XXXII Encontro Anual de Iniciação Científica
IX Encontro Anual de Iniciação Científica Jr.
EAIC 2023

PURIFICAÇÃO E CRISTALIZAÇÃO DA ENZIMA LEUCIL-tRNA SINTETASE DE *Trypanosoma cruzi*

Bruna Ukrainski (PROVIC), Jorge Iulek (Orientador), iulek@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química

Química, Físico-Química.

Palavras-Chave: Proteínas, *Trypanosoma cruzi*, Leucil-tRNA sintetase.

Resumo

A Doença de Chagas, causada pelo agente etiológico *Trypanosoma cruzi*, é uma das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) que vêm sendo alvo de estudos para medicamentos anti-infectivos. Um destes alvos são as aminoacil-tRNA sintetases (aaRS), que desempenham papel fundamental na síntese de proteínas, sendo a proteína trabalhada, a leucil-tRNA sintetase (*Tc*LeuRS), que corresponde ao aminoácido alifático leucina. Desse modo, a fim de se obter informações estruturais acerca da *Tc*LeuRS, foram realizados ensaios de expressão e purificação, para que, assim, posteriormente possam ser realizados os ensaios de cristalização.

Introdução

Causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, a Doença de Chagas é uma das doenças que mais assola a América Latina, onde a mesma é endêmica[1]. Uma das etapas principais da manutenção da vida dos seres vivos é a síntese de proteínas, de modo que durante o processo, várias enzimas são cruciais para a fidelidade desse processo. As enzimas aaRS desempenham papéis críticos na síntese de proteínas, catalisando a ligação de aminoácidos específicos aos seus tRNAs cognatos. No caso da presente proteína, a enzima estudada é a *Tc*LeuRS, membro da classe das aaRS I, caracterizada pelo aminoácido ativado ser transferido para o grupo 2'-OH de um tRNA cognato que aceita a leucina, sendo que posteriormente a essa transferência o 2'-O-aminoacil-tRNA acabará por migrar para a posição 3'[2].

Materiais e Métodos

Células eletrocompetentes de *Escherichia coli* da cepa Rosetta BL21(DE3)pLysS foram transformadas por eletroporação com o vetor plasmidial, que porta o gene da enzima *Tc*LeuRS. A superexpressão da *Tc*LeuRS foi realizada através do emprego do meio de autoindução, ZYP-5052, cujo indutor é lactose, durante 16 h a 37 °C. Os meios foram centrifugados a 4 °C e 5000 rpm por 15 minutos. O pellet de células foi ressuspenso em tampão de lise (HEPES 20 mmol L^{-1} , NaCl 500 mmol L^{-1} e glicerol 5%, pH 7,5) e lisadas por ultrassom. Após isso, o lisado total foi centrifugado, a fração solúvel foi tomada para purificação cromatográfica por afinidade a íons Ni^{2+} em colunas previamente equilibradas com tampão de lise em pH 7,5. A eluição foi realizada em tampão de lise acrescido de concentração variável até 500 mM de imidazol. As frações eluídas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Confirmada a expressão da *Tc*LeuRS, as frações que a continham foram unidas e concentradas por ultrafiltração.

Resultados e Discussão

Os testes de expressão da *Tc*LeuRS evidenciaram que ela foi expressa solúvel a 37 °C. O cromatograma de afinidade obtido (Figura 1) apresentou dois picos de possíveis contaminantes na etapa de eluição com imidazol. A análise por eletroforese mostrou que a *Tc*LeuRS é eluída após esses dois picos.

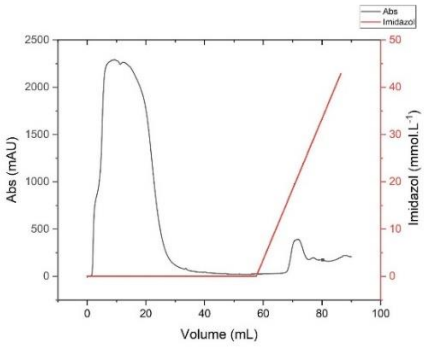


Figura 1. Cromatograma indicando os picos de acordo com absorção de UV (preto) e concentração do gradiente de imidazol (vermelho).

Conclusão ou Conclusões

A *Tc*LeuRS foi expressa solúvel no cultivo a 37 °C. Na purificação, foi eluida com uma baixa pureza e concentração. Devido à isso, pretende-se ampliar a busca de condições em que a *Tc*LeuRS possa ser produzida mais pura, a fim de se partir para a geração de cristais. Desse modo, mais ensaios de purificação serão realizados, para o objetivo final de determinação de sua estrutura 3D.

Agradecimentos

UEPG, C-LABMU.

[1] CARVALHO, T. Organização estrutural. Doença de Chagas, **Fiocruz**, 2017.

[2] RAJENDRAN, V. et *al.* Aminoacyl-tRNA synthetases: Structure, function, and drug discovery. **International Journal of Biological Macromolecules,** v. 111, p. 400–414, 2018.