

Caracterização funcional e estrutural de proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* envolvidas no metabolismo de enxofre

Supervisoras: Dra. Andrea Balan e Dra. Melissa Fessel (Laboratório Nacional de Biociências/CNPEM)

Resumo

Mycobacterium tuberculosis é a bactéria patogênica causadora da tuberculose, doença que causa 2 milhões de mortes ao ano, infecta cerca de 1/3 da população mundial e apresenta tratamento demorado, com severos efeitos colaterais e baseado em um coquetel de drogas que têm levado ao desenvolvimento de linhagens multiresistentes. Na fase persistente da doença, *M. tuberculosis* sobrevive em fagossomos de macrófagos, onde a bactéria é exposta condições oxidantes e intermediários de nitrogênio como resposta celular à invasão pelo patógeno, o que leva a oxidação e S-nitrosilação de resíduos de cisteína.

Embora ainda não se conheça em detalhes quais são os genes do patógeno que ativam efetores do sistema imune para a indução da formação do granuloma, é sabido que os genes envolvidos no metabolismo do enxofre estão envolvidos na resposta a estresse oxidativo, escassez de nutrientes, adaptação à dormência (situações presentes no granuloma) e durante a fase de infecção no macrófago. O enxofre, encontrado em vários estados de oxidação, é importante para a virulência, resistência a antibióticos e defesa contra agentes oxidantes. Cisteína, por exemplo, além de ser empregada na síntese de proteínas, metionina e outros cofatores contendo enxofre, como a coenzima A, é utilizada para a produção do micotiol, composto essencial para a sobrevivência de MTB e funcionalmente equivalente à glutatona, associado à proteção de *M. tuberculosis* contra o estresse oxidativo e antibióticos.

Nesse contexto, nosso estudo foca a caracterização de proteínas do metabolismo de enxofre, via metabólica fundamental para a bactéria, cuja importância para infecção e patogênese tem sido demonstrada funcionalmente. Adicionalmente, sabe-se que os genes da via biossintética de cisteína são superregulados na fase persistente de *M. tuberculosis* e, portanto, as correspondentes enzimas são potenciais alvos para desenvolvimentos de novas drogas bactericidas.

O alvo principal deste projeto é a proteína CysK2, uma cisteína sintase ou O-acetil serina sulfidrilase dependente de piridoxal fosfato, que ainda não foi caracterizada em *M. tuberculosis*, e está potencialmente envolvida na síntese *de novo* de cisteína.

Objetivos: A proposta tem como objetivo central a caracterização funcional e estrutural da proteína CysK2. Para tanto, pretende-se a super expressão heteróloga do gene clonado em vetor de expressão, a purificação da respectiva proteína recombinante, e, com a proteína pura, sua caracterização bioquímica e estrutural (interação com ligantes/cofatores, avaliação de conteúdo de estrutura secundária e estado oligomérico, por exemplo, além de determinação de condições de cristalização) e estudos da atividade catalítica da enzima.

Metodologia: A indução da síntese de CysK2 será feita em *E. coli* BL21(DE3) com cauda de histidina na região N-terminal, o que permitirá a purificação da proteína por cromatografia de afinidade em resina niquelada. Cromatografias adicionais, como gel-filtração e troca iônica, poderão ser realizadas para a eliminação de contaminantes e estados conformacionais diferenciados. Otimização nas condições de expressão poderão ser necessárias, visando a obtenção de quantidade adequada de proteína recombinante na forma solúvel.

A caracterização inicial de CysK2 será feita empregando-se métodos espectroscópicos, tais como dicroísmo circular e fluorimetria, e calorimétricos, como calorimetria de titulação isotérmica (ITC), em equipamentos disponíveis no Laboratório de Espectrometria e Calorimetria do LNBio. Os estudos de atividade O-acetil serina sulfidrilásica de CysK2 serão realizados de acordo com metodologia estabelecida, que monitora por espectrofotometria a formação de cisteína, empregando o método da nihidrina-ácida. Amostras de CysK2 puras serão submetidas aos ensaios de cristalização usando diferentes condições e concentrações de proteína. Os testes iniciais de cristalização serão realizados no ROBOLAB, do LNBio, de forma automatizada. Após a obtenção de monocristais, estes serão refinados e testados na linha D03B-MX2 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).