EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Babesia bovis*.

Emelly Borkowski Galvão[1] (PIBIC,CNPq), Bruna Ukrainski[2], Jorge Iulek[2], Christiane Philippini Ferreira Borges[2] (Orientador), email: cpfborges@uepg.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Farmácia[1]
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química[2]

Química, Físico-Química.

Palavras-Chave: *Proteínas, GAPDH, Babesiose bovina, cristalização.*

Resumo

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Babesia bovis* (BbGAPDH) foi obtida experimentalmente. O meio de expressão mais produtivo na fração solúvel foi o ZYP-5052. Na purificação, a BbGAPDH foi eluída entre 260 e 310 mmol L^{-1} de imidazol. Para os ensaios de cristalização, a proteína foi concentrada a até 20 mg mL^{-1}, apresentando formação mais significativa de cristais a 10 °C. Os cristais obtidos em diferentes condições foram submetidos à difração por raios X.

Introdução

Babesia bovis é um protozoário unicelular apicomplexo que causa uma infecção aguda que muitas vezes é fatal no bovino adulto, instalando-se em capilares de órgãos centrais (Brown *et al.*, 2006). A GAPDH, que catalisa a sexta etapa da glicólise, convertendo gliceraldeído-3-fosfato em ácido 1,3-bifosfoglicérico na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico, é uma das enzimas que garantem funcionamento metabólico do protozoário, cogitada como alvo antiparasitário (Tristan *et al.*, 2011, p. 317-323).

Materiais e Métodos

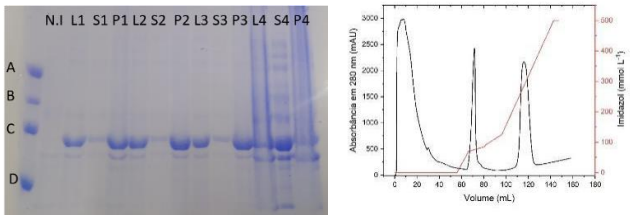
Células quimiocompetentes da *Escherichia coli* da cepa Rosetta BL21(DE3)pLysS foram transformadas por choque térmico. A expressão foi realizada através do emprego do meio de autoindução ZYP-5052. Os meios foram centrifugados, o pellet de células foi ressuspenso em tampão (HEPES 20 mmol L^{-1} pH 7,5, NaCl 500 mmol L^{-1}, glicerol 5%), lisado por sonicação e centrifugado. A fração solúvel foi tomada para purificação cromatográfica por afinidade a íons Ni^{2+}. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 10% e posteriormente concentradas em valores de até 20 mg mL^{-1}, onde a quantificação proteica foi feita pelo teste de Bradford. Para os ensaios de cristalização foram utilizados kits comerciais, onde o poço foi preenchido com 500 µL de agente precipitante e a proporção do agente precipitante em relação à proteína variou entre 1:1, 1:2 e 2:1. Os ensaios de cristalização foram conduzidos a 10 e 18 °C. Os cristais obtidos foram submetidos à técnica de difração por raios X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Resultados e Discussão

Os testes de expressão da BbGAPDH (Figura 1A) evidenciaram que o meio autoindutor ZYP-5052 foi o que produziu maior quantidade de proteína na fração solúvel. O cromatograma (Figura 1B) indicou que a BbGAPDH foi eluída entre 260 e 310 mmol L^{-1} de imidazol. As frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE 10%. Os ensaios de cristalização foram conduzidos a 10 e 18 °C, onde a temperatura de 10 °C se mostrou mais favorável quanto ao surgimento de cristais. Os cristais obtidos que resistiram à viagem foram difratados por raios X no LNLS, onde constatou-se que eram de sal. Demais cristais obtidos passaram da forma cristalina para amórfica durante a viagem, o que faz se acreditar que estes sejam de proteínas.

Figura 1. (A) SDS-PAGE 10% das condições de expressão; (B) Cromatograma por afinidade a íons Ni^{2+}.

(A) (B)



Conclusão ou Conclusões

A BbGAPDH foi expressa e purificada de maneira satisfatória. Sobre sua cristalização, deve-se agora realizar no próprio Síncrotron para que os prováveis cristais de proteína tenham integridade no momento da difração.

Agradecimentos

A CAPES, UEPG, CNPq, Fundação Araucária e C-LABMU.

Referências

BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D.P; L.GOFF, W.L. A Functional and Biochemical Approach. 1. ed. **Springer**, 2018.Immune control of Babesia bovis infection.**Veterinary Parasitolog**y, v.138, p. 75 -87, 2006.

TRISTAN, C.; SHAHANI, N.; SEDLAK,T.W.; SAWA, A. The diverse functions of GAPDH:views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling,** v. 23, p.317-323, 2011.