

Expressão e purificação da enzima UCK1 da via de salvação de pirimidinas do parasita *Schistosoma mansoni*

Gabriela Viotto Sarro¹, Larissa Romanello¹, Juliana Roberta Torini de Souza¹, Louise Bird³, Joanne Nettleship³, Raymond Owens³, Yamini Reddivari³, José Brandão-Neto², Humberto D'Muniz Pereira¹.

1- Laboratório de Biologia Estrutural, IFSC, USP; gabrielasarro@hotmail.com

2- Diamond Light Source, Harwell Science and Innovation Campus Didcot, Oxfordshire;

3- Oxford Protein Production Facility UK, Dicot, Oxfordshire.

Palavras Chave: via salvação de pirimidinas, *Schistosoma mansoni*, cristalografia de proteínas.

Introdução

O *Schistosoma mansoni*, parasita responsável pela esquistossomose, doença que afeta cerca de 300 milhões de pessoas em todo mundo. As vias de síntese e salvação de purinas e pirimidinas tem sido citadas como alvos potenciais pro desenvolvimento de fármacos contra o parasita. A uridina citidina quinase (UCK), envolvida na via de salvação de pirimidinas, catalisa a fosforilação de uridina e citidina para seus respectivos monofosfatos (UMP e CMP). Essa enzima também é capaz de catalisar a fosforilação de vários ribonucleosídeos. Este trabalho faz parte de um projeto maior que visa à obtenção das estruturas tridimensionais e das constantes catalíticas de todas as proteínas envolvidas nas vias de novo e de salvação de pirimidinas e na via de salvação de purinas.

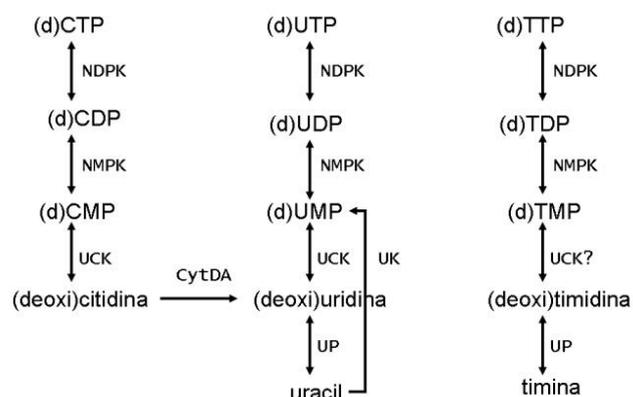


Figura 1. Via de salvação de pirimidinas.

Resultados e Discussão

O cDNA correspondente à enzima UCK1 (245 aminoácidos - 27,7 kDa) foi amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pOPIN(S3C) e inserido em *E. coli* Lemo21(DE3) através de transformação por choque-térmico nas dependências do laboratório Oxford Protein Production Facility (OPPF) em Harwell - UK. Para expressão da enzima, as bactérias cresceram à 37°C durante 4 horas até D.O. = 0,6, e então induzidas com 1 mM de IPTG e incubadas durante 16 horas à 20°C. A enzima foi purificada em coluna de cobalto agarose por afinidade devido à presença de uma cauda poli-his. A proteína foi expressa e purificada com um rendimento de ~30mg/L. Na figura 2 visualiza-se o gel de poli-acrilamida referente à purificação da enzima. A diferença do peso molecular teórico da proteína com o exibido no gel de

poliacrilamida é devido à presença de uma proteína de fusão S3C adicionada e uma cauda de histidina ligada à proteína de interesse. Esta cauda será clivada com uma protease para a realização dos ensaios de cristalização e cinética enzimática.

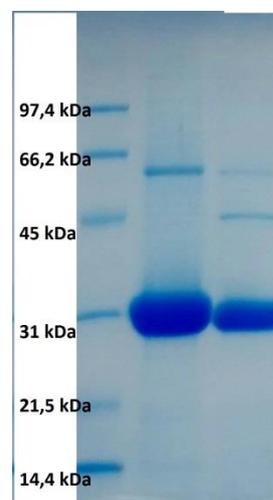


Figura 2 – Gel de poli-acrilamida com o resultado do teste de expressão e purificação da proteína UCK1.

Conclusões

A obtenção da enzima pura é passo fundamental para experimentos de cristalização para obtenção da estrutura tridimensional da enzima e cinética enzimática. Esses dados podem contribuir para o entendimento de como o parasita pode ser seletivamente privado de recursos, o que pode ser usado para o desenvolvimento de novas drogas e/ou vacinas contra este importante parasita.

Agradecimentos

FAPESP e CNPq.