

**Universidade de São Paulo  
Instituto de Física de São Carlos**

**Semana Integrada do Instituto de Física  
de São Carlos**

**13<sup>a</sup> edição**

**Livro de Resumos**

**São Carlos  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Informação do IFSC

Semana Integrada do Instituto de Física de São Carlos  
(13: 21-25 ago.: 2023: São Carlos, SP.)  
Livro de resumos da XIII Semana Integrada do Instituto de  
Física de São Carlos – Universidade de São Paulo / Organizado  
por Adonai Hilário da Silva [et al.]. São Carlos: IFSC, 2023.  
358p.

Texto em português.  
1.Física. I. Silva, Adonai Hilário da, org. II. Título.

ISSN: 2965-7679

**PG170**

## Caracterização de enzimas ThiL de bactérias gram-negativas

NASCIMENTO, Alessandro<sup>1</sup>; FARRO, Erick Giancarlo Suclupe<sup>1</sup>

esuclupef@ifsc.usp.br

<sup>1</sup>Instituto de Física de São Carlos - USP

Na atualidade a resistência aos antibióticos é um problema que forma parte de global e urgente. A estimativa pela OMS diz que, em 30 anos, um aproximado de 10 milhões de mortes anuais em decorrência direta de infecções causadas por organismos resistentes a antibióticos. O problema é agravado pelo número limitado de vias/alvos sobre os quais agem os antibióticos atualmente disponíveis. De acordo com Walsh e Wencevicz (1), os antibióticos atualmente existentes são restritos a apenas cinco alvos/vias de ação. Desta forma, somam-se (i) a difusão de cepas resistentes, (ii) o número decrescente de novos antibióticos ou de moléculas inovadoras, e (iii) o número reduzido de alvos sobre os quais os antibióticos agem. Recentemente, a enzima tiamina fosfato quinase (ThiL) foi validada como um novo alvo para o desenvolvimento de antibióticos contra *Pseudomonas aeruginosa*. (2) Enzima que faz parte da via de síntese de tiamina (vit-B1) presente em muitos microrganismos e em plantas, mas ausente em mamíferos. Recentemente foi avaliada a deleção da enzima ThiL que causa defeitos de crescimento em *P. aeruginosa* e reduz a virulência da bactéria. (3) Neste projeto, propomos um estudo da relação estrutura-função sobre a enzima ThiL em organismos importantes do ponto de vista clínico, dentre os quais *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Para esta finalidade os genes para as enzimas ThiL de *K. pneumoniae* (KpThiL) e *E. coli* (EcoThiL) foram sintetizados com otimização de códons para a expressão bacteriana e a metodologia empregada envolve a expressão e purificação por afinidade ao metal e por exclusão por tamanho. Experimentos iniciais de DSF (Differential Scanning Fluorimetry) serão realizados para mapear a interação das enzimas com os substratos visando experimentos de co-cristalização. Os primeiros resultados indicam que as proteínas de KpThiL e EcoThiL são bem expressas em *E. coli* Rosetta, e são purificadas na fração solúvel, com um rendimento médio de 12 e 9 mg/mL respectivamente. Os ensaios com o DSF variando pH e concentração de NaCl sugeriram uma estabilidade máxima em um pH 8.0 e em uma concentração de 700 mM de sal. A mesma técnica também revelou o aumento da estabilidade térmica na presença de Mg<sup>2+</sup> e ADP. Foram obtidos cristais de ThiL de Kp, obtendo um conjunto de dados de difração até 1,53 Å, já esta em fase de análises. Com este resultado inicial pode se iniciar testes de inhibição por docking molecular.

**Palavras-chave:** Estrutura-e-função-de-proteínas. Klepsiella-pneumoniae. ThiL.

**Agência de fomento:** FAPESP (2022/04298-3)

**Referências:**

1 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.** Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services - CDC, 2019. DOI: 10.15620/cdc:82532.

2 WALSH, C.T.; WENCEWICZ, T.A. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. **Journal of Antibiotics**, v. 67, p. 7-22, 2014. DOI: 10.1038/ja.2013.49.

3 KIM, H. J. et al. The ThiL enzyme is a valid antibacterial target essential for both thiamine biosynthesis and salvage pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 29, p. 10081-10091, 2020. DOI: 10.1074/jbc.ra120.013295.