TRR1, foram testadas diferentes condições de lavagens com imidazol: (Fig 1B) quatro frações de tampão com 80mM de imidazol, (Fig 1C) seis e (Fig 1D) oito frações de tampão com 50mM de imidazol. Os resultados demonstraram maior eficiência na condição de 80 mM, no qual as bandas com o peso molecular da TRR1 apresentam-se de forma mais isolada e com menor presença de proteínas contaminantes <37 kDa.

A proteína Trx PI também foi encontrada na fração solúvel. Apesar de uma menor quantidade ser obtida na indução, a TrxPI apresentou-se com maior pureza após a eluição com 80 mM de imidazol. (Figura 2A). Uma menor concentração de imidazol (50 mM) com 6 etapas de lavagem, não apresentou a mesma eficiência para eliminar proteínas >15 kDa (Figura 2B).

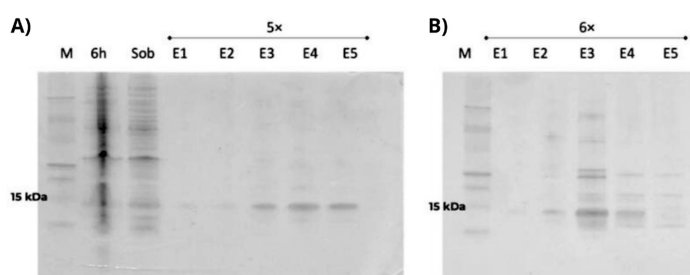


Figura 2 - Gel de poliacrilamida da purificação por afinidade em níquel da proteína recombinante Trx PI, contendo marcador (M), indução bacteriana no tempo 6 horas (6h), sobrenadante obtido após a indução bacteriana (Sob) e eluições (E1, E2, E3, E4 e E5) após 5 lavagens a 80 mM de imidazol (3A) e 6 lavagens a 50 mM (3B)

A fim de se obter uma proteína com maior grau de pureza, e entender seu estado de agregação, uma etapa adicional de gel filtração foi realizada (Figura 3). Como podemos observar, dois picos principais foram observados para TRR1. Já para Trx PI (Figura 3B), apenas um pico foi observado indicando a presença de apenas um estado oligomérico da Trx. Análises posteriores de espalhamento de luz multiangular

poderão confirmar o estado de agregação da TRR e Trx, mas sabe-se que a unidade funcional de proteínas homólogas TRR de baixo peso molecular se encontram em estado dimérico, podendo então o primeiro pico (de menor intensidade) corresponder a formação de um agregado maior enquanto que a Trx encontra-se normalmente na forma de monômeros em solução, confirmado pela presença de um pico único (Marshall et al., 2019). Os géis de poliácridamida (Figura 4C e 4D) são referentes às frações dos picos mais representativos e mostram frações de TRR e Trx mais concentradas e puras.

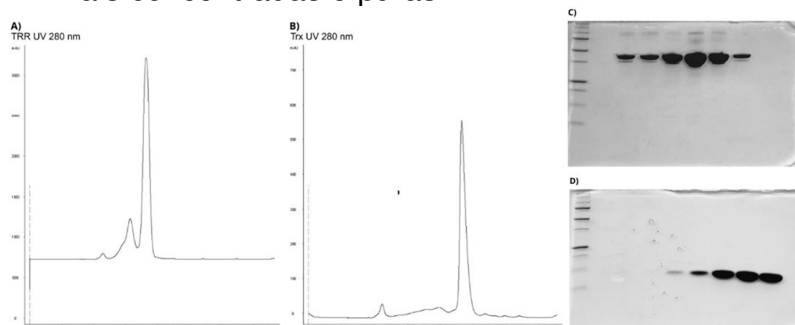


Figura 3. Espectro de absorção UV 280 nm e géis de poliácridamida das proteínas TRR PI (A e C) e Trx PI (B e D) durante a cromatografia por exclusão de tamanho.

Os resultados obtidos permitiram a padronização das condições de expressão e purificação das proteínas do sistema tiorredoxina de *P. lutzii*. A utilização de imidazol a 80 mM em quatro frações mostrou-se mais eficiente para a obtenção de proteínas recombinantes com maior pureza, possibilitando a redução de contaminantes e a recuperação em quantidade satisfatória. As amostras obtidas durante a gel filtração foram enviadas para o Centro Nacional de Pesquisa em Energias e Materiais, Campinas, SP, onde passarão pelas etapas subsequentes para cristalização. Esses achados representam um avanço importante para cristalização, fundamental para a determinação da estrutura tridimensional do sistema tiorredoxina em presença do inibidor LMM6. Dessa forma, o presente estudo contribui para o desenvolvimento de estratégias racionais no planejamento de novos antifúngicos seletivos e eficazes contra a PCM.

REFERÊNCIAS

Faria DR, et al. *Fungicidal Activity of a Safe 1,3,4-Oxadiazole Derivative Against Candida albicans*. Pathogens. 2021; 10(3):314.

GRABARZ, F. Produção de interferon-alfa consenso recombinante em *S. cerevisiae*: avaliação de estratégias para obtenção da proteína solúvel. 30 jul. 2021.

Kioshima, ES et al. One Century of Study: What We Learned about *Paracoccidioides* and How This Pathogen Contributed to Advances in Antifungal Therapy. J. Fungi 2021, 7, 106.

WHO, 2020¹. First meeting of the WHO Antifungal Expert Group on Identifying Priority Fungal Pathogens: Meeting report. Geneva.

Marshall AC, Kidd SE, Lamont-Friedrich SJ, Arentz G, Hoffmann P, Coad BR and Bruning JB (2019) Structure, Mechanism, and Inhibition of *Aspergillus fumigatus* Thioredoxin Reductase. Antimicrob Agents Chemother 63, e02281-18.