

# Estudos Estruturais da Enzima Enolase de *P. falciparum*: Alvo Molecular para Desenvolvimento de Novos Agentes Antimaláricos

Fernando V. Maluf\*<sup>1</sup> (PG), Evandro J. Mulinari<sup>1</sup> (PG), Eduardo A. dos Santos<sup>2</sup> (PG),  
Célia R. S. Garcia<sup>2</sup> (PQ), Glaucius Oliva (PQ), Rafael V. C. Guido<sup>1</sup> (PQ)

\*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, Universidade de São Paulo, IB – USP

Palavras Chave: malária, alvo molecular, glicólise, enolase, cristalização,

## Introdução

Nos últimos anos, ações efetivas em políticas de saúde pública conseguiram reduzir significativamente o número de novos casos e mortes por malária. Nesse contexto, em 2010, foram identificados, aproximadamente, 200 milhões de casos de malária e 600 mil mortes ao redor do mundo.<sup>1</sup> No entanto, a situação ainda é bastante grave. O problema tem se agravado com o surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* (agente etiológico da forma mais severa de malária) resistentes aos tratamentos disponíveis.<sup>2</sup> Neste cenário, a seleção e validação de novos alvos moleculares torna-se imprescindível.

A via glicolítica em protozoários representa um alvo altamente promissor, uma vez que é o único processo para obtenção de energia do parasita.<sup>3</sup> A enolase (EC 4.2.1.11), nona enzima desta via, é responsável pela catálise do substrato 2-fosfoglicerato (2-PGA) em fosfoenol piruvato (PEP). Devido à função chave na produção energética do parasita, bem como, pelas diferenças estruturais em relação à enzima homóloga humana, a enolase de *P. falciparum* (*Pf*-enolase) é considerada um alvo extremamente atrativo para o desenvolvimento de novos antimaláricos.

A produção heteróloga da enzima enolase, através de métodos modernos de DNA recombinante, determinou a produção e purificação em larga escala da proteína alvo. Estudos avançados de biologia estrutural permitiram a elucidação da estrutura tridimensional da enolase de *P. falciparum*. A análise estrutural indicou elementos estruturais relevantes para a atividade catalítica, além disso, a comparação molecular com enzimas homólogas revelou diferenças estruturais relevantes que podem ser exploradas para o desenvolvimento de inibidores seletivos para a enzima do parasita.

## Resultados e Discussão

A sequência de DNA codificante para enzima enolase foi obtida por amplificação através de reação de PCR com molde em uma biblioteca de cDNA de *P. falciparum*. O fragmento amplificado foi clonado através da técnica de ligação independente de clonagem (LIC, do inglês, *Ligation Independent Cloning*) em três diferentes vetores de expressão (pETM11, pETTrx-1a e pETNusA-1a). Ensaios de expressão indicaram que a *Pf*-enolase foi produzida em maior escala em sistema bacteriano (Rosetta DE3) com a construção no pETTrx-1a. A *Pf*-enolase foi obtida com elevado teor de pureza (confirmado por análise eletroforética SDS-PAGE) através de técnicas cromatográficas de afinidade e exclusão por tamanho. A proteína concentrada (30 mg/mL) foi submetida aos ensaios cristalização, o qual avaliou mais de 500 condições diferentes de cristalização. Condições promissoras para a cristalização foram identificadas e após diversas etapas de otimização cristais adequados para estudos de difração de raios X foram obtidos. Um conjunto de dados a alta resolução e (1.7Å) e com excelente parâmetros estatísticos foi coletado em

difratômetro Micromax-007 – R-AXIS IV++ (Rigaku) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros estatísticos das etapas de processamento e refinamento dos dados cristalográficos.

### Processamento dos dados

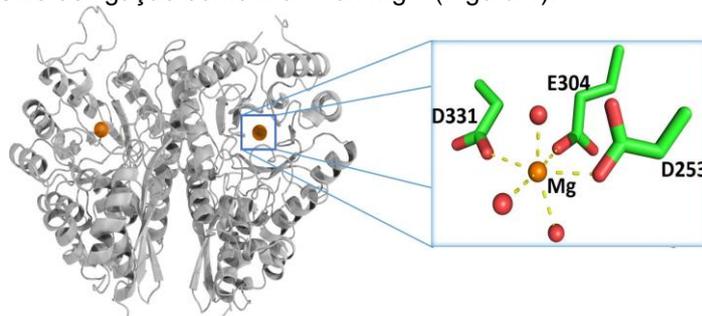
Grupo espacial	P21
Célula unitária a,b,c (Å)	60,61; 77,50; 90,51
Célula unitária $\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90,00; 96,30; 90,00
Mosaicidade	0,40
Resolução (Å)	47,70 – 1,70
Completeza (%)	99,7 (99,5)
Multiplicidade	3,7 (3,3)
$I/\sigma$	10,1 (2,9)
$R_{\text{merge}}$ (%)	9,10 (44,3)

### Refinamento dos dados

$R_{\text{fator}}$	0,17
$R_{\text{livre}}$	0,22

Dados entre parênteses relativos à última faixa de resolução 1.70-1.79

A estrutura tridimensional foi resolvida por substituição molecular utilizando-se como modelo inicial a estrutura da enolase de *T. brucei* (PDB ID, 2PTY). O refinamento foi realizado com sucesso ( $R_{\text{fator}} = 0,17$ ,  $R_{\text{livre}} = 0,22$ ). A análise estrutural indicou enovelamento tipo barril  $\beta/\alpha$ , além disso, o sítio de ligação contém um íon  $Mg^{2+}$  (Figura 1).



**Figura 1.** Estrutura 3D da *Pf*-enolase. Em destaque, sítio de ligação do cofator  $Mg^{2+}$ .

## Conclusões

O emprego de um protocolo moderno e robusto de clonagem e purificação permitiu a obtenção da proteína recombinante em quantidade e pureza suficiente para a obtenção de um cristal adequado aos experimentos de difração de raios X. Um conjunto de dados a alta resolução foi coletado e de maneira inédita a estrutura tridimensional de enolase de *P. falciparum* foi elucidada.

## Agradecimentos

CNPq, FAPESP

WHO – World Malaria Report 2012. Disponível em [http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/malaria\\_20121217/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2012/malaria_20121217/en/index.html). Acesso em 25/01/2013

<sup>2</sup> Dondorp, A. M., et al. *N. Engl. J. Med.*, 2009, 361, 455.

<sup>3</sup> Olszewski, K. L.; Llinás, M. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2011, 175, 95.