

Estudos Bioquímicos e Estruturais da Enzima Heme Oxigenase de *Plasmodium falciparum*: Novo Alvo Molecular para o Desenvolvimento de Fármacos Antimaláricos

Fernando V. Maluf*¹ (PG), Célia R. S. Garcia² (PQ), Glaucius Oliva¹ (PQ), Rafael V. C. Guido¹ (PQ)

*fernandovmaluf@ursa.ifsc.usp.br

¹Centro de Biotecnologia Molecular Estrutura – CBME, Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC, Instituto de Física de São Carlos, IFSC – USP; ²Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, IB – USP

Palavras Chave: malária, heme oxigenase, cristalização

Introdução

A malária é uma doença infecciosa responsável pela morte de aproximadamente 2 milhões de indivíduos a cada ano [1]. O *Plasmodium falciparum* é o agente etiológico da forma mais severa desta parasitose, sendo o problema agravado pelo surgimento de casos de resistência aos fármacos disponíveis para o controle e tratamento. Neste cenário, torna-se de extrema importância a seleção de novos alvos moleculares e o planejamento de agentes quimioterápicos inovadores contra a malária [2]. Recentemente, foi demonstrado que o *P. falciparum* possui um gene que codifica a enzima heme oxigenase (PfHO) [3]. A presença dessa enzima no parasita sugere um mecanismo alternativo de detoxicação celular, representando um alvo molecular atrativo para o desenvolvimento de fármacos antimaláricos. Estudos integrados de biologia estrutural e química medicinal encontram-se em andamento em nosso grupo para elucidação da estrutura 3D da PfHO, permitindo a identificação dos elementos estruturais responsáveis pelo processo de reconhecimento molecular e seletividade.

Resultados e Discussão

Um sistema de expressão em *Escherichia coli* BL21(DE3) foi construído e otimizado para produção de PfHO. O sistema, obtido a partir de uma construção gênica truncada no qual foi excluído o domínio de membrana, forneceu quantidades satisfatórias de proteína na fração solúvel (40 mg/L). Em seguida, foi desenvolvido um protocolo de purificação robusto e reprodutivo que incluiu cromatografias de afinidade (Ni-NTA, Qiagen) e gel filtração (Superdex 200 10/300 GL, GE Health Science) (Fig. 1A). A análise do gel de eletroforese em acrilamida da fração isolada confirmou a eficiência do método cromatográfico e a alta pureza da enzima (Fig. 1B).

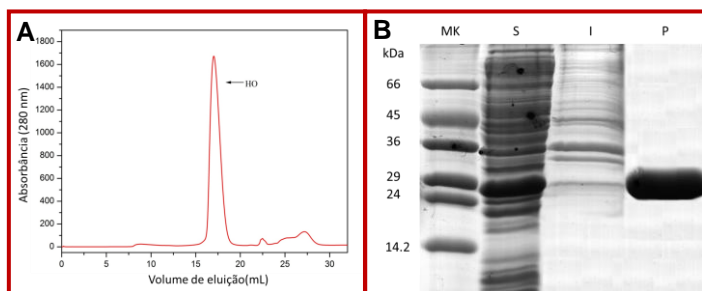


Figura 1. (A) Cromatograma da Gel Filtração (Superdex 200 10/300 GL). Heme oxigenase (HO) pura foi obtida a partir do pico assinalado. (B) SDS-PAGE (10% acrilamida): MK - Marcador de Peso Molecular; S - Fração Solúvel; I - Fração Insolúvel; P - Proteína pura após as etapas de purificação.

Estudos preliminares de cristalização foram realizados com a fração de alta pureza de PfHO na concentração de 4,5 mg/mL. Ensaios robotizados foram empregados para avaliação de, aproximadamente, 3.000 condições de cristalização (Qiagen) utilizando-se a técnica de gota

assentada (do inglês, *sitting-drop*). Esse estudo identificou 12 condições promissoras para a cristalização da PfHO. A otimização das condições iniciais incluiu a alteração do pH, temperatura, concentração da enzima e dos agentes precipitantes. Cristais com propriedades adequadas (e.g., tamanho e qualidade) para estudos iniciais de difração de raios-X foram obtidos em solução 0,1 M Hepes pH 7,4, 12% (m/v) PEG 8.000, 0,2 M acetato de magnésio e 3,5 mg/mL de PfHO 18 °C (Fig. 2A). Os dados de difração de raios-X foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas-SP) e no *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble-França). O padrão de difração obtido estende-se até 2,7 Å de resolução e indica ordem interna adequada (Fig. 2B). Novos experimentos de cristalização encontram-se em andamento com o objetivo de aumentar o tamanho médio dos cristais e obter dados a mais alta resolução. Esses dados serão úteis para identificação inequívoca dos elementos estruturais que auxiliarão na descoberta e desenvolvimento de novos inibidores seletivos da PfHO.

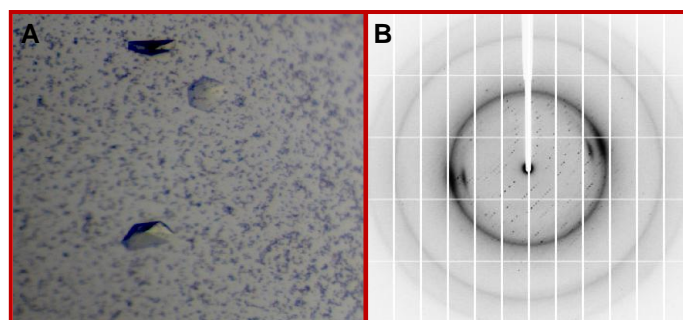


Figura 2. (A) Cristais de PfHO otimizados. (B) Padrão de difração representativo dos cristais de PfHO coletados no ESRF.

Conclusões

A produção em quantidade elevada e pura de proteína é fundamental para os trabalhos de determinação estrutural de novos alvos moleculares. Nesse trabalho, o desenvolvimento de um sistema de expressão robusto associado a um protocolo eficiente e reprodutivo de purificação permitiu a obtenção de cristais de PfHO com qualidade satisfatória que difrataram a 2,7 Å de resolução. Novos experimentos encontram-se em andamento para melhorar a qualidade dos cristais. Os dados estruturais da PfHO integrados com as técnicas modernas em química medicinal permitirão a identificação e planejamento de novos candidatos a agentes antimaláricos.

Agradecimentos

CNPq, CAPES, FAPESP, ESRF, LNLS

1. Snow R.W., et al. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **2005**, *434*, 214-271.
2. Guido R.V.C, Oliva G. Structure-based drug discovery for tropical diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 824-843.
3. Sartorello R., et al. In vivo uptake of a heme-analogue Zn-Protoporphyrin IX by the human malaria parasite *P. falciparum*-infected red blood cells. *Cell Biol. Int.* **2010**, *34*, 859-865.