

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
PROTEÍNA HIPOXANTINA GUANINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE DE
Plasmodium falciparum

BRUNA LOVIZUTTO PROTTI WÖHLKE

MANAUS, AMAZONAS
MARÇO/2012

BRUNA LOVIZUTTO PROTTI WÖHLKE

EXPRESSÃO HETERÓLOGA, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
PROTEÍNA HIPOXANTINA GUANINA FOSFORRIBOSILTRANSFERASE DE
Plasmodium falciparum

ORIENTADOR: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Biotecnologia para Saúde.

MANAUS, AMAZONAS

MARÇO/2012

Aos meus pais, Rosângela e Renato.

As minhas irmãs Karina e Renata.

Ao meu amor e marido Jonathan Luiz Wöhlke.

"Apesar dos nossos defeitos, precisamos enxergar que somos pérolas únicas no teatro da vida e entender que não existem pessoas de sucesso e pessoas fracassadas. O que existem são pessoas que lutam pelos seus sonhos ou desistem deles."

Augusto Cury

Agradecimento Institucional

Meus agradecimentos aos apoiadores e financiadores da pesquisa científica. Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pelo Projeto CNPq- PRONEX - Rede Malária. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Ao Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas por toda estrutura física e suporte técnico-laboratorial.

Agradecimentos Pessoais

Inicialmente gostaria de agradecer a meus pais maravilhosos e irmãs, que tanto amo e que estive distante nesta época de minha vida. Também ao meu marido que me apoiou em todos os sentidos durante esta jornada.

Agradeço especialmente:

Ao incomparável professor Dr. Spartaco Astolfi Filho que brilhantemente me orientou. Especialmente pela sua pessoa carismática e que transborda conhecimento e amor pela ciência e acima de tudo é extremamente humilde ao passar seus conhecimentos aos seus alunos.

Ao Dr. Luiz Hildebrando Pereira da Silva, pois é o idealizador do projeto em Rede Malária-PRONEX.

Ao Dr. Massayochi Yoshida, por ceder o espaço e permitir que algumas análises fossem realizadas no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

Ao Dr. André Mariúba que me ajudou com as bases de bioinformática e na construção e escolha dos alvos.

A Dr^a Érika Izumi que participou em vários momentos de minha pesquisa, não apenas com seus conhecimentos teóricos mas também como amiga.

Aos amigos Edson Júnior, Thiago Oliveira e Rogério Neves que me auxiliaram no início de minha pesquisa.

À minha companheira de graduação Vanessa Neves que sempre esteve presente em várias disciplinas e que sempre me ajudou com seu apoio de amiga.

Ao grupo de Biotecnologia da UFAM, ao pessoal do laboratório de Tecnologia de DNA e Proteoma: Andrea Listick, Anita, Mirna, Suelen, Elson, Helber, Patricia, Dina, Hugo, André, Jeane, Elza e a risonha Dona Regina, por toda experiência profissional compartilhada, pela amizade sincera e pelos momentos de confraternização.

Aos doutores avaliadores do projeto de qualificação: Dr. Edmar Vaz de Andrade, Dr. Carlos Gustavo e Dr. Eduardo Honda.

Aos doutores avaliadores da dissertação: Dr. Eduardo Honda, Dr. Spartaco Astolfi Filho e Dr. André Luis Willerding e Dr. Carlos Gustavo.

Enfim, agradeço a todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A malária continua a ser a maior causa de morbidade e mortalidade mundial com até três milhões de mortes anuais. O tratamento da malária, causada por *Plasmodium falciparum*, dependeu por décadas do uso da aminoquinolina cloroquina. Contudo a resistência à cloroquina em uma escala global expôs a capacidade com que o parasita pode desenvolver resistência a drogas. É, portanto, necessário o desenvolvimento de estudos que assegurem que drogas mais eficazes sejam descobertas de forma sustentável e que novos alvos moleculares para agentes antimalária sejam revelados. Através de análises de biologia celular e molecular foi possível sequenciar o genoma de *P. falciparum* e identificou-se novos alvos terapêuticos antimalária. A proteína alvo estudada neste projeto foi a Hipoxantina guanina fosforribosiltransferase do *P. falciparum*, que está relacionada com a via de recuperação das purinas. O gene da enzima foi identificado no genoma do *P. falciparum*, e produzido por síntese química com códons preferenciais de *Escherichia coli*, clonado em um forte promotor de expressão para esta bactéria, expresso e a proteína recombinante purificada mostrou-se ativa. A enzima será utilizada futuramente em estudos de *binding* e inibição com novos compostos químicos e/ou componentes de extratos de microrganismos e plantas amazônicas.

Palavras chave: *P. falciparum*, hipoxantina guanina fosforribosiltransferase, *E.coli*, alvo molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS

APRT: Adenina fosforibosiltransferase

ATP: Adenosina trifosfato

cDNA: DNA complementar

Da: Dalton

E. coli: Escherichia coli

GMP: Guanosina 5`-monofosfato

GPRT: Guanosina fosforibosiltransferase

HGPRT: Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase

HGXPRT: Hipoxantina-guanina-xantina fosforibosiltransferase

IMP: inosina 5`-monofosfato

IPTG: isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: kilo Dalton

LB: meio de cultura Luria – Bertani

OD₆₀₀ : Densidade Óptica a 600 nm

OMS: Organização Mundial da Saúde

PB: Pares de bases

P. falciparum: *Plasmodium falciparum*

PNP: Purina nucleosídeo fosforilase

PPi: Pirofosfato inorgânico

PRPP: 5-fosforibosil-1-pirofosfato

PRT: Purina fosforibosiltransferase

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

XPRT: Xantina fosforibosiltransferase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Malária, 2009. Adaptado de <i>World Health Organization</i> , 2010. Áreas de risco de transmissão de malária identificado no mapa em azul escuro.	1
Figura 2. Ciclo de vida do <i>P. falciparum</i> . Adaptado de Division of Parasitic Diseases/Centers for Disease Control and Prevention (DPDx/CDC).	4
Figura 3. Visão geral do metabolismo de purino nucleotídeos em humanos. Há dois caminhos para a obtenção de purino ribonucleotídeos em mamíferos: <i>Via de novo</i> , onde são utilizados precursores não purínicos; <i>Via de recuperação</i> , onde bases purínicas (incluindo as purinas provenientes da alimentação) e nucleosídeos são reutilizados para a formação de ribonucleotídeos. Os ribonucleotídeos formados podem ser convertidos em desoxirribonucleotídeos, utilizados em processos metabólicos ou sofrer degradação e serem eliminados (Adaptado de Reichard ,1988).	8
Figura 4. Vias metabólicas associadas à reciclagem de purinas. As reações (1), (2) e (6) são catalisadas pelas enzimas recicladoras. As enzimas são: (1) adenina fosforribosiltransferase (APRT), (2) hipoxantina guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), (3) purino nucleosídeo fosforilase, (4) xantina desidrogenase, (5) 5'-nucleotidase, (6) adenosina quinase, (7) adenosina desaminase, (8) AMP desaminase, (9) S-AMP sintetase, (10) S-AMP liase, (11) IMP desidrogenase, (12) GMP sintetase, (13) gualinato quinase, (14) adenilato quinase, (15) guanina desaminase, (16) SAH hidrolase, (17) homocisteína metiltransferase, (18) SAM descarboxilase e (19) aminopropiltransferase. X é um aceptor de grupo metil. Em vermelho destaca-se a reação da enzima APRT e em azul destaca-se a formação do metabólito insolúvel 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) (Manfredi & Holmes, 1985).	10
Figura 5. Metabolismo de purinas em eritrócito infectado. Abreviações: Ado, adenosina; Ino, inosine; Hxt, hipoxantina; Guo, guanosina; Gua, ganina; Xan, xantina; Ade, adenina; PRPP, fosforribosiltransferase; RBC, célula vermelha do sangue; PV, vacúolo do parasita; MTA, metiltioadenosina; MTI, metiltioinosina (Adaptado de Downie et al., 2008).	11
Figura 6. Reação reversível dependente de Mg^{+2} , com substratos hipoxantina e 5-fosfo- α -D-ribosil-pirofosfato catalizada pela enzima fosforribosiltransferase,	12

Figura 7. Representação estrutural da HGPRTase . A representação estrutural dos monômeros. B Representação da estrutura quaternária, com as quatro subunidades.(Shi <i>et al.</i> ,1999).....	13
Figura 8. Esquema ilustrando o funcionamento do <i>operon lac</i>	16
Figura 9. Esquema da transcrição da T7 RNA polimerase, sob controle do promotor <i>lac</i> L8-UV5. Adaptado do catálogo da Novagen.	18
Figura 10. Esquema da expressão gênica de proteína heteróloga em vetor pET, utilizando como hospedeira E.coli BL21 (DE3)pLysS. Adaptado de Bell & Lewis, 2000.	18
Figura 11. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGS21a e do seu sítio múltiplo de clonagem.	23
Figura 12. Mapa físico de Sítio múltiplo de clonagem do vetor pUC57.....	25
Figura 13. Esquema ilustrando a metodologia de expressão.....	29
Figura 14. Esquema de purificação utilizando resina de níquel. Adaptado do catálogo da Quiagen.	31
Figura 15. Resultado da busca com o programa <i>BLAST</i> . Em azul a similaridade em porcentagem, entre a sequência da enzima HGPRT de humanos com a sequência de <i>P. falciparum</i>	33
Figura 16. Sequência gênica modificada <i>in silico</i> para HGPRT de <i>P. falciparum</i> . Em verde sítio de restrição para a enzima <i>NdeI</i> , em rosa sequência codificadora de seis caudas de histidina, em vermelho sítio para a enzima proteolítica enteroquinase e em amarelo sítio de restrição para a enzima <i>NotI</i>	34
Figura 17. Mapa físico do plasmídeo recombinante pUC57HP construído pela empresa <i>GeneScript</i> , contendo a clonagem da sequência do gene HGPRT.	34
Figura 18. Perfil eletroforético dos produtos de digestão do plasmídeo pUC57HP. Coluna 1- Marcador de peso molecular; 2 – Vetor pUC57HP; 3- Vetor pUC57HP digerido com <i>NdeI</i> e <i>NotI</i>	35
Figura 19. Fotografia do gel de agarose após a retirada das bandas correspondentes ao vetor pGS21a e região codificadora do gene HGPRT para <i>P.falciparum</i> . Coluna 1- Marcador de peso molecular; 2 e 3– Vetor pGS21a; 4 e 5- Vetor pUC57HP digerido com <i>NdeI</i> e <i>NotI</i>	36

Figura 20. (A) Resultado da análise eletroforética do vetor e da sequência da HGPRT purificados após dupla digestão com <i>NdeI</i> e <i>NotI</i> . Coluna 1- Marcador de peso molecular; 2 -Sequência codificadora do gene da HGPRT; 3 – Vetor pGS21a. (B) Resultado da análise de restrição do plasmídeo recombinante pGSHP. Coluna 1– Plasmídeo pGSHP intacto; 2- plasmídeo duplamente digerido com <i>NdeI</i> e <i>NotI</i>	37
Figura 21. Mapa do plasmídeo recombinante construído pela ligação da região codificadora do gene da enzima HGPRT de <i>P.falciparum</i> ao vetor pGS21a.....	38
Figura 22. Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelo clone recombinante (<i>E.coli</i> (BL21(DE3) pLysS + pGSHP). M - marcador de peso molecular. 1- tempo de expressão zero, fração solúvel do lisado celular, 2- tempo de expressão zero, fração insolúvel do lisado celular, 3- tempo de expressão de quatro horas sem IPTG, fração solúvel, 4- tempo de expressão de quatro horas sem IPTG, fração insolúvel, 5- tempo de expressão de quatro horas com IPTG, fração solúvel, 6- tempo de expressão de quatro horas com IPTG, fração insolúvel.	39
Figura 23 Análise do processo de purificação da enzima HGPRT por SDS-PAGE. M marcador de peso molecular. 1- extrato total solúvel, 2- eluato inicial da coluna, 3- conteúdo liberado com 25 mM de imidazol , 4- 50 mM de imidazol, 5- 100 mM de imidazol, 6- 200 mM de imidazol, 7- 250 mM de imidazol, 8- 300 mM de imidazol, 9- 400 mM de imidazol.....	41
Figura 24. Gráfico da velocidade de reação no período de um minuto em diferentes volumes de enzima purificada	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Linhagens e genótipos de <i>E.coli</i> utilizados no presente estudo.....	15
Tabela 2. Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.....	16
Tabela 3. Concentrações protéicas realizadas pelo método de Bradford a cada 2 mL de extrato bruto.....	36

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Epidemiologia da malária	1
1.2 Transmissão	2
1.3 Sintomalogia	4
1.4 Diagnóstico	5
1.5 Tratamento	6
1.6 Genoma	7
1.7 Metabolismo de nucleotídeos purínicos	8
1.8 Via de recuperação de purinas	9
1.9 HGPRT (EC 2.4.2.8)	12
1.10 Tecnologia do DNA recombinante	14
1.11. Vetores de Expressão	17
2. Justificativa	20
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1. Linhagens de <i>E. coli</i>	22
4.2. Plasmídeo	22
4.3. Reagentes	23
4.4. Meios de cultura	24
4.5 Marcadores moleculares	24
4.6 Síntese química da região estrutural do gene de HGPRT	24
4.6.1. Ferramentas de bioinformática	24
4.6.2 Região estrutural do gene para a enzima HGPRT	25
4.7 Construção do plasmídeo recombinante pGSHP	26

4.7.1 Digestão do vetor de expressão pGS21a e pUC57	26
4.7.2 Subclonagem da sequência gênica HGPRT no vetor de expressão pGS21a (montagem do vetor pGSHP para expressão em <i>E. coli</i>)	26
4.7.3 Preparo de células <i>E.coli</i> eletrocompetentes	27
4.7.4 Transformação da hospedeira	27
4.7.5 Identificação da sequência gênica da proteína HGPRT no plasmídeo recombinante por análise de restrição	28
4.7.6 Transformação em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS do plasmídeo recombinante pGSHP	28
4.7.7 Expressão da proteína recombinante	28
4.7.8 Obtenção dos extratos de proteínas totais, solúveis e insolúveis.....	29
4.8 Avaliação da expressão.....	30
4.8.1 Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE.....	30
4.8.2 Coloração de proteínas por Azul Brilhante de Coomassie G250	30
4.9 Quantificação da proteína	30
4.10 Purificação da proteína HGPRT de <i>P. falciparum</i>	31
4.11 Troca de tampão da amostra purificada	32
4.12 Atividade da enzima HGPRT.	32
5. Resultados e Discussão	33
5.1 Desenho <i>in silico</i> da sequência gênica para HGPRT e sua otimização para <i>E.coli</i>	33
5.1 Construção do plasmídeo recombinante de expressão pGSHP	35
5.2 Expressão heteróloga da proteína HGPRT de <i>P. falciparum</i> em <i>E.coli</i> em meio líquido.....	38
5.3 Purificação da proteína recombinante HGPRT	40
5.4 Análise da atividade enzimática da fração solúvel	42
6. Conclusões	44
7. Referências Bibliográficas	45

1. Introdução

1.1 Epidemiologia da malária

A Malária continua a ser a maior causa de morbidade e mortalidade mundial com até três milhões de mortes anuais (Bremán *et al.*, 2004) (figura 1). Segundo a OMS, registram-se anualmente cerca de 300 milhões de novos casos de malária aguda em todo o mundo. Cerca de 60% dos novos casos registram-se na África sub-sahariana, onde ocorrem 90% dos casos fatais de malária humana, 75% dos quais incidindo sobre crianças com idades inferiores a 5 anos. A malária é a principal causa de mortalidade infantil na África, sendo também responsável por cerca de 10 % dos casos de morbidade geral da população africana e consumindo cerca de 40% das despesas com Saúde Pública (WHO, 2002).

Áreas de Risco de Transmissão de Malária em 2009

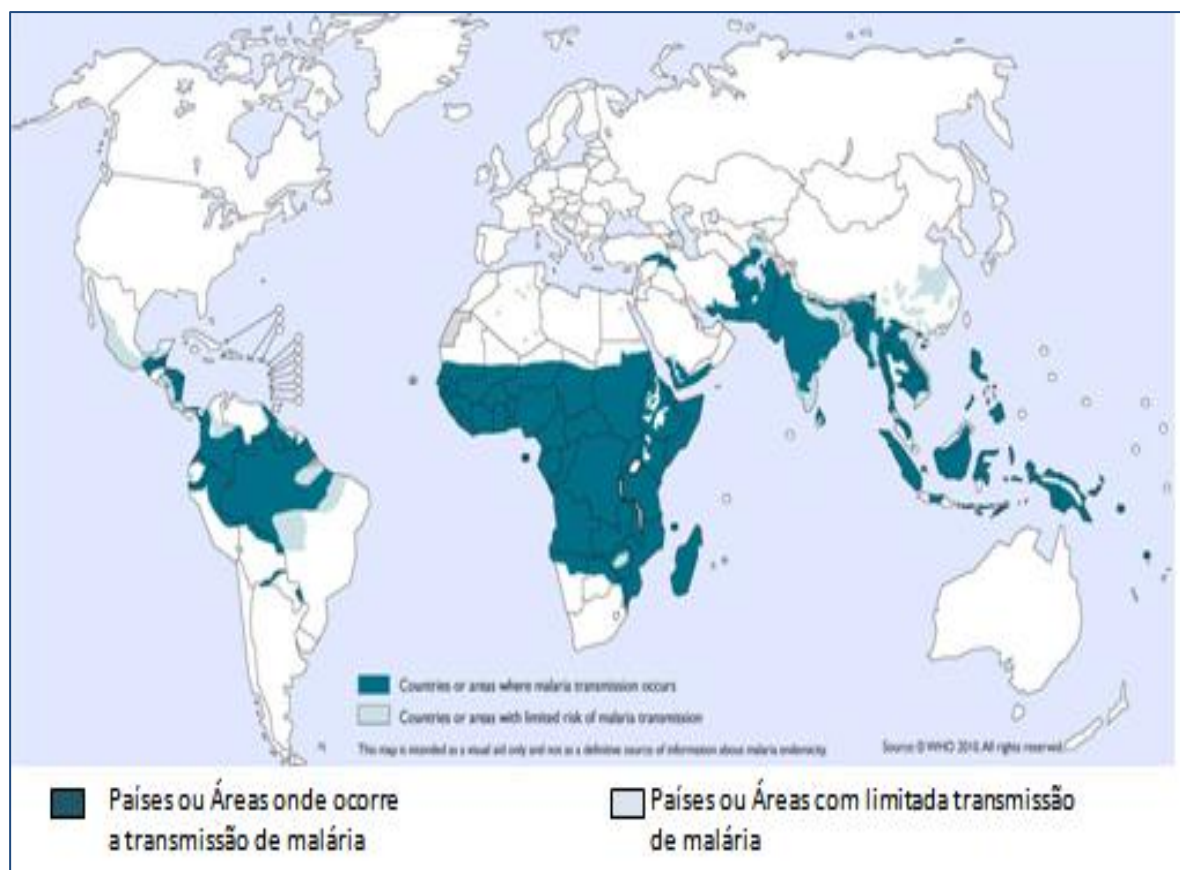


Figura 1. Malária, 2009. Adaptado de *World Health Organization*, 2010. Áreas de risco de transmissão de malária identificado no mapa em azul escuro.

Atualmente, uma abordagem empírica para estimar o número de eventos clínicos causado por *P. falciparum* em todo mundo, usando uma combinação de dados epidemiológicos, geográficos e demográficos, estimou que houve 515 (faixa 300-600) milhões de episódios de malária clínica por *P. falciparum* em 2002 (Snow *et al.*, 2005). Essas estimativas globais são até 50% maiores do que aquelas relatadas pela Organização Mundial de Saúde.

No Amazonas, entre 1960 e 1980, a malária apresentou baixos níveis endêmicos, com ocorrência de epidemias em poucos municípios, controladas em médio prazo (Saraiva *et al.*, 2006). Em Manaus, a incidência de malária é endêmica com surtos epidêmicos, o desmatamento e a ocupação de áreas antes cobertas por mata provida de mananciais, agora com assentamentos humanos, de forma desordenada (invasões) ou programada (conjuntos habitacionais) e estabelecimento de práticas laborais (atividades de piscicultura), têm sido fatores determinantes para a reintrodução e a permanência da malária, principalmente em áreas urbanas da cidade.

1.2 Transmissão

A malária é transmitida pela fêmea do mosquito *Anopheles* ao hospedeiro humano, e são quatro as espécies de parasitas responsáveis pela doença (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovalis*) sendo que, em termos de virulência e mortalidade, a espécie *P. falciparum* é a mais importante.

O *Anopheles darlingi* é o principal vetor de malária no Brasil. Além de seu papel na transmissão de *P. falciparum*, este mosquito também é vetor de outras espécies de *Plasmodium* (Klein *et al.*, 1991). Sua distribuição geográfica e densidade estão intimamente relacionadas com a malária e estes mosquitos são frequentemente encontrados infectados com o parasita causador da doença, não raras vezes por mais de uma espécie de *Plasmodium* (Tadei *et al.*, 1998). Sua distribuição é extensa, sendo encontrado desde as regiões orientais do México até o norte da Argentina. No Brasil, antes das campanhas de erradicação, só estavam livres de sua presença quatro estados: Rio Grande do Norte, Paraíba, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Atualmente, este mosquito encontra-se em grande número principalmente na região Amazônica.

O *P. falciparum* possui duas fases em seu ciclo, sendo estas distintas. Uma fase assexuada (esquizogonia), que ocorre no hospedeiro vertebrado (homem), outra sexuada (esporogonia), que ocorre no hospedeiro definitivo invertebrado (mosquito) (figura 2).

O ciclo biológico do parasita no homem: Inicia-se com a picada de um mosquito na pele humana, sendo os esporozoítos do parasita transferidos para a corrente sanguínea. Mais tarde, estes invadem as células do fígado, dando-se início à divisão assexuada do parasita (ciclo pré-eritrocitário), da qual resulta a produção de milhares de merozoítos. Estes deixam as células hepáticas e infectam os eritrócitos da corrente sanguínea, onde tem início uma nova fase de reprodução assexuada (ciclo intraeritrocitário), em ciclos de 48 horas. Através de estágios circulares, o parasita se desenvolve em trofozoítos e esquizontes para, numa fase seguinte, cada esquizonte se divide em 16 merozoítos eritrocíticos, que são liberados do eritrócito para invadir, logo em seguida, um novo eritrócito. Durante a fase eritrocítica, o parasita utiliza a hemoglobina do hospedeiro como fonte de aminoácidos para sua reprodução (White , 2004).

O ciclo biológico do parasita no mosquito: Enquanto os anofelinos machos se alimentam somente de néctar e seiva vegetal, as fêmeas necessitam de sangue em sua alimentação, para o amadurecimento de seus ovos e possibilitar a oviposição. Assim, após uma fêmea do mosquito *Anopheles* ingerir sangue de um hospedeiro humano contendo as formas sexuais do parasita (gametócitos) inicia-se a fase sexual no interior de seu estômago. Os gametas masculinos e femininos se diferenciam em micro e macrogametas respectivamente e a fecundação, na qual acontece a formação do zigoto ou oocineto, ocorre em poucos minutos após da alimentação sangüínea. O zigoto é a única fase diplóide do parasita. Posteriormente, o zigoto migra através da camada única de células do estômago do mosquito, posicionando-se entre esta e sua membrana basal. O oocineto se transforma em oocisto ao envolver-se por uma grossa cápsula a qual permite a passagem de nutrientes para a geração dos esporozoítos, formas infectantes, que migram para as glândulas salivares do inseto as quais poderão no momento da picada, ser inoculadas no ser humano (White, 2004).

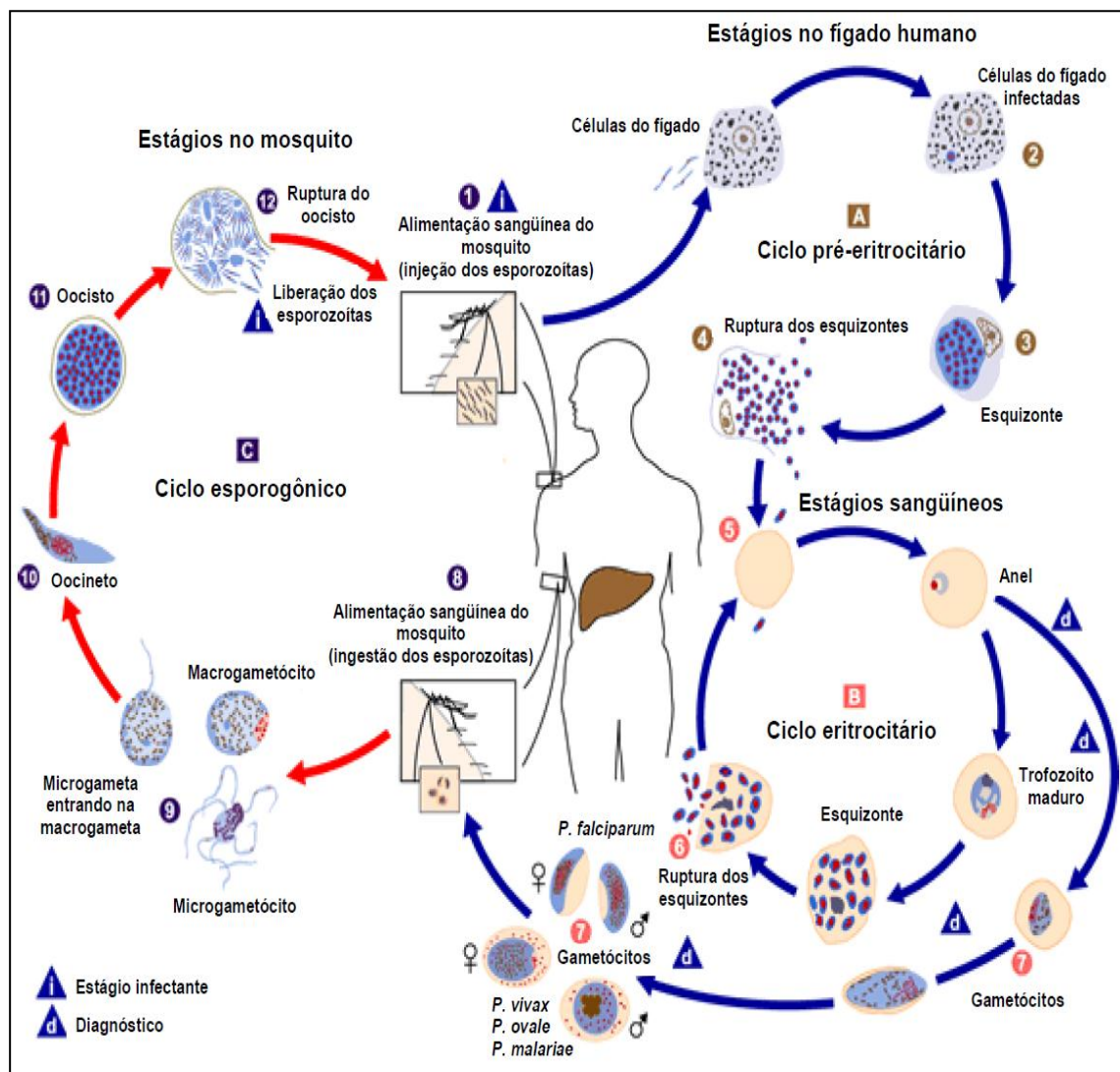


Figura 2. Ciclo de vida do *P. falciparum*. Adaptado de Division of Parasitic Diseases/Centers for Disease Control and Prevention (DPDx/CDC).

1.3 Sintomalogia

Segundo o Ministério da Saúde 2011, o quadro clínico típico é caracterizado por febre alta, acompanhada de calafrios, sudorese profusa e cefaléia, que ocorrem em padrões cíclicos, dependendo da espécie de plasmódio infectante. Em alguns pacientes, aparecem sintomas prodrômicos, vários dias antes dos paroxismos da doença, a exemplo de náuseas, vômitos, astenia, fadiga, anorexia.

A fase sintomática inicial caracteriza-se por mal-estar, cansaço e mialgia. O ataque paroxístico inicia-se com calafrio, acompanhado de tremor generalizado, com duração de 15

minutos a 1 hora. Na fase febril, a temperatura pode atingir 41°C. Esta fase pode ser acompanhada de cefaléia, náuseas e vômitos. É seguida de sudorese intensa.

Se o paciente não recebe terapêutica específica, adequada e oportuna, os sinais e sintomas podem evoluir para formas graves e complicadas, dependendo da resposta imunológica do organismo, aumento da parasitemia e espécie de plasmódio. São sinais de malária grave e complicada: hiperpirexia (temperatura >41°C), convulsão, hiperparasitemia (>200.000/mm³), vômitos repetidos, oligúria, dispnéia, anemia intensa, icterícia, hemorragias e hipotensão arterial. As formas graves podem cursar com alteração de consciência, delírio e coma, estão relacionadas à parasitemia elevada, acima de 2% das hemácias parasitadas, podendo atingir até 30% dos eritrócitos.

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico laboratorial da malária é realizado por exame da gota espessa de sangue, que é um método simples, eficaz e de baixo custo. A técnica baseia-se na visualização do parasito por microscopia de luz, após coloração permanente (azul de metileno e Giemsa), permitindo a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise da sua morfologia e pelos estágios de desenvolvimento dos protozoários encontrados no sangue periférico (WHO, 2006).

Quando os serviços de microscopia de boa qualidade não podem ser prontamente fornecidos, uma alternativa para o diagnóstico é o Teste de Diagnóstico Rápido (T. D. R). O teste baseia-se na detecção de antígenos específicos (proteínas) produzidos pelo parasita, que estão presentes no sangue dos indivíduos infectados recentemente (WHO, 2010).

O rápido diagnóstico e tratamento da malária são elementos básicos para controlar a doença. Tratando no início, pode-se diminuir a duração da infecção e prevenir complicações posteriores, entre elas a maioria das mortes. O acesso ao tratamento deve ser considerado não só um componente do controle da malária e sim um direito fundamental de toda a população em risco (OMS, 2006).

1.5 Tratamento

Os fármacos antimaláricos englobam um grande número de moléculas orgânicas, que são tradicionalmente distribuídas por três grupos:

- Amino-álcoois, que incluem os alcalóides do grupo das quinolinas, dos quais a quinina é o exemplo clássico, e todas as aminoquinolinas sintéticas;
- Derivados artemisínicos, que como o nome indica, englobam o sesquiterpeno artemisinina e seus derivados;
- Antifolatos e outros, onde se incluem antibióticos com atividade antimalárica, como biguanidas e sulfonamidas, e outros que não se encaixam nas duas famílias anteriores (Rang *et al.*, 1997).

Em 1820 os químicos franceses Pelletier e Caventou isolaram a substância ativa da casca da quina, o alcalóide quinina, o trabalho foi reconhecido e premiado pelo Instituto Francês de Ciências (Rang *et al.*, 1997).

A partir de 1940, o tratamento para a malária consistiu em uma monoterapia com a administração de cloroquina, uma 4-aminoquinolina previamente caracterizada pela sua eficácia, baixa toxicidade e baixo custo (Berry *et al.*, 2006). A cloroquina se liga ao ambiente rico em grupo heme dentro do eritrócito infectado, interferindo no processo de detoxificação do parasita, levando a uma rápida remoção dos parasitas circulantes (Pagola *et al.*, 2000).

O uso massivo de cloroquina em todo o mundo, por volta de 1950, levou ao aparecimento dos primeiros parasitas resistentes a esta terapia. Apesar da prevalência da resistência a cloroquina, esta droga continua sendo extensamente utilizada, devido a seu custo reduzido e disponibilidade nos países afetados. Juntamente a cloroquina, o artesunato, o antifolato e a mefloquina constituem-se nas únicas alternativas de tratamento da malária a custo baixo, porém da mesma forma, cepas resistentes de *P. falciparum* surgem rapidamente, e contribuem para as atuais taxas inaceitáveis de falha de tratamento da malária na Ásia e África subsaariana (Plowe, 2005).

O uso indiscriminado de medicamentos antimaláricos no século passado levou a propagação de linhagens resistente a alguns medicamentos, como a cloroquina, o que aumentou a morbidade e a mortalidade pela doença. Na última década, com um novo grupo de medicamentos à base de artemisinina, houve uma nova esperança no combate à malária (Taranto *et al.*, 2006).

Em 1972 foi isolado o sesquiterpeno artemisinina, que deu origem a uma família de compostos antimaláricos. A artemisinina é, fundamentalmente, um esquizonticida sanguíneo

com uma ação rápida. Os derivados da artemisinina mais importantes são a diidroartemisinina , artesunato de sódio, o arteméter e o artéter . Os derivados da artemisinina agem e são eliminados rapidamente. A sua rápida acção torna-se especialmente eficaz contra a malária grave (Meshnick *et al.*; 2002).

1.6 Genoma

Um esforço internacional foi lançado em 1996 em sequenciar o genoma do *P. falciparum*, finalizada em 2002 (Gardner *et al.*, 2002). A sequência genômica do vetor, o mosquito *Anopheles gambiae* (Holt, 2002) também foi determinada. Com isso, uma enorme gama de possibilidades de estudos se abriu, já que todos os genomas envolvidos no ciclo de desenvolvimento de *P. falciparum* foram elucidados iniciando-se assim a era pós genômica no estudo da malária.

O genoma nuclear de *P. falciparum* 3D7 é composto de 22,8 mega-bases (Mb), distribuídas em 14 cromossomos, variando em tamanho cerca de 0,643-3,29 Mb. A composição do conjunto (A / T) é de 80,6%, e sobe para 90% nos íntrons e regiões intergênicas. As estruturas dos genes que codificam proteínas foram preditos por meio de diversos programas e cerca de 5.300 genes que codificam proteínas foram identificados. Isto sugere uma densidade média de genes, em *P. falciparum*, de um gene por 4.338 pares de base (pb), ligeiramente maior que a encontrada anteriormente com os cromossomos 2 e 3 (1 por 4.500 pb e 1 por 4.800 pb, respectivamente).

Os íntrons foram previstos em 54% dos genes de *P. falciparum*, uma proporção parecida com a de *S. pombe* e *Dictyostelium discoideum*, mas muito superior ao observado em *S. cerevisiae*, onde apenas 5% dos genes contêm íntrons. Excluindo os íntrons, o comprimento médio de genes de *P. falciparum* foi de 2,3 kb, substancialmente maior do que em outros organismos em que o comprimento médio dos genes está na faixa de 1,3-1,6 kb. O genoma de *P. falciparum* apresentaram uma proporção significativamente maior de genes (15,5%) com mais de 4 kb em relação a *Saccharomyces pombe* e *S. cerevisiae* (3,0% e 3,6%, respectivamente); a explicação para este fato ainda não foi elucidado. Muitos destes genes codificam proteínas grandes ainda não caracterizados que podem ser proteínas citosólicas, já que eles não possuem peptídeos sinal reconhecível (Hernandez *et al.*,1996).

1.7 Metabolismo de nucleotídeos purínicos

As purinas são biomoléculas de importância vital para todos os organismos vivos. Elas são essenciais para a síntese de ácidos nucleicos, proteínas e outros metabólitos, assim como para reações que necessitam de energia. (Grossman *et al.*, 1998).

Os dois nucleotídeos purínicos presentes nos ácidos nucleicos são: AMP e GMP. Em células de mamíferos, eles podem ser obtidos a partir de caminhos bioquímicos diferentes. Eles podem ser sintetizados endogenamente a partir de precursores não purínicos, via de síntese *de novo*, ou através da reutilização de nucleosídeos e do aproveitamento de purinas livres provenientes da dieta alimentar e degradação de ácidos nucleicos, via de recuperação (Reichard ,1988) (Figura 3).

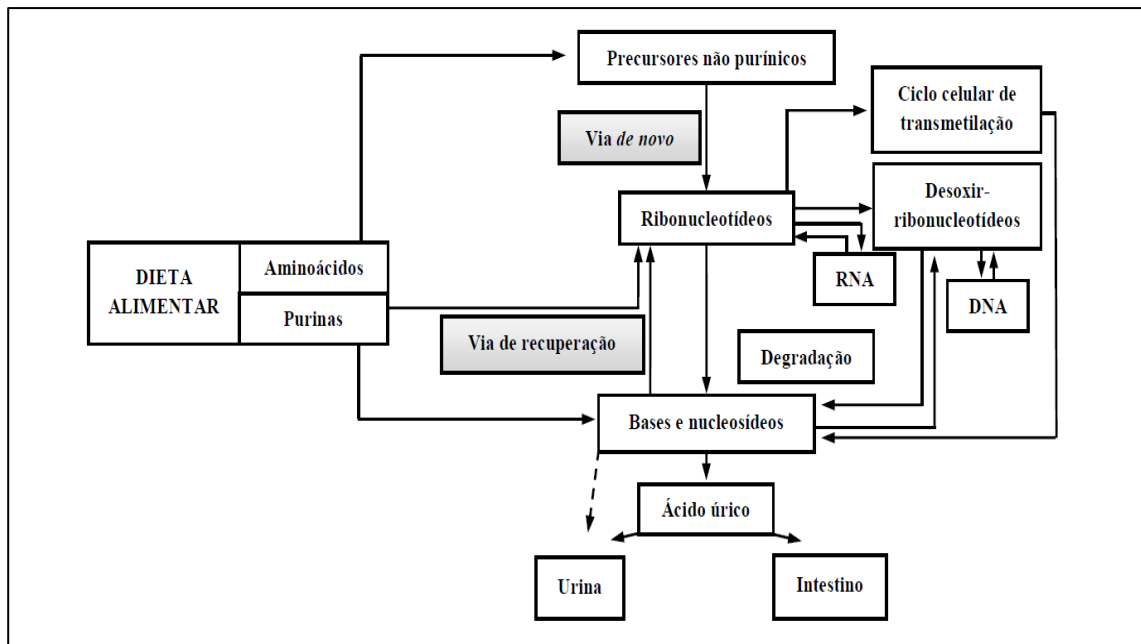


Figura 3. Visão geral do metabolismo de purino nucleotídeos em humanos. Há dois caminhos para a obtenção de purino ribonucleotídeos em mamíferos: *Via de novo*, onde são utilizados precursores não purínicos; *Via de recuperação*, onde bases purínicas (incluindo as purinas provenientes da alimentação) e nucleosídeos são reutilizados para a formação de ribonucleotídeos. Os ribonucleotídeos formados podem ser convertidos em desoxirribonucleotídeos, utilizados em processos metabólicos ou sofrer degradação e serem eliminados (Adaptado de Reichard ,1988).

Uma característica única do parasita da malária é sua restrita habilidade para sintetizar nucleotídeos. Este parasita é incapaz de sintetizar a purina (anel) e necessita, portanto obter pré-formadas bases purínicas e nucleotídeos de células hospedeiras dos eritrócitos. Então seria de se prever que o bloqueio da via de recuperação de purinas deverá afetar negativamente o crescimento do parasita (Wang, 1984)

O metabolismo de purinas constitui um alvo potencial excelente para o desenho racional de quimioterápicos antiparasitários, devido a algumas diferenças que se destacam entre parasitas e seus hospedeiros. Entre elas, está a especificidade do transporte de purinas, podendo ter um alto grau de seletividade e também as diferenças relacionadas à preferência pelo substrato utilizado (Chen *et al.*, 2003)

1.8 Via de recuperação de purinas

As enzimas capazes de produzir nucleotídeos a partir de nucleosídeos ou bases purínicas livres são chamadas de enzimas recicladoras e constituem o ponto principal da via. Existem dois tipos principais de enzimas recicladoras de purinas, as nucleosídeo quinases e as fosforibosiltransferases (PRTases). As nucleosídeo quinases são responsáveis pela fosforilação direta de nucleosídeos à nucleotídeos, já as PRTases convertem bases purínicas em seus respectivos nucleotídeos em uma única etapa(figura 4) (Manfredi & Holmes, 1985):

A rota de recuperação de purinas em células humanas ocorre quando adenina e adenosina são convertidas a AMP pela adenina fosforibosiltransferase (APRT) e adenosina quinase, e hipoxantina e guanina são convertidas a inosina monofosfato (IMP) ou guanosina monofosfato (GMP) pela hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HGPRT). Estes nucleosídeos são convertidos a nucleotídeos trifosfatados (ATP, GTP, dATP e dGTP), os quais são substratos de RNA e DNA polimerases(Parker, 2007).

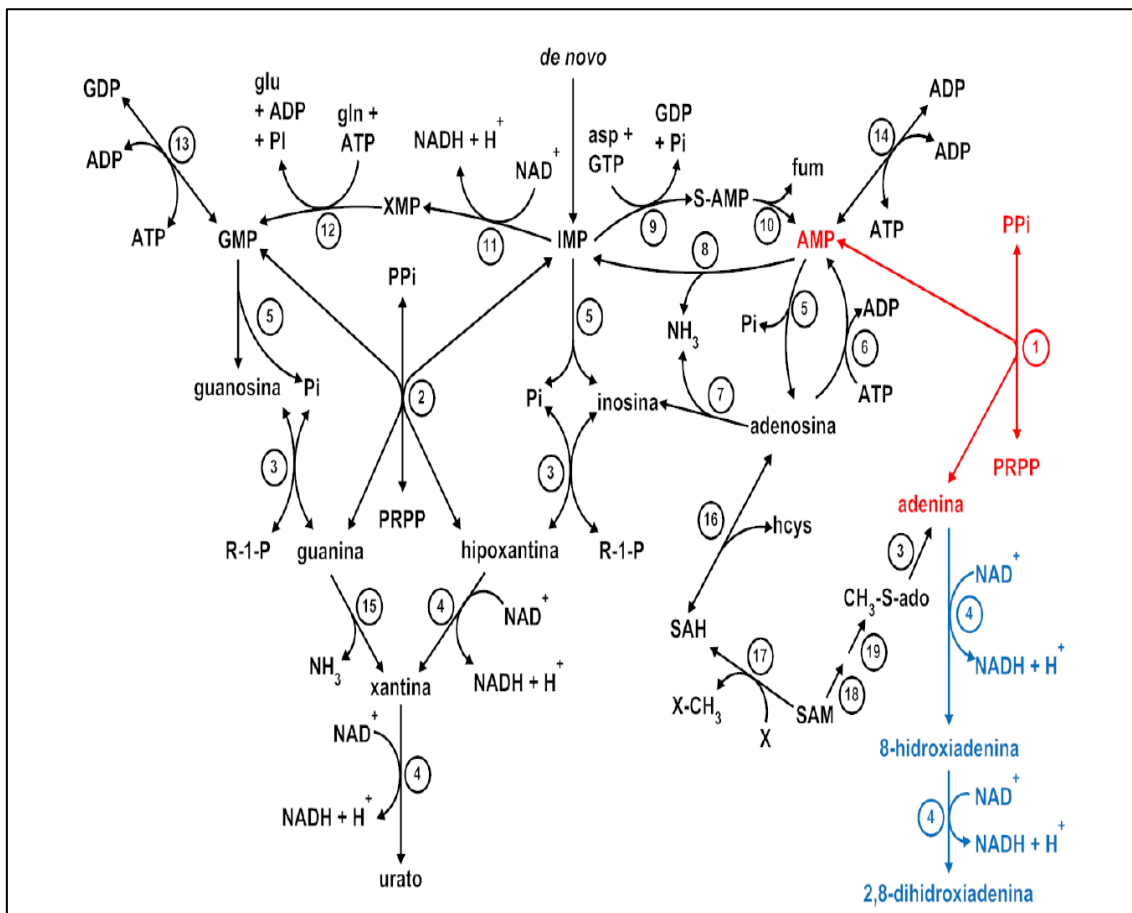


Figura 4. Vias metabólicas associadas à reciclagem de purinas. As reações (1), (2) e (6) são catalisadas pelas enzimas recicladoras. As enzimas são: (1) adenina fosforribosiltransferase (APRT), (2) hipoxantina guanina fosforribosiltransferase (HGPRT), (3) purino nucleosídeo fosforilase, (4) xantina desidrogenase, (5) 5'-nucleotidase, (6) adenosina quinase, (7) adenosina desaminase, (8) AMP desaminase, (9) S-AMP sintetase, (10) S-AMP liase, (11) IMP desidrogenase, (12) GMP sintetase, (13) gualinato quinase, (14) adenilato quinase, (15) guanina desaminase, (16) SAH hidrolase, (17) homocisteína metiltransferase, (18) SAM descarboxilase e (19) aminopropiltransferase. X é um aceptor de grupo metil. Em vermelho destaca-se a reação da enzima APRT e em azul destaca-se a formação do metabólito insolúvel 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA) (Manfredi & Holmes, 1985).

Dentro do eritrócito do hospedeiro, o parasita reside dentro de um vacúolo parasitário criado após a invasão, pela invaginação da membrana da célula hospedeira. O citosol do parasita é portanto separado do meio extracelular por três membranas. A membrana da célula hospedeira, a membrana do vacúolo parasitário e a membrana plasmática do parasita.

O metabolismo de purinas ocorre no interior do eritrócito infectado (figura 5). Inosina é produzida a partir da adenosina pela enzima adenosina desaminase (ADA). A inosina é então

convertida a hipoxantina pela purina nucleosil fosforilase (PNP). ADA humana e PNP humana estão presentes no citoplasma da célula sanguínea, enquanto ADA e PNP do parasita estão presentes no citosol do parasita. Adenosina, inosina, hipoxantina, guanosina, guanina e xantina são transportadas para o parasita através do transportador de nucleosídeo (PfNT1). A adenina é transportada para o interior do parasita através de um transportador independente (PfNT1). PRTs ativas convertem hipoxantina para IMP, guanina para GMP, e xantina para XMP. IMP, GMP, e XMP são convertidas para nucleotídeos guanilato e adenilato em reações subsequentes (Downie *et al.*, 2008).

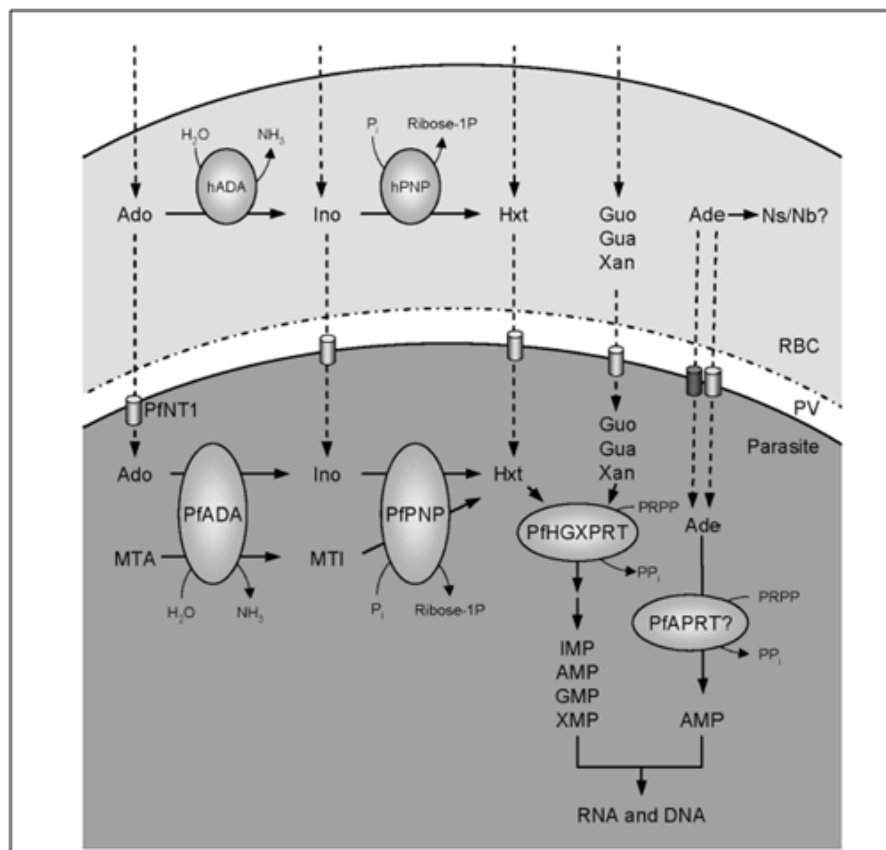


Figura 5. Metabolismo de purinas em eritrócito infectado. Abreviações: Ado, adenosina; Ino, inosine; Hxt, hipoxantina; Guo, guanosina; Gua, ganina; Xan, xantina; Ade, adenina; PRPP, fosforribosiltransferase; RBC, célula vermelha do sangue; PV, vacúolo do parasita; MTA, metiltioadenosina; MTI, metiltioinosina (Adaptado de Downie *et al.*, 2008).

1.9 HGPRT (EC 2.4.2.8)

HGPRTase é um membro da classe de aproximadamente 10 fosforribosiltransferase (PRTases) que catalisam reações similares envolvendo PRPP e uma base nitrogenada (Musick, 1981).

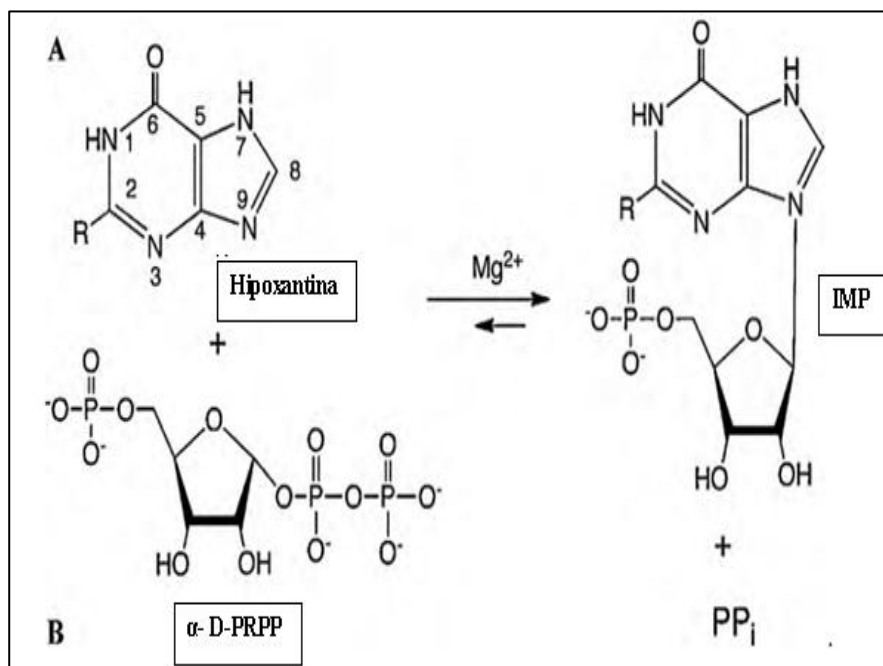


Figura 6. Reação reversível dependente de Mg^{+2} , com substratos hipoxantina e 5-fosfo-α-D-ribosil-pirofosfato catalizada pela enzima fosforribosiltransferase,

A enzima HGPRT de *P. falciparum* é uma PRTase do tipo I, que catalisa a transferência reversível dependente de magnésio, de um grupo fosforibosil do 5-fosfo-α-D-ribosil-pirofosfato (PRPP) para uma base purínica (hipoxantina, guanina ou xantina) para formar o ribonucleotídeo purina, liberando pirofosfato (PP_i) (figura 6) (Keough *et al.*, 1999).

Nas estruturas das PRTases da classe I existe uma sequência de 13 aminoácidos que se refere ao sítio de ligação do PRPP, localizado na porção N-terminal na fita-β 3 da folha-β, sendo uma sequência conservada para as PRTases da classe I. As PRTases classe I apresentam um grande *loop* flexível, envolvido na catálise quando na conformação fechada, enquanto a conformação aberta permite a ligação dos substratos e liberação dos produtos (Eads *et al.*, 1994)

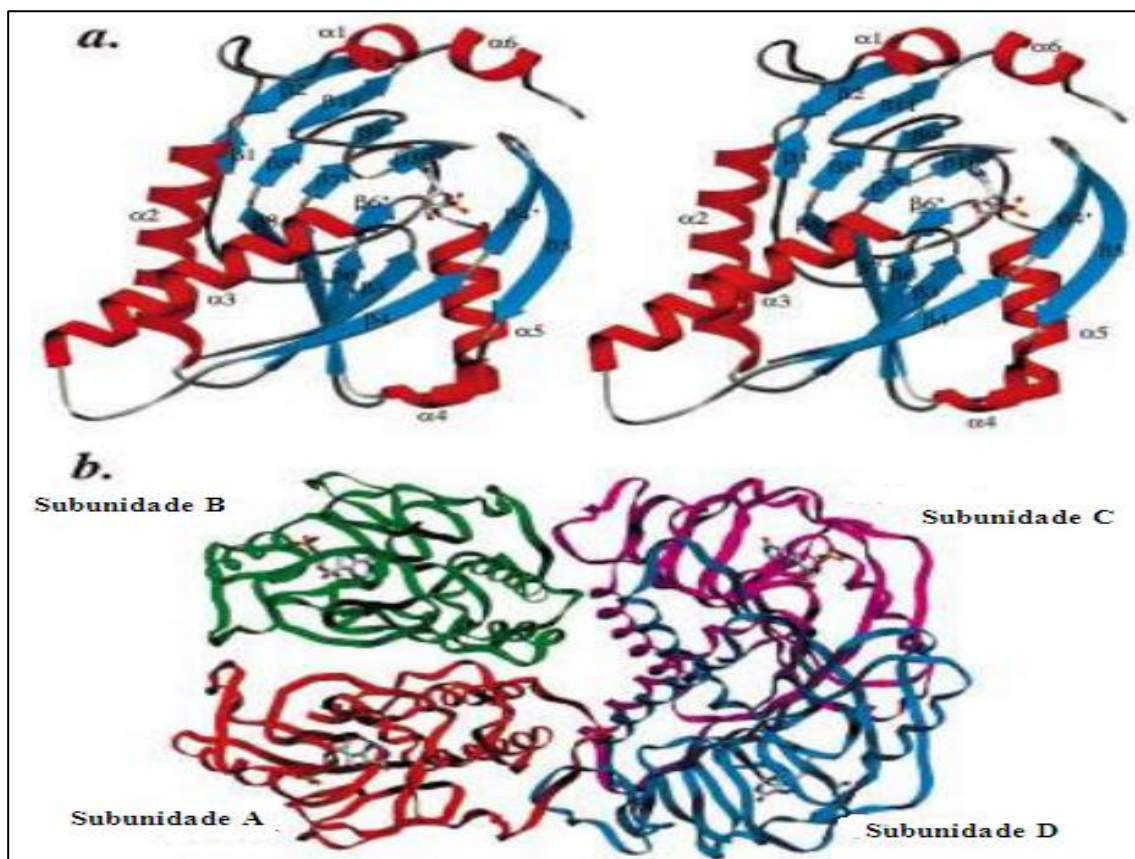


Figura 7. Representação estrutural da HGPRTase . A representação estrutural dos monômeros.
B Representação da estrutura quaternária, com as quatro subunidades.(Shi *et al.*,1999)

A estrutura do monômero de HGPRTase de *P.falciparum* consiste em seis α -hélices e onze β -fitas (figura 7). O monômero consiste em um núcleo (resíduos 46-194) e um capus (resíduos 1-45 e 195-231) (Shi *et al.*,1999). As quatro subunidades independentes são similares segundo os desvios médios quadráticos (d.m.q) entre todos os átomos de $C\alpha$ e a maior parte das diferenças ocorre nas regiões de *loop*, em particular no *loop* que conecta $\alpha 3$ e $\beta 4$ (98-105) e o *loop* $\beta 5$ e $\alpha 4$ (128-130). Em cada subunidade independente há sítios ativos que são praticamente idênticos (menos que 10 Å), segundo os desvios médios quadráticos.

A enzima HGPRT para *P. falciparum* possui atividade específica em pH 7,45, 12mM $MgCl_2$ e 0,1 M Tris-HCl de 0.77 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ e 1,4 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ em pH 8,5, 110 mM $MgCl_2$ e 0,1 M Tris-HCl. Para a enzima humana observa-se atividade específica de 19 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ em pH 7,45, 12mM $MgCl_2$ e 0,1 M Tris-HCl e 27 $\mu mol.min^{-1}.mg^{-1}$ em pH 8,5, 110 mM $MgCl_2$ e 0,1 M Tris-HCl (Keough *et al.*, 1999) .

Com relação às constantes de Michaelis-Menten (K_m) foi observado K_m para HGPRT de *P. falciparum* para o substrato hipoxantina=0,9 μM , para guanina=1,4 μM , e a

xantina=420 μ M . Para HGPRT humana para o substrato hipoxantina=3,1 μ M, Km para guanina=1,9 μ M, e Km para a xantina=0 μ M (Keough *et al.*, 1999).

Em trabalhos anteriores estudou-se a estrutura de HGPRTase para um grupo de organismos através do desvio médio quadrático (d.m.q) entre todos os átomos de Ca e notou-se uma boa conservação estrutural desta proteína ao longo da evolução, sendo que foi possível separar os organismos em dois grandes grupos. Um grupo para os organismos *Leishmania tarentolae*, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli* e *Trichomonas foetus*, e outro grupo formado por *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Homo sapiens*. No primeiro grupo, as três estruturas são mais semelhantes e melhores sobrepostas, e se comportam como dímeros. No segundo, as estruturas são melhores sobrepostas, sendo tetraméricas em solução (Monzani, 2003).

Inibidores específicos e potentes para HGPRTs de parasitas devem explorar as diferenças funcionais e estruturais entre a enzima do parasita e o seu hospedeiro. A estrutura tetramérica do cristal da HGPRT humana revelou a arquitetura do sítio ativo mostrando que na região C-terminal ocorre uma mudança conformacional quando associada com a ligação da base, sugerindo também que tanto o PRPP quanto a base devem ser capazes de se ligar simultaneamente (Xu *et al.*, 1997). As evidências disponíveis sugerem que, em adição à sua especificidade pelo substrato, a enzima do hospedeiro difere da enzima do parasita pelos seguintes aspectos: diferentemente da enzima humana estável, a HGPRT do parasita é instável na ausência de PRPP e o Km da enzima do parasita varia substancialmente da enzima humana (Sarkar *et al.*, 2004). A HGPRT humana apresenta baixa eficiência para a reação com xantina, diferentemente de *P. falciparum*. O fato da HGPRT humana apresentar baixa eficiência para a reação com xantina poderia ser devido ao deslocamento dos resíduos no *loop IV*, particularmente dos resíduos 191 a 195 (Keough *et al.*, 1999).

1.10 Tecnologia do DNA recombinante

Embora a tecnologia do DNA recombinante tenha surgido no início dos anos 1970, ela é decorrente de uma série de descobertas extremamente importantes que ocorreram anteriormente. Assim, ela pode ser considerada um somatório dos dados que foram se acumulando dentro da genética e da biologia molecular (Azevedo, 2008)

O sistema de expressão em *Escherichia coli* foi o primeiro a ser utilizado para produzir produtos farmacêuticos recombinantes e tem muitas vantagens comparadas com sistemas eucarióticos, como o fácil cultivo, baixo custo e alto potencial de produção (Swartz, 2001).

Entre os diversos sistemas de expressão heteróloga disponíveis, a bactéria *Gram* negativa *E. coli* continua sendo um dos mais atraentes devido ao seu rápido crescimento em meio de cultura, sua genética já bem descrita e a disponibilidade de inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes (Baneyx, 1999).

A grande desvantagem da *E. coli* é que muitas vezes em um processo de expressão citoplasmática há dificuldade em obter a proteína em sua correta conformação original, além da proteína não sofrer glicosilação (Swartz, 2001).

No processo de expressão protéica em *E. coli*, o mais desejável é obter a proteína recombinante na sua forma solúvel e com sua conformação estrutural correta.

Entretanto, o dobramento protéico está muito relacionado com a degradação proteolítica no citoplasma, uma vez que proteínas em sua conformação incorreta são rapidamente degradadas como forma de reciclagem de aminoácidos (Baneyx, 1999).

Além do dobramento incorreto da proteína heteróloga expressa, o alto nível de expressão citoplasmática pode resultar na formação de agregados insolúveis conhecidos como corpúsculos de inclusão. A maioria das proteínas produzidas nessa bactéria estão na forma de corpúsculo de inclusão devido a pequena quantidade de chaperonas no citoplasma (Schmidt, 2004). Por outro lado, a formação de corpúsculo de inclusão possui algumas vantagens como o isolamento fácil com alto grau de concentração e pureza das proteínas, além de ser uma proteção da proteína contra a degradação por proteases (Schmidt, 2004). Contudo, apesar da proteína na sua forma insolúvel facilitar a etapa de purificação nem sempre é possível obtê-la com atividade biológica (Baneyx, 1999).

A descoberta de promotores e repressores específicos de genes de *E. coli*, de uma variedade de vírus de *E. coli* e de células eucarióticas permitiu a manipulação da expressão de proteínas e a clonagem de genes sob o controle de um dado promotor, cuja expressão pode ser induzível ou contínua. O primeiro, e mais comumente usado, sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* é baseado no *operon lac*. (Figura 8). Neste sistema, o DNA de interesse é clonado em fago (no caso de biblioteca de cDNA de expressão) ou plasmídeo contendo o *lacI* (repressor), *lacP* (promotor) e *lacZ* (gene estrutural transcrito para RNAm da b-galactosidase). A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável (tiogalactopiranosídeo de isopropila, IPTG), o qual se associa ao repressor, inibindo-o e deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e consequente transcrição do gene (Brown, 2003).

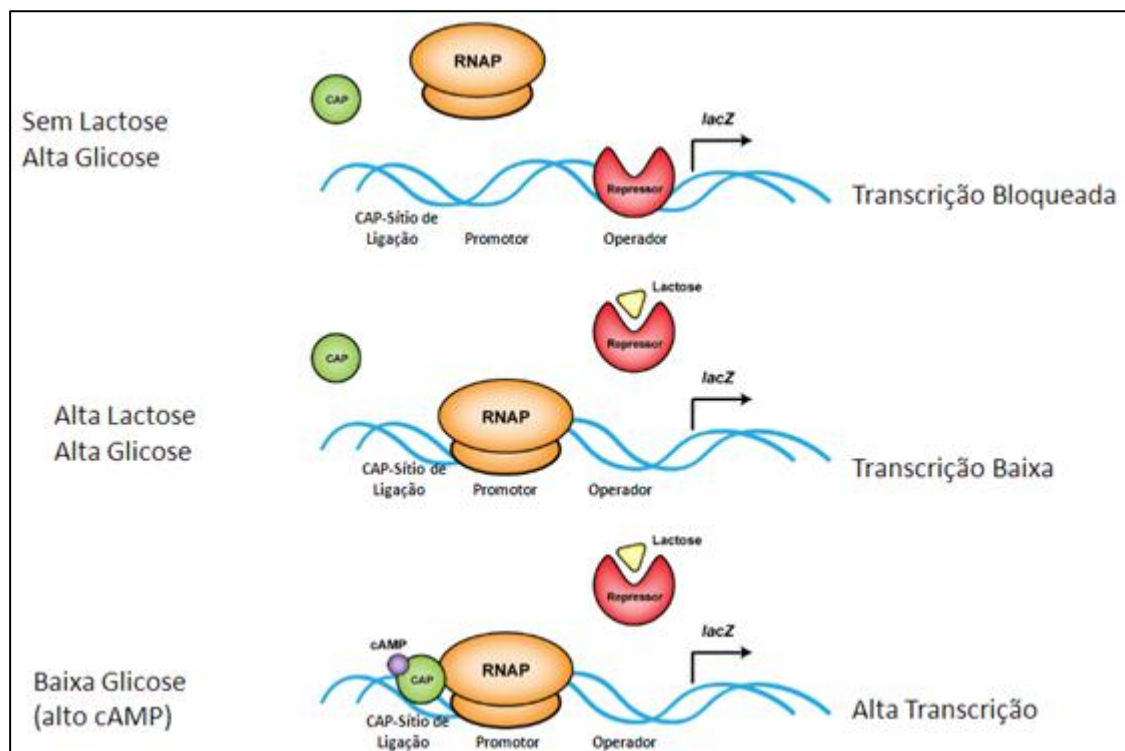


Figura 8. Esquema ilustrando o funcionamento do operon *lac*.

As proteínas inseridas no DNA da *E. coli* para expressão podem ser facilmente purificadas se possuírem cauda de histidina em fusão. Isso porque existe uma grande afinidade entre a cauda e alguns íons metálicos, como Ni^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} , permitindo que o produto em fusão seja rapidamente separado de outras proteínas existentes no meio, com pureza de até 95% (Hengen, 1995).

1.11. Vetores de Expressão

Vetores são veículos utilizados para introdução e manutenção de um DNA exógeno em um hospedeiro. Um bom vetor deve apresentar propriedades que facilitem a sua ligação ao DNA a ser clonado, ter propriedades que permitam a seleção de hospedeiros que contenham o DNA recombinante, possibilitar a expressão da mensagem exógena inserida no hospedeiro e apresentar propriedades que colaborem para a não proliferação ambiental do DNA clonado (Astolfi *et al.*, 2005).

Os vetores mais simples e amplamente utilizados são os do tipo plasmídeos devido sua fácil manipulação e a grande variedade de aplicações (Bataus, 1991). São DNAs circulares extracromossomais com número de cópias característico para cada hospedeira (Woese *et al.*, 1990).

Os vetores de expressão são veículos que além de conter origem de duplicação e marcador de seleção, contém promotor, região codificadora do sítio de ligação do ribossomo e códon de iniciação de tradução, seguido pelo menos de um sítio de restrição para a inserção de uma mensagem genética e no final do ‘cassete de expressão’ existe um terminador de transcrição. Nesse caso, a sequência inserida, uma vez em fase, é expressa, resultando em uma proteína híbrida ou não (Astolfi *et al.*, 2005).

Um dos sistemas de expressão mais amplamente utilizado é o T7 RNA polimerase (Studier & Moffatt 1986) (figura 10). O T7 RNA polimerase possui atividade cerca de, cinco vezes mais rápido do que a RNA *E.coli* polimerase. As duas polimerases reconhecem promotores completamente diferentes e podem ser usados seletivamente. Milhares de proteínas heterólogas já foram expressas com sucesso e em altos níveis em *E.coli* BL21(DE3) (Grossman et al 1998; Pan e Malcolm, 2000).

O gene da T7 RNA polimerase está na estirpe BL21(DE3) de *E.coli*, sob o controle de um promotor lac L8-UV5 (Grossman et al 1998; Pan e Malcolm, 2000). O lac L8-UV5 (figura 9) contém mutações pontuais que permite distingui-lo do promotor lac do tipo selvagem. Os pontos de mutações estão na região - 10, e aumentam a força do promotor e diminuem a sua dependência do AMP cíclico (Grossman *et al.*, 1998).

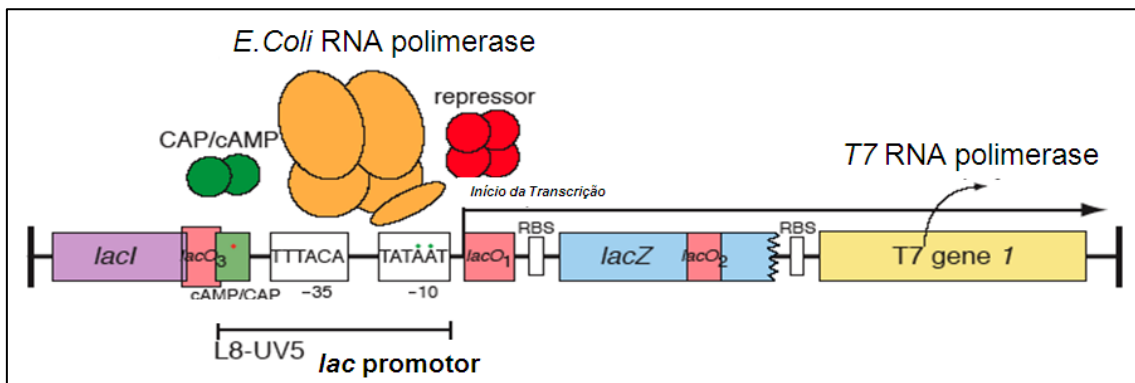


Figura 9. Esquema da transcrição da T7 RNA polimerase, sob controle do promotor *lac* L8-UV5. Adaptado do catálogo da Novagen.

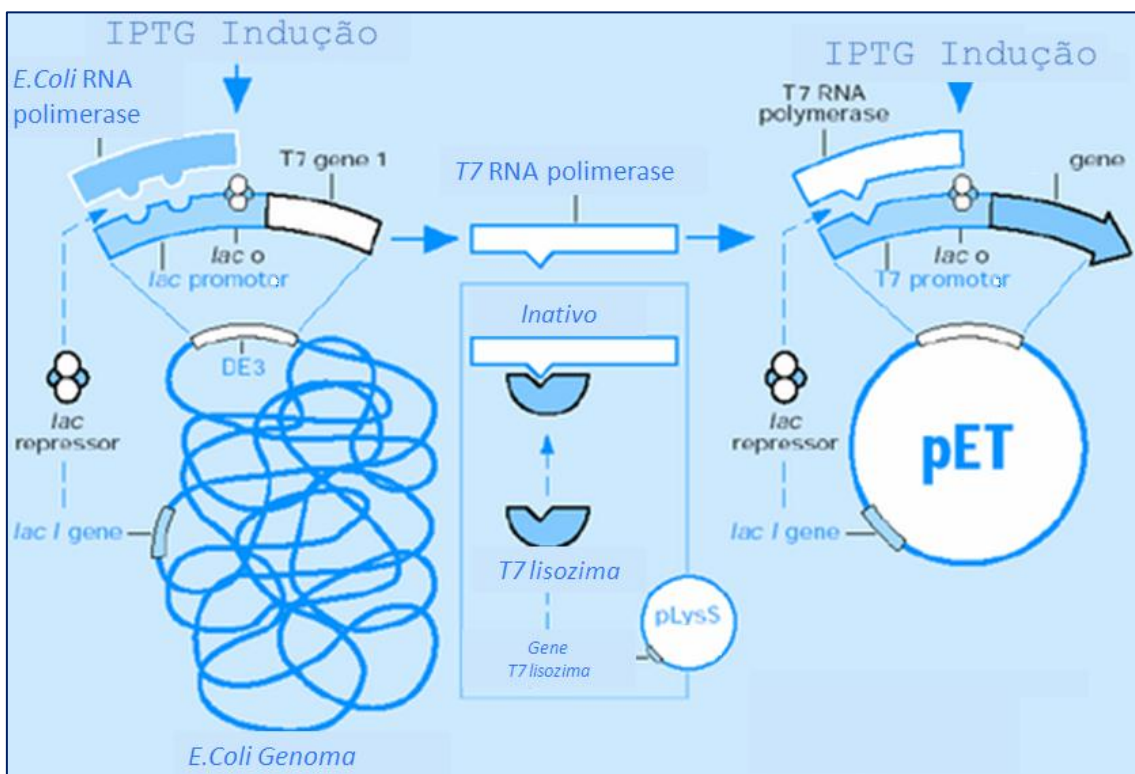


Figura 10. Esquema da expressão gênica de proteína heteróloga em vetor pET, utilizando como hospedeira E.coli BL21 (DE3)pLysS. Adaptado de Bell & Lewis, 2000.

Um terceiro ponto de mutação cria um forte promotor que é menos sensível à glicose (Grossman *et al.*, 1998). Isto permite a indução forte da T7 RNA polimerase com IPTG, mesmo na presença de glicose. No entanto, há expressão basal de T7 RNA polimerase para indução (Dubendorff & Studier 1991; Pan & Malcolm 2000), o que pode levar a problemas na expressão se as proteínas forem tóxicas para as células hospedeiras (Studier 1991). Uma

maneira de reduzir o nível basal de expressão é trabalhar com células hospedeiras contendo vetores pLysS ou pLsE. Esses vetores expressam a lisozima T7, um inibidor natural da T7 RNA polimerase (Moffatt & Studier, 1987). A T7 lisozima é um eficiente inibidor natural da T7 RNA polimerase, pois sua presença está envolvida na regulação da expressão gênica do bacteriófago λ durante sua via lisogênica (Ikeda & Bailey, 1992). O nível basal de BL21 comparado com BL21pLysS é aproximadamente dez vezes mais lento (Studier, 1991).

Um problema adicional é que a T7 lisozima é uma proteína bifuncional. Ela também corta uma ligação específica da camada de peptidoglicana da parede celular da célula de *E.coli*. Isto significa ser a razão da diminuição do crescimento celular em estirpes pLysS ou pLysE. Outro aspecto é que a T7 lisozima pode reduzir a expressão seguida de indução, resultando em um rendimento inferior (Studier, 1991).

A redução do nível basal da T7 RNAPolimerase pode também ser alcançado pela adição de 0,5 - 1,0% de glicose ao meio (Grossman *et al.*, 1998). Este efeito da repressão catabólica é muito mais forte para BL21 (DE3) do que para BL21 (DE3) pLys (Pan e Malcolm 2000).

2. Justificativa

A sequência de genomas de patógenos e parasitas tem permitido a identificação dos genes essenciais para a sobrevivência dos mesmos, e suas proteínas codificadas podem servir como alvos moleculares para a descoberta de novas drogas.

Apesar dos enormes esforços em pesquisa, a morbidade, mortalidade e as perdas econômicas geradas pela malária são substanciais. Um dos grandes obstáculos no controle da malária refere-se à aquisição de resistência de algumas cepas de *P. falciparum* aos antimaláricos comumente utilizados na terapêutica.

A malária é uma das mais importantes doenças parasitárias do mundo, apresentando como agente etiológico protozoários do gênero *Plasmodium*. Dados recentes apontam que aproximadamente 40% da população mundial está exposta à malária, especialmente os indivíduos que habitam países tropicais ou subtropicais. Nos últimos anos, observou-se uma crescente preocupação com o combate à doença. As estratégias de controle da infecção estão baseadas principalmente, no desenvolvimento de vacinas e medicamentos, assim como no avanço de políticas de erradicação do vetor, quimioprofilaxia e melhoria dos sistemas de saúde.

Faz-se necessário a constante busca de alvos moleculares alternativos para o desenvolvimento de antimaláricos suficientemente eficazes que contornem o fenômeno da resistência.

A enzima purificada HGPRT e ativa, será utilizada futuramente em estudos de *binding* e inibição com novos compostos químicos e/ou componentes de extratos de microrganismos e plantas amazônicas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Expressar em *E. coli*, purificar e caracterizar a enzima HGPRT do *P. falciparum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenhar a região estrutural do gene HGPRT, com códons preferenciais para *E. coli* e sítios para clonagem no vetor de expressão;
- Subclonar a região estrutural do gene no vetor de expressão pGS21a;
- Transformar *E.coli* com o plasmídeo recombinante, e induzir a expressão da proteína recombinante;
- Purificar e caracterizar a proteína recombinante (enzima HGPRT).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Linhagens de *E. coli*

Todas as linhagens celulares empregadas nesta pesquisa, relacionadas na tabela 01, foram estocadas a -80° C em meio LB, contendo 25% de glicerol.

Tabela 01. Linhagens e genótipos de *E.coli* utilizados no presente estudo.

Bactéria	Linhagem	Genótipo
<i>E.coli</i>	DH5 α f'Iq	EndA1, recA1, hsdR17, SupE44,gyrA96, thi-1,relA1,AlacU169
<i>E.coli</i>	Bl21 (DE3)pLysS	<i>F</i> - ompT gal dcm lon hsdSB (rB mB-) λ (DE3) pLysS (cmR)

4.2. Plasmídeo

Para expressão da enzima em bactéria *E. coli*, foi escolhido o plasmídeo pGS-21a (*GenScript*) (figura 11).

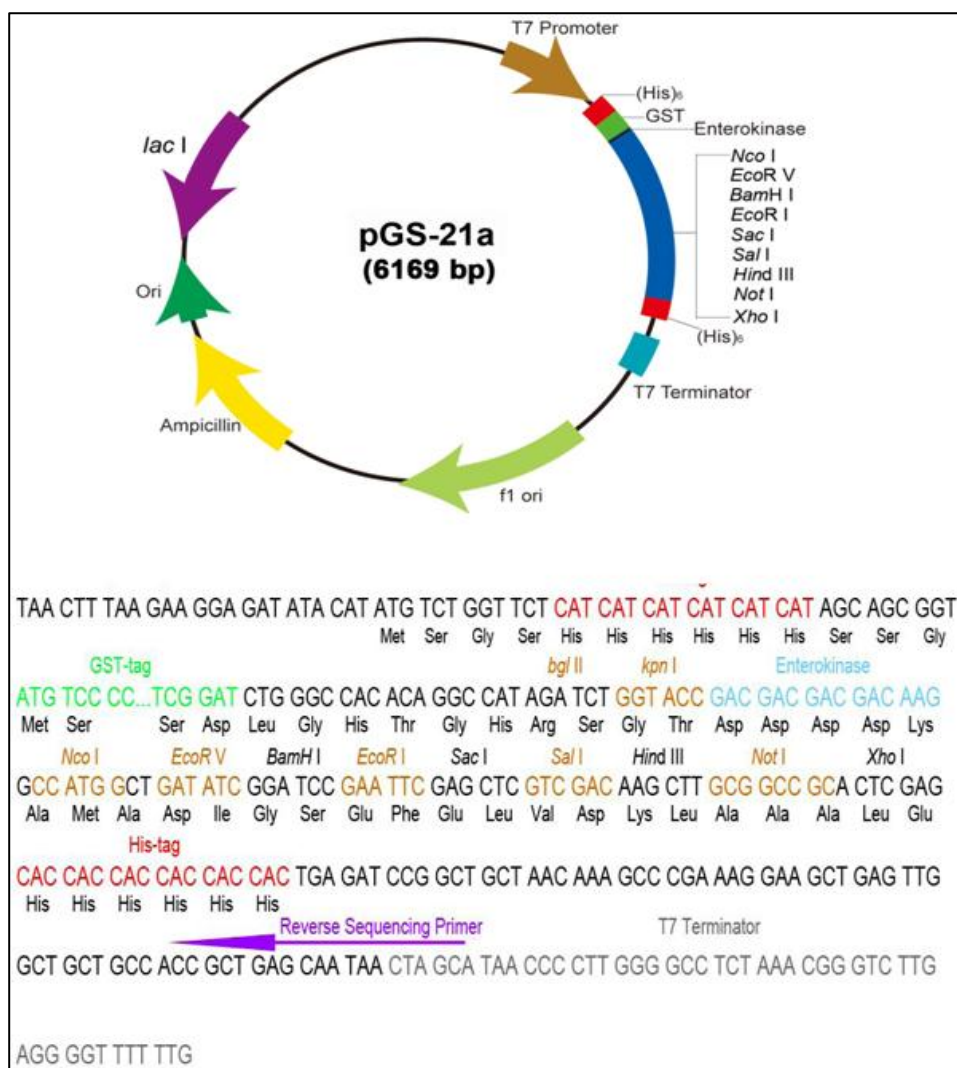


Figura 11. Representação esquemática do mapa físico do vetor pGS21a e do seu sítio múltiplo de clonagem.

4.3. Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram de grau analítico e compatível com o trabalho de biologia molecular. A água utilizada foi destilada e deionizada (água mili-Q).

Quando necessário as soluções foram esterilizadas a 120°C por 15 minutos.

4.4. Meios de cultura

A linhagem de *E. coli* foi cultivada em meio Luria Bertani líquido e meio LB sólido. As composições destes meios estão descritas na tabela 2.

Tabela 2- Meios de cultura utilizados e suas respectivas composições.

Meio LB (Luria Bertani) líquido	Triptona	10g\L
	Extrato de levedura	05g\L
	NaCl	5g\L
Meio LB (Luria Bertani) sólido	Triptona	10g\L
	Extrato de levedura	05g\L
	NaCl	5g\L
	Ágar	15g\L

4.5 Marcadores moleculares

O marcador para peso molecular de DNA utilizado neste estudo foi de 1kb Gene RulerTM Fermentas. O marcador de peso molecular para proteína empregado foi Page RulerTM Fermentas.

4.6 Síntese química da região estrutural do gene de HGPRT

4.6.1. Ferramentas de bioinformática

Utilizou-se como banco de dados, para a pesquisa de genes e sua sequência gênica os sites *Plasmodium Genomics* (<http://plasmodb.org/plasmo/>) e *Malaria Parasite Metabolic Pathways* ([http:// sites.huji.ac.il](http://sites.huji.ac.il)). A análise da sequência do gene clonado e a similaridade com humanos foram realizadas através do programa *Blast-p* (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>). A tradução e a massa molecular foram estimadas utilizando a ferramenta do site *Expasy* (<http://web.expasy.org/>). Para verificar o número de ligações dissulfeto presente na estrutura da

proteína foi utilizada a ferramenta Dianna (<http://bioinformatics.bc.edu>) e para a construção dos mapas físicos dos vetores o programa pDRAW32.

4.6.2 Região estrutural do gene para a enzima HGPRT

A região estrutural do gene da enzima HGPRT de *P. falciparum* foi produzido por síntese química com códons preferenciais de *E. coli* e clonado no vetor pUC57 (figura 12) pela empresa GeneScript. A sequência codificadora responsável possui sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *NotI*, além de sequências para a síntese de poli-histidina. Esta etiqueta codifica a formação de um bloco de seis histidinas em sequência.

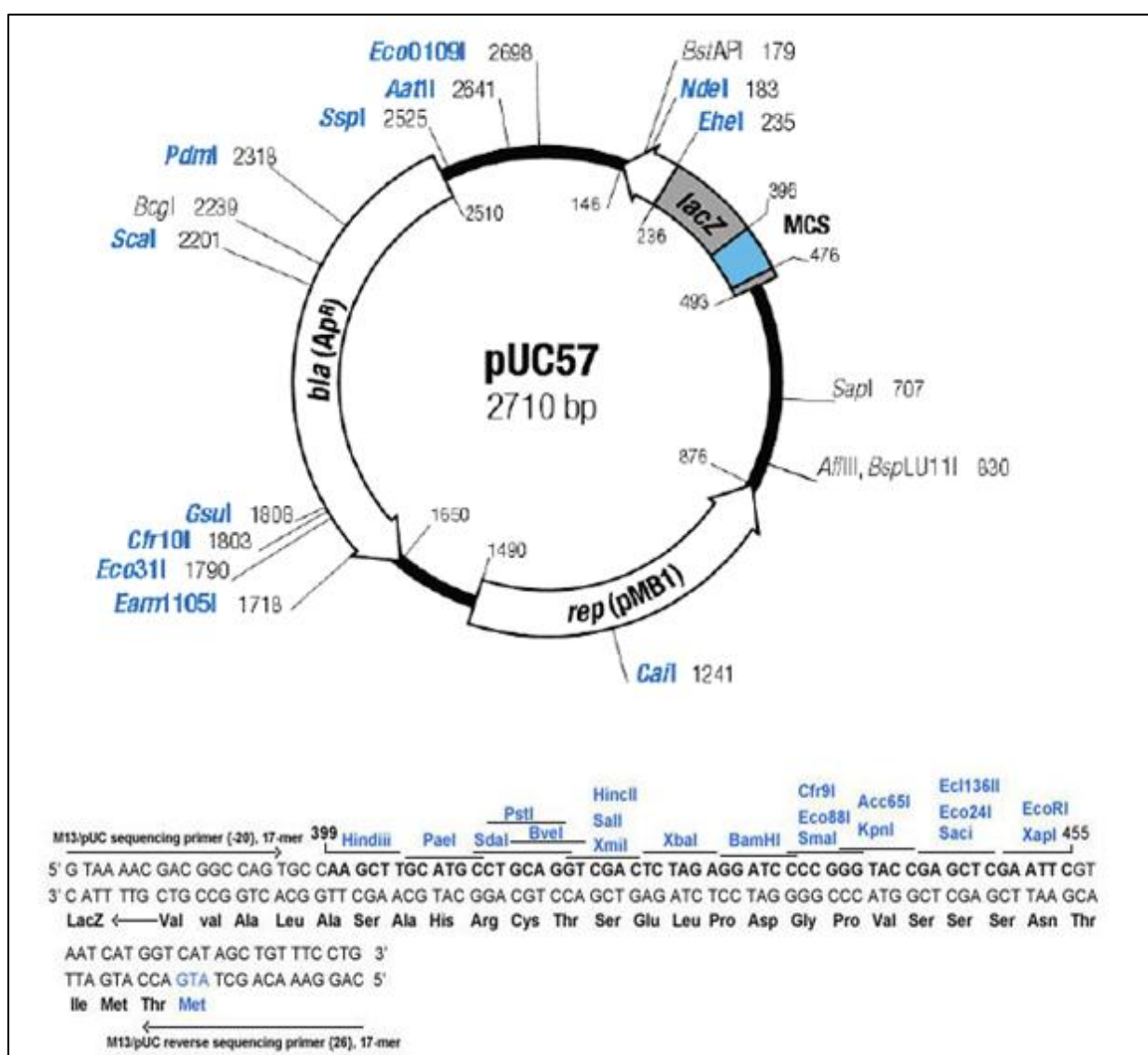


Figura 12. Mapa físico de Sítio múltiplo de clonagem do vetor pUC57.

4.7 Construção do plasmídeo recombinante pGSHP

4.7.1 Digestão do vetor de expressão pGS21a e pUC57

A sequência gênica da proteína HGPRT foi construído quimicamente pelo laboratório GenScript e enviado ao laboratório inserido em vetor pUC57 liofilizado na quantidade de 4 µg. Foi adicionado 50 µL de água deionizada e estéril ao plasmídeo para estoque -80°C.

Para construção do vetor de expressão o plasmídeo pGS21a e pUC57 foram digeridos duplamente com as enzimas de restrição *NdeI* (Biolabs) e *NotI* (Biolabs), com tampão 3, de acordo com as recomendações do fabricante. Os sistemas de digestão foram compostos pelos vetores com DNA alvo, enzimas de restrição, tampões que melhor interagem com as duas enzimas e água deionizada estéril. A concentração do material utilizado variou entre 500 ng e 5 ng e o sistema foi incubado em banho seco a 37°C por 2 h.

O produto das digestões foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% preparado com tampão TBE 1X e corado com brometo de etídio. A região do gel que continha o fragmento de interesse foi cortada e submetida à purificação utilizando o *kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) seguindo suas especificações para proceder posteriormente a subclonagem da sequência gênica de HGPRT no vetor pGS21a e construção do plasmídeo recombinante pGSHP.

4.7.2 Subclonagem da sequência gênica HGPRT no vetor de expressão pGS21a (montagem do vetor pGSHP para expressão em E. coli)

A sequência gênica da proteína HGPRT purificada foi clonada no múltiplo sítio de clonagem do vetor pGS21a entre os sítios de restrição *NdeI* e *NotI*.

O sistema de ligação foi realizado na proporção de 1:3 (vetor/inserto). O volume do sistema de ligação foi de 10 µL e a quantidade de enzima T4 DNA ligase 40 U. Nos ensaios de ligação utilizou-se enzima T4 DNA ligase e tampão 10x de ligação, proveniente da empresa *New England Biolabs Inc.*, que recomenda incubação a 16°C. O sistema foi incubado durante 16h. O produto da ligação foi introduzido em células *E.coli* DH5α por eletroporação.

4.7.3 Preparo de células *E.coli* eletrocompetentes

Para esta etapa foram cultivadas células de *E.coli*, comerciais e eletrocompetentes, DH5 α f λ q (Invitrogen) e BL21(DE3)pLysS (Promega). Para isso, uma única colônia da bactéria foi inoculada em 20 mL de meio LB e a cultura foi incubada com agitação de 150 rpm em *shaker* a 37 ° durante 16 h.. Foi inoculada 1 mL dessa cultura em 300 mL de meio LB (sem antibióticos) e mantido em constante agitação até ser atingida a O.D₆₀₀ 0.5. O frasco foi esfriado em gelo durante 1 hora e a cultura dividida em tubos de 50 mL que foram centrifugados à 3.500 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas gentilmente até dissolver o *pellet* em 10 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Uma nova centrifugação foi realizada a 3.500 g por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado novamente em 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. Estas etapas foram repetidas mais 4 vezes. Ao final o *pellet* foi ressuspensado em 15 mL de glicerol 10% gelado e estéril, centrifugado e ressuspensado em 1 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As células eletrocompetentes foram aliqüotadas em 100 μ L, e estocadas em freezer a -80 °C.

4.7.4 Transformação da hospedeira

A transformação por eletroporação ocorre por meio de descargas elétricas de alta voltagem que atravessam uma suspensão bacteriana por mili segundos, criando poros na parede e na membrana celular, possibilitando a entrada do DNA exógeno para dentro da célula hospedeira.

Uma alíquota de solução contendo o plasmídeo recombinante de interesse (1 μ L $\pm$ 50ng) foi misturada a 100 μ L de células eletrocompetentes e transferidos para a cubeta de eletroporação (0,2cm). Foi aplicado um pulso elétrico de 1900 Volts em aparelho de eletroporação (Mod. Eletroporador 2510 Eppendorf). Imediatamente após o pulso, foi adicionado 1000 μ L de meio LB na cubeta, revigorando as células transformadas. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C com agitação (150 rpm). Em seguida, alíquotas foram plaqueadas em placas de Petri com meio LB-ágar contendo o antibiótico ampicilina (200 μ g/mL). Ao final do plaqueamento, as placas de Petri foram incubadas invertidas a 37°C durante 16 h.

4.7.5 Identificação da sequência gênica da proteína HGPRT no plasmídeo recombinante por análise de restrição

Após o procedimento de transformação bacteriana do plasmídeo recombinante pGSHP, foi realizado o crescimento celular bacteriano. Inoculou-se uma colônia bacteriana, resultante da transformação, em meio LB líquido durante 16 h. Foi realizado posteriormente à extração do DNA plasmidial, utilizando-se o *Kit Ilustra plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare), seguindo suas especificações. Os plasmídeos extraídos foram analisados por digestão dupla com enzimas *NotI* e *NdeI* (New England Biolabs) para a confirmação da presença do inserto no plasmídeo recombinante pGSHP.

4.7.6 Transformação em *E. coli* Bl21(DE3)pLysS do plasmídeo recombinante pGSHP

Para a expressão do gene HGPRT presente no plasmídeo recombinante pGSHP recém construído foi necessário inicialmente inserir este em uma célula eletrocompetente e específica para expressão. Foi utilizado a linhagem bacteriana Bl21 (DE3) pLysS para expressão em promotores baseados em fago T7, o qual é promotor do plasmídeo recombinante pGSHP.

Os procedimentos utilizados para a transformação do vetor foram idênticos aos citados no item 4.7.4.

4.7.7 Expressão da proteína recombinante

Uma colônia carregando o plasmídeo recombinante foi pré-inoculada em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100µg/mL) e incubada a 37°C sob agitação (150rpm) durante 16 h. Um inóculo líquido (30 mL) foi preparado com 5% do pré-inóculo (5 mL) e submetido a crescimento, a 37°C sob agitação (150rpm) , até atingir DO de 0,6 a 600nm. Uma alíquota do inóculo foi retirada (tempo zero de indução) e outra para estoque em glicerol. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG (isopropil tiogalactosídeo) numa concentração final de 1 mM para a indução da expressão gênica. Foram retiradas alíquotas da cultura a cada 4 horas e as amostras coletadas foram centrifugadas à 13.000g por 2 minutos e o *pellet* estocado a -20° C (figura 13).

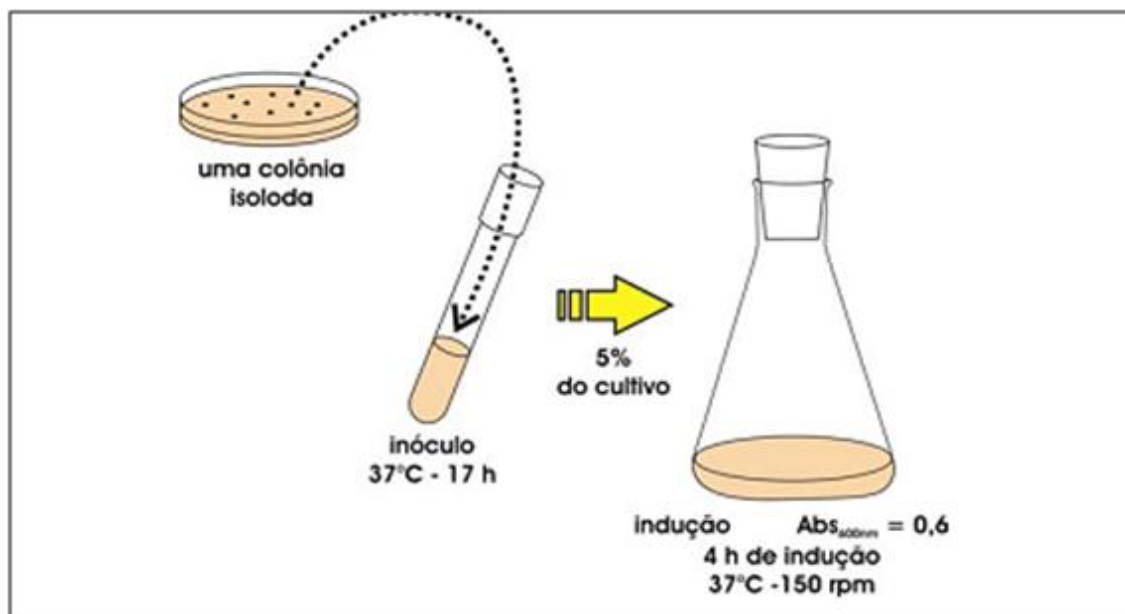


Figura 13. Esquema ilustrando a metodologia de expressão

4.7.8 Obtenção dos extratos de proteínas, solúveis e insolúveis.

Inicialmente o sedimento foi ressuspensionado em 1000 µl de tampão MCA (20mM Tris-HCl pH 7.9; 0.5 M NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF(feilmetilsulfonil fluoride) utilizando-se vórtex. Foram adicionados 10 µl de lisozima (20mg/ml) e a mistura incubada durante 10 minutos a 20°C. A amostra foi transferida ao gelo e ultrassonicada três vezes (3 ciclos de ultrason). Após este procedimento foram adicionados 4 µl de triton X-100 10% (v/v). As preparações foram centrifugadas a 12.000g durante 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante corresponde à fração de proteínas solúveis e o sedimento às insolúveis. Para análise das frações em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, a fração solúvel foi coletada e estocada a -20 °C e a fração insolúvel foi ressuspensionada em 400µl de tampão MCA e 4 µl de triton X- 100.

4.8 Avaliação da expressão.

4.8.1 Análise da proteína recombinante em gel de SDS-PAGE

A proteína recombinante solúvel e insolúvel foi analisada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). As amostras solúveis e insolúveis da proteína recombinante foram ressuspensas em 20 µL de tampão de amostra de eletroforese 1X para SDS-PAGE (200 mM Tris pH 6.8; 0.1% de azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β-mercaptoetanol; 20% glicerol v/v) e as amostras foram fervidas em banho maria durante 5 minutos e imediatamente incubadas em gelo até a aplicação no gel. As amostras foram aplicadas em um sistema de gel concentrador de 5% e separador 12%. A eletroforese foi realizada durante 2 horas a uma voltagem de 150 V. Após a eletroforese as proteínas desnaturadas foram coradas com a solução de Azul Brilhante de *Comassie*.

4.8.2 Coloração de proteínas por Azul Brilhante de Coomassie G250

Após a eletroforese o gel foi incubado durante a noite em uma solução de *Comassie* coloidal que tem a capacidade de detectar proteínas e é constituída de 0,1% de *Coomassie* G250 p/v, ácido fosfórico 2% v/v, sulfato de amônio 10% p/v e metanol 20% v/v. Após o período de incubação o gel foi imerso em água ultra pura para perder o excesso de corante até atingir um contraste desejado para capturar a imagem via *scanner*.

4.9 Quantificação da proteína

A concentração de proteínas foi determinada através do método de Bradford, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976).

Para o preparo da solução de Bradford, 10 mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 foram solubilizados em 5 mL de etanol 95%. Após completa homogeneização, adicionaram-se 10 mL de ácido fosfórico 85%, e o volume foi completado com água ultrapura até 100 mL. Posteriormente, esta solução foi filtrada em papel 3 MM e estocada ao abrigo da luz.

Para a dosagem de proteínas foram utilizados 850 µL da solução de Bradford mais 50 µL da amostra diluída, sendo a leitura feita em espectrômetro Termo[®] Biomate³ a 595 nm.

4.10 Purificação da proteína HGPRT de *P. falciparum*

A proteína de interesse solúvel em tampão MCAC (20 mM Tris-HCl pH 7.9; 0.5 M NaCl; 10% glicerol; 1 mM PMSF(fenilmetilsulfonil fluoride) pH 8.0, foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de 5 mL de resina de níquel-NTA(Quiagen, Valencia, C.A, Pierce) (Petty 1996) (figura 14).

A coluna foi previamente lavada com água mili-Q, para retirar o álcool da coluna. Após este procedimento foi aplicado 2 mL de tampão MCAC, para equilibrar a coluna. A amostra contendo a proteína recombinante foi aplicada à coluna. Em seguida a coluna foi lavada com tampão MCAC, e posteriormente foi aplicado um gradiente de Imidazol (10-500 mM) à coluna de níquel para a eluição das proteínas ligadas à resina, e em especial a proteína de interesse. As frações foram coletadas e as alíquotas analisadas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e quantificadas pelo método de Bradford.

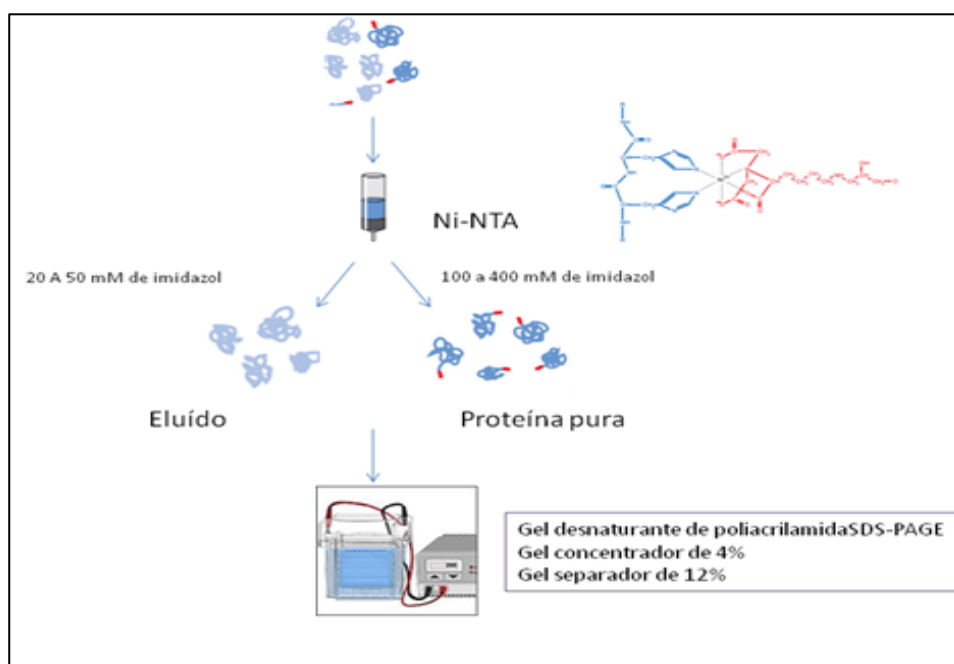


Figura 14. Esquema de purificação utilizando resina de níquel. Adaptado do catálogo da Quiagen.

4.11 Troca de tampão da amostra purificada

Foram submetidos 2 mL das amostras com 90-100% purificadas para concentração por ultrafiltração utilizando microconcentradores Centricon com membrana de exclusão igual a 10 kDa, durante aproximadamente duas horas a 4° C.

Ao sobrenadante foram adicionados 2 µL de tampão de amostra (100 mM fosfato de potássio, 1 mM DTT e 20% de glicerol).

4.12 Atividade da enzima HGPRT.

A atividade enzimática de HGPRT para ao substrato hipoxantina foi determinada pelo método espectrofotométrico (UV-1650 PC-Shimadzu) a 245 nm. A variação da absorbância era devida à formação do produto de reação IMP. No cálculo de atividade utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\Delta\epsilon$ ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) 2,2 para hipoxantina (Tuttle & Krenitsky, 1980). O ensaio foi realizado em meio reacional com volume final de 1 mL, sendo tampão 0.1M Tris-HCl, 12 mM MgCl_2 , pH 7,45 a 25°C. Soluções estoque de PRPP foram preparadas em água. A base purínica (Hipoxantina) também foi dissolvida em água.

O sistema de reação enzimático continha 1 mL de tampão, 50 µL de 20 mM PRPP, 30 µL de 2 mM de hipoxantina e enzima.

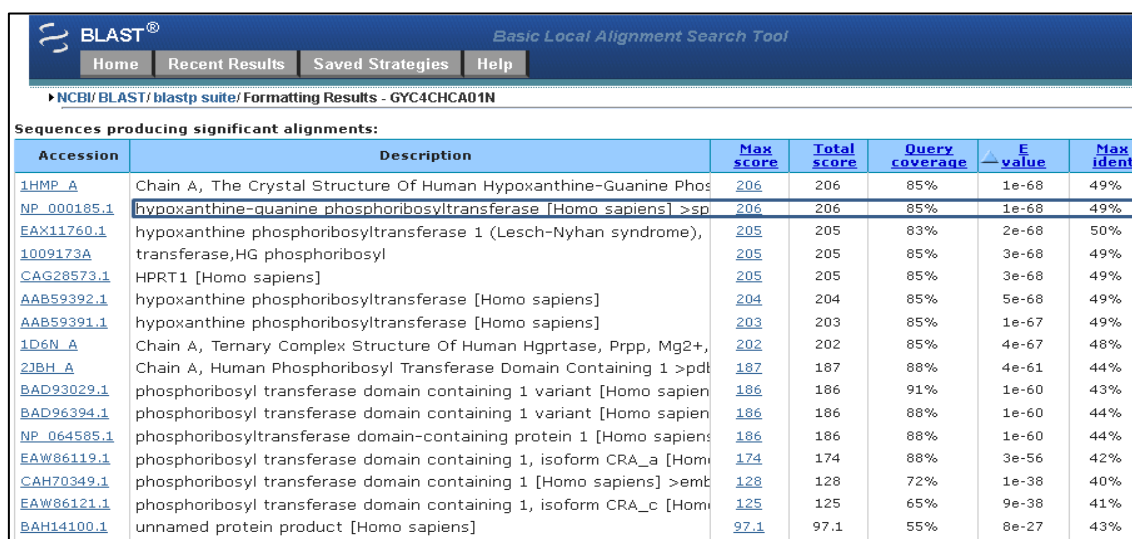
Foram testados vários volumes (µL) da enzima purificada (0,3,6,7 e 8), para verificar a atividade em diferentes concentrações de enzima.

5. Resultados e Discussão

5.1 Desenho *in silico* da sequência gênica para HGPRT e sua otimização para *E.coli*

Gardner *et al* (2002) identificou o gene da HGPRT de *P. falciparum* (ID 810279) presente no cromossomo 10 com o símbolo PF10_0121. A partir dos dados publicados pelo autor, foi possível verificar a similaridade da sequência com a enzima humana (figura 15).

Inicialmente, foi adicionado a região estrutural do gene, sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *NotI*, uma região de aminoácidos que codificam a cauda de histidina (His)₆ e um sítio para a enzima proteolítica enteroquinase, caso houvesse necessidade de retirar a cauda de histidina em alguma etapa dos experimentos (figura 16). Posteriormente, esta sequência gênica foi otimizada para códons preferencias da bactéria *E. coli*, sintetizada quimicamente pela Empresa *GenScript* e inserida na região dos múltiplos sítios de clonagem do vetor pUC57(figura 17).



Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
1HMP_A	Chain A, The Crystal Structure Of Human Hypoxanthine-Guanine Phos	206	206	85%	1e-68	49%
NP_000185.1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase [Homo sapiens] >sp	206	206	85%	1e-68	49%
EAX11760.1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome),	205	205	83%	2e-68	50%
1009173A	transferase,HG phosphoribosyl	205	205	85%	3e-68	49%
CAG28573.1	HPRT1 [Homo sapiens]	205	205	85%	3e-68	49%
AAB59392.1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase [Homo sapiens]	204	204	85%	5e-68	49%
AAB59391.1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase [Homo sapiens]	203	203	85%	1e-67	49%
1D6N_A	Chain A, Ternary Complex Structure Of Human Hgprtase, Prpp, Mg2+,	202	202	85%	4e-67	48%
2JBH_A	Chain A, Human Phosphoribosyl Transferase Domain Containing 1 >pd	187	187	88%	4e-61	44%
BAD93029.1	phosphoribosyl transferase domain containing 1 variant [Homo sapien	186	186	91%	1e-60	43%
BAD96394.1	phosphoribosyl transferase domain containing 1 variant [Homo sapien	186	186	88%	1e-60	44%
NP_064585.1	phosphoribosyltransferase domain-containing protein 1 [Homo sapiens	186	186	88%	1e-60	44%
FAW86119.1	phosphoribosyl transferase domain containing 1, isoform CRA_a [Homi	174	174	88%	3e-56	42%
CAH70349.1	phosphoribosyl transferase domain containing 1 [Homo sapiens] >emb	128	128	72%	1e-38	40%
FAW86121.1	phosphoribosyl transferase domain containing 1, isoform CRA_c [Homi	125	125	65%	9e-38	41%
BAH14100.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	97.1	97.1	55%	8e-27	43%

Figura 15. Resultado da busca com o programa *BLAST*. Em azul a similaridade em porcentagem, entre a sequência da enzima HGPRT de humanos com a sequência de *P. falciparum*.

CATATG	TCTG	GTTCT	CATCA	CCATCACCAT	CACAGCGGTA	CCGACGATGA	CGATAAA
ATGCCAATAC	CAAATAATCC	AGGAGCTGGT	GAAAATGCCT	TTGATCCCGT	TTTCGTAAAG		
GATGACGATG	GTTATGACCT	TGATTCTTTT	ATGATCCCTG	CACATTATAA	AAAATATCTT		
ACCAAGGTCT	TAGTTCCAAA	TGGTGTCTATA	AAAAACCGTA	TTGAGAAATT	GGCTTATGAT		
ATTAAAAAGG	TGTACAACAA	TGAAGAGTTT	CATATTCTTT	GTTTGTTGAA	AGGTTCTCGT		
GGTTTTTTTCA	CTGCTCTCTT	AAAGCATTTA	AGTAGAATAC	ATAATTATAG	TGCCGTTGAG		
ACGTCCAAAC	CATTATTTGG	AGAACACTAC	GTACGTGTGA	AATCCTATTG	TAATGACCAA		
TCAACAGGTA	CATTAGAAAT	TGTAAGTGAA	GATTTATCTT	GTTTAAAAGG	AAAACATGTA		
TTAATTGTTG	AAGATATTAT	TGATACTGGT	AAAACATTAG	TAAAGTTTTG	TGAATACTTA		
AAGAAATTG	AAATAAAAAC	CGTTGCCATC	GCTTGTCTTT	TTATTAAAAG	AACACCTTTG		
TGGAATGGTT	TTAAAGCTGA	TTTCGTTGGA	TTCTCAATTC	CTGATCACTT	TGTTGTTGGT		
TATAGTTTAG	ACTATAATGA	AATTTTCAGA	GATCTTGACC	ATTGTTGTTT	GGTTAATGAT		
GAGGGAAAAA	AGAAATATAA	AGCAACTTCA	TTATAAGCGG	CCGC			

Figura 16. Sequência gênica modificada *in silico* para HGPRT de *P. falciparum*. Em verde sítio de restrição para a enzima *Nde*I, em rosa sequência codificadora de seis caudas de histidina, em vermelho sítio para a enzima proteolítica enteroquinase e em amarelo sítio de restrição para a enzima *Not*I.

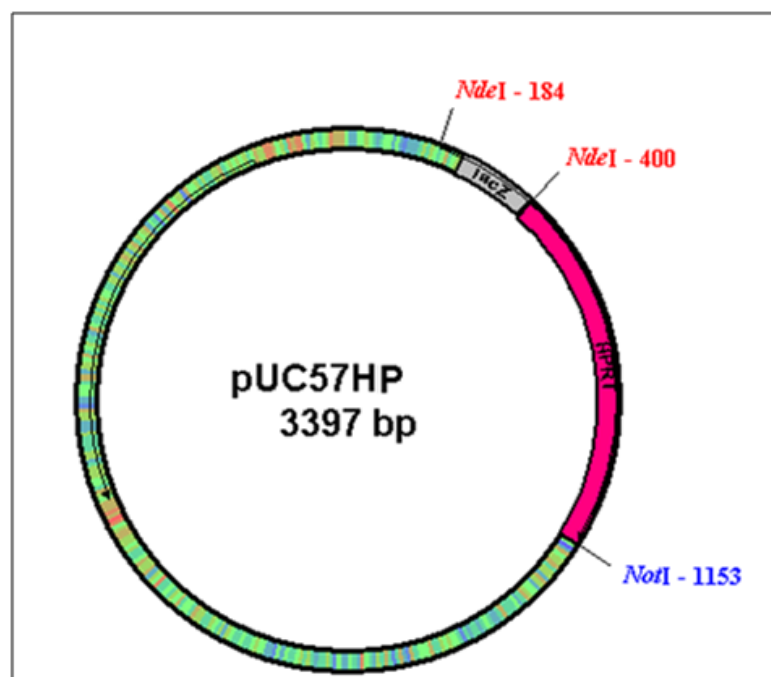


Figura 17. Mapa físico do plasmídeo recombinante pUC57HP construído pela empresa *GeneScript*, contendo a clonagem da sequência do gene HGPRT.

5.1 Construção do plasmídeo recombinante de expressão pGSHP

A região estrutural do gene HGPRT sintetizada quimicamente foi clonada no vetor pUC57, pela empresa *GeneScript*, e o mapa do plasmídeo recombinante resultante denominado pUC57HP está mostrado na figura 17.

Para a expressão da mensagem genética da enzima HGPRT na bactéria *E.coli* foi utilizado o vetor de expressão pGS21A. A mensagem genética da HGPRT foi liberada do vetor pUC57HP por dupla digestão com *NdeI* e *NotI*, purificada por eletroforese em gel de agarose e ligada ao vetor de expressão pGS21a previamente tratado com as mesmas enzimas e também purificado por eletroforese em gel de agarose.

A mensagem genética de HGPRT possui aproximadamente 750 pb. A clivagem do plasmídeo recombinante pUC57HP com as enzimas *NdeI* e *NotI*, liberou dois fragmentos, como demonstrado na figura 18 coluna 3, um de aproximadamente 750 pb e outro de 300 pb.

O fragmento liberado de 750 pb era o esperado para o a região codificadora do gene de HGPRT. O segundo fragmento liberado de aproximadamente 300 pb, foi resultante da presença de dois sítios de restrição da enzima *NdeI* no plasmídeo recombinante pUC57HP, após a inserção da sequência gênica ao vetor (vide também figura 17).

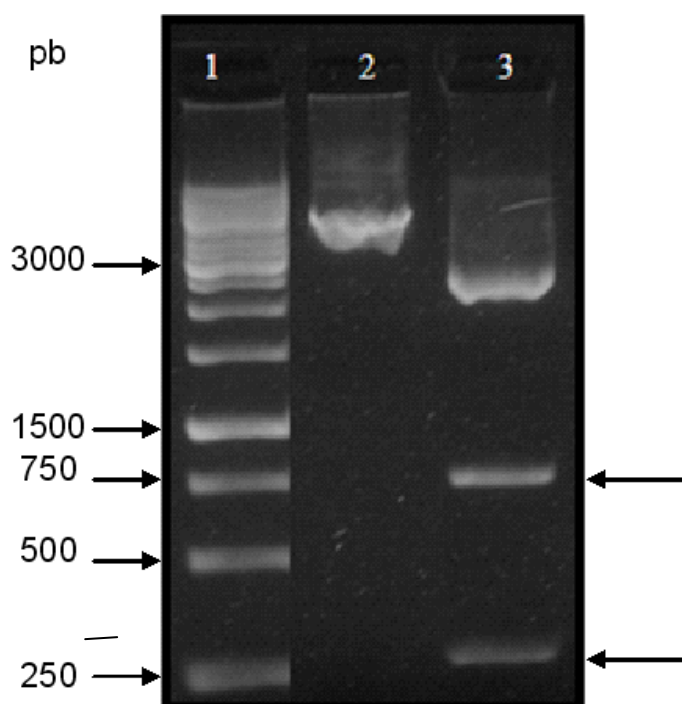


Figura 18. Perfil eletroforético dos produtos de digestão do plasmídeo pUC57HP. Coluna 1- Marcador de peso molecular; 2 – Vetor pUC57HP; 3- Vetor pUC57HP digerido com *NdeI* e *NotI*.

A clivagem dupla do vetor pGS21a foi demonstrada por eletroforese em gel de agarose (figura 19). Pode-se observar pela figura o vetor pGS21a linearizado o qual foi recortado do gel e purificado para ser utilizado na clonagem da mensagem genética da enzima HGPRT.

É possível verificar na figura 19, coluna 2 e 3 que após a digestão dupla do vetor pGS21a ocorreu a linearização do vetor. Também houve a liberação de um fragmento de aproximadamente 3000 pb que não foi recortado para purificação. Esse fragmento corresponde à região estrutural do gene da corismato sintase clonada anteriormente no vetor pGS21a (Honda, E. - resultado ainda não publicado).

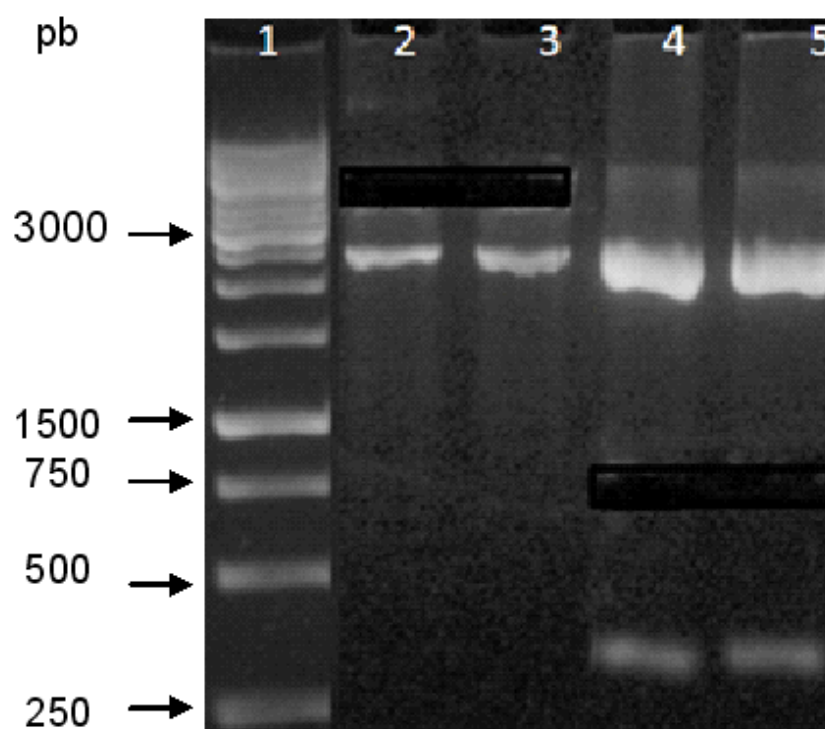


Figura 19. Fotografia do gel de agarose após a retirada das bandas correspondentes ao vetor pGS21a e região codificadora do gene HGPRT para *P.falciparum*. Coluna 1- Marcador de peso molecular; 2 e 3- Vetor pGS21a; 4 e 5- Vetor pUC57HP digerido com *NdeI* e *NotI*.

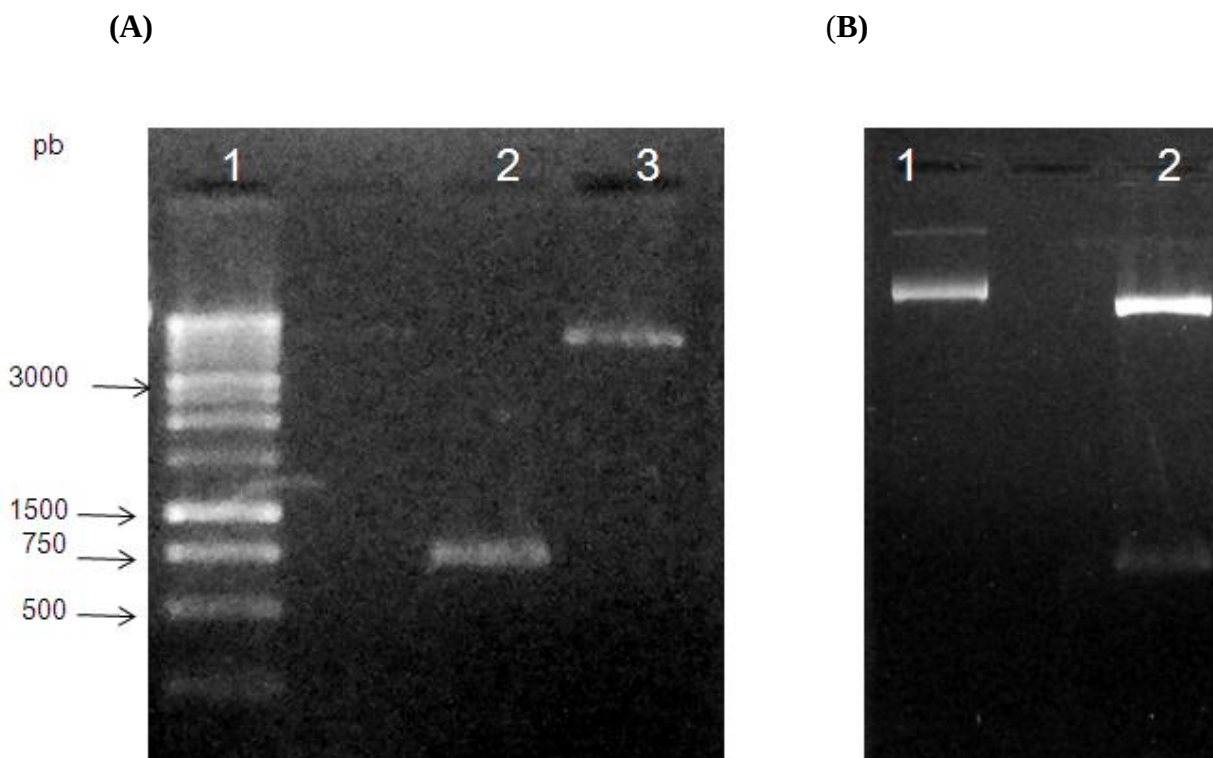


Figura 20. (A) Resultado da análise eletroforética do vetor e da sequência da HGPRT purificados após dupla digestão com *NdeI* e *NotI*. Coluna 1- Marcador de peso molecular; 2 -Sequência codificadora do gene da HGPRT; 3 – Vetor pGS21a. (B) Resultado da análise de restrição do plasmídeo recombinante pGSHP. Coluna 1– Plasmídeo pGSHP intacto; 2- plasmídeo duplamente digerido com *NdeI* e *NotI*.

Na figura 20(A) é observado o perfil eletroforético do plasmídeo pGS21a tratado com as enzimas de restrição *NdeI* e *NotI* (coluna 3) e purificado por eletroforese em gel, que será ligado ao fragmento sintético do gene de HGPRT. Na coluna 2 é observado este fragmento purificado.

Após a ligação da região codificadora de HGPRT ao vetor de expressão pGS21a, foi feita a análise de restrição do plasmídeo recombinante pGSHP para demonstrar a correta clonagem do inserto. De acordo com a figura 20(B) é possível verificar a liberação de um fragmento correspondente à sequência codificadora da enzima HGPRT, após dupla digestão com as enzimas *NdeI* e *NotI*. Após a confirmação da clonagem, o plasmídeo recombinante foi utilizado para experimentos de expressão gênica em *E.coli* B121.

A figura 21 mostra o mapa físico do plasmídeo resultante da ligação do vetor pGS21a a sequência codificadora da enzima HGPRT.

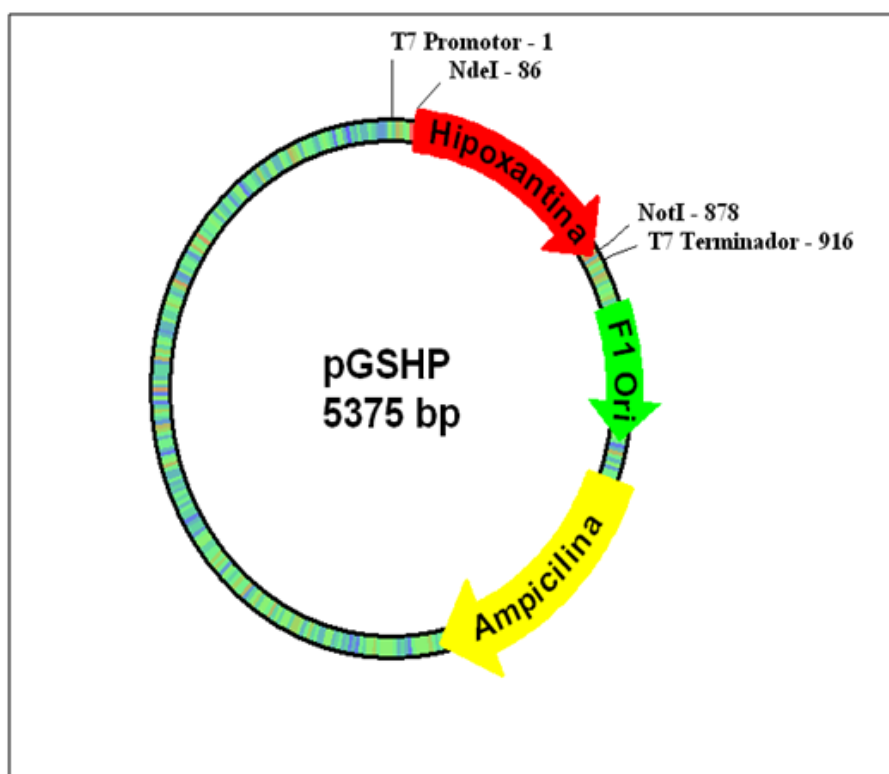


Figura 21. Mapa do plasmídeo recombinante construído pela ligação da região codificadora do gene da enzima HGPRT de *P.falciparum* ao vetor pGS21a.

5.2 Expressão heteróloga da proteína HGPRT de *P. falciparum* em *E.coli* em meio líquido.

A expressão da HGPRT de *P.falciparum* em *E.coli* BL21(DE3)pLysS foi realizada em meio LB líquido durante quatro horas a 37°C com indução por IPTG.

A expressão eficiente da proteína recombinante pode ser observada na figura 22 coluna 5 (seta vermelha), na fração solúvel induzida por 4 h com IPTG. Essa banda deve ser correspondente à enzima HGPRT uma vez que não foi expressa nos controles (colunas 1, 2, 3, 4) e tem massa molecular de aproximadamente 28 kDa, conforme esperado pois sua massa molecular teoricamente a partir da sequência de aminoácidos é de 258,381 kDa. A análise processou-se por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, com detergente de dodessil-sulfato de sódio (SDS-PAGE).

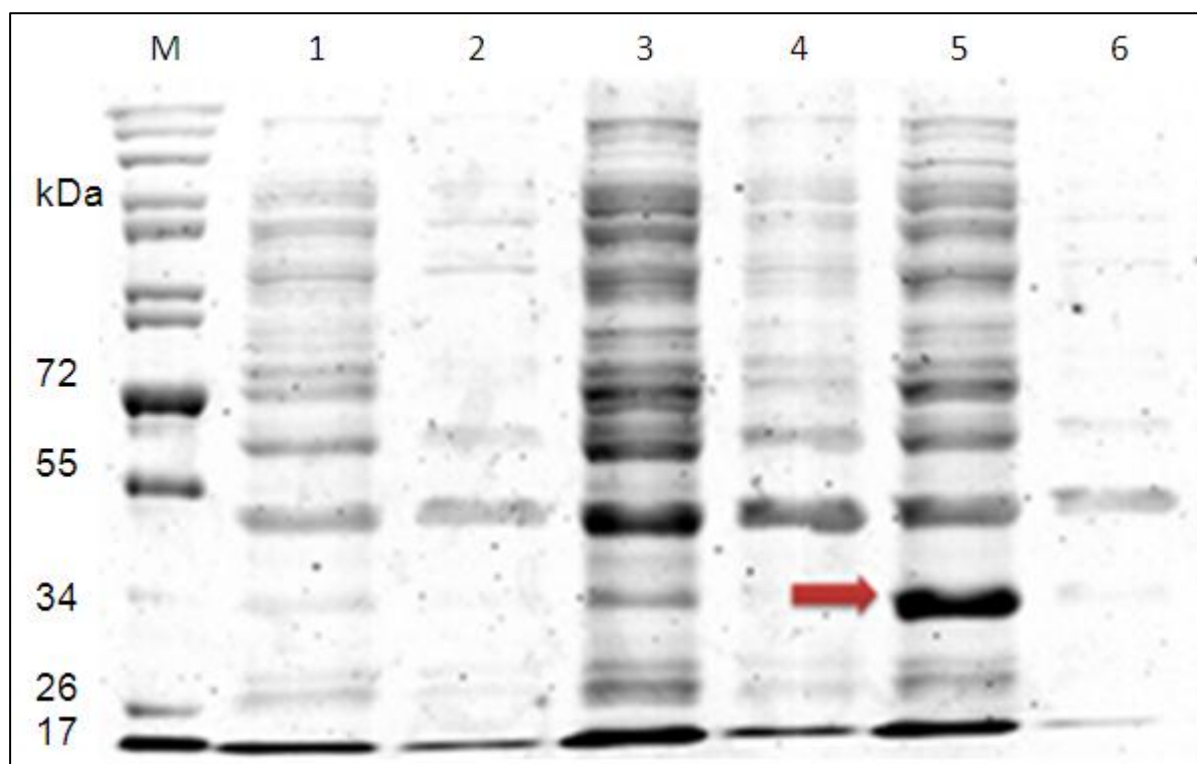


Figura 22. Perfil eletroforético das proteínas produzidas pelo clone recombinante (*E.coli* (BL21(DE3) pLysS + pGSHP). M - marcador de peso molecular. 1- tempo de expressão zero, fração solúvel do lisado celular, 2- tempo de expressão zero, fração insolúvel do lisado celular, 3- tempo de expressão de quatro horas sem IPTG, fração solúvel, 4- tempo de expressão de quatro horas sem IPTG, fração insolúvel, 5- tempo de expressão de quatro horas com IPTG, fração solúvel, 6- tempo de expressão de quatro horas com IPTG, fração insolúvel.

O fato de a enzima HGPRT ter sido expressa na forma solúvel além de facilitar o processo de purificação, é um indicativo de que está com sua estrutura tridimensional correta.

A proteína HGPRT, possui apenas duas pontes de sulfeto em sua estrutura, conforme observado na ferramenta de bioinformática *Dianna*. Este pode ser um dos motivos de que neste trabalho, a enzima tenha sido expressa pela hospedeira *E.coli* de forma solúvel.

Foi possível expressar a proteína HGPRT solúvel neste trabalho mas, algumas dificuldades podem ser encontradas quando a utilização de *E.coli* como hospedeira para a síntese de proteínas recombinantes. A *E.coli* pode não enovelar a proteína corretamente e geralmente é incapaz de sintetizar as ligações dissulfeto presentes em muitas proteínas recombinantes, pois não possui em seu citoplasma a enzima dissulfeto isomerase (Sorensen, 2005). Se a proteína não adota a sua estrutura terciária com enovelamento correto, ela geralmente fica insolúvel e forma corpos de inclusão no interior da bactéria. A recuperação da

proteína a partir de corpúsculos de inclusão é possível, mas a sua conversão na forma corretamente enovelada é um processo laborioso (Brown 2003).

Nestas condições foi possível produzir 100 mg de extrato bruto a cada 2 mL de cultura celular e não houve dificuldades em expressar a proteína de interesse na forma solúvel. Outros autores que também já trabalharam com esta proteína relataram que não apresentaram dificuldade em expressar esta enzima em sua forma solúvel (Keough *et al.*, 1998; Raman *et al.*, 2005, Keough *et al.*, 2010)

5.3 Purificação da proteína recombinante HGPRT

A HGPRT foi purificada por cromatografia de afinidade com resina de níquel, pois a proteína recombinante HGPRT, foi construída com a inserção de uma cauda de histidina (His₆) que possui afinidade ao níquel.

A enzima recombinante foi purificada a partir de 2 mL de extrato bruto solúvel, resultante do cultivo de 30 mL de meio líquido (LB) inoculado com o clone recombinante (*E.coli* e plasmídeo recombinante pGSHP). Na a figura 23 é possível verificar que foi possível purificar a proteína de interesse. A proteína foi purificada utilizando o tampão de eluição com imidazol na concentração de 400 mM, apesar de que nas concentrações de 200 a 300 mM de imidazol também foi possível verificar a eluição da enzima da coluna parcialmente purificada. Em outras concentrações do tampão de eluição não houve liberação da proteína de interesse, este fato indica que não houve saturação da coluna com a proteína recombinante.

As concentrações de proteínas purificadas das frações de interesse foram estimadas pelo método de Bradford. Os resultados estão mostrados na Tabela 3. A partir do extrato bruto de 23 mg foi possível purificar 0,46 mg de enzima.

Tabela 3. Quantidade de proteínas (mg) obtidas no processo de purificação, nas diferentes frações.

Frações	Concentrações de Proteínas (mg/mL)	Quantidade de Proteína (mg)
Extrato bruto solúvel (proteínas totais)	13,01	26,02
Proteínas não ligantes à coluna de níquel	3,21	6,42
Proteínas liberadas utilizando 100 mM de imidazol	6,38	12,76
Proteínas liberadas utilizando 200 mM de imidazol	2,11	4,22
Proteínas liberadas utilizando 250 mM de imidazol	0,31	0,62
Proteínas liberadas utilizando 300 mM de imidazol	1,00	2,0
Proteínas liberadas utilizando 400 mM de imidazol	0,23	0,46

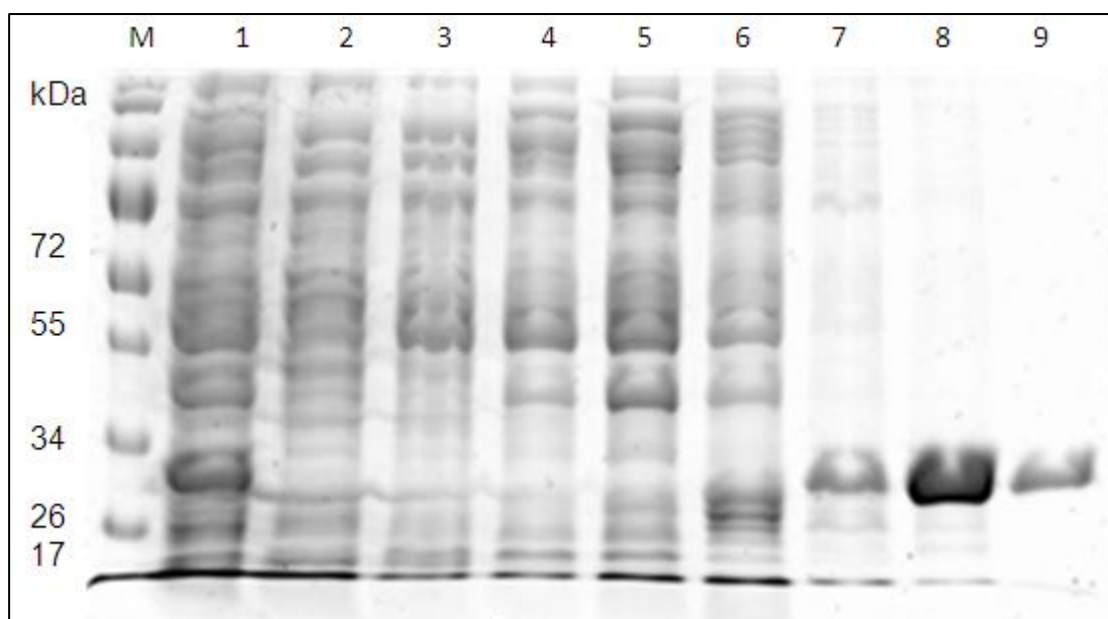


Figura 23 Análise do processo de purificação da enzima HGPRT por SDS-PAGE. M marcador de peso molecular. 1- extrato total solúvel, 2- eluato inicial da coluna, 3- conteúdo liberado com 25 mM de imidazol , 4- 50 mM de imidazol, 5- 100 mM de imidazol, 6- 200 mM de imidazol, 7- 250 mM de imidazol, 8- 300 mM de imidazol, 9- 400 mM de imidazol.

A utilização da resina de níquel para o processo de purificação, resultou na proteína com alto grau de pureza (figura 23, coluna 09), sendo este método de fácil aplicabilidade e

rápido, pois foi realizado de forma manual sem a necessidade da utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo.

5.4 Análise da atividade enzimática da fração solúvel

O propósito desta etapa do experimento foi verificar se a enzima expressa pela bactéria *E.coli* e purificada estava ativa, pois era possível que a proteína de interesse durante o procedimento de expressão e purificação perdesse sua atividade .

Foi possível verificar a atividade da enzima HGPRT utilizando como substratos a hipoxantina e PRPP e cofator magnésio.

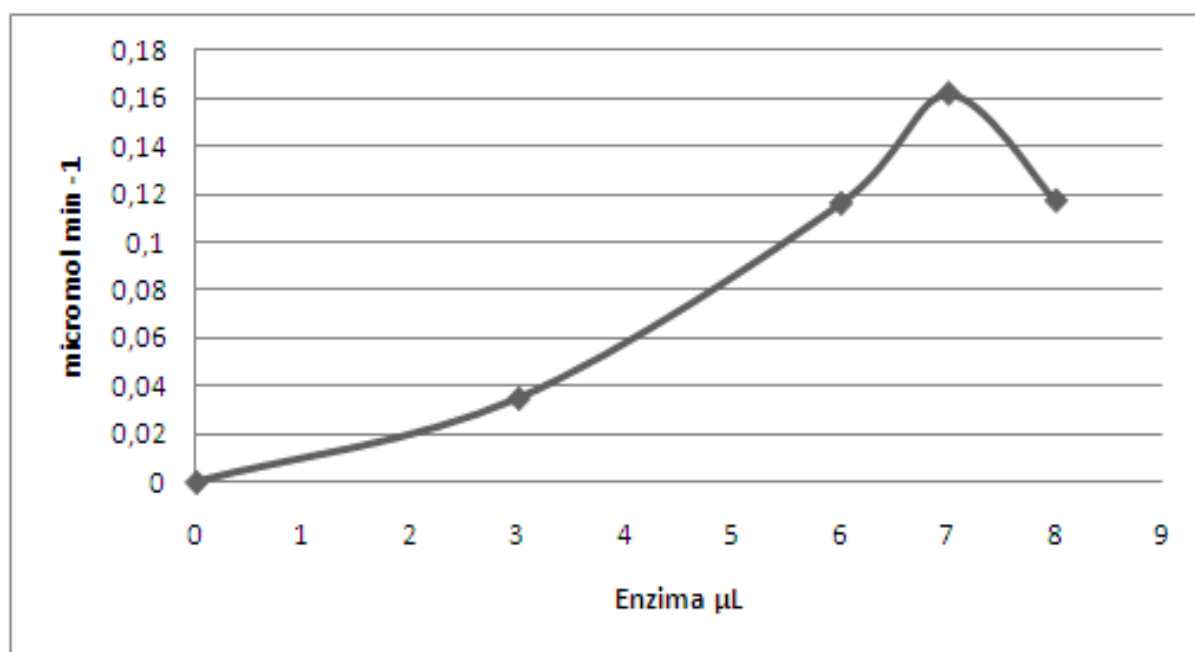


Figura 24. Gráfico da velocidade de reação no período de um minuto em diferentes volumes de enzima purificada

A figura 24 demonstra a atividade enzimática em função do volume da enzima purificada. É possível verificar, que com o aumento da quantidade de enzima inserida no sistema de reação, os substratos são convertidos em maior velocidade durante um minuto, ou seja é maior a atividade enzimática. Pode-se visualizar que este aumento não é progressivo, pois quando se utilizou oito microlitros de enzima a velocidade de reação diminuiu se comparado com a velocidade de reação utilizando sete microlitros de enzima purificada, este fenômeno pode ter ocorrido, pois para a quantidade maior que 7 μL de enzima o substrato deve

ter sido o fator limitante da reação, ou seja, não houve substrato suficiente para a enzima atuar na sua plenitude.

Outro dado de interesse é que, segundo Raman *et al.*, a enzima purificada pura possui atividade baixa, e há necessidade de incubar a enzima durante 12 h com os substratos PRPP e uma base purínica (hipoxantina, guanina ou xantina) para ativá-la. Em nosso caso não houve ativação prévia da enzima.

Para futuros testes com a enzima recombinante purificada será possível utilizar sete microlitros de enzima e realizar experimentos variando-se os substratos para definir os parâmetros cinéticos enzimáticos como K_m , K_{cat} e V máximo da enzima. Neste estudo não foi possível obter bons resultados para estes parâmetros pois a cinética enzimática é extremamente rápida e considerou-se necessário utilizar-se um espectrofotômetro específico para análise desse tipo de enzima. Optou-se então por realizar esses experimentos após a conclusão do Mestrado.

6. CONCLUSÕES

- A construção do plasmídeo recombinante de expressão, para a expressão heteróloga da região estrutural do gene de hipoxantina fosforribosiltransferase (HGPRT) foi realizada com sucesso;
- Foi possível expressar a enzima recombinante na forma solúvel;
- A técnica de cromatografia de afinidade com níquel mostrou-se adequada para purificação de HGPRT resultando na proteína com alto grau de pureza;
- Ao final do processo de expressão e purificação foi possível comprovar que a enzima recombinante estava em sua forma ativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Astolfi Filho, S; Azevedo, M. O; Pereira, J. O; Xavier, M, S.S. Noções Básicas de tecnologia do DNA recombinante. Ed. EDUA, Manaus, Amazonas. 61 pp. 2005.
- Azevedo, J.L. *Genética de Microrganismos*. Ed. UFG, Goiânia, 2. 536 pp. 2008.
- Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(5):411-21. 1999.
- Bataus, L. A. M. Construção de um vetor de seleção de promotores para *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília-UNB/DF. Brasil. 1991.
- Bell, C.E; Lewis, M. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature structural biology* .7: 209-14. 2000.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254. 1976.
- Breman, J.G; Alilio, M. S; Mills, A. Conquering the intolerable burden of malaria: what's new, what's needed: a summary. *Am J Trop Med Hyg*. 71: 1-15. 2004.
- Brown, T. A. *Clonagem Gênica e Análise de DNA*. Ed Artmed, 4. 376 p. 2003.
- Chen, Q; You, D; Hu, M; Gu, X; Luo, M; Lu, S. Cloning, purification, and characterization of thermostable hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*, *Protein Expr. Purif.* 239-245. 2003.
- Division of Parasitic Diseases/Centers for Disease Control and Prevention (DPDx/CDC).2011. (acessado em fevereiro de 2011). <http://www.cdc.gov/>.
- Downie, M. J; Kirk, K; Mamoun, C. B. Purine Salvage Pathways in the Intraerythrocytic Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic Cell*. 7(8):1231-1237. 2008.
- Dubendorff, J. W, Studier, F. W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J Mol Bio*. 219:45–59. 1991.
- Eads, J. C., Scapin, G., Xu, Y., Grubmeyer, C., Sacchettini, J. C. The crystal structure of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase with bound GMP. *Cell*. 78: 325-334. 1994.

- Eakin, A. E, Guerra, A, Focia, P. J, Torres-Martinez, J. & Craig, S. P. Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi* as a target for structure-based inhibitor design: crystalization and inhibition studies with purine analogs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41(8):1686-1692. 1997.
- Gardner, M. J; Hall, N; Fung, E; White, O; Berriman, M; Hyman, R. W. Genome sequence of the human malaria parasite *P. falciparum*. *Nature*. 419(6906): 498 - 511. 2002.
- Grossman, T.H; Kawasaki, E.S.; Punreddy, S. R; Osburne. M.S. Spontaneous cAMP-dependent depression of gene expression in stationary phase plays a role in recombinant expression instability. *Gene*. 209 95-103. 1998.
- Hengen, P. N. Purification of His-Tag fusion protein from E.coli. *Trends in Biochemical Sciences*. 20(7):285-286. 1995.
- Hernandez, R. R, Hinterberg, K; Scherf, A. Compartmentalization of genes coding for immunodominant antigens to fragile chromosome ends leads to dispersed subtelomeric gene families and rapid gene evolution in *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78: 137–148. 1996.
- Holt, R. A.; Subramanian, G. M.; Halpern, A.; Sutton, G. G.; Charlab, R.; Nusskern, D. R. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*. 298:129-49. 2002.
- Keought, D.T; McConachie, L. A; Gordon, R. B; Jersey, J; Emmerson, B. T. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; development of a spectrophotometric assay and its use with detection and characterisation of mutant forms. *Clin Chim Acta*. 36:3700-12. 1987.
- Keought, D. T; Ng, A; Winzor, D. J; Emmmerson, B. T; Jersey, J. Purification and characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine-guanine-xanthine phosphoribosyltransferase and comparison with the human enzyme. *Mol, Biochem. Parasitol.* 98: 29-41. 1999.
- Klein T.A, Lima J.B.P, Tada M.S. Comparative susceptibility of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum* in Rondônia, Brasil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44, 598-603. 1999.

- Queen, S. A; Jagt, V. D; Reyes, P. Properties and substrate specificity of a purine phosphoribosyltransferase from the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:123-133. 1998.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-685. 1970.
- Manfredi, J. P.; Holmes, E. W. Purine salvage pathways in myocardium. *Annual Review of Physiology.* 47:691-705. 1985.
- Meshnick, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int. J. Parasitol.* 32, 1655. 2002.
- Ministério da Saúde. 2011.(acessado em 03 de fevereiro de 2011). Disponível em www.saude.gov.br/svs
- Moffatt, B. A, Studier, F. W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell.* 49:221–227. 1987.
- Monzani, P. S.. *Estrutura cristalográfica da enzima hipoxantina fosforribosiltransferase (HGPRT) de Lieshmania tarentolae complexada com GMP*. 2003. f 177.Tese (Doutorado em Física)-UFSCAR, São Carlos.
- Music, D. L. Structural features of the phosphoribosyl transferase and their relationship to the human deficiency disorders of purine and pyrimidine metabolism *CRC Crit. Rev. Biochem.* 11:1–34. 1981.
- Pagola, S; Stephens, P. W; Bohle, D. S; Kosar, A. D; Madsen, S. K. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature.* 404(6775):307-10. 2000.
- Pan, S. H, Malcolm, B. A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). *Biotechniques* 29:1234–1238. 2000.
- Parker, W. B; Long, M. C. Purine metabolism in *Mycobacterium tuberculosis* as a target for drug development. *Current pharmaceutical design.* 13:599-608. 2007.
- Petty, K. J. Metal-Chelate Affinity Chromatography. *Current Protocols in Protein Science.* 9.4.1-9.4.16. 1996.
- Plowe, C. V. Antimalarial drug resistance in Africa: strategies for monitoring and deterrence. *Curr Top Microbiol Immunol.* 295:55-79. 2005.

- Raman, J; Ashok, C. S; Subbayya, S. I.N; Anand, R. P; Selvi. S. T; Balaram, H. *Plasmodium falciparum* hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase: Stability studies on the product-activated enzyme. *Journal FEBS*. 272: 1900-1911. 2005.
- Rang, H. P; Ritter, J. M.; Dale, M. M. *Farmacologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.
- Reichard, P. Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annual Review of Biochemistry*. 57:349-374. 1998.
- Saraiva, M. G. G; Souza, R. D. S; Lopes, L. D. S; Marreiro, L. S; Amorim, R. D. S. Situação da malária no Estado do Amazonas – 1999 a 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 114. 2006.
- Sarkar, D; Ghosh, I; Datta, S. Biochemical characterization of *Plasmodium falciparum* hypoxanthine- guanine-xanthine phosphoribosyl transferase: role of histidine residue in substrate selectivity. *Mo.l Biochem Paras*. 137:267-276. 2004.
- Swartz, J. R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 12(2):195-201. 2001.
- Shi, W; Li, C. M; Tyler, P. C; Furneaux, R. H; Grubmeyer, C; Schramm, V. L; Almo, S. C. The 2.0 Å structure of malarial purine phosphoribosyltransferase in complex with a transition-state analogue inhibitor. *Biochemistry*. 38: 9872-9880. 1999.
- Snow, R. W; Guerra. C, A; Noor. A, M; Hay, S. I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 434: 214-7. 2005.
- Sorensen, H. P; Mortensen, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 115:113-128. 2005.
- Studier, F. W; Moffatt, B.A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*. 198(1):13-30. 1986.
- Studier, F.W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219:37–44. 1991.
- Tadei, W.P; Thatcher, B. D; Santos, J. M; Scarpassa, V. M; Rodrigues, I. B; Rafael, M. S. Ecologic observations on anopheline vectors of malaria 98 in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 325–335. 1998.

- Taranto, A.G; Carneiro, J. W.M; Araujo, M. T; Silva, B. M. Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. *Sitientibus*. 34: 47-58. 2006.
- Wang, C. C. Parasite enzymes as potencial targets for antiparasitic chemotherapy. *J. Med Chem*. 27:1-9. 1984.
- White, N. J. Antimalarial drug resistance. *J. Clin. Invest*. 113(8):1084. 2004.
- Woese, C. R; Kandler, O; Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms. Proposal for the domains Archae, Bacteria an Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87:4576-4579. 1990.
- World Health Organization. Report. Communicable Diseases Report— Roll Back Malaria 2002 (acessado em 04 de janeiro de 2011) <http://www.who.int/infectious-disease-news/cds2002/chapter7.pdf>.
- World Health Organization. 2006. Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO Press.
- World Health Organization. 2010 (acessado em 04 de janeiro de 2011). Disponível em http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG.
- Xu, Y; Eads, J; Sacchettini, J. C; Grubmeyer, C. Kinetic mechanism of human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase: rapid phosphoribosyltransfer chemistry. *Biochemistry*. 36:3700-3712. 1997.