

# Heme Oxigenase de *Plasmodium falciparum*: Construções Gênicas para Estudos de Biologia Estrutural e Química Medicinal

Fernando V. Maluf<sup>\*1</sup> (PG), Célia R. S. Garcia<sup>2</sup> (PQ), Glaucius Oliva<sup>1</sup> (PQ), Rafael V. C. Guido<sup>1</sup> (PQ)

<sup>\*</sup>fernandovmaluf@ursa.ifsc.usp.br

<sup>1</sup>Laboratório de Química Medicinal e Computacional – LQMC, Instituto de Física de São Carlos, IFSC – USP;

<sup>2</sup>Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, IB – USP

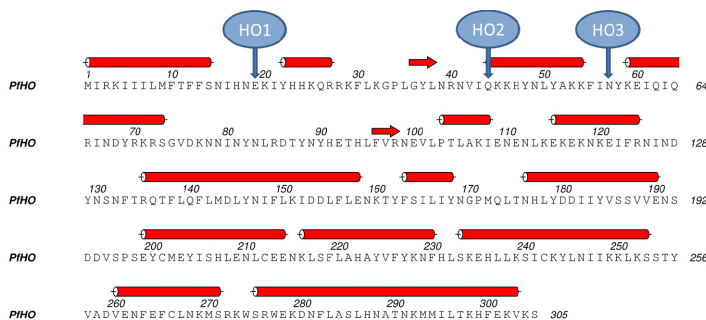
Palavras Chave: heme oxigenase, malária, proteína recombinante

## 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. Construções gênicas da proteína alvo do estudo em sua forma nativa e truncada, através de técnicas de biologia molecular, aumentam significativamente as chances de sucesso na produção e purificação de proteína recombinante adequada para os estudos de biologia estrutural. A obtenção de PfHO solúvel e pura permitirá o avanço nas etapas de elucidação da estrutura 3D permitindo a identificação dos elementos estruturais responsáveis pelo processo de reconhecimento molecular e seletividade desta enzima.

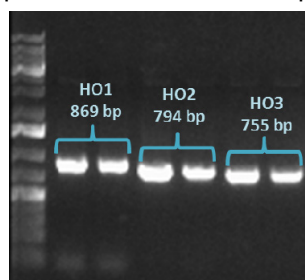
## Resultados e Discussão

A análise detalhada da estrutura primária da heme oxigenase de *P. falciparum* revelou a presença de um peptídeo sinal e um possível peptídeo de trânsito de endereçamento para o apicoplasto. O tamanho exato deste peptídeo de trânsito não pode ser precisamente predito, assim propôs-se três construções considerando a distribuição da estrutura secundária, predita através dos servidores PsiPred e JPred, para início da expressão da proteína recombinante truncada (Figura 1).



**Figura 1.** Distribuição consensual da estrutura secundária predita para a heme oxigenase de *P. falciparum*. Em destaque, o resíduo de aminoácido escolhido para início da expressão da proteína recombinante truncada para as construções nomeadas HO1, HO2 e HO3.

Oligonucleotídeos para amplificação das construções gênicas propostas foram sintetizados e amplificados através da reação da polimerase em cadeia, do cDNA de *P. falciparum* (3D7). Fragmentos amplificados (Figura 2) foram ligados em vetor de subclonagem pGEM-T (Promega). Os fragmentos de interesse obtidos após a digestão com as endonucleases (BamHI e XhoI) foram então religados nos vetores de expressão pSMT3 e pGex-4T1, contendo as proteínas de fusão, na região N-terminal, SUMO e GST respectivamente. As construções foram confirmadas através de sequenciamento e os plasmídeos construídos utilizados para transformação de cepas de expressão Rosetta (DE3). As construções SUMO-HO1, SUMO-HO2, SUMO-HO3 apresentaram, em condições



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 1% para as 3 construções propostas.

padrões de expressão e purificação, solubilidade limitada. Os testes de extração da proteína da fração insolúvel identificaram como um potente carreador da proteína para fração solúvel o agente detergente sarkosyl, na concentração ideal de 0.3%. As construções fusionadas a proteína GST estão em avaliação e otimização das condições de expressão ideais para obtenção da proteína solúvel.

## Conclusões

A análise da estrutura primária da proteína alvo do estudo permitiu o planejamento de construções que maximizam as chances de obtenção da proteína em sua forma solúvel, essencial para os estudos de biologia estrutural e química medicinal. As três construções propostas (HO1, HO2, HO3) foram clonadas e fusionadas com sucesso. Análises biofísicas serão realizadas com as proteínas obtidas, podendo elucidar a presença e o tamanho do peptídeo de trânsito predito. Estudos estruturais integrados com técnicas modernas de química medicinal permitirão a identificação e planejamento de novos candidatos a agentes antimaláricos para o alvo molecular selecionado.

## 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.