UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Estudos biofísicos, estruturais e imunológicos de proteínas
recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de
merozoítas de *Plasmodium vivax*

Maria Carolina Sarti Jimenez

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR.

Orientadora: Profa. Dra. Irene da Silva Soares

São Paulo
2007

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013029

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

J61e   Jimenez, Maria Carolina Sarti
Estudos biofísicos, estruturais e imunológicos de proteínas
recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de
merozoítas de *Plasmodium vivax* / Maria Carolina Sarti
Jimenez . -- São Paulo, 2007.
Iv.(várias paginações)

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Soares, Irene da Silva

1. Parasitologia 2. Protozoologia 3. Malária 4. Imunologia
5. Biologia molecular 6. Bioquímica estrutural I. T. II.
Soares, Irene da Silva, orientador.

616.96 CDD

Maria Carolina Sarti Jimenez

Estudos biofísicos, estruturais e imunológicos de proteínas
recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de
merozoítas de *Plasmodium vivax*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Irene da Silva Soares
Orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 13 de Setembro de 2007.

Trabalho realizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

**"Não há fatos eternos, como não há
verdades absolutas."**

Nietzsche

Dedicatória

À Deus, por tornar tudo possível e por ser a base na minha vida.

Aos meus pais pelo apoio constante, pelo amor incondicional, pelo incentivo ao estudo, e principalmente pela compreensão em todos os momentos difíceis.

Aos meus avós e irmãos, pelo carinho, incentivo constante na minha trajetória e por acreditarem em mim.

Dedicatória

Ao Kricor, meu amado noivo, cujo amor, lealdade e presença constante foram essenciais durante a trajetória deste trabalho. Sua motivação me fez acreditar que somos capazes de tudo, basta nunca desistir de lutar.

A minha melhor amiga Andréia “every woman”, por estar sempre presente na minha vida em todos os momentos, pelo incentivo e por nunca me deixar abater pelas dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Irene da Silva Soares pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, pela confiança em mim depositada e principalmente por sua contribuição na minha formação científica.

Ao Prof. Dr. Maurício Martins Rodrigues do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP- CINTERGEN por tornar viável o desenvolvimento desse projeto disponibilizando seu laboratório para o início da minha formação científica e para etapas de purificação cruciais no meu estudo.

Ao Prof. Dr. João Alexandre R. G. Barbosa e Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos do Centro de Biologia Molecular Estrutural - LNLS e Instituto de Química da UNICAMP, pela colaboração na etapa de caracterização estrutural e biofísica das proteínas MSP-3 e MSP1₁₉.

Aos Profs. Drs. Alberto Spisni, Sergio Oyama Junior e Francisco Javier Medrano Martin do LNLS, pela colaboração na construção do modelo molecular da MSP1₁₉ de *P. vivax*.

Ao Prof Dr. Sérgio Schenkman, coordenador do nosso grupo na SMOlBNet. Ao Prof Dr. Shaker Chuck Farah do departamento de Bioquímica (IQ-USP), e ao LNLS pela estrutura oferecida para os ensaios de cristalização.

Aos amigos de bancada de 1^a, 2^a e 3^a geração: Daniela, Gerson, Meire, Ronnie, Sílvia, Tatiane, Maria Helena, Karina, Juliana, Andreia, Bruno, Mayara, Ricardo, Wesley, Mariana e Vanessa pelo carinho, companheirismo por tudo que me ensinaram durante estes anos. Não sei o que seria de mim sem vocês...

Ao Ricardo Ricci por me auxiliar com os ensaios sorológicos das proteínas recombinantes durante este projeto e Fabio Schaberle, Vanessa C. Tavares, Cristiane R. Guzzo pela assistência técnica e pela bela amizade que nasceu entre nós (Valeu meninas!!!).

As Profas. Dras. Dulcinéia Abdalla, Primavera Borelli coordenadora e vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Carlos H. I. Ramos e Profa. Dra. Adelaide Vaz, pelas sugestões e críticas na banca prévia.

A todos os colegas e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pela amizade e convivência diária.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	xii
Lista de tabelas.....	xiv
Lista de abreviaturas.....	xv
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xx
I. Introdução.....	1
1. Aspectos epidemiológicos da malária no mundo e no Brasil.....	2
2. Etiologia da malária e ciclo de vida do <i>Plasmodium</i>	3
3. Estudos estruturais, funcionais e imunológicos sobre proteínas de merozoítas de <i>Plasmodium</i> candidatas a vacinas.....	7
3.1. Proteína 1 da Superfície de Merozoítas (MSP-1).....	10
3.2. Proteína 3 da Superfície de Merozoítas (MSP-3 α , MSP-3 β e MSP-3 γ).....	16
4. Tipos de estrutura de proteínas.....	19
4.1. Estrutura primária.....	19
4.2. Estrutura secundária.....	20
4.3. Estrutura terciária.....	20
4.4. Estrutura quaternária.....	21
5. Métodos de análise estrutural de proteínas.....	22
5.1. Técnicas de caracterização espectroscópica e de espectrometria de massas.....	22
5.1.1. Dicroísmo Circular.....	22
5.1.2. Fluorescência.....	23
5.1.3. Espectrometria de massas.....	24
5.2. Espalhamento Dinâmico de Luz.....	25
5.3. Métodos cromatográficos: Gel-filtração.....	26
5.4. Ultracentrifugação Analítica.....	26
5.5. Métodos utilizados na resolução de estruturas tridimensionais: Cristalografia, Ressonância Magnética Nuclear e Modelagem Molecular.....	27
II. Objetivos.....	29
1. Objetivo Geral.....	30
2. Objetivos Específicos.....	30

III. Material e Métodos	31
1. Reagentes e Soluções	32
1.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose	32
1.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)	32
1.3. Meios de cultura para bactérias	33
1.4. Soluções e tampões para “Immunoblotting”	33
1.5. Tampões utilizados para a purificação das proteínas recombinantes	33
1.6. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)	33
2. Construção dos plasmídeos recombinantes	34
2.1. Geração de plasmídeos correspondentes à MSP-3 α	34
2.2. Geração de plasmídeos correspondentes à MSP-3 β	37
3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes	39
3.1. Expressão das proteínas recombinantes em pequena escala	39
3.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes em média e larga escala	40
4. Modelagem Molecular	42
5. Métodos Biofísicos	43
5.1. Dicroísmo Circular	43
5.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência	45
5.3. Espectrometria de Massa	46
5.4. Cromatografia em Gel-filtração	46
5.5. Espalhamento Dinâmico de Luz	48
5.6. Ultracentrifugação Analítica	48
6. Métodos Estruturais	49
6.1. Testes de Cristalização	50
6.2. Refinamento das condições de cristalização	51
6.3. Difração de raios X	52
7. Ensaios imunológicos	53
7.1. Amostras de soro	53
7.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	54
8. Análise estatística	55
IV. Resultados	56

1. Subclonagem dos genes que codificam as proteínas MSP-3 α e MSP-3 β	57
2. Expressão e purificação das proteínas MSP1 ₁₉ , MSP-3 α e MSP-3 β em larga escala.....	57
3. Análise estrutural da MSP1 ₁₉ por Modelagem Molecular.....	61
4. Estudos Biofísicos.....	63
4.1. Caracterização preliminar da composição da estrutura secundária das proteínas MSP-3 α e MSP-3 β por Dicroísmo Circular.....	63
4.2. Emissão do espectro de fluorescência da proteína CC5 (MSP-3 α).....	68
4.3. Caracterização das proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α) por Espectrometria de Massa.....	69
4.4. Análise das proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α) por cromatografia em Gel- filtração.....	70
4.5. Ensaio de Espalhamento Dinâmico de Luz das proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α).....	73
4.6. Avaliação do estado oligomérico da proteína CC5 (MSP-3 α) por Ultracentrifugação Analítica.....	74
5. Estudos Estruturais.....	76
5.1. Testes de cristalização.....	76
5.2. Refinamento das condições de cristalização.....	79
5.3. Análise dos cristais obtidos por difração de raios X.....	82
6. Estudos Imunológicos.....	85
6.1. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das MSPs por anticorpos IgG.....	85
6.2. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as MSPs.....	88
6.3. Comparação da longevidade da resposta de anticorpos IgG contra as MSPs em indivíduos expostos à malária.....	90
V. Discussão	94
VI. Conclusões	108
VII. Referências bibliográficas	110
VIII. Anexo	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Plasmodium sp.</i>	6
Figura 2. Vista perpendicular de uma estrutura terciária do tipo “coiled-coil” com duas α -hélices paralelas.....	21
Figura 3. Espectro de DC na região do UV distante associado com os diferentes tipos de estrutura secundária.....	24
Figura 4. Sequência de aminoácidos e representação esquemática das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α	36
Figura 5. Sequência de aminoácidos e representação esquemática das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β	38
Figura 6. Padrão de migração das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α	59
Figura 7. Padrão de migração das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β	60
Figura 8. Padrão de migração da proteína recombinante MSP1 ₁₉	60
Figura 9. Estrutura tridimensional do modelo para a MSP1 ₁₉ de <i>P. vivax</i>	62
Figura 10. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α	64
Figura 11. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β	65
Figura 12. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α e da interação entre as mesmas.....	67
Figura 13. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β e da interação entre as mesmas.....	67
Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência da proteína recombinante CC5 (MSP-3 α).....	68
Figura 15. Espectro de massa MALDI-Tof das proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α).....	70
Figura 16. Cromatografia em Gel-filtração da proteína recombinante CC4 (MSP-3 α).....	71
Figura 17. Cromatografia em Gel-filtração da proteína recombinante CC5 (MSP-3 α).....	72

Figura 18. Cromatografia em Gel-filtração da interação entre as proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α).....	72
Figura 19. Gráfico de intensidade de espalhamento de luz das proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α).....	73
Figura 20. Ultracentrifugação Analítica da proteína recombinante CC5 (MSP-3 α).....	75
Figura 21. Cristais obtidos a partir das proteínas recombinantes FP-1 e CC3-6 (MSP-3 α).....	81
Figura 22. Padrão de difração das proteínas recombinantes FP-1 e CC3-6 (MSP-3 α).....	84
Figura 23. Comparação da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes derivadas da MSP1 ₁₉ , MSP-3 α e MSP-3 β em soros de indivíduos com infecção patente por <i>P. vivax</i>	86
Figura 24. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em soros de indivíduos com infecção patente por <i>P. vivax</i>	87
Figura 25. Análise comparativa da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs quanto à frequência de episódios prévios de malária <i>vivax</i>	89
Figura 26. Avaliação comparativa da longevidade da resposta de anticorpos específicos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em indivíduos com infecção patente e após o tratamento.....	91
Figura 27. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em soros de indivíduos com infecção patente por <i>P. vivax</i> e nove meses após o tratamento.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas identificadas e caracterizadas em merozoítas de <i>P. vivax</i> ...	8
Tabela 2 - Estruturas tridimensionais de proteínas de superfície de merozoítas de <i>Plasmodium</i> depositadas no “Protein Data Bank”	11
Tabela 3 - Sumário das massas moleculares e raio de Stokes das proteínas globulares utilizadas como padrão para a cromatografia em Gel-filtração.....	47
Tabela 4 - Sumário das proteínas recombinantes produzidas em <i>Escherichia coli</i>	58
Tabela 5 - Porcentagem de estrutura secundária das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 (α e β) por DC.....	63
Tabela 6 - Porcentagem de estrutura secundária da análise de interação entre as proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 (α e β) por DC.....	66
Tabela 7 - Sumário dos testes de cristalização realizados com cada uma das proteínas recombinantes.....	78
Tabela 8 - Sumário dos refinamentos realizados a partir das proteínas recombinantes que formaram cristais.....	80
Tabela 9 - Frequências de respondedores e IR (em mediana) de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes que representam as MSPs em soros de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i>	88
Tabela 10 - Frequências de respondedores e IR (em mediana) de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em soros de indivíduos infectados por <i>P. vivax</i> e nove meses após o tratamento.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	absorbância
AMA-1	Antígeno 1 de membrana apical
Amp	Ampicilina
BSA	Albumina Sérica Bovina
C	Concentração da proteína
CC	"coiled coil"
$C_6H_8O_7$	Ácido cítrico
D	coeficiente de difusão
DC	Dicroísmo Circular
dp	desvio padrão
DO	Densidade óptica
ϵ	coeficiente de extinção
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
EDL	Espalhamento Dinâmico de Luz
f	Coeficiente friccional
f/f_0	Razão friccional ou Fator de Perrin
FP	Proteína fusionada à GST (fusion protein)
GST	Glutathiona S-transferase
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1- ácido piperazinaetanosulfonico
HCl	Ácido clorídrico
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
His ₆	Cauda de seis resíduos de histidina
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosidase
IR	Índice de reatividade
Kav	coeficiente de distribuição
kDa	quilo Dalton
LB	Luria Bertani
L	litro
l	Caminho óptico (cm)
MSP-1	Proteína 1 da superfície de merozoítas

MSP-3	Proteína 3 da superfície de merozoítas
MSP-3 α FP-1	Proteína recombinante baseada na região C-terminal da MSP-3 α
MSP-3 α FP-2	Proteína recombinante baseada na MSP-3 α inteira
MSP-3 α CC3-6	Proteína recombinante baseada nas regiões CC3 a CC6 da MSP-3 α com probabilidade para formação de “coiled-coil”
MSP-3 α CC4-5	Proteína recombinante baseada nas regiões CC4 a CC5 da MSP-3 α com probabilidade para formação de “coiled-coil”
MSP-3 α CC5	Proteína recombinante baseada na região CC5 da MSP-3 α com probabilidade para formação de “coiled-coil”
MSP-3 α CC4	Proteína recombinante baseada na região CC4 da MSP-3 α com probabilidade para formação de “coiled-coil”
MSP-3 β FP-1	Proteína recombinante baseada na região N-terminal da MSP-3 β
MSP-3 β FP-2	Proteína recombinante baseada na região C-terminal da MSP-3 β
MSP-3 β FP-3	Proteína recombinante baseada na MSP-3 β inteira
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
n	número de resíduos da proteína
η	Viscosidade do solvente
N	Número de Avogrado
NaC ₂ H ₃ O ₂	Acetato de sódio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio bibásico
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônio
nm	Nanômetros
θ	Elipcticidade
OPD	σ -Fenilenodiamina

PfMSP-3	Proteína 3 da superfície do merozoíta de <i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
r	posição radial
R	Constante dos gases
R_{hyp}	Raio hipotético
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
R_s	Raio de Stokes
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrimalida
T	Temperatura absoluta
T.A.	Temperatura ambiente
TEMED	N,N,N', N' tetrametil etilenodiamida
Tris	Hidroximetilaminometano
2-ME	2-mercaptoetanol
μg	micrograma
μL	microlitro
UCA	Ultracentrifugação Analítica
V_{bar}	volume parcial específico
V_0	Volume na face externa da coluna
V_e	Volume de eluição
V_t	Volume total da coluna
ω	velocidade angular
$[\theta]$	Elipticidade molar residual

RESUMO

Diversas proteínas de superfície de merozoítas (MSPs) de *Plasmodium* têm sido consideradas candidatas a compor uma vacina contra a malária. Nos últimos anos estudamos diversos aspectos da resposta imune naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes baseadas nas MSPs de *P. vivax*. Estes estudos demonstraram que estas proteínas recombinantes mantêm suas funções imunológicas, podendo servir como base para a caracterização de suas estruturas tridimensionais.

Com o objetivo de obter informações estruturais sobre as MSPs de *P. vivax*, 10 proteínas recombinantes, correspondentes à região C-terminal da MSP-1 (MSP1₁₉), e diferentes regiões da MSP-3 α e MSP-3 β foram expressas em *Escherichia coli*. Os dados estruturais da MSP1₁₉ foram obtidos por modelagem molecular com base nas coordenadas cristalográficas da MSP₁₉ de *P. cynomolgi*. Por outro lado, existem poucas informações estruturais sobre as proteínas da família MSP-3 de *Plasmodium*. A análise da estrutura primária dessas proteínas indica que elas apresentam um domínio central rico em alaninas que estão organizadas como motivos “heptads”. Esse tipo de estrutura primária favorece a formação de estruturas do tipo α -hélices e “coiled-coil” (CC). No presente estudo, a composição da estrutura secundária de cada proteína recombinante foi caracterizada preliminarmente por ensaio de Dicroísmo Circular, realizado na região do UV distante. Com base nos resultados obtidos, selecionamos duas proteínas recombinantes baseadas na região C-terminal da MSP-3 α (CC4 e CC5) para análises biofísicas mais detalhadas. Inicialmente, demonstramos por espectrometria de massa que ambas as proteínas têm massa molecular esperada. Entretanto, os dados obtidos por cromatografia em gel filtração sugeriram que essas proteínas formam oligômeros. No caso específico da proteína CC5, estes dados foram confirmados por ultracentrifugação analítica que indicou a formação de tetrâmeros alongados, corroborando com a formação de estrutura do tipo “coiled-coil”. Como o papel biológico dessas proteínas não é conhecido, os dados

estruturais obtidos neste estudo podem servir como base para o entendimento da função dessas proteínas.

Na segunda parte deste projeto, selecionamos cinco proteínas recombinantes para estudos comparativos de reconhecimento por anticorpos IgG de indivíduos procedentes de áreas endêmicas de malária *vivax*. Tais estudos confirmaram dados prévios que as MSPs são imunogênicas em infecções naturais. Em conjunto, nossos resultados sugerem que, assim como a MSP1₁₉, proteínas recombinantes baseadas na MSP-3 α e MSP-3 β podem ser exploradas em futuros estudos de indução de imunidade protetora contra a malária *vivax* em primatas não humanos.

ABSTRACT

Several merozoite surface proteins (MSPs) of *Plasmodium* have been considered candidates to compose a vaccine against malaria. In the last years, we have studied several aspects of the naturally acquired immune response against recombinant proteins based on MSPs of *P. vivax*. These studies demonstrated that the recombinant proteins maintain their immunological functions and could be used for the characterization of their three-dimensional structure.

To gain structural information on the MSPs of *P. vivax*, 10 recombinant proteins corresponding to the C-terminal region of MSP-1 (MSP1₁₉) and to different regions of the MSP-3 α and MSP-3 β were expressed in *Escherichia coli*. The structural data of the MSP1₁₉ were obtained by molecular modeling based on the crystallographic coordinates of the *P. cynomolgi* MSP1₁₉. On the other hand, there is limited structural information available for MSP-3 family of *Plasmodium*. The analysis of the primary structure of these proteins indicates that they present a central alanine-rich domain organized as heptads repeats. This type of primary structure favors the formation of α -helices and coiled-coil (CC) structures. In the present study, the composition of the secondary structure of each recombinant protein was characterized preliminarily by circular dichroism monitored in the far-UV region. On the basis of the obtained results, we selected two recombinant proteins based on C-terminal region of the MSP-3 α (CC4 and CC5) for detailed biophysical analyses. Initially, we demonstrated that the monomer mass assigned for the two recombinant proteins corresponded exactly to those predicted from the primary sequence. However, during size exclusion chromatography, the proteins eluted at volumes corresponding to molecular weights that were much larger than their monomeric masses, suggesting that both proteins are oligomeric molecules. Interestingly, analytical ultracentrifugation experiments showed that the CC5 oligomers are elongated molecules. As the function of these proteins is not known, the structural data obtained in this study can be used to understand the function of these proteins.

In the second part of this study, we selected five recombinant proteins for comparative recognition by IgG antibodies of the individuals from endemic areas of malaria *vivax*. These studies confirmed previous data that the MSPs are immunogenic in natural infections. Together, our results suggest that, as well as the MSP1₁₉, that recombinant proteins based on the MSP-3 α and MSP-3 β can be explored in future studies for the induction of protective immunity against malaria *vivax*.

I. Introdução

---

1. Aspectos epidemiológicos da malária no mundo e no Brasil.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é considerada a doença parasitária que só é superada em número de mortes pela AIDS. Segundo dados de 2005, a malária representa um problema de saúde pública em mais de 100 países, onde cerca de 3,2 bilhões de pessoas (40% da população mundial) convivem com o risco de contágio. Anualmente, sobretudo no continente africano, a infecção abrange um número de pessoas entre 350 e 500 milhões, dos quais cerca de um milhão morrem em consequência da doença. Calcula-se que a maioria destas mortes ocorra entre crianças menores de cinco anos e mulheres grávidas infectadas por *Plasmodium falciparum* na África (OMS - World Malaria Report, 2005).

A malária causada pelo *P. vivax*, embora seja mais branda e raramente letal, representa um problema de saúde pública hoje em vários países, incluindo países do sudeste da Ásia, Índia e Brasil. O número de casos clínicos anuais de *P. vivax* no mundo é estimado em 80 milhões, sendo que aproximadamente 85% destes casos ocorrem fora da África (revisto por MENDIS et al., 2001).

No Brasil, principalmente na Região Amazônica a malária é responsável em média por 500 mil casos anuais, abrangendo o período de 1999 a 2006 (Secretaria de Vigilância em Saúde, SVS - Situação epidemiológica da malária em 2006). Após três anos consecutivos de aumento de casos de malária, registrou-se no ano de 2006, uma redução de aproximadamente 60 mil casos dessa doença, que corresponde a cerca de 10% em relação ao ano de 2005 (603.532 mil casos). Em 2006, foram registrados 540.182 casos, onde as infecções causadas por *P. vivax* aproximaram-se de 396.000 correspondendo a 73,4% das notificações. A malária

concentra-se na região da Amazônia Legal, que responde por mais de 99,5% dos casos registrados no País. Os estados que registraram maior número de casos da doença foram o Pará, Rondônia e Amazonas. Nos estados das demais regiões, os casos registrados são quase totalmente importados da Região Amazônica ou de outros países onde ocorre transmissão (SVS - Situação epidemiológica da malária em 2006). A relativa ineficiência das medidas de controle atualmente empregadas exige o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, como vacinas, novas drogas e inseticidas. Estudos de genoma, transcriptoma e proteoma do vetor, parasita e do homem, podem ajudar a compreender a biologia de cada um e a buscar novas ferramentas de controle para a doença (revisto por CATTERUCCIA, 2007; DURAISINGH et al., 2006; HOFFMAN et al., 2002; KOOLIJ et al., 2006).

2. Etiologia da malária e ciclo de vida do *Plasmodium*.

A malária é causada por protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e ao gênero *Plasmodium*, o qual apresenta várias espécies, mas apenas quatro infectam o homem: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, e *P. ovale*.

O *Plasmodium* apresenta um ciclo de vida com uma fase sexuada que ocorre na fêmea do mosquito do gênero *Anopheles* e três etapas de reprodução assexuada, sendo uma no hospedeiro invertebrado e as outras duas etapas no hospedeiro vertebrado. O ciclo do parasita no hospedeiro vertebrado tem início quando a fêmea infectada inocula as formas esporozoítas na corrente sangüínea, durante o repasto sangüíneo. Foi demonstrado recentemente em modelo murino, que após a picada do mosquito, os esporozoítas, apesar de sua alta motilidade,

permanecem na derme durante um longo período de tempo (podendo ultrapassar 7 horas após a picada), realizando movimentos randômicos e de padrão tortuoso. No intervalo de uma hora, aproximadamente 50% dos esporozoítas deixam a derme, de maneira que dentre estes, 70% atingem os vasos sangüíneos dirigindo-se para o fígado, invadindo hepatócitos, enquanto os 30% restantes invadem os vasos linfáticos. Estes esporozoítas que são levados através dos vasos linfáticos apresentam um movimento de deslizamento lateral, sendo detectados posteriormente nos linfonodos, onde entram em contato com células do sistema imune, e apenas uma pequena porcentagem se desenvolve na forma exo-eritrocítica (AMINO et al., 2006).

No interior dos hepatócitos, os esporozoítas se transformam em esquizontes hepáticos, que amadurecem e passam por várias divisões, produzindo milhares de merozoítas (ciclo pré-eritrocítico). Para *P. vivax* e *P. ovale* alguns esporozoítas originam formas dormentes conhecidas como hipnozoítas, que são responsáveis pelas recaídas da malária alguns meses depois da infecção primária. Após o rompimento dos hepatócitos, os merozoítas deixam o fígado e invadem os eritrócitos. Segundo Sturm et al. (2006), foi evidenciado em modelo murino, que parasitas são capazes de induzir morte e descolamento do hepatócito hospedeiro, seguido da formação de vesículas contendo parasitas (merossomos), que aparentemente asseguram a migração dos parasitas através dos vasos sangüíneos e a sua proteção contra a imunidade do hospedeiro.

Desta maneira, inicia-se a segunda etapa do ciclo assexuado do parasita (ciclo eritrocítico). É importante ressaltar que, ao contrário do *P. falciparum*, que invade eritrócitos em todas as fases, o *P. vivax* infecta e se multiplica exclusivamente em eritrócitos jovens (reticulócitos). Além disso, o *P. vivax* é

somente capaz de invadir células que expressam o grupo sanguíneo Duffy, que funciona como ligante para uma proteína encontrada no complexo apical (micronemas) de *P. vivax*, denominada “Duffy Binding Protein” (DBP) (BARNWELL et al., 1989). Assim, indivíduos Duffy-negativos, predominantemente encontrados na África Ocidental, foram durante muito tempo, considerados refratários à infecção pelo *P. vivax*. Entretanto, recentemente surgiram evidências de transmissão de *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos de uma população do Quênia (RYAN et al., 2006). Além disso, em um estudo muito recente foi demonstrado que indivíduos da Papua Nova Guiné heterozigotos para Fy (+/-) são mais resistentes à infecção por *P. vivax* quando comparados aos indivíduos homozigotos (+/+) (KASEHAGEN et al., 2007).

No interior dos eritrócitos e/ou reticulócitos ocorre uma nova divisão assexuada, dando origem aos trofozoítas, que amadurecem e se dividem várias vezes formando os esquizontes. Com a ruptura da célula sanguínea os merozoítas liberados reinfectam novas hemácias. Esta fase de multiplicação do parasita que ocorre no interior dos eritrócitos/reticulócitos é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da malária. O período de incubação varia, dependendo da espécie de *Plasmodium*, sendo em média de 15 dias.

Após um período de replicação assexuada, alguns trofozoítas se diferenciam em gametócitos, que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes para o mosquito. Quando a fêmea do *Anopheles* realiza novamente o repasto sanguíneo em indivíduos infectados e ingere os gametócitos (machos e fêmeas), estes dão origem ao processo de fertilização, produzindo um zigoto, que migra para a parede intestinal transformando-se em um oocisto. Os oocistos maduros liberam milhares de esporozoítas que migram para as glândulas salivares do inseto, onde novamente a

fêmea do *Anopheles*, durante o repasto sanguíneo, inocula esporozoítas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, fechando o ciclo evolutivo dos plasmódios. A Figura 1 apresenta uma ilustração do ciclo de vida do *Plasmodium*.

A principal característica clínica da malária em indivíduos não imunes é o paroxismo malárico, constituído por febre, calafrios e cefaléia. Na malária causada pelo *P. vivax* a febre se repete quase que sincronicamente a cada 48 horas e a infecção não costuma evoluir com aparecimento de complicações sistêmicas, daí ser chamada de febre terçã benigna. Por outro lado, na malária causada pelo *P. falciparum* a febre é intermitente com periodicidade irregular, se repete a cada 36 horas e tem características de febre terçã maligna, pois a infecção tende a evoluir com complicações.

Figura 1. Ciclo biológico do *Plasmodium* sp. Adaptado do site http://encarta.msn.com/media_461541582/Life_Cycle_of_the_Malaria_Parasite.html (acessado em março de 2007)

3. Estudos estruturais, funcionais e imunológicos sobre proteínas de merozoítas de *Plasmodium* candidatas a vacinas.

As formas sanguíneas do parasita são as responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. Portanto, uma vacina contra estas formas preveniria ou reduziria a morbidade e a mortalidade dessa endemia através da eliminação ou redução da carga parasitária. Neste sentido, nos últimos anos, um significativo progresso tem sido obtido na caracterização, a nível molecular, de antígenos de *Plasmodium*, assim como na compreensão dos mecanismos imunológicos capazes de eliminar as diferentes formas do parasita (revisto por GREENWOOD et al., 2005; HILL, 2006; PRUDÊNCIO et al., 2006). No caso específico do *P. vivax*, as pesquisas focando a caracterização de antígenos-alvo para o desenvolvimento de vacinas têm sido limitadas, primeiramente pela dificuldade de se obter grandes quantidades de parasitas – uma vez que não dispomos de um sistema eficiente de cultivo do *P. vivax* – e também pelas baixas parasitemias obtidas diretamente de pacientes infectados. Porém, nos últimos anos, houve um grande avanço no isolamento, clonagem e sequenciamento de genes que codificam antígenos imunologicamente relevantes de *P. vivax*. Este fato permitiu a geração de proteínas recombinantes correspondentes a diferentes regiões antigênicas, as quais estão sendo utilizadas em estudos imunoepidemiológicos e imunizações pré-clínicas, visando uma melhor compreensão da resposta imune humana e o desenvolvimento de uma vacina contra o *P. vivax* (revisto por BARRERO et al., 2005; COLLINS et al., 2006; HERRERA et al., 2007). Os antígenos de merozoíta de *P. vivax* mais relevantes que já tiveram seus genes clonados e seqüenciados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Proteínas identificadas e caracterizadas em merozoítas de *P. vivax*.

Proteína	Localização	Referência
Duffy Binding Protein (DBP)	Micronema	FANG et al. (1991)
Merozoite Surface Protein-1 (MSP-1)	Membrana externa	DEL PORTILLO et al. (1991)
MSP-2	''	BARNWELL et al. (1999)
MSP-3 α , β e γ	''	GALINSKI et al. (1999, 2001)
MSP-4 e 5	''	BLACK et al. (2002)
MSP-9	''	VARGAS-SERRATO et al. (2002)
MSP-10	''	PEREZ-LEAL et al. (2005)
Reticulocyte Binding Protein-1 (RBP-1 e 2)	Polo apical	GALINSKI et al. (1992)
Apical Membrane Antigen-1 (AMA-1)	Polo apical	CHENG; SAUL (1994)

Os estudos em estruturas de proteínas têm importantes implicações práticas, uma vez que a elucidação da estrutura tridimensional de uma proteína pode auxiliar no entendimento de sua função. No caso específico de proteínas de *Plasmodium*, a elucidação da estrutura de uma determinada proteína envolvida na invasão da célula hospedeira (hepatócito ou merozoíta) poderá ajudar na compreensão de um aspecto importante da biologia dos plasmódios e contribuir para o desenvolvimento de agentes que interfiram com o ciclo do parasita. Para se chegar a essas estruturas, ao nível de resolução atômica, há dois métodos complementares: Cristalografia de raios X e Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

O número de estruturas tridimensionais de proteínas de *Plasmodium* depositadas no "Protein Data Bank" (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>) tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. No caso específico de proteínas de merozoítas de *Plasmodium*, até o presente momento existem oito com estrutura tridimensional resolvida por cristalografia de raios X ou RMN, as quais são consideradas candidatas a compor uma vacina contra a malária. São elas: (i) fragmento de 19 kDa correspondente a região C-terminal da Proteína 1 da Superfície do Merozoíta (MSP1₁₉) de *P. vivax*, *P. cynomolgi*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, (ii) ectodomínio do Antígeno 1 de Membrana Apical (AMA-1) de *P. vivax*, (iii) região II da Proteína de Ligação ao Eritrócito 175 (EBA-175) de *P. falciparum* e (iv) Antígeno de Ligação ao Duffy (DBL) de *P. knowlesi*. Os principais dados sobre a estrutura tridimensional das proteínas acima citadas estão apresentados na Tabela 2 (revisto por BENTLEY et al., 2006). A resolução das estruturas destas proteínas têm sido de grande importância na compreensão de suas funções biológicas e propriedades imunológicas, bem como no desenho racional de drogas. Além disso, o desenvolvimento de vacinas tem muito a se beneficiar futuramente com os estudos estruturais.

Apesar dos avanços nesta área nos últimos anos, a resolução da estrutura tridimensional de algumas proteínas de *Plasmodium* tem sido particularmente complicada por determinadas razões tais como: (i) dificuldade de obtenção de proteínas em quantidade e pureza apropriadas para cristalização, (ii) problemas de solubilidade ou presença de porções hidrofóbicas expostas em algumas proteínas, (iii) complexidade estrutural das proteínas e (iv) presença de glicosilação (revisto por CARUCCI, 2004). Em virtude das dificuldades encontradas na resolução da estrutura tridimensional de determinadas proteínas, diversos grupos de

pesquisadores têm investido no estudo de algumas propriedades biofísicas das proteínas visando obter informações estruturais preliminares, como conteúdo de estrutura secundária, massa molecular monomérica, interações proteína-proteína entre outras. Estes procedimentos incluem: (i) métodos hidrodinâmicos (ultracentrifugação analítica, viscometria, etc), (ii) termodinâmicos (espalhamento de luz, microcalorimetria, etc), (iii) espectroscópicos (fluorescência, dicroísmo circular, etc) (revisto por NEET; LEE, 2002).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo utilizando proteínas recombinantes baseadas em antígenos de *P. vivax*, demonstraram que as proteínas MSP1₁₉, MSP-3 α e MSP-3 β mantêm as suas funções imunológicas (CUNHA, 2001; CUNHA et al., 2001; SOARES et al., 1997, 1999a; RODRIGUES et al. 2003). Desta forma, essas proteínas recombinantes podem servir como base para a caracterização de suas estruturas tridimensionais.

3.1. Proteína 1 da Superfície de Merozoítas (MSP-1).

Entre os antígenos de superfície de merozoítas já caracterizados, um dos principais candidatos para o desenvolvimento de uma vacina contra as formas sangüíneas de *Plasmodium*, é a Proteína 1 da Superfície de Merozoíta (MSP-1). A MSP-1 é uma proteína que está presente em todas as espécies de *Plasmodium* e dependendo da espécie, o peso molecular varia de 180 a 230 kDa (revisto por HOLDER; BLACKMAN, 1994). Estudos realizados com *P. falciparum* mostraram que a MSP-1 é sintetizada durante a esquizogonia (HOLDER; FREEMAN, 1982) e permanece associada à membrana do merozoíta através da âncora de

Tabela 2- Estruturas tridimensionais de proteínas de superfície de merozoítas de *Plasmodium* depositadas no “Protein Data Bank”.

Antígeno de superfície ^a	Acesso no PDB ^b	Método	Resolução ^c (Å)	Referência
PcMSP1 ₁₉	1B9W	Cristalografia	1,8	CHITARRA et al. (1999)
PfMSP1 ₁₉	1CEJ	RMN		MORGAN et al. (1999)
PvMSP1 ₁₉	2NPR	RMN		BABON et al. (2007)
PkMSP1 ₁₉	1N1I	Cristalografia	2,4	GARMAN et al. (2003)
PfMSP1 ₁₉ -complexo Fab	10B1	Cristalografia	2,9	PIZARRO et al. (2003)
PfAMA-1 (Domínio III)	1HN6	RMN		NAIR et al. (2002)
PvAMA-1 (Domínio I-III)	1W8K, 1W81	Cristalografia	2,0, 1,8	PIZARRO et al. (2005)
PfAMA-1 (Domínio II)	1YXE	RMN		FENG et al. (2005)
PfAMA-1 (Domínio I-III)	1Z40	Cristalografia	1,9	BAI et al. (2005)
PfEBA-175 (Região II)	1ZRL	Cristalografia	2,3	TOLIA et al. (2005)
PfEBA-175 (Região II-sialolactose)	1ZRO	Cristalografia	2,3	TOLIA et al. (2005)
PkDBL (Região II)	2C6J	Cristalografia	3,0	SINGH et al. (2006)

^a abreviações: Pv, *P. vivax*; Pf, *P. falciparum*; Pc, *P. cynomolgi*; Pk, *P. knowlesi*.^b <http://www wwptdb.org/>. (acessado em maio de 2007)^c determinação da resolução da estrutura por difração de raios X

glicosilfosfatidilinositol (GPI) (revisto por HOLDER; RILEY, 1996). Esta proteína é sintetizada inicialmente como um precursor de aproximadamente 200 kDa, que durante a invasão do merozoíta é processado por clivagem proteolítica, onde apenas parte da porção C-terminal permanece na superfície do merozoíta. Após a primeira etapa de clivagem quatro fragmentos são originados (83, 30, 38 e 42 kDa), posteriormente, o fragmento de 42 kDa (MSP₁₄₂) sofre uma segunda etapa de clivagem originando dois fragmentos de 33 e 19 kDa (HOLDER et al., 1987). Apenas o fragmento de 19 kDa (MSP₁₁₉) permanece ancorado à membrana e é carregado para dentro dos eritrócitos na superfície dos merozoítas (BLACKMAN et al., 1990). Foi demonstrado que anticorpos que reconhecem a MSP₁₁₉ de *P. falciparum* podem inibir a invasão de merozoítas (BLACKMAN et al., 1990; CHANG et al., 1992; CHAPEL; HOLDER, 1993).

A importância biológica da MSP-1 para a sobrevivência do parasita é desconhecida, entretanto, tentativas iniciais de deletar o gene da *msh-1* resultaram em parasitas inviáveis, o que sugere que esta proteína é importante para a sobrevivência do parasita (O'DONNELL et al., 2000). Mais recentemente, foi realizada uma nova tentativa de deletar genes que codificam, além da MSP-1, outras seis proteínas de merozoítas de *P. falciparum* associadas à membrana do parasita através de âncora de GPI (MSP-1, MSP-2, MSP-4, MSP-5, MSP-10, RAMA e Pf92), através de recombinação homóloga, por duplo "crossover". Os ensaios demonstraram que, embora todos os plasmídeos construídos tenham sido transfectados com sucesso, não foi observado o sinal de deleção genética (com exceção da MSP-5), ressaltando a importância das proteínas não deletadas no desenvolvimento do estágio sanguíneo do parasita (SANDERS et al., 2006).

O gene que codifica a MSP-1 de *P. vivax* tem várias similaridades com os genes de outras espécies de *Plasmodium*. A comparação das seqüências de nucleotídeos dos genes da MSP-1 de *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. yoelii* revelaram a existência de 10 blocos conservados entre as espécies (ICBs) alternando com regiões de maior diversidade. Duas famílias dimórficas foram descritas inicialmente definidas pelas seqüências das cepas de *P. vivax* Belém e Salvador/Sal-1 (DEL PORTILLO et al., 1991, GIBSON et al., 1992). Estas duas formas alélicas são relativamente conservadas com uma similaridade global de 81%.

Nas diferentes espécies de *Plasmodium* a estrutura da MSP₁₉ consiste de dois domínios. Estes domínios apresentam 10 a 12 resíduos de cisteínas, sendo que o domínio 1 apresenta 4-6 resíduos e forma 2 a 3 ligações dissulfídicas. O domínio 2 apresenta seis resíduos e forma 3 ligações dissulfídicas, ambos configurados de maneira semelhante ao fator de crescimento epidermal (EGF) (GARMAN et al., 2003). Este tipo de conformação foi inicialmente sugerido pela seqüência primária de aminoácidos e, posteriormente, confirmado pela análise cristalográfica de proteínas recombinantes representando a MSP₁₉ de *P. cynomolgi* e *P. knowlesi* (CHITARRA et al., 1999; GARMAN et al., 2003).

Na MSP₁₉ de *P. falciparum* estes domínios apresentam 12 resíduos de cisteínas, com seis ligações dissulfídicas, três para cada domínio. Esta diferença foi observada por análise estrutural da molécula por RMN (MORGAN et al., 1999). Nas outras espécies de *Plasmodium* foi demonstrado através do alinhamento dos domínios EGF-like 1 e 2, a substituição de uma cisteína por um triptofano no resíduo 28 do primeiro domínio, enquanto no *P. falciparum* este resíduo está conservado (CHITARRA et al., 1999; GARMAN et al., 2003; PIZARRO et al., 2003).

O complexo formado pela região Fab de um anticorpo monoclonal específico e a proteína MSP1₁₉ (Fab-MSP1₁₉) de *P. falciparum* teve sua estrutura resolvida, demonstrando que a interação antígeno-anticorpo ocorre em epítomos descontínuos destacando os mesmos. É importante ressaltar que este anticorpo monoclonal não possui atividade inibitória de invasão do parasita *in vitro* (PIZARRO et al., 2003). Posteriormente foram investigadas algumas propriedades funcionais de anticorpos contra a MSP1₁₉ de *P. falciparum* em relação à inibição da invasão e bloqueio da inibição da invasão. Foi proposto que apenas uma parte dos anticorpos contra a MSP1₁₉ é capaz de inibir a invasão (anticorpos inibidores), enquanto que outros anticorpos não exercem efeito durante este processo (anticorpos neutros). Foi demonstrado que formação do complexo com ambos os anticorpos não evidenciam diretamente uma superposição destes epítomos (DEKKER et al., 2004).

A comparação entre as três estruturas da MSP1₁₉ revelou que estas são muito similares. A MSP1₁₉ de *P. knowlesi* compartilha uma identidade de 82% com a sequência de *P. cynomolgi* e 51% de identidade com a sequência de *P. falciparum*. Entretanto, a MSP1₁₉ de *P. knowlesi* apresenta um sítio de ligação para histidina no primeiro domínio EGF, o qual não está presente na estrutura das duas outras espécies de *Plasmodium* (GARMAN et al., 2003).

A estrutura da MSP1₁₉ de *P. vivax* foi recentemente elucidada, através de RMN, corroborando com as estruturas previamente resolvidas da MSP1₁₉ presente nas demais espécies. Quando a MSP1₁₉ é parte da molécula precursora MSP1₄₂, existe como um domínio independente sem contato estável com o resto da subunidade. Estudos demonstraram que, embora a proteína MSP1₄₂ seja encontrada na forma de dímero, a MSP1₁₉ mantém-se monomérica, sugerindo um processo secundário que causaria a dissociação da proteína recombinante antes da

invasão do eritrócito (BABON et al., 2007). Devido a ausência de cultivo de *P. vivax* *in vitro*, existe apenas um estudo funcional com a MSP1₁₉ do parasita (HAN, H. et al., 2004), o qual demonstrou que ambos os domínios EGF (1 e 2) foram necessários para a interação com reticulócitos humanos.

Do ponto de vista antigênico, nos últimos anos estudamos diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes que representavam as regiões N- e C- terminais da MSP-1 de *P. vivax* em indivíduos de áreas endêmicas de malária da região amazônica brasileira (CUNHA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003; SOARES et al., 1997, 1999a, 1999b, 1999c; SOARES; RODRIGUES, 2002). Estes estudos sugeriram que a MSP1₁₉ é particularmente imunogênica para anticorpos e linfócitos T durante infecções por *P. vivax*. A alta frequência de indivíduos infectados contendo anticorpos contra a MSP1₁₉ de *P. vivax* foi confirmada em estudos subseqüentes realizados no Brasil e Coréia (MORAIS et al., 2005; PARK et al., 2001). Devido à elevada capacidade antigênica das proteínas recombinantes representando a MSP1₁₉, recentemente ensaios para a detecção de anticorpos específicos por ELISA (LIM et al., 2002; RODRIGUES et al., 2003), Dot-ELISA (COELHO et al., 2007) e imunocromatografia (PARK et al., 2003) foram desenvolvidos como método diagnóstico para indivíduos expostos ao *P. vivax*.

Diferentes grupos vêm desenvolvendo trabalhos sobre a imunogenicidade de proteínas recombinantes baseadas na MSP1₁₉ de *P. vivax* em modelos experimentais utilizando camundongos, coelhos e macacos. As imunizações foram feitas na presença de diferentes formulações de adjuvantes. Após a imunização na presença de adjuvantes fortes, alta imunogenicidade desta região é sempre observada (BARRERO et al., 2005; CUNHA et al., 2001; DUTTA et al., 2001, 2005;

ROSA et al., 2004, 2006; SACHDEVA et al., 2004; SIERRA et al., 2003; SOARES; RODRIGUES, 2002; WICKRAMARACHCHI et al., 2007).

3.2. Proteína 3 da Superfície de Merozoítas (MSP-3 α , MSP-3 β e MSP-3 γ).

Três outras proteínas de superfície de merozoítas de *P. vivax* foram identificadas e denominadas MSP-3 α (GALINSKI et al., 1999), MSP-3 β e MSP-3 γ (GALINSKI et al., 2001). Estas proteínas estão associadas à membrana do parasita, entretanto não apresentam uma região trans-membrana e nem âncora de GPI. A estrutura primária deduzida a partir do gene clonado da MSP-3 α (cepa Belém) indica que esta proteína é constituída de 845 aminoácidos e tem um peso molecular aparente de 150 kDa em fusão com a proteína GST. O domínio central desta proteína é rico em alaninas (31%) que estão organizadas como motivos “heptads” (GALINSKI et al., 1999). Estas alaninas preenchem preferencialmente as posições 1 e 4 (AXXAXXX). As posições 5 e 7 são preferencialmente preenchidas por aminoácidos carregados. Este tipo de estrutura primária favorece estruturas terciárias do tipo α -hélices e “coiled-coil”, fato demonstrado através de análises computacionais, evidenciando que a proteína MSP-3 α possui um total de seis regiões promissoras para a formação deste tipo de estrutura terciária (GALINSKI et al., 1999). Estruturas do tipo “coiled-coil” por sua vez favorecem as interações proteína-proteína que podem levar a formação de estruturas quaternárias homólogas ou heterólogas do tipo dímeros, trímeros ou tetrâmeros.

Foi demonstrado que o gene que codifica a proteína MSP-3 α é altamente polimórfico apresentando regiões de inserção e deleção entre diferentes isolados de *P. vivax*. Esta diversidade alélica demonstrada é amplamente utilizada como

marcador de infecção por *P. vivax* (BRUCE et al., 1999; HAN, E. T. et al., 2004; JOSHI 2003; ORD et al., 2005; ZAKERI et al., 2006), sendo também empregada em função da avaliação da dinâmica de regulação em infecções por *Plasmodium*, na qual evidenciou uma regulação dependente da densidade parasitária (BRUCE et al., 2000). Apesar do elevado grau de polimorfismo, a região C-terminal da proteína MSP-3 α se mantém altamente conservada, originando subdomínios envolvidos em dois blocos (Bloco I: porção N-terminal polimórfica e Bloco II: região C-terminal de menor variabilidade), em ambos os subdomínios definidos, há uma alta probabilidade (quase 100%) para formação de estrutura do tipo “coiled-coil”, quando a sequência é analisada através do programa PAIRCOIL (<http://paircoil.lcs.mit.edu/cgi-bin/paircoil>) (RAYNER et al., 2002). Estes resultados sugerem que a distribuição do polimorfismo se restringe ao gene, não à função, e requer maiores investigações como candidata à vacina (CUI et al., 2003; MASCORRO et al., 2005). Dentre as proteínas de *P. vivax*, a MSP-3 α é estruturalmente relacionada com as proteínas MSP-3 β e MSP-3 γ (GALINSKI et al., 2001).

A MSP-3 β está também localizada na membrana de merozoítas de *P. vivax*. Como no caso da MSP-3 α , 23% dos aminoácidos que compõe o domínio central desta proteína é constituído por alaninas que estão organizadas como motivos “heptads”. Estas proteínas possuem um total de cinco regiões promissoras para a formação “coiled-coil” (GALINSKI et al., 2001).

Em estudos anteriores, avaliamos diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra 4 proteínas recombinantes (em fusão com Glutathiona S-transferase - GST) derivadas da MSP-3 α (C-terminal) e MSP-3 β (N e C-terminal e a proteína inteira) de *P. vivax* (CUNHA, 2001). Estes estudos

mostraram que: i) a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG durante a infecção patente contra pelo menos uma das proteínas recombinantes representando a MSP-3 α e MSP-3 β foi de 44,2% e 54,8%, respectivamente; ii) anticorpos citofílicos do tipo IgG1 e IgG3 foram as subclasses de anticorpos que predominaram na resposta imune anti-MSP-3, iii) a proteína recombinante MSP-3 β (inteira) foi capaz de induzir respostas proliferativas por células mononucleares de 40% dos indivíduos expostos ao *P. vivax*; iv) a resposta imune de anticorpos contra a MSP-3 é de curta duração (CUNHA, 2001).

Em conclusão, nossos estudos imunológicos demonstraram que estas proteínas recombinantes mantêm a antigenicidade e podem servir como base para a caracterização de suas estruturas tridimensionais. Uma vez que estas proteínas ainda não foram caracterizadas funcionalmente, a caracterização estrutural das mesmas pode contribuir para abrir novas perspectivas de um melhor entendimento da biologia do parasita e auxiliar no desenvolvimento de drogas e vacinas para o controle da malária.

Neste contexto, recentemente foi demonstrado que apesar do gene que codifica a proteína MSP-3 β ser altamente polimórfico em isolados naturais de *P. vivax*, certas propriedades físicas da proteína são mantidas, particularmente a habilidade para formação da estrutura terciária em “coiled-coil”. Estes dados sugerem que a manutenção destes domínios estruturais deve ser importante do ponto de vista funcional da proteína (RAYNER et al., 2004). Estas informações enfatizam a importância da caracterização estrutural desta família, a qual não possui proteínas homólogas com estrutura resolvida, até o presente momento.

A proteína MSP-3 de *P. falciparum* (PfMSP-3) apresenta similaridades com as proteínas da família das MSP-3 de *P. vivax* em relação à formação de um domínio

com alta predição para formação de “coiled-coil”. A PfMSP-3 apresenta 3 diferentes domínios: um domínio central formado por repetições imperfeitas de “heptads” de alanina, uma segunda região central rica em resíduos de glutamato e um domínio C-terminal de zíper de leucina. Recentemente, através de estudos biofísicos foi demonstrado que a proteína de *P. falciparum* forma uma estrutura altamente estendida e oligomérica (dímeros e tetrâmeros) possuindo 47% de α -hélice e 31% de estrutura randômica (BURGESS et al., 2005). Este mesmo estudo evidenciou que a formação oligomérica da proteína é dependente da região contendo o zíper de leucina, demonstrando que o domínio de “coiled-coil” não sofre oligomerização independente (BURGESS et al., 2005).

4. Tipos de estrutura de proteínas.

As proteínas podem ter quatro tipos de estrutura dependendo do tipo de aminoácidos que possui, do tamanho da cadeia e da configuração espacial da cadeia polipeptídica, que são: primária, secundária, terciária e quaternária.

4.1. Estrutura primária.

É dada pela seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. São específicas para cada proteína, sendo geralmente determinadas geneticamente. A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de aminoácidos semelhante a um “colar de contas”, com uma extremidade “amino terminal” (N) e uma extremidade “carboxi terminal” (C). Sua estrutura é

somente a seqüência dos aminoácidos, sem se preocupar com a orientação espacial da molécula (ALBERTS et al., 1997).

4.2. Estrutura secundária.

É dada pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na seqüência primária da proteína. É o último nível de organização das proteínas fibrosas, que são mais simples estruturalmente. Esta organização ocorre graças à possibilidade de rotação das ligações entre os carbonos dos aminoácidos e seus grupamentos amina e carboxila. O arranjo secundário de um polipeptídeo pode ocorrer de forma regular, isso acontece quando os ângulos das ligações entre carbonos e seus ligantes são iguais e se repetem ao longo de um segmento da molécula. Os dois tipos principais de arranjo secundário regular são: α -hélice e fita- β (ALBERTS et al., 1997).

4.3. Estrutura terciária.

Resulta do enrolamento da proteína como um todo, sendo mantido por pontes de hidrogênio e dissulfeto. Esta estrutura confere a atividade biológica das proteínas. A estrutura terciária descreve o dobramento final de uma cadeia, por interações de regiões com estrutura regular ou de regiões sem estrutura definida, podendo haver interações de segmentos distantes de estrutura primária, por ligações não covalentes. Enquanto a estrutura secundária é determinada pelo relacionamento estrutural de curta distância, a terciária é caracterizada pelas interações de longa distância entre aminoácidos. Todas proteínas têm seqüências de aminoácidos diferentes, refletindo estruturas e funções diferentes (ALBERTS et al., 1997).

de aminoácidos diferentes, refletindo estruturas e funções diferentes (ALBERTS et al., 1997).

A estrutura de α -hélice do tipo “coiled-coil” é um dos principais motivos de oligomerização de subunidade em proteínas. A seqüência é caracterizada por uma periodicidade de sete resíduos (“heptad-repeats”), com a ocorrência de resíduos apolares preferencialmente na primeira (a) e quarta (d) posições do “heptad” (Figura 2). A arquitetura de um domínio particular de “coiled-coil” pode determinar seu estado de oligomerização, rigidez e função. (revisto por BURKHARD et al., 2001).

Figura 2. Vista perpendicular de uma estrutura terciária do tipo “coiled-coil” com duas α -hélices paralelas. As sete posições de “heptad-repeats” estão coloridas de acordo com suas posições partindo do amarelo (a) ao laranja (g). Os resíduos nas posições “a” e “d” estão em interface com o “coiled-coil” e rodeados pelos resíduos nas posições “e” e “g”.

4.4. Estrutura quaternária.

Algumas proteínas podem ter duas ou mais cadeias polipeptídicas denominadas de subunidades protéicas, as quais entre si, podem ser iguais ou diferentes em estrutura. O arranjo das proteínas e das subunidades protéicas em complexos tridimensionais constitui a estrutura quaternária. Elas são orientadas e estabilizadas pelas mesmas interações da estrutura terciária. A junção de cadeias

polipeptídicas pode produzir diferentes funções para os compostos. Um dos principais exemplos de estrutura quaternária é a hemoglobina, cuja estrutura é formada por quatro cadeias polipeptídicas (LEHNINGER et al., 1995).

5. Métodos de análise estrutural de proteínas.

A seguir será feita uma breve descrição dos métodos utilizados para o estudo de algumas propriedades biofísicas e para determinação da estrutura tridimensional de proteínas, utilizados durante o desenvolvimento deste projeto.

5.1. Técnicas de caracterização espectroscópica e de espectrometria de massas.

5.1.1. Dicroísmo Circular (DC).

O DC é a diferença na absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Esta técnica é particularmente útil para o estudo de macromoléculas, sejam elas de origem biológica ou não, tais como proteínas, carboidratos, dentre outros. Compostos esses, que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de DC. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente. A técnica de DC detecta exatamente a alteração através da medida da diferença de absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, após a luz passar pela amostra. Se após a passagem através da amostra a ser analisada, os componentes da esquerda e direita não forem absorvidos ou forem absorvidos em igual extensão, a

recombinação irá regenerar a radiação polarizada ao plano original (KELLY et al, 2005).

Um dos pontos fortes do DC é que vários aspectos estruturais da proteína podem ser medidos. Estudos em UV distante (tipicamente 240 a 180 nm) podem ser utilizados para avaliar quantitativamente o índice de estrutura secundária de uma proteína. Em estudo na região do UV próximo, as cadeias de aminoácidos aromáticos absorvem em uma escala entre 290 e 250 nm, dando um espectro que pode servir como a característica individual da estrutura nativa. As diferentes formas de estruturas secundárias encontradas em peptídeos e proteínas exibem distintos espectros em UV distante (190 a 250 nm) (Figura 3). Alguns desafios são encontrados no intuito de analisar os espectros observados e deduzir diferentes formas estruturais pelas seguintes razões: i) aminoácidos aromáticos (especialmente o triptofano) podem contribuir para o espectro de UV distante; ii) pontes dissulfeto podem contribuir para o espectro e iii) as características do espectro podem depender do comprimento e regularidade dos elementos estruturais em peptídeos e proteínas (KELLY; PRICE, 1997).

5.1.2. Fluorescência.

A espectroscopia de fluorescência em solução aquosa é utilizada na obtenção de informações sobre modificações na estrutura terciária com base na fluorescência do triptofano. De acordo com a localização deste resíduo nas proteínas, sua emissão máxima pode variar de 302 nm (localização do resíduo de triptofano no interior hidrofóbico) a 350 nm (localização do resíduo de triptofano na superfície) quando excitado a 295 nm. Proteínas desnaturadas em soluções aquosas, geralmente

resultam na alteração do triptofano em relação à hidrofobicidade (SHARMA; KALONIA, 2003).

Figura 3. Espectro de DC na região do UV distante associado com os diferentes tipos de estrutura secundária. Linha cheia, α -hélice; tracejado, folhas β antiparalelas; pontilhado, " β turn"; tracejado e pontilhado, estruturas irregulares.

5.1.3. Espectrometria de massas.

O espectro de massa é o resultado obtido através da fragmentação dos íons em relação à razão de sua massa por carga (m/z). Essa propriedade da espectrometria de massa faz com que a identificação da substância presente na amostra seja considerada inequívoca e incontestável (CAÑAS et al., 2006). A ionização /dessorção de matriz assistida por laser (MALDI – "*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*"), se trata de um método que torna possível a ionização de macromoléculas biológicas. Tais macromoléculas são analisadas através da

irradiação de uma mistura compilada de substâncias (matriz) as quais absorvem feixes de laser e amostras macromoleculares. Esta técnica, combinada com o detector de tempo-de-vôo acoplado ao espectrômetro de massa (TOF/MS - Time-Of-Fligh/Mass Spectrometer), utiliza a diferença de tempo-de-vôo das moléculas para caracterizar o tamanho das substâncias ionizadas (RANUCCI et al., 2006). Fazendo-se uma analogia, o espectro de massa é a 'impressão digital' da substância, pois não existem duas substâncias com o mesmo espectro.

5.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL).

As medidas de EDL dão informações sobre o coeficiente de difusão (D) e o raio hidrodinâmico ou raio de Stokes (R_s) da molécula. A técnica é utilizada para auxiliar na caracterização biofísica de proteínas (DEV et al., 2006) e também na determinação do número de espécies (dímeros, trímeros etc.) formadas por uma determinada molécula (WHANG et al., 2004). Nesta técnica, basicamente se mede a intensidade de luz espalhada pela amostra, com a qual se calcula o coeficiente de difusão e o diâmetro médio das partículas. Ela é adequada para determinação de tamanho de partículas dispersas em líquido, na faixa de dezenas de nanômetros a microns, servindo não apenas para fornecer tamanhos de partículas, mas também para mostrar a ocorrência de associação e entrelaçamento entre elas. Para partículas com o mesmo tamanho (amostra monodispersa) em suspensão, é apresentado um único pico associado ao valor médio do coeficiente de difusão das partículas. Para amostras polidispersas, a função é caracterizada por picos, estando cada pico associado a um valor médio do coeficiente de difusão das partículas em uma dada população (OLIVEIRA, 2006).

5.3. Métodos cromatográficos: Gel-filtração.

A cromatografia em Gel-filtração tem como base a separação de moléculas empregando as diferenças de tamanho durante a passagem em resina de gel-filtração inserido em uma coluna. A coluna é constituída por uma matriz de pequenas esferas porosas empacotadas. Ao fazer passar a solução de proteínas pela matriz da coluna, as moléculas pequenas entram nos poros das esferas demorando a atravessá-los, enquanto que as grandes passam entre as esferas sendo separadas primeiramente. Esta técnica permite determinar a Massa Molecular aparente e Raio de Stokes das moléculas (GEL..., acessado em 2007).

5.4. Ultracentrifugação Analítica (UCA).

A UCA desempenha um papel importante na caracterização de propriedades biofísicas de proteínas, biopolímeros, polímeros sintéticos, entre outros. Os ensaios de UCA baseiam-se em dois critérios: velocidade de sedimentação e equilíbrio de sedimentação, que podem ser utilizados concomitantemente ou isoladamente dependendo da análise em questão. No presente estudo utilizamos a metodologia de equilíbrio de sedimentação, no entanto é possível encontrar na literatura discussões sobre velocidade de sedimentação (BERZOWITZ, 2006). O principal foco do equilíbrio de sedimentação é a determinação da estequiometria e equilíbrio termodinâmico de interações de proteínas. Uma característica atraente no equilíbrio de sedimentação da UCA é a possibilidade de observar as proteínas em solução, sem requerer interações com qualquer matriz ou superfície, ou a comparação com quaisquer padrões. (VISTICA et al., 2004).

5.5. Métodos utilizados na resolução de estruturas tridimensionais: Cristalografia, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Modelagem Molecular.

A resolução da estrutura tridimensional pode auxiliar na compreensão da função de uma proteína. A técnica mais utilizada para elucidar a estrutura tridimensional de moléculas é a cristalografia por difração de raios X. A posição e intensidade de cada ponto no padrão de difração contem informações sobre as posições dos átomos no cristal que deram esta imagem. A dedução da estrutura tridimensional de uma molécula grande, a partir do padrão de difração de seu cristal é uma tarefa complexa e sua análise é automatizada (ALBERTS et al., 1997).

Espectroscopia por RMN é utilizada para estudar a estrutura de pequenas proteínas ou domínios de proteínas. Ao contrário da cristalografia, a RMN independe da obtenção da amostra cristalizada e requer um pequeno volume da solução concentrada de proteína que é colocada em um campo magnético forte. A técnica baseia-se na variação do estado de excitação dos núcleos atômicos em resposta a pulsos aplicados de radiofrequência de radiação eletromagnética, dando informações sobre as distâncias entre as partes da molécula de proteína. Combinando estas informações com o conhecimento da seqüência de aminoácidos, é possível computar a estrutura tridimensional da proteína (ALBERTS et al., 1997).

A grande diferença entre o número de seqüências disponíveis e estruturas de proteínas elucidadas poderia ser minimizada através de métodos computacionais. Dentre as predições teóricas de estruturas, a modelagem molecular prediz a estrutura tridimensional de uma proteína baseada na sua seqüência de aminoácidos e na similaridade de uma ou mais proteínas com a estrutura previamente determinada (revisto por XIANG, 2006).

No presente estudo, realizamos ensaios biofísicos e estruturais utilizando diferentes regiões das proteínas MSP-3 α e MSP-3 β , bem como a proteína recombinante MSP1₁₉, estudada pelo nosso grupo nos últimos anos. Os estudos biofísicos e estruturais foram realizados como parte da Rede de Biologia Molecular Estrutural (SMolBNet), em parceria com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Em paralelo, avaliamos comparativamente a resposta imune naturalmente adquirida contra as proteínas recombinantes em estudo, em populações de áreas endêmicas do Brasil. O efeito do número de episódios de malária *vivax* e a longevidade da resposta de anticorpos do tipo IgG contra os diferentes antígenos também foram avaliados.

II. Objetivos

---

1. Objetivo Geral

Geração de proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax* (MSP1₁₉, MSP-3 α e MSP-3 β) visando a caracterização biofísica, bioquímica e estrutural dessas proteínas. Estes estudos serão complementados pela análise comparativa do reconhecimento imune destas proteínas por anticorpos de indivíduos naturalmente expostos ao *P. vivax*.

2. Objetivos Específicos

- 2.1. Geração de proteínas recombinantes correspondentes a diferentes regiões das proteínas MSP-1, MSP-3 α e MSP-3 β ;
- 2.2. Caracterização preliminar da composição da estrutura secundária das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α e MSP-3 β por Dicroísmo Circular;
- 2.3. Caracterização biofísica e bioquímica das proteínas recombinantes derivadas da região C-terminal da MSP-3 α (CC4 e CC5) através de ensaios de Espectrometria de Massas, Cromatografia em Gel-filtração, Espalhamento Dinâmico de Luz e Ultracentrifugação Analítica;
- 2.4. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das proteínas recombinantes MSP1₁₉, MSP-3 α e MSP-3 β por anticorpos IgG em indivíduos expostos ao *P. vivax*.

III. Material e Métodos

---

1. Reagentes e Soluções

1.1. Soluções e tampões para eletroforese em gel de agarose.

- a. *TAE*: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0 (Invitrogen)
- b. *Gel de agarose*: 1% agarose (Invitrogen), *TAE*, 1 µg/mL brometo de etídeo (Invitrogen)
- c. *Tampão de amostra para eletroforese de DNA (5X)*: 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno-cianol (Sigma), 30% Glicerol (Merck)

1.2. Soluções e tampões para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).

- a. *Gel de corrida*: 30% acrilamida, 0,8% bis-acrilamida (Fluka Chemie, Steinheim, Alemanha), 0,75 M Tris (Invitrogen), 0,2% SDS pH 8,8 (Invitrogen), 0,1% persulfato de amônio, Temed 12 µL (Invitrogen) (vol. final de 10 mL)
- b. *Gel de separação*: 12% acrilamida, 1,2% bis-acrilamida, 0,25 M Tris, 0,2% SDS pH 6,8, 0,1% persulfato de amônio, Temed 10 µL (vol. final 5 mL)
- c. *Tampão de amostra para SDS-PAGE (4x)*: 10% glicerol, 4% SDS, 100 mM 2-mercaptoetanol (Bio-Rad), 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% de azul de bromofenol (Bio-Rad)
- d. *Tampão de corrida*: 35 mM SDS, 160 mM glicina, 25 mM Tris-HCl pH 8,3
- e. *Solução corante*: 1% Coomassie blue R250 (USB), 45% Metanol, 10% ácido acético
- f. *Solução descorante*: 45% Etanol, 10% ácido acético

1.3. Meios de cultura para bactérias.

- a. *LB (Luria Bertani)*: 2% LB broth base (USB), 0,5% NaCl pH 7,0
- b. *LB-amp*: LB, 100 µg/mL de ampicilina (USB)
- c. *LB-kan*: LB, 30 µg/mL de kanamicina (gibco)
- d. *SOB*: 2% triptona (Oxoid), 0,5% extrato de levedura (Difco), 0,05% NaCl, pH 7,0
- e. *SOC*: SOB, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glicose (Invitrogen)

1.4. Soluções e tampões para “Immunobloting”.

- a. *Tampão de transferência*: 192 mM Glicina, 25 mM Tris, 20% Metanol
- b. *Solução de revelação*: 5 mg 3,3'-Diaminobenzidina (Sigma), 10 µL H₂O₂, 35 mL PBS

1.5. Tampões utilizados para a purificação das proteínas recombinantes.

- a. *Tampão de lise*: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF e 1 mg/mL de lisozima
- b. *Tampão de equilíbrio*: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl.
- c. *Tampão de lavagem*: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10% glicerol.
- d. *Tampão de eluição*: 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10% glicerol, 15 a 300 mM Imidazol.

1.6. Soluções e tampões para ensaios imunoenzimáticos (ELISA).

- a. *Tampão carbonato 0,05 M*: 15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃ pH 9,6
- b. *PBS*: 8 mM NaH₂PO₄, 2,3 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl pH 7,4
- c. *PBS-Tween*: PBS, 0,05% Tween 20 (Fluka Chemie)
- d. *Tampão fosfato-citrato*: 0,2 M NaH₂PO₄, 0,2 M C₆H₈O₇ pH 5,0

- e. *Soluções de bloqueio*: PBS, 5% de leite desnatado (Molico)
- f. *Solução de revelação*: 1 mg/mL de OPD (Sigma), 0,03% (vol/vol) de H₂O₂ diluído em tampão fosfato-citrato

2. Construção dos plasmídeos recombinantes.

2.1. Geração de plasmídeos correspondentes à MSP-3 α .

Os plasmídeos recombinantes correspondentes a região C-terminal da MSP-3 α (pGEX-1 λ T/FP-1, aa 359 – 798) e proteína inteira (pGEX-2T/FP-2, aa 24 – 838) foram cedidos pelo Dr. John Barnwell (CDC-Atlanta, EUA). As seqüências de nucleotídeos que codificam a FP-1 ou FP-2 foram obtidas através da digestão com as enzimas de restrição *EcoRI* ou *BamHI* (Invitrogen), respectivamente. Os fragmentos correspondentes a FP-1 ou FP-2 foram inseridos nos vetores de expressão pHISa ou pHISb (SHEFFIELD et al., 1999), respectivamente, em fusão com His₆. Os clones recombinantes contendo o inserto de interesse na orientação correta foram selecionados por análises de restrição enzimática.

Com base na informação de que a proteína MSP-3 α apresenta regiões com alta probabilidade para formar estrutura terciária “coiled-coil” (GALINSKI et al., 1999), resolvemos investir na construção de plasmídeos recombinantes contendo fragmentos que codificam determinadas regiões preditas para formação deste tipo de estrutura visando estudar possíveis interações entre as mesmas. A Figura 4 apresenta a seqüência de aminoácidos da MSP-3 α inteira (Gene Bank, número de acesso AF093584) destacando a região C-terminal da MSP-3 α e as posições de cada uma das quatro proteínas recombinantes geradas a partir da análise de

probabilidade para formação de “coiled-coil” (CC) como estrutura terciária conforme descrito por Galinski et al. (1999). Nesta figura pode ser observado que os recombinantes gerados a partir da região C-terminal da MSP-3 α representam seqüências contendo uma (CC4, CC5), duas (CC4-5) ou quatro (CC3-6) regiões promissoras para formação de “coiled-coil”.

As seqüências de nucleotídeos correspondentes aos diferentes domínios foram obtidas através da amplificação por PCR a partir do plasmídeo MSP-3 α pGEX2T/FP-2 utilizando os seguintes oligonucleotídeos (Invitrogen): CC3-6 senso (CGA CAA GCT TGC TCT GAA GTA CCA GAG GGG) e CC3-6 anti-senso (GGG TGC TCG AGT AAT GTC GAA TTC GTC TCC AAA); CC4 senso (CAA GCT TGC AAA GCA TCG ATC GAA ACG ACG) e CC4 anti-senso (TGC TCG AGT TTA GTG GGT CTT TGC CTC TTC); CC5 senso (CAA GCT TGC TCA GAT GAA GCA CAG CAA GAA) e CC5 anti-senso (TGC TCG AGT TTA TGC CCC TAC TTT TGC TGC). As porções sublinhadas dos oligonucleotídeos senso e anti-senso indicam sítios de restrição para as enzimas *Hind*III ou *Xho*I, respectivamente. Para a amplificação do gene msp-3 α (CC4-5) foram utilizados os oligonucleotídeos CC4 senso e CC5 anti-senso. Estes nucleotídeos codificam para as posições 1047-2369 (CC3-6), 1233-1854 (CC4-5), 1434-1854 (CC5) e 1233-1389 (CC4).

Os produtos das amplificações foram inicialmente inseridos no vetor pMOSBlue (Amersham Biosciences), para confirmação da seqüência de DNA e, posteriormente, subclonados no vetor pET-28a em fusão com His₆ (Novagen) utilizando sítios de restrição enzimática (*Hind*III e *Xho*I) específicos para clonagem neste vetor. Após ligação no vetor pET digerido com as mesmas enzimas, o produto da ligação foi transformado em bactérias competentes DH5 α . As colônias contendo

plasmídeos com inserto na orientação correta foram selecionadas por análise de restrição.

A

MKHTRSVTLYLFLLLTLCAYLTGAEVIGGSPNNEAPNSSRHHLRNGFPGKNDLPHPEEPNNLEGKNESSDQCDTIN
LDQVTEKEKKTIEEASVQAQDGPNAEPNNAEQIQAE LQKVKTAKENSAASATAAETAKNNAVSAGKGLDAAKTAI
EKAKAAAEEAKKEAAIAEKA EKDAEAAQKKDNL EDVKSQVPTAETAATNAEKKKTKAEI AVEIVKAVVAKEEEAQK
ASDEAQKACEKAKKAHAKAQKASDTTKTVETFKTNAEAAAANKAKDEAGKAETAATDAKSTEDLSVAKDKAKAA
ETAAIEAKKQQVKAEIAAEVAKAKVAKEEADAAQKKAEAAKKIVDKIAKDSEVPEAQKAAEFATETVKKATTAATE
AGEKAQEAENLPAAETSDAVKEKADGAEKAAGEAKKASIETEI AVEVAKAEVLNAEVKKTAQEAENDATEAKKQ
AEKAKAAAEEAKTHGEKA EKVGESTKAHSDEAQQENKNAKDASEEAENRAVDAL EEAYAVEAHLARTKNAAES
AKSATDLSKLEEAKEEAIDAANIAHQWLKATQAATIAKEKKEAAKVAAEKAQKEATAAKLKA AKAEAKKAETEA
VKA AVEARAAAAEAKQEAAKVGASKEPQETKNKANVEAEATGNEAKKAEDAAEEAKEAAKKANEATDADVARA
EADKTIAAAKKAKKAREKAAYGLLKTKNQYVLEPLDISPESADNITSKEEQVKEEVEDQGDEDNSEAEVEEALPNG
SGAQEEDVNLEMDDEEEVEENVATNQQTGGNREKRNTSDTVDDTNADKQFGDEFDTYDDIKKVTEALVKSMTSL
VSDDPSVGDITINEFLSDMNLHFLSW

B

Figura 4. Seqüência de aminoácidos e representação esquemática das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α . **A.** Seqüência de aminoácidos (aa) correspondente à MSP-3 α (acesso AF093584). A seqüência de aa correspondente à região da MSP-3 α expressa como proteína recombinante está sombreada na cor cinza e as áreas preditas para a formação de "coiled-coil" estão sublinhadas. **B.** Representação esquemática da localização das proteínas recombinantes geradas em relação à proteína inteira. A área destacada representa a região da MSP-3 α que foi expressa como proteína recombinante, . As linhas acima do box representam a análise de predição para formação de "coiled-coil" como estrutura terciária e as linhas abaixo representam a posição das proteínas recombinantes geradas.

2.2. Geração de plasmídeos correspondentes à MSP-3 β .

Os plasmídeos recombinantes correspondentes a região N-terminal da MSP-3 β (pGEX-1 λ T/FP-1, aa 35 – 375), C-terminal (pGEX-2T/FP-2, aa 385 – 654) e proteína inteira (pGEX-1 λ /FP-3, aa 35 – 654) foram cedidos pelo Dr. John Barnwell (CDC-Atlanta, EUA). A Figura 5 apresenta a seqüência de aminoácidos da MSP-3 β inteira (Gene Bank, número de acesso AF099662) destacando a posição das proteínas recombinantes obtidas (GALINSKI et al., 2001). As seqüências de nucleotídeos correspondentes às regiões N e C-terminais da MSP-3 β (FP-1 e FP-2) foram obtidas por digestão com a enzima de restrição *EcoRI*, em ambos os casos. Os produtos de digestão foram inseridos nos vetores pHISa (FP-1) ou pHISb (FP-2). Os plasmídeos recombinantes contendo o inserto de interesse na orientação correta foram selecionados por análises de restrição enzimática.

A seqüência de nucleotídeos correspondente à MSP-3 β inteira (FP-3) foi obtida através de amplificação por PCR a partir do vetor pGEX-1 λ T/FP-3 utilizando os seguintes oligonucleotídeos: ATG GAT CCG AAC TTG AGA AAC GGA TGG TCA (senso) e CGG ATC CTC TGC GAG TGT TTT ATG CGC TTC (anti-senso) (Invitrogen). A reação de PCR foi realizada com oligonucleotídeos contendo sítios de restrição enzimática para *Bam*HI (porções sublinhadas). O produto desta amplificação foi inicialmente inserido no vetor pMOS*Blue*, para confirmação da seqüência de DNA e, posteriormente, subclonado no vetor pET-14b (Novagen).

A

MKQLCGLAFLALLLNFLTCDNVATRGEIVNLKNPNLRNGWSMNNLSAQNEENIVNPDGSDDVTDEEGDGEALEG
 QNGSPEKSAEPKVHAQEEVNKESLKSKAQNAKAEAEKAAKAAESAKKNTLDALEKVNVPTELNNVKKFAESAAT
EAQKQENIATEAEKKVAEANGEVVELQKLKDEVDKAAKKAKQLQLKAEIAEHAVKAQVAKTEAEKAQKDATTAK
EVAIKETGTSKSENVTKAIDMAKKEEEETKNQASIASENADKAAKAAQEEVKKEIKDENKEISQLENEITKLGDINTV
KELASNAEDASKNAKKEMVKAQIAAEVAKAEKAKIEAENANFLAEKAKQTAEKIAKTSKSTEKITEEVRKATEFAK
TAGDATTQAATEAAGDVSSEEQKQKVLLESIKQKAESALQASKDAIKAKTEAENFLEIAKEVPKAEAAKEEAQKA
ATSADAEKTEALKIAEEVNKSDASENEKKKIETEANATAGEAQKAAAFAKEAADAADKDTNEAVTLAVAKEKVEKA
LKAAKEAKKANEEKASYALIRTKKQYALEPLEITSEAGYNITEKEEQVKEEIEEQDDKASEEEEEEDTHQTDQTEIDEV
 DISVDNEEEEEEGTADEQIEGEKDTPEKEAKEEPASGEKILDDKEAHKTAEKFKDSNPAKTEGDKILETLISDVGED
 TLKNMQQDLHQYFKGK

B

Figura 5. Sequência de aminoácidos e representação esquemática das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β . **A.** Sequência de aminoácidos (aa) correspondentes à MSP-3 β inteira (acesso AF099662). A sequência de aa correspondente à região da MSP-3 β expressa como proteína recombinante está sombreada na cor cinza e as áreas preditas para a formação de “coiled-coil” estão sublinhadas. **B.** Representação esquemática da localização das proteínas recombinantes geradas em relação à proteína inteira. A área destacada representa a região da MSP-3 β que foi expressa como proteína recombinante, . As linhas acima do box representam a análise de predição para formação de “coiled-coil” como estrutura terciária e as linhas abaixo representam a posição das três proteínas recombinantes geradas (FP-1, FP-2 e FP-3).

3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.

3.1. Expressão das proteínas recombinantes em pequena escala.

A expressão e purificação das proteínas recombinantes derivadas da MSP₁₉, MSP-3 α e MSP-3 β foram realizadas conforme descrito anteriormente (CUNHA et al., 2001), com algumas modificações. Todos os reagentes e soluções utilizados na metodologia estão contidos no item 1. Bactérias da linhagem BL21(DE3) (Novagen) foram transformadas com cada um dos plasmídeos recombinantes e as condições ótimas de lise e expressão foram estabelecidas em pequena escala de crescimento bacteriano (10 mL). A concentração apropriada de IPTG (Eppendorf) para indução da expressão de cada uma das proteínas foi estabelecida após estudos dose-resposta (0,01 mM, 0,1 mM e 1 mM IPTG) e em diferentes temperaturas de indução (30°C e 37°C). Estudos cinéticos de tempo de indução (3 – 18h) com IPTG também foram realizados para cada uma das proteínas recombinantes, na cepa de *E. coli* selecionada. Além disso, diversos tampões de lise das bactérias foram testados: PBS; PBS, 1% Triton X-100; PBS, 1 mM EDTA e 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl (pH 8,0). Em todos os tampões foram adicionados 1 mg/mL de lisozima (Sigma) e 1 mM de PMSF (Pierce). As condições de lise das bactérias por sonicação em banho de gelo (3 ciclos de 30 segundos em intervalos de 30 segundo entre os ciclos) foram também estabelecidas com auxílio de um sonicador (Branson Sonifier mod. 450, EUA). As frações obtidas (precipitados e sobrenadantes) foram analisadas por separação eletroforética em gel de poliacrilamida de 12 ou 15% (SDS-PAGE 12 ou 15%) utilizando equipamento “Mini PROTEAN® 3 cell” (Bio-Rad), em condições redutoras, na presença de 2-mercaptoetanol (2-ME) e coradas por azul de

Coomassie. Após a detecção de todas as proteínas recombinantes por "immunoblotting" com anticorpo monoclonal anti-His (Amersham Biosciences), utilizamos o programa PhotoCapt MW Versão 10, 01 (Viller. Lourmat Biosystems, Curitiba, PR, Brasil) para estabelecer a massa molecular aparente de cada uma delas.

3.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes em média e larga escala.

Uma vez padronizadas as condições ótimas de expressão para cada uma das proteínas recombinantes em pequena escala, estas foram, então, produzidas em média escala (1 L) com a finalidade de padronizar os protocolos de purificação. Resumidamente, as bactérias recombinantes foram cultivadas em meio LB (Luria Bertani, Sigma) contendo o antibiótico ampicilina (100 µg/mL, USB) para expressão a partir dos vetores pHIS e pET-14b ou kanamicina (30 µg/mL, GIBCO) para expressão a partir do vetor pET-28a, por 16 horas a 37°C, sob agitação a 200 rpm. Após este período, a cultura foi diluída (1:25) em meio contendo os antibióticos correspondentes e incubada a 37°C, sob agitação, até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5-0,7. A seguir, as bactérias foram induzidas pela adição de IPTG a 37°C, durante 3 horas, sob agitação. Após este período, as bactérias foram centrifugadas (5.000 rpm/15 min/4°C) e o precipitado ressuspendido em tampão de lise. As bactérias foram lisadas em banho de gelo aplicando-se 3 ciclos de sonicação cada um com 5 minutos de pulso (50%, 75% e constante) e intervalos de 5 minutos entre os pulsos. Posteriormente, o extrato bacteriano foi centrifugado (14.000 rpm/60 min/4°C) e o sobrenadante obtido aplicado em resina de cobalto Talon (BD Biosciences) ou

Níquel Ni Sepharose™ High Performance (Amersham Biosciences) previamente equilibrada com o tampão de equilíbrio.

Em seguida, a resina foi lavada em tampão de lavagem e as proteínas que se ligaram à coluna foram submetidas a um gradiente de eluição, utilizando-se tampão contendo concentrações entre 15 e 300 mM de Imidazol (USB). O material eluído foi dialisado contra 20 mM Tris-HCl pH 8,0. Após filtração em membrana de 0,22 µm, as proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna Resource Q (Amersham Biosciences) ou UNO Q 12 (BioRad), equilibrada com 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, acoplada ao sistema ÄKTA™prime (Amersham Biosciences) ou o Sistema BioLogic Duo-Flow (BioRad). As proteínas foram eluídas por um gradiente linear de 0 a 1 M de NaCl neste mesmo tampão. As frações coletadas foram analisadas em gel de poliacrilamida e coradas por azul de Coomassie.

Uma vez estabelecidas as condições de expressão e purificação em média escala, as proteínas recombinantes passaram a ser produzidas a partir de crescimento bacteriano em larga escala (5 L – 20 L) a fim de obter quantidade suficientes de material para realização dos testes de caracterização estrutural e imunológicos. A MSP1₁₉ passou por uma purificação adicional por gel-filtração em coluna Superdex 200 (GE Healthcare).

A concentração de cada proteína foi determinada espectroscopicamente em 280 nm utilizando a lei de Beer-Lambert:

$$\text{Abs} = \varepsilon \times l \times C$$

Onde Abs é a absorbância obtida pela proteína em tampão contendo 6,2 M de Guanidida em comprimento de onda de 280 nm; ε é o coeficiente de extinção; l é o caminho óptico (cm) e C é a concentração da proteína (g/L). O valor do coeficiente

de extinção foi calculado através do programa ProtParam tool (GASTEIGER et al., 2005) (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>, acessado em março de 2007). Em virtude da CC4 (MSP-3 α) não possuir resíduos de triptofano ou tirosina na sua sequência, sua concentração foi estimada através de gel de poliacrilamida 15%, comparando-se a concentração proteína com concentrações pré-estabelecidas de albumina bovina.

4. Modelagem Molecular.

A Modelagem Molecular da MSP₁₉ de *P. vivax* foi realizada pelos Dr. Alberto Spisni e Dr. Sergio Oyama Junior do Grupo de Ressonância Magnética Nuclear e pelo Dr. Francisco Javier Medrano Martin, coordenador do Grupo de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas. As coordenadas cristalográficas da MSP₁₉ de *P. cynomolgi* foram obtidas do “Protein Data Bank” (Código PDB: 1BW9). Os procedimentos de visualização, alteração das cadeias laterais e refinamento foram realizados em uma estação de trabalho “Octane” (Silicon Graphics) utilizando-se os módulos “Biopolymer”, “Homology” e “Discover” do programa “InsightII”.

Uma vez que o alinhamento das seqüências revelou que a estrutura primária de *P. vivax* difere em apenas dez resíduos de aminoácidos em relação a *P. cynomolgi* (CHITARRA et al., 1999; FERREIRA; SOARES, 2000), a posição topológica destes resíduos na estrutura cristalográfica foi criteriosamente avaliada, assim como o impacto das mutações sobre a proteína. Os resíduos foram manualmente alterados e a estrutura resultante otimizada a cada passo. Devido ao dimorfismo K/E de *P. vivax*, esta alteração não foi implementada ao modelo final.

A otimização da estrutura foi realizada através de uma combinação dos algoritmos “Steep Descents” e “Conjugate Gradient” até que uma variação de 0,01 Kcal/mol Å fosse obtida.

5. Métodos Biofísicos.

5.1. Dicroísmo Circular.

Para a caracterização preliminar da composição da estrutura secundária das proteínas em estudo, realizamos ensaios de DC em um espectropolarímetro J-810 (JASCO) com as seguintes regiões: CC4, CC5, CC4-5, CC3-6 e FP-1 (MSP-3 α) e FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β), previamente dialisadas contra PBS e ajustadas para as seguintes concentrações finais de: CC4 – 35 μ M, CC5 – 2,6 μ M, CC4-5 – 2,2 μ M, CC3-6 – 15 μ M, FP-1 (MSP-3 α) – 3,6 μ M, FP-1 (MSP-3 β) – 33 μ M, FP-2 – 5,4 μ M e FP-3 – 1,4 μ M. Os dados foram coletados utilizando-se varredura de 100 nm/min, intervalo de dados de 1 nm e tempo de resposta de 1s. As análises foram realizadas em um comprimento de onda variando entre 200 e 260 nm (UV-distante), sob temperatura de 20°C, controlada pelo sistema tipo *Peltier* PFD 425S em cubeta de quartzo de 0,5 cm para CC4, CC5, CC4-5 e FP-1 (MSP-3 α) e FP-2 (MSP-3 β) e 0,1 cm para as demais proteínas. Após a obtenção de 10 coletas para cada amostra, o registro e tratamento de dados foram realizados utilizando-se o programa Spectra Manager (JASCO), auxiliado pelo programa Origin 6.1 (OriginLab Corporation). Para a análise gráfica, a unidade dos dados originados da leitura de cada proteína foi convertida em Elipticidade Molar Residual $[\theta]$ utilizando a equação segundo Ramos (2004):

$$[\theta] = \theta / 10 \cdot l \cdot C \cdot n$$

Onde θ é a elipticidade (milidegrees), l indica o caminho óptico (cm), C é a concentração da proteína (mol/Litro) e n representa o número de resíduos de cada proteína. A Elipticidade Molar Residual é dada em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$.

Os dados obtidos por DC foram interpretados e convertidos, através do programa CDNN (BOHM et al., 1992), em porcentagem de estrutura secundária, levando-se em consideração a concentração e o número de aminoácidos da proteína analisada. Para tanto, foram realizadas as deconvoluções dos espectros, onde são comparados em forma de rede neural, os espectros de DC das proteínas estudadas e os espectros armazenados em um banco de dados de proteínas contendo estrutura cristalográfica já determinada. Todos os ensaios de DC foram realizados no LNLS sob a supervisão do Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos e auxílio técnico de Fabio Schaberle.

Através de análise computacional, foi demonstrado que as proteínas da família das MSP-3 contêm regiões promissoras para formação de estrutura terciária do tipo “coiled-coil” (GALINSKI et al., 1999). Por sua vez, este tipo de estrutura terciária estabelece a formação entre duas a cinco hélices, sendo que, dímeros e trímeros são as formas mais comumente encontradas. Estas formações também podem ser encontradas na forma paralela (formando homo-dímeros, homo-trímeros, etc.), ou antiparalela (formando hetero-dímeros, hetero-trímeros, etc.). Desta forma, decidimos avaliar uma possível interação entre as regiões da MSP-3 α com alta probabilidade para a formação de “coiled-coil” (CC4 e CC5) e as regiões N e C-terminais da MSP-3 β .

Para a análise da interação entre as diferentes regiões da MSP-3 α e MSP-3 β , utilizamos as proteínas recombinantes diluídas em PBS nas seguintes

concentrações: i) MSP-3 α : CC4 – 17 μ M, CC5 – 6,7 μ M, CC4 + CC5 – proporção equimolar de 5 μ M; ii) MSP-3 β : FP-1 – 15 μ M, FP-2 – 15 μ M, FP-1 + FP-2 – proporção equimolar de 15 μ M. Após a junção das proteínas, ambas as soluções foram incubadas em gelo 30 minutos antes da leitura. Os dados foram coletados e analisados de acordo com o procedimento utilizado para as demais proteínas, em cubeta de quartzo de 0,5 cm para CC4 e CC5 (MSP-3 α) e 0,1 cm para FP-1 e FP-2 (MSP-3 β).

Os espectros provenientes das interações analisadas foram comparados em relação à soma teórica dos espectros obtidos pelas regiões individualmente (em $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$). Paralelamente, comparamos também os espectros da interação em relação às proteínas recombinantes que compreendem ambas as regiões analisadas: (i) MSP-3 α (CC4-5), quando analisamos a interação entre CC4 + CC5 e, (ii) MSP-3 β (FP-3), quando analisamos a interação entre FP-1 + FP-2.

5.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência.

O espectro de emissão de fluorescência foi obtido no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS) empregando o fluorímetro Aminco Bowman® Series 2 (SLM-AMINCO). O espectro da CC5 (MSP-3 α), em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0 na concentração de 1 mg/mL foi mensurado em cubetas de quartzo de caminho óptico de 10 x 10 mm. O espectro de emissão do triptofano foi obtido com excitação a 280 nm e emissão de 300 a 400 nm. Uma segunda leitura foi realizada com a proteína, nas mesmas condições citadas acima com adição de tampão contendo 20 mM Tris-HCl, 6,2 mM guanidina pH 8,0, com o objetivo de medir o espectro de emissão de fluorescência da proteína desnaturada. Os dados obtidos foram analisados com o

analisados com o auxílio do Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos e auxílio técnico de Fabio Schaberle (LNLS).

5.3. Espectrometria de Massa.

Com o objetivo de determinar a massa molecular monomérica das proteínas recombinantes que compreendem regiões com alta probabilidade para formação de “coiled-coil” (CC4 e CC5), realizamos a análise dos espectros de massa utilizando o espectrômetro de massa Ettan™ MALDI-ToF Pro, pertencente ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo. As amostras foram ajustadas para a concentração de 1 mg/mL e suas massas moleculares foram avaliadas utilizando uma matriz de ácido sinapínico (3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid).

5.4. Cromatografia em Gel-filtração.

As proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α), ambas na concentração de 0,2 mM, foram dialisadas contra PBS e aplicadas em coluna Superdex 200 XK16/70 previamente equilibradas em PBS com 1,5 volumes de coluna em um fluxo de 0,5 mL/min. O Raio de Stokes (R_s) e a massa molecular teórica das frações eluídas nos diferentes picos foram estimados usando proteínas globulares padrão apresentadas na tabela 3, anteriormente submetidas à cromatografia sob condições idênticas. O volume de solvente na face externa da coluna (V_o) foi determinado por Azul Dextrana 2000. As amostras de cada fração foram monitoradas em um comprimento de onda de 280 nm e, após a eluição, analisadas em gel de poliacrilamida 15%.

Tabela 3 - Sumário das massas moleculares e raio de Stokes das proteínas globulares utilizadas como padrão para a cromatografia em Gel-filtração.

Denominação	Proteína globular	Massa molecular (kDa)	Raio de Stokes (Å)	Volume de Eluição (mL)
a	Ferritina	440	57,9	160
b	Albumina	67	35,5	210
c	Ovalbumina	43	30,5	223
d	Ribonuclease A	13,7	16,4	262

A denominação de cada proteína padrão foi usada para localizar graficamente (no item resultados) as frações das amostras eluídas.

Para estimar a massa molecular de cada proteína recombinante, estabelecemos inicialmente o coeficiente de distribuição ("partition coefficient" – K_{av}) (SIEGEL; MONTY, 1966; LÊ MAIRE et al., 1980) dado pela equação:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Onde V_e é o volume de eluição da proteína e V_t é o volume total da coluna. A massa molecular aparente (M_r) foi obtida através da plotagem de:

$$\log M_r \text{ vs. } K_{av}$$

O Raio de Stokes (R_s) das proteínas MSP-3 α (CC4) e MSP-3 α (CC5) foram obtidos de acordo com Hwang et al. (2004) plotando:

$$(-\log K_{av})^{1/2} \text{ vs. } R_s$$

Com o intuito de identificar uma possível interação entre as duas regiões com alta predição para formação de "coiled-coil", incubamos as proteínas CC4 e CC5 na concentração equimolar de 200 μ M, durante 18 horas, a 4°C. As proteínas

recombinantes foram aplicadas em coluna Superdex 200 XK16/70 utilizando o mesmo protocolo citado acima.

Os ensaios de cromatografia foram efetuados no Instituto de Química – USP, no laboratório do Prof. Dr. Chuck Farah, com o auxílio de Cristiane R. Guzzo.

5.5. Espalhamento Dinâmico de Luz.

Os ensaios de EDL foram realizados utilizando um equipamento DynaPro-MS800 (Protein Solutions Inc.) que monitora o espalhamento de luz em 90°, equipado com controlador de temperatura. As proteínas CC4 e CC5 na concentração de 1 mg/mL em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0, foram previamente centrifugadas a 13.000 rpm por 30 min a 4°C e filtradas (0,22 µM) com o objetivo de remover partículas grandes inespecíficas. O coeficiente de difusão (D) foi medido monitorando o espalhamento da luz a 20°C. Foram coletadas 100 medidas independentes de 10 s cada. Selecionamos apenas os picos de espalhamento entre 0,1 e 100 nm. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos e Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa do LNLS.

5.6. Ultracentrifugação Analítica.

Com o objetivo de determinar a massa molecular oligomérica da proteína CC5, esta foi analisada através de ensaios de UCA. Os ensaios de equilíbrio de sedimentação, foram realizados sob a supervisão do Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos e auxílio técnico de Fabio Schaberle em uma ultracentrífuga analítica Beckman Optima XL-A, utilizando-se o protocolo descrito por Regis et al. (2005).

A CC5 foi analisada em concentrações variando entre 0,25 a 1 mg/mL em tampão 20 mM Tris-HCl e 100 mM NaCl (pH 8,0), utilizando velocidades de 7.000 a 11.000 rpm (rotor AN-60Ti), e aquisição dos dados a 280 nm. As análises dos dados envolvendo a interpretação da curva de absorbância *versus* o raio da célula foram realizada através de regressão não-linear utilizando o pacote do programa Origin (Microcal). Os métodos utilizado para a análise do equilíbrio de sedimentação foram realizados utilizando se a equação segundo Johnson et al. (1981):

$$C = C_0 \exp [M (1 - \bar{V} \rho) \omega^2 (r^2 - r_0^2) / 2RT]$$

Onde C é a concentração da proteína na posição radial r , C_0 é a concentração da proteína na posição radial r_0 , M é a massa molecular, $\bar{V}$ é o volume parcial específico, ω é a velocidade angular, R é constante dos gases e T é a temperatura absoluta. O software Sednterp (www.jphilo.mailway.com/download.htm), foi utilizado para estimar o volume parcial específico, a densidade e a viscosidade do tampão. Os resultados obtidos foram analisados pelo Dr. Carlos Henrique Inácio Ramos.

6. Métodos Estruturais.

As frações contendo as proteínas CC4, CC5, CC4-5, CC3-6 e FP-1 (MSP-3 α) e FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) em alto grau de pureza foram reunidas, e sua concentração foi ajustada para 7-40 mg/mL em colunas Centriprep^{TM}YM3 ou Amicon®Ultra-4 (ambas da Millipore). Em seguida, estas foram dialisadas contra tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0.

6.1. Testes de Cristalização.

Após obtenção das proteínas recombinantes em quantidade e pureza apropriados, as primeiras tentativas de cristalização foram iniciadas. Os seguintes kits de cristalização foram utilizados: Crystal Screen I (Hampton Research), Crystal Screen II (Hampton Research), INDEX (Hampton Research) Emerald Wizard I (Emerald Biostructures), Emerald Wizard II (Emerald Biostructures) e JBScreen 1-10 bulk (Jena Bioscience). Utilizamos placas “sitting drop” (Cryschem plate, Hampton Research) contendo 24 poços e adicionamos 450 μL por poço de cada uma das condições do kit. Aliquotas de 1,5 μL de cada condição do kit foram transferidas para o “palco” central do poço e 1,5 μL da proteína-alvo foi adicionado, formando uma gota. A concentração final de cada proteína a ser testada variou de acordo com o número de condições por placa em que se observou a presença de precipitados (~50%) e também em função da intensidade destes precipitados. As placas foram vedadas com fita adesiva transparente e, em seguida, mantidas a 18°C. Periodicamente as placas foram analisadas quanto à presença de precipitados e/ou possíveis cristais.

A partir da submissão das proteínas recombinantes aos testes, cada placa foi visualizada diariamente durante a primeira semana subsequente à montagem das placas. Após este período a análise foi realizada semanalmente durante o primeiro mês e, posteriormente, as placas foram observadas mensalmente.

6.2. Refinamento das condições de cristalização.

Durante os ensaios de cristalização iniciais, algumas proteínas apresentaram a formação de cristais. Com o objetivo de melhorar a qualidade destes cristais realizamos ensaios de refinamento variando sensivelmente as condições em que os cristais foram formados, variando-se a concentração para mais e para menos em relação ao agente precipitante (Polietilenoglicol - PEG) e pH dos tampões referente à condição em que os cristais foram formados. Para isso, mantivemos a proporção de aplicação das soluções relativas à gota e ao poço, de acordo com os ensaios utilizando os kits comerciais descritos no item 6.1.

Para a proteína FP-1 (MSP-3 α) um total de seis refinamentos foram concluídos: (i) PEG 3350 (21 a 31%); 0,1 M HEPES (pH 7,0 a 8,5); 0,2 M (NH₄)₂ SO₄ (proteínas na concentração de 7, 10 e 15 mg/mL), (ii) PEG 3350 (15 a 25%); 0,1 M HEPES (pH 6,5 a 8,0); 0,2 M (NH₄)₂ SO₄ e (iii) PEG 3350 (15 a 25%); 0,1 M Tris-HCl (pH 6,5 a 8,0); 0,2M (NH₄)₂ SO₄. Realizamos também refinamentos na condição de 23% de PEG 3350, 0,1 M Hepes pH 7,0 e 0,2 M (NH₄)₂SO₄ em presença dos aditivos referentes aos kits Additive Screen 1 (iv), 2 (v) e 3 (vi) (Hampton Research), onde excepcionalmente, adicionamos 400 μ L da solução descrita acima em cada poço das placas e no “palco” central foram depositados 1,5 μ L da proteína recombinante, 0,3 μ L de cada aditivo respectivo aos kits e 1,2 μ L da solução da placa.

Em relação à proteína CC3-6 (MSP-3 α), observamos formação de cristais em diversas condições, as quais foram submetidas aos testes de refinamento: (i) PEG 8000 (14 a 25%); 0,1 M CHES (pH 8,6 a 10), (ii) PEG 10000 (12 a 22%); 0,1 M Tris-

HCl (pH 7,5 a 9,0), (iii) PEG 8000 (5 a 30%); 0,1 M HEPES (pH 7,0 a 8,2) e (iv) PEG 4000 (10 a 23%); 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5 a 9,0); 0,2 M Acetato de Sódio.

A proteína FP-3 (MSP-3 β) formou agulhas em uma condição do kit Crystal Screen II (Hampton Research) e cristais em outra condição, do kit Crystal Screen I. Devido a este fato, foram realizados os refinamentos necessários dos cristais obtidos, utilizando as seguintes condições: (i) PEG 10000 (18, 20, 22, 24 e 26%) e 0,1 M HEPES (pH 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5) e (ii) PEG 8000 (6 a 11%).

Os testes de cristalização foram efetuados no LNLS sob a supervisão do Dr. João Barbosa. Posteriormente, utilizamos simultaneamente a Sala de Cristalização do Prof. Dr. Chuck Farah, (Instituto de Química - USP) e a Sala de Cristalização do Prof. Dr. Sergio Schenkman, (Departamento de Biologia Celular - UNIFESP), devido à facilidade de serem mais próximas do nosso laboratório.

6.3. Difração de raios X.

Os cristais obtidos durante os testes iniciais ou refinamento que apresentaram dimensões aceitáveis (100 μ m) para a análise de difração, foram encaminhados para a linha de luz D03B-MX1 que opera na faixa de raios X e utiliza o detector CCD (MarResearch). Todas as análises de difração foram realizadas sob a supervisão do Dr. João Barbosa.

Inicialmente foram preparadas diversas soluções de crio proteção, que descrevem as mesmas condições em que cada cristal foi formado, acrescidas de 20% PEG 400, 20% Glicerol ou 20% Etilenoglicol, alternadamente. Durante as análises, a difração é avaliada em relação à formação de anéis de gelo, sendo necessário então a imersão do cristal durante um minuto em 1 μ L de um dos crio

protetores selecionados. Buscando melhorar a qualidade de alguns dos cristais analisados, duas metodologias foram adotadas. A metodologia de "annealing" consiste em retirar, durante aproximadamente três segundos, o suprimento de nitrogênio presente sobre o cristal direcionado ao feixe de raios X, visando um rápido aquecimento e resfriamento do mesmo. Desta forma, as moléculas de alguns cristais poderiam sofrer um "rearranjo" aumentando a uniformidade entre as células unitárias do cristal. Tendo a mesma finalidade da técnica de "annealing" mencionada acima, realizamos a técnica de desidratação, deixando aberta a gota por aproximadamente 1 minuto.

7. Ensaio Imunológicos.

7.1. Amostras de soro.

Um total de 220 amostras de soro de indivíduos infectados pelo *P. vivax* procedentes de diferentes áreas endêmicas de malária do Estado do Pará foram incluídos neste estudo. De 33 destes indivíduos, uma segunda amostra de soro de cada indivíduo, coletada 9 meses após tratamento quimioterápico, também estava disponível para este estudo. Estas amostras já estavam disponíveis e foram utilizadas em estudos anteriores sobre a resposta imune humana a MSP-1 (SOARES et al., 1997, 1999b; RODRIGUES et al., 2003) e AMA-1 (RODRIGUES et al., 2005).

Um grupo de 26 indivíduos adultos sadios sem história clínica de malária foram selecionados com o objetivo de estabelecer o "cut off" para cada proteína por ELISA. Dentre estas 26 amostras, treze delas foram cedidas pelo Dr. Orlando C.

Ferreira Jr, do Departamento de Hemoterapia, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP. As demais amostras foram coletadas no Laboratório de Análises Clínicas (LAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

7.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

As seguintes proteínas foram selecionadas para os ensaios imunoenzimáticos: FP-1 (MSP-3 α), FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) e MSP1₁₉. A detecção de anticorpos IgG foi feita por ELISA conforme descrito por Soares et al. (1997) e Rodrigues et al. (2005). A concentração de cada proteína foi ajustada para 4 μ g/ml em tampão carbonato 0,05 M pH 9,6 e, em seguida, foram adicionados 50 μ l por poço a microplacas de ELISA (High binding, Costar). Após incubação durante a noite em temperatura ambiente (T.A.), as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e incubadas em solução de bloqueio, por 2 horas a 37°C. Posteriormente, 50 μ l de cada amostra foram adicionados por poço em duplicata e, incubadas durante 2 horas à T.A. Após lavagem das placas, uma outra incubação foi realizada por 1 hora com 50 μ l por poço de uma solução contendo IgG de cabra anti-IgG humano conjugado a peroxidase (específico para a porção Fc da IgG, Sigma) diluído 1:16.000 em solução de bloqueio. A reação enzimática foi revelada pela adição de solução contendo OPD como descrito no item 1. A reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ l de uma solução contendo H₂SO₄ 4N. A ABS foi determinada em um leitor de microplacas (Awareness Technology, mod. Stat Fax 2100, EUA) usando comprimento de onda de 492 nm (ABS₄₉₂).

A absorbância discriminante entre os resultados positivos e negativos ("cut off") foi estabelecida pela média das absorbâncias produzidas por amostras de 26

indivíduos sem história clínica de malária, acrescida de três desvios padrões (dp). O índice de reatividade (IR) foi calculado dividindo-se a média da absorbância de cada amostra pelo valor do “cut off”, sendo os soros com $IR \geq 1$, considerados positivos.

8. Análise estatística

As frequências de respondedores obtidas nos ensaios sorológicos foram comparadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) em tabelas de contingência (2x2), com correção de Yates (VassarStats, <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). Os valores dos índices de reatividade dos anticorpos específicos contra as diferentes proteínas foram comparados pelo teste estatístico Mann-Whitney (GraphPad Prism versão 4.0).

IV. Resultados

---

1. Subclonagem dos genes que codificam as proteínas MSP-3 α e MSP-3 β .

Um total de nove plasmídeos recombinantes correspondentes a diferentes regiões das proteínas MSP-3 α e β foi gerado a partir dos seguintes vetores de expressão: pHISa, pHISb, pET-14b ou pET-28a. A Tabela 4 apresenta as informações detalhadas de todos os plasmídeos recombinantes gerados neste projeto, incluindo número de aminoácidos, estratégias de subclonagem e vetores de expressão utilizados.

2. Expressão e purificação das proteínas MSP1₁₉, MSP-3 α e MSP-3 β em larga escala.

Todas as proteínas recombinantes foram produzidas em *E. coli* e purificadas em duas etapas: cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica. A proteína MSP1₁₉, cujo método de obtenção já estava estabelecido no laboratório, foi purificada em larga escala, passando por uma purificação adicional por Gel-filtração. A expressão das proteínas recombinantes sob forma solúvel foi confirmada por “immunoblotting” utilizando anticorpo monoclonal anti-His (dados não mostrados). Um resumo das estratégias de obtenção de cada uma das proteínas recombinantes geradas nesta etapa do estudo está apresentado na Tabela 4.

Uma vez que as condições de obtenção para cada uma das proteínas recombinantes foram estabelecidas em pequena e média escala, iniciamos a expressão e purificação das proteínas em larga escala com a finalidade de obter quantidade suficiente de cada uma delas para os estudos estruturais e imunológicos. A Figura 6 mostra o perfil de eluição das proteínas recombinantes derivadas da

Tabela 4 - Sumário das proteínas recombinantes produzidas em *Escherichia coli*.

Proteína recombinante	Vetor de origem	Sítios enzimáticos	Vetor de expressão	Condições de indução	Aminoácidos (aa)	Massa molecular aparente (kDa)
MSP-3α CC4	pGEX-2T	<i>Hind</i> III - <i>Xho</i> I	pET-28a	1 mM IPTG	411 - 463	13
MSP-3α CC5	pGEX-2T	<i>Hind</i> III - <i>Xho</i> I	pET-28a	0,01 mM IPTG	478 - 618	27
MSP-3α CC4-5	pGEX-2T	<i>Hind</i> III - <i>Xho</i> I	pET-28a	0,01 mM IPTG	411 - 618	32
MSP-3α CC3-6 (C-terminal)	pGEX-2T	<i>Hind</i> III - <i>Xho</i> I	pET-28a	0,1 mM IPTG	349 - 798	86
MSP-3α FP-1 (C-terminal)	pGEX-1 λ T	<i>Eco</i> RI	pHISa	0,1 mM IPTG	359 - 798	87
MSP-3α FP-2 (inteira)	pGEX-2T	<i>Bam</i> HI	pHISb	0,1 mM IPTG	24 - 838	135
MSP-3β FP-1 (N-terminal)	pGEX-1 λ T	<i>Eco</i> RI	pHISa	0,1 mM IPTG	35 - 375	60
MSP-3β FP-2 (C-terminal)	pGEX-2T	<i>Eco</i> RI	pHISb	0,1 mM IPTG	385 - 654	57
MSP-3β FP-3 (inteira)	pGEX-1 λ T	<i>Bam</i> HI	pET-14b	0,1 mM IPTG	35 - 654	104
MSP1₁₉	pGEX-3X	<i>Nde</i> I - <i>Bam</i> HI	pET-14b	0,01 mM IPTG	1616-1704	19

proteína MSP-3 α após a purificação em coluna de troca iônica, indicando o padrão de migração das mesmas em SDS-PAGE. Podemos observar que mesmo após duas etapas de purificação, as proteínas CC4-5, CC3-6 e FP-1 (MSP-3 α) não atingiram grau de pureza maior que 95% apresentando produtos de degradação. Em contraste as proteínas CC4 e CC5 apresentaram um alto grau de pureza na análise por SDS-PAGE. Por outro lado, no que se refere à proteína FP-2 (MSP-3 α), esta migrou em gel de poliacrilamida como duas bandas na mesma intensidade. Acreditamos que a banda de menor massa molecular seja produto de degradação, por esta razão, não investimos nos estudos estruturais e imunológicos com esta proteína.

Figura 6. Padrão de migração das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α . As proteínas foram posteriormente analisadas através de gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie. 1. CC4, 2. CC5, 3. CC4-5, 4. CC3-6, 5. FP-1 e 6. FP-2.

Em relação as proteínas FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β), observamos que FP-2 atingiu um grau de pureza superior a 95% (Figura 7). Por outro lado, a MSP1₁₉ foi

considerada em nível muito bom de pureza, mas somente após uma terceira etapa de purificação, por Gel-filtração (Figura 8).

Figura 7. Padrão de migração das proteínas recombinantes derivadas da MSP3 β . Gel de poliacrilamida 12% corado com azul de Coomassie indicando o perfil de migração das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β , purificadas por cromatografia de afinidade e troca iônica, consecutivamente. 1. FP-1, 2. FP-2 e 3. FP-3.

Figura 8. Padrão de migração da proteína recombinante MSP1₁₉. Gel de poliacrilamida 15% corado com azul de Coomassie indicando o perfil de migração da proteína recombinante MSP1₁₉, purificada por cromatografia de afinidade, troca iônica e gelfiltração.

3. Análise estrutural da MSP1₁₉ por Modelagem Molecular.

Tendo em vista o fato de que a proteína MSP1₁₉ homóloga presente em *P. cynomolgi* teve sua estrutura resolvida através de difração de raios X (CHITARRA et al., 1999) e dada a grande similaridade encontrada entre as duas seqüências (*P. vivax* e *P. cynomolgi*), julgamos que uma análise teórica utilizando técnicas de modelagem molecular seria suficiente para fornecer os dados estruturais desta proteína.

A avaliação da estrutura final revelou que as substituições introduzidas não resultaram em alterações na estrutura tridimensional da proteína, o que havia sido anteriormente previsto (CHITARRA et al., 1999). Observou-se que a maioria dos resíduos alterados encontrava-se em regiões de alças da molécula, concentradas em uma superfície exposta ao solvente. A análise revelou ainda que nenhum resíduo alterado por mutação poderia modificar de forma significativa os contatos que mantém os domínios “EGF-like”. Somente a substituição na posição 45 (P-S; Figura 9) pode vir a influenciar a flexibilidade do segmento conectivo entre os dois domínios “EGF-like”, ocasionada pela perda da restrição conformacional imposta pela prolina nesta região da molécula. A estrutura terciária representada pelo caminho da cadeia principal (“backbone”) com as cadeias laterais que foram construídas estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9. Estrutura tridimensional do modelo para a MSP1₁₉ de *P. vivax*. Em vermelho estão assinalados os resíduos que diferem em relação a estrutura cristalográfica da MSP1₁₉ de *P. cynomolgi*. A seta indica o resíduo que pode influenciar a flexibilidade entre os dois domínios do tipo EGF ("EGF-like").

4. Estudos Biofísicos

4.1. Caracterização preliminar da composição da estrutura secundária das proteínas MSP-3 α e MSP-3 β por Dicroísmo Circular.

Com o intuito de caracterizar preliminarmente a composição da estrutura secundária das proteínas recombinantes obtidas, foram realizadas medidas de DC em UV-distante em comprimentos de onda de 200 a 260 nm, e posteriormente, os dados obtidos para cada uma das proteínas recombinantes foram interpretados e convertidos pelo programa CDNN. Uma estimativa do conteúdo de estrutura secundária utilizando-se este programa, indicou que todas as proteínas recombinantes se mantêm estruturadas como detalhado na Tabela 5. É importante salientar que a deconvolução dos espectros através de programas computacionais podem gerar uma margem de mais de 5% de erro para mais ou para menos.

Tabela 5 - Porcentagem de estrutura secundária das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 (α e β) por DC.

Proteína Recombinante	Alfa-hélice	Outras Estruturas	Estrutura Randômica	Total
MSP-3α CC4	17	54	46	117
MSP-3α CC5	59	21	15	95
MSP-3α CC4-5	76	15	9	100
MSP-3α CC3-6	32	36	30	98
MSP-3α FP-1	33	34	31	98
MSP-3β FP-1	17	46	35	98
MSP-3β FP-2	17	54	44	115
MSP-3β FP-3	49	25	22	96

As proteínas CC-5, CC4-5, CC3-6 e FP-1 (MSP-3 α) mostraram dois mínimos em torno de 208 e 222 nm, características pertinentes ao perfil de α -hélice (Figura 10). Através do programa CDNN, a deconvolução dos dados obtidos por DC indicaram uma porcentagem elevada para formação deste tipo de estrutura (59%, 76%, 32% e 33%, respectivamente), de acordo com o esperado, em virtude da alta probabilidade destas proteínas para a formação de estrutura terciária do tipo “coiled-coil”. Contudo, a deconvolução do de CC-4 apresentou uma baixa porcentagem de α -hélice (17%) e alta proporção de estrutura randômica (46%) indicando enovelamento parcial desta proteína.

Notamos uma discrepância relevante entre a análise da porcentagem de estrutura secundária e a característica do espectro medido para a CC4-5, contudo este resultado pode ser explicado através da presença de produtos de degradação que poderiam interferir nas medidas de DC para esta proteína.

Figura 10. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α . Sinal de dicroísmo circular das proteínas recombinantes com o comprimento de onda variando entre 200 e 260 nm.

Em relação à deconvolução dos espectros de DC para as proteínas derivadas da MSP-3 β , observamos um alto conteúdo de estrutura secundária do tipo α -hélice (49%) na composição da FP-3, enquanto as proteínas FP-1 e FP-2 apresentaram somente 17% de α -hélice, apesar de se manterem parcialmente estruturadas. Duas destas proteínas (FP-1 e FP-3) apresentaram dois mínimos em torno de 208 e 222 nm. A Figura 11 apresenta os espectros de dicroísmo circular referentes às proteínas analisadas.

Figura 11. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β . Sinal de DC das proteínas recombinantes, medidos em um comprimento de onda variando entre 195 e 260 nm.

Com o intuito de avaliar uma possível interação entre as proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α) e entre as proteínas FP-1 e FP-2 (MSP-3 β), foram realizadas medidas de DC (UV-distante) em comprimentos de onda de 200 a 260 nm, e posteriormente, os dados obtidos para cada uma das proteínas recombinantes através de DC foram interpretados e convertidos pelo programa

CDNN. Uma estimativa do conteúdo de estrutura secundária utilizando-se este programa, indicou que as proteínas recombinantes se mantêm estruturadas conforme detalhado na Tabela 6.

Tabela 6 - Porcentagem de estrutura secundária da análise da interação entre as proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 (α e β) por DC.

Proteína Recombinante	Alfa-hélice	Outras Estruturas	Estrutura Randômica	Total
MSP-3α CC4	17	54	46	117
MSP-3α CC5	59	21	15	95
MSP-3α (CC4 mais CC5)	30	37	31	98
MSP-3β FP-1	17	46	35	98
MSP-3β FP-2	17	54	44	115
MSP-3β (FP-1 mais FP-2)	18	50	45	113

De acordo com os dados analisados em Elipticidade Molar Residual, em ambas as interações envolvendo fragmentos recombinantes derivados da MSP-3 α ou MSP-3 β houve uma perda de estruturação (Figuras 12 e 13), quando comparamos o espectro obtido através da interação entre as regiões das proteínas com a soma teórica dos espectros de cada região individualmente e quando comparamos também em relação às proteínas recombinantes compreendendo as duas regiões: CC4-5 (MSP-3 α) e FP-3 (MSP-3 β). Tais resultados sugerem que a interação entre as regiões das proteínas recombinantes não ocorrem naturalmente em virtude da perda de estruturação encontrada.

Figura 12. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 α e da interação entre as mesmas. Sinal de DC das proteínas recombinantes, individualmente e em relação à suas somas teóricas e interação, com o comprimento de onda variando entre 200 e 260 nm.

Figura 13. Espectros de DC das proteínas recombinantes derivadas da MSP-3 β e da interação entre as mesmas. Sinal de DC das proteínas recombinantes, individualmente e em relação à suas somas teóricas e interação, medidos em um comprimento de onda variando entre 200 e 260 nm.

4.2. Emissão do espectro de fluorescência da proteína CC5 (MSP-3 α).

A emissão do espectro de fluorescência do triptofano é uma técnica importante para se acessar o ambiente em que este resíduo está localizado, é utilizada também para se determinar o estado de estruturação da proteína. Sabendo-se que a proteína CC5 (142 aa) possui 1 triptofano localizado no resíduo 30, decidimos analisar a localização deste triptofano em relação à estrutura terciária da proteína. A proteína recombinante, quando em condições não desnaturantes, apresentou um espectro de intensidade máxima em 339 nm (figura 14A), e em tampão desnaturante contendo guanidina apresentou um espectro de intensidade máxima em 358 nm (figura 14B). Estes resultados sugerem que a proteína encontra-se enovelada existindo um contato terciário em torno do triptofano.

Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência da proteína recombinante CC5 (MSP-3 α). **A.** Proteína recombinante em tampão 20 mM Tris-HCl pH 8,0. **B.** Proteína recombinante desnaturada em tampão 20 mM Tris-HCl, 6,2 M guanidina pH 8,0.

4.3. Caracterização das proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α) por Espectrometria de Massa.

Tendo em vista o fato de que as proteínas recombinantes baseadas na MSP-3 apresentarem um padrão de migração em gel de poliacrilamida relativamente maior do que o estimado pelas suas seqüências de aminoácidos, avaliamos a massa monomérica das proteínas recombinantes CC4 e CC5 através de espectrometria de massas MALDI-Tof MS (Figura 15). Os resultados obtidos confirmaram a massa monomérica das proteínas recombinantes em relação à seqüência primária MSP-3 α . CC4 (Figura 15 A - 10,176 kDa) e MSP-3 α CC5 (Figura 15 B - 19,428 kDa).

A

Figura 15. Espectro de massa MALDI-Tof das proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α). (A) CC4 e (B) CC5 na concentração de 1 mg/mL.

4.4. Análise das proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α) por cromatografia em Gel-filtração.

Com o intuito de identificar o raio de Stokes e a massa molecular da proteína CC4, realizamos ensaios de cromatografia em gel-filtração (Superdex 200). Durante a purificação, a proteína que apresenta aproximadamente 10 kDa a partir da seqüência, eluiu em um volume correspondendo a massa molecular em dois picos de 40 e 20 kDa apresentando raio de Stokes (R_s) de 28,8 e 21,5 Å, respectivamente (Figura 16A) quando comparadas com as proteínas globulares padrão. As frações coletadas durante a purificação confirmaram o volume de eluição da proteína (Figura 16B), onde a maior parte do volume da proteína eluiu no pico representando a

massa molecular de 40 kDa. Em relação à proteína CC5, os ensaios foram realizados em coluna Superdex 200 utilizando os tampões PBS ou 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 8,0 (com objetivo de excluir a interferência do tampão). Da mesma forma, durante a purificação, a proteína que apresenta aproximadamente 20 kDa a partir da sequência, eluiu em um pico único (após duas etapas de purificação) em volume correspondendo a uma massa molecular aproximada de 100 kDa e R_s de 38,4 Å quando comparada com as proteínas globulares padrão (Figura 17A), as frações coletadas durante a purificação confirmaram o volume de eluição da proteína (Figura 17B).

No entanto, quando avaliamos a interação entre as proteínas CC4 e CC5, não notamos a presença de nenhum pico de eluição referente à interação das proteínas ou o pico referente à CC4 (Figura 18A), além disso, não fomos capazes de identificar CC4 nas frações analisadas em gel de poliacrilamida 15% (Figura 18B).

Figura 16. Cromatografia em Gel-filtração da proteína recombinante CC4 (MSP-3α). **A.** Análise realizada em coluna Superdex 200 utilizando tampão PBS. As proteínas globulares padrão estão destacadas nas letras a, b, c e d de acordo com a tabela 3 especificada no item 5.4 em Material e Métodos. **B.** Os volumes dos picos de eluição foram determinados através da análise em gel de poliacrilamida 15%.

Figura 17. Cromatografia em Gel-filtração da proteína recombinante CC5 (MSP-3 α). A. Análise realizada em coluna Superdex 200 utilizando tampão 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl. As proteínas globulares padrão estão destacadas nas letras a, b, c e d de acordo com a tabela 3 especificada no item 5.4 em Material e Métodos. B. O volume do pico de eluição foi determinado através da análise em gel de poliacrilamida 15%.

Figura 18. Cromatografia em Gel-filtração da interação entre as proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α). A. Análise realizada em coluna Superdex 200 utilizando tampão PBS. As proteínas globulares padrão estão destacadas nas letras a, b, c e d de acordo com a tabela 3 especificada no item 5.4 em Material e Métodos. B. Os volumes dos picos de eluição foram determinados através da análise em gel de poliacrilamida 15%.

4.5. Ensaio de Espalhamento Dinâmico de Luz das proteínas CC4 e CC5 (MSP-3 α).

O ensaio de EDL foi realizado visando determinar o coeficiente de difusão (D) das proteínas CC4 e CC5. O coeficiente de difusão obtido para a proteína CC4 foi de $5,72 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $R_s = 33 \text{ \AA}$; e para CC5 $D = 3,82 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $R_s = 58 \text{ \AA}$. As figuras 19A e B indicam a porcentagem de intensidade do espalhamento de luz em relação ao raio de Stokes estimados, demonstrando que ambas as amostras encontram-se em na forma monodispersa, apresentando uma única espécie de molécula.

Figura 19. Gráfico de intensidade de espalhamento de luz das proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α). (A) CC4 e (B) CC5 em relação ao raio de Stokes estimado, demonstrando a dispersividade das moléculas.

4.6. Avaliação do estado oligomérico da proteína CC5 (MSP-3 α) por Ultracentrifugação Analítica.

Realizamos o ensaio de UCA com o intuito de avaliar o estado oligomérico e forma da proteína recombinante MSP-3 α (CC5). O perfil do equilíbrio de sedimentação da CC5 ajustou-se a uma espécie tetramérica (e não pentamérica como sugerido através da cromatografia em Gel-filtração) em todas as concentrações e velocidades analisadas (Figura 20). Este resultado indicou uma massa molecular de 78,5 kDa cujo raio de uma esfera rígida hipotética apresentando volume idêntico a molécula de interesse (R_{hyp}) foi predito usando a seguinte equação:

$$R_{hyp} = (3 M \bar{V} / 4\pi N)^{1/3}$$

Onde N é o número Avogadro. O raio de Stokes (R_s) obtido a partir da cromatografia em Gel-filtração foi utilizado para calcular o coeficiente friccional segundo a equação de Stokes (TELLER et al., 1979):

$$f = 6 \pi \eta R_s$$

Onde η é a viscosidade do solvente. Da mesma forma, o coeficiente friccional de uma esfera rígida possuindo um volume idêntico à molécula de interesse (f_0) foi calculado utilizando o R_{hyp} . A partir destes resultados calculamos o fator de Perrin (fator F), que representa a razão do coeficiente friccional mensurado (f) pelo coeficiente friccional (f_0) e é indicativo para a forma da molécula (CANTOR; SCHIMMEL, 1980). Portanto o fator de Perrin (f / f_0) fornece informação sobre a forma da partícula, pois quanto mais distante o seu valor de 1, menos esférica

(globular) é a sua forma. A análise revelou um fator de Perrin de 1,35, indicando que a proteína não é globular. Para isso, duas explicações podem ser levantadas: (i) o domínio não se apresenta estruturado, no entanto esta hipótese é descartada através das análises de DC e Espectro de Emissão de Fluorescência que indicaram que a proteína encontra-se bem estruturada. (ii) o domínio é alongado corroborando com a formação de uma estrutura do tipo “coiled-coil”.

Figura 20. Ultracentrifugação Analítica da proteína recombinante CC5 (MSP-3 α). A figura mostra os dados de equilíbrio de sedimentação da proteína em 0,5 mg/mL a 9.000 rpm (1) e 8.000 rpm (2). Os dados obtidos indicam espécies tetraméricas (de acordo com o primeiro gráfico apresentado).

5. Estudos Estruturais.

5.1. Testes de cristalização.

Na medida em que as proteínas recombinantes foram obtidas, nas condições de pureza apresentadas no item 2 e em concentrações apropriadas (7 a 40 mg/mL), os testes de cristalização foram iniciados utilizando-se kits disponíveis comercialmente. Periodicamente, as placas foram analisadas quanto à presença de precipitados e/ou possíveis cristais. De acordo com a intensidade do precipitado obtido (ideal 50%) em cada placa, a concentração da proteína foi ajustada para mais ou para menos. A Tabela 7 apresenta um sumário dos testes iniciais de cristalização, destacando a concentração final adequada, os kits de cristalização testados e os resultados obtidos para cada uma das proteínas recombinantes selecionadas. As proteínas recombinantes submetidas aos testes iniciais de cristalização foram as seguintes: CC4, CC5, CC4-5, CC3-6 e FP-1 (MSP-3 α), FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) e MSP1₁₉. Após a realização dos testes iniciais, as placas foram observadas periodicamente visando detectar a formação de cristais. Quatro proteínas recombinantes formaram cristais: CC3-6, FP-1 e CC5, (MSP-3 α) e FP-3 (MSP-3 β).

Durante as observações periódicas dos ensaios iniciais de cristalização, detectamos a presença de cristais formados com a proteína FP-1 (MSP-3 α) que apresentaram as dimensões de 224 μ m x 80 μ m (Figura 21A) referente à condição contendo 25% PEG 3350, 0,2 M (NH₄)₂ SO₄ e 0,1 M Hepes pH 7,5. Da mesma forma, a proteína recombinante CC3-6 (MSP-3 α) formou cristais em diferentes condições e de dimensões variadas. Os cristais aparentemente mais promissores (>

100 μm) foram encontrados nas condições: (i) - 1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 M Hepes pH 7,5, 0,2 M NaCl; (ii) - 15% PEG 8000, 0,1 M Hepes pH 6,5, 0,2 M $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ e (iii) - 15% PEG 4000, 0,1 M Tris pH 8,5, 0,3 M $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$ (Figura 21C e D). Os cristais formados a partir dos testes iniciais com as proteínas MSP-3 α (FP-1 e CC3-6) foram encaminhados para análise de difração por raios X. Em relação à proteína CC5, os cristais foram formados na presença de 16% PEG 10000; 0,1 M Tris pH 8,5, entretanto, estes cristais apresentaram-se sobrepostos, não aconselháveis para a difração.

A FP-3 (MSP-3 β) formou cristais durante os testes iniciais. Entretanto, as dimensões dos cristais em questão não se encontravam aceitáveis para serem encaminhados para a linha de difração de raios X ($< 100 \mu\text{m}$). Por este motivo, foi necessário refinar as condições propícias para a formação de cristais desta proteína, com o intuito de obter cristais de maior dimensão.

Tabela 7 - Sumário dos testes de cristalização realizados com cada uma das proteínas recombinantes.

Proteína recombinante	Testes iniciados em:	Kits utilizados ^a	Concentração testada	Presença de cristais
MSP-3α CC4	20/09/2005	CSI, CSII, IN, WZI, WZII e J1 a J10	16 mg/mL	-
MSP-3α CC5	30/08/2005	CSI, CSII, IN, WZI, WZII e J1 a J10	7 mg/mL	Cristal
MSP-3α CC4-5	30/10/2005	CSI, CSII, IN, WZI, WZII e J1 a J10	12,4 mg/mL	-
MSP-3α CC3-6 (C-terminal)	11/02/2005	CSI, CSII, WZI, WZII, J2, J5 e J6	10 mg/mL	Cristais
	12/07/2005	CSI, CSII, IN, WZI, WZII e J1 a J10	20 mg/mL	
	11/01/2005	CSI, CSII, J2, J5 e J6	30 mg/mL	
MSP-3α FP1 (C-terminal)	19/02/2004	CSI, CSII e IN	10 mg/mL	Cristais
MSP-3β FP1 (N-terminal)	16/03/2004	CSI	20 mg/mL	-
	17/03/2004	CSI e CSII	10 mg/mL	-
MSP-3β FP2 (C-terminal)	25/05/2004	CSI	15 mg/mL	-
	26/05/2004	CSI, CSII e IN	30 mg/mL	-
MSP-3β FP3 (inteira)	16/04/2004	CSI	10 mg/mL	Cristais
	19/04/2004	CSI, CSII e IN	20 mg/mL	
MSP1₁₉	20/03/2003	CSI, CSII e J1 a J10	10 mg/mL	-
	04/05/2004	CSI e CSII	20 mg/mL	-
	04/05/2004	CSI e CSII	40 mg/mL	-

^a abreviaturas: **CSI**, Crystal Screen I; **CSII** Crystal Screen II; **IN**, INDEX; **WZI**, Wizard I; **WZII**, Wizard II e **J1 a J10**, Jena 1 a Jena 10

5.2. Refinamento das condições de cristalização.

A partir do refinamento da proteína recombinante FP-1 (MSP-3 α), foram detectados cristais nas condições que variavam em PEG (21 a 25%), independentemente do pH. Tais cristais apresentaram as dimensões de 510 μm x 225 μm (Figura 21B), que representa o dobro do tamanho dos cristais provenientes dos testes iniciais. Estes cristais foram submetidos à difração por raios X com o intuito de elucidar sua estrutura.

Em relação aos testes de cristalização iniciais com a proteína recombinante CC3-6 (MSP-3 α), houve a formação de vários cristais promissores (Figuras 21C e D), de dimensões aceitáveis (> 100 μm), que foram encaminhados para serem difratados por raios X. Simultaneamente, realizamos o refinamento das condições que formaram menores cristais com o intuito de encaminhá-los posteriormente para análise de difração.

Inicialmente, obtivemos pequenos cristais a partir da proteína recombinante FP-3 (MSP-3 β). Por esta razão, a proteína foi submetida aos testes de refinamento na tentativa de obter bons cristais e encaminhá-los posteriormente para difração. Entretanto, após o refinamento, não houve formação de cristais.

Todos os ensaios de refinamento realizados estão destacados detalhadamente na Tabela 8.

Tabela 8 - Sumário dos refinamentos realizados a partir das proteínas recombinantes que formaram cristais.

Proteína recombinante	Refinamento realizado em:	Condição do refinamento	Concentração da proteína	Presença de cristais
MSP-3α CC3-6	17/02/2006	(14 a 25%) PEG 8000; 0,1 M CHES (pH 8,6 a 10)	20 mg/mL	Cristais
	17/02/2006	(12 a 22%) PEG 10000; 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5 a 9,0)	20 mg/mL	
	17/02/2006	(5 a 30%) PEG 8000; 0,1 M HEPES (pH 7,0 a 8,2)	10 mg/mL	
	17/02/2006	(10 a 23%) PEG 4000; 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5 a 9,0); 0,2 M NaC ₂ H ₃ O ₂	10 mg/mL	
MSP-3α FP-1	31/08/2004	(21 a 31%) PEG 3350; 0,1 M HEPES (pH 7,0 a 8,5); 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	7 mg/mL	Cristais
	31/08/2004		10 mg/mL	
	31/08/2004		15 mg/mL	
	10/03/2005	(15 a 25%) PEG 3350; 0,1 M HEPES (pH 6,5 a 8,0); 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	15 mg/mL	
	10/03/2005	(15 a 25%) PEG 3350; 0,1 M Tris-HCl (pH 6,5 a 8,0); 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	15 mg/mL	
	04/05/2005	23% PEG 3350; 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; additive screen 1	15 mg/mL	
	04/05/2005	23% PEG 3350; 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; additive screen 2	15 mg/mL	
	04/05/2005	23% PEG 3350; 0,1 M HEPES pH 7,5, 0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; additive screen 3	15 mg/mL	
MSP-3β FP-3	03/08/2004	(6 a 11%) PEG 8000; 0,1 M Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0)	10 mg/mL	-
	03/08/2004	(18 a 26%) PEG 10000; 0,1 M HEPES (pH 7,0 a 8,5)	20 mg/mL	

Figura 21. Cristais obtidos a partir das proteínas recombinantes FP-1 e CC3-6 (MSP-3 α). A e B: Cristais obtidos a partir dos testes iniciais de cristalização da proteína recombinante MSP-3 α (FP-1) nas condições: 25% PEG 3350; 0,1M HEPES pH 7,5, 0,2 M (NH₄)₂SO₄ e a partir do refinamento da mesma condição respectivamente. C e D: Cristais obtidos a partir da proteína recombinante MSP-3 α (CC3-6) nas condições 15% PEG 8000; 0,1M HEPES pH 6,5, 0,2 M NaC₂H₃O₂ e 15% PEG 4000; 0,1M Tris pH 8,5, 0,3 M NaC₂H₃O₂ respectivamente.

5.3. Análise estrutural por difração de raios X dos cristais.

Os cristais obtidos a partir dos testes de cristalização utilizando-se kits disponíveis comercialmente foram considerados aptos a serem levados para a linha de difração por raios X. Tais cristais foram encaminhados até a linha de difração D03B-CPr pertencente ao LNLS (Campinas). Análises preliminares foram realizadas visando diferenciar cristais de proteína e cristais de sal trivialmente formados durante os testes. Os dados obtidos a partir da análise preliminar comprovaram a presença de cristais de proteína, todavia, a resolução obtida a partir da difração foi da ordem de 10 Å, considerada ainda muito baixa para coleta de dados.

Após a confirmação da presença de cristais de proteína FP-1 (MSP-3 α) sob uma resolução de 10 Å, iniciamos o refinamento dos cristais formados, com o intuito de obtermos cristais que difratassem com uma maior resolução. Como consequência do refinamento, visualizamos cristais que apresentaram o dobro do tamanho dos cristais anteriormente obtidos. Tais cristais foram encaminhados até a linha de difração D03B-CPr. Durante a análise, selecionamos aproximadamente 20 cristais presentes em 11 diferentes condições. Estes cristais foram provenientes das três placas escolhidas referentes ao primeiro refinamento. Realizamos em alguns dos cristais a metodologia de “annealing” e desidratação. Nos cristais onde a metodologia de “annealing” foi aplicada, não houve grande interferência, demonstrando uma melhora dos cristais, entretanto, a técnica de desidratação demonstrou uma queda na qualidade dos cristais perante a linha de difração. Após a abertura da gota, notamos que o primeiro cristal selecionado apresentava uma difração razoável, porém, devido à evaporação da solução os cristais subsequentes apresentavam ranhuras e a sua qualidade de difração por raios X já não era a

mesma. A análise de difração realizada em um cristal presente na condição 23% PEG 3350; 0,1 M HEPES pH 8,0, 0,2 M $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ contendo a proteína na concentração de 15 mg/mL, apresentou o padrão de difração (Figura 22A) atingindo a resolução de 3,87 Å. Os demais cristais coletados apresentaram difração até cerca de 8 Å.

Os cristais da proteína CC3-6, obtidos a partir dos testes de cristalização utilizando-se kits disponíveis comercialmente foram considerados aptos a serem levados para a linha de difração por raios-X. Em virtude da análise, selecionamos aproximadamente 11 cristais presentes em 5 diferentes placas. Durante a análise, utilizamos crio-protetor para todos os cristais, devido à formação de anéis de gelo. Nos cristais referentes à condição contendo 1,6 M Sulfato de amônia, 0,1 M Hepes pH 7,5, 0,1 M NaCl onde a metodologia de “annealing” foi aplicada, não houve grande interferência relativa à melhora dos cristais perante a linha de difração. Dois cristais pertencentes às condições contendo: 15% PEG 8000, 0,1 M Hepes pH 6,5, 0,2 M $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ e 15% PEG 4000, 0,1 M Tris pH 8,5, 0,3 M $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ apresentaram difração através dos raios-X. Os dois cristais apresentaram um padrão de difração apresentado foi considerado incomum em proteínas globulares, contendo pontos com aparência arrastada (Figura 22B). Entretanto, a baixa resolução obtida (no máximo 7 Å) não possibilitou concluir com segurança a formação de estrutura terciária do tipo “coiled-coil” proveniente da difração.

Figura 22. Padrão de difração das proteínas recombinantes FP-1 e CC3-6 (MSP-3 α). Padrão de Difração, rodando em 1 grau, do cristal selecionado. **A.** Proteína FP-1 na condição 23% PEG 3350; 0,1 M Hepes pH 8,0, 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A seta indica o ponto de difração referente a resolução de 3,87 Å. **B.** Proteína CC3-6 na condição 15% PEG 4000; 0,1 M Tris-HCl pH 8,5, 0,3 M $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$. A seta indica o ponto de difração aparentemente arrastado.

6. Estudos Imunológicos

6.1. Avaliação comparativa do reconhecimento imune das MSPs por anticorpos IgG.

Dentre as proteínas recombinantes avaliadas do ponto de vista biofísico e estrutural na primeira parte deste trabalho, selecionamos cinco para os estudos imunológicos: MSP1₁₉, FP-1 (MSP-3 α) e FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β). Inicialmente, avaliamos comparativamente, por ELISA, o reconhecimento das diferentes proteínas por anticorpos IgG de 220 indivíduos com infecção patente por *P. vivax*, procedentes de diferentes áreas endêmicas do Estado do Pará. Como demonstrado na figura 23, as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra cada uma das proteínas testadas foi de: MSP1₁₉ = 95,0%, FP-1 (MSP-3 α) = 68,2%, FP-1 (MSP-3 β) = 26,4%, FP-2 (MSP-3 β) = 64,5% e FP-3 (MSP-3 β) = 65,9%. Observamos que a frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra pelo menos uma das proteínas derivadas da MSP-3 β foi de 79,1%.

A análise estatística, utilizando-se o teste do qui-quadrado, revelou que a proporção de indivíduos respondedores para a MSP1₁₉ foi significativamente maior do que as proporções obtidas para as outras proteínas recombinantes ($P < 0,001$). Em contraste, a proporção de indivíduos respondedores para a proteína FP-1 (MSP-3 β) foi significativamente menor do que as proporções obtidas para todas as outras proteínas recombinantes ($P < 0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa nas proporções de indivíduos que reconheceram as proteínas FP-1 (MSP-3 α), FP-2 e FP-3 (MSP-3 β), ($P > 0,05$).

Figura 23. Comparação da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes derivadas da MSP1₁₉, MSP-3α e MSP-3β em soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax*. As barras expressam a porcentagem de respondedores para cada uma das proteínas analisadas. Os soros de 220 indivíduos foram analisados quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA e testados na diluição de 1:100, em duplicata. O “cut off” obtido para as proteínas MSP1₁₉, FP-1 (MSP-3α) e FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3β) foi de: 0,185; 0,179; 0,715; 0,195 e 0,396, respectivamente.

MSP1 ₁₉ x MSP-3α FP-1	X ² = 50,9	P < 0,0001
MSP1 ₁₉ x MSP-3β FP-1	X ² = 214,33	P < 0,0001
MSP1 ₁₉ x MSP-3β FP-2	X ² = 61,35	P < 0,0001
MSP1 ₁₉ x MSP-3β FP-3	X ² = 57,36	P < 0,0001
MSP-3α FP-1 x MSP-3β FP-1	X ² = 75,51	P < 0,0001
MSP-3α FP-1 x MSP-3β FP-2	X ² = 0,5	P = 0,4795
MSP-3α FP-1 x MSP-3β FP-3	X ² = 0,16	P = 0,6892
MSP-3β FP-1 x MSP-3β FP-2	X ² = 67,09	P < 0,0001
MSP-3β FP-1 x MSP-3β FP-3	X ² = 44,34	P < 0,0001
MSP-3β FP-2 x MSP-3β FP-3	X ² = 0,04	P = 0,8415

A Figura 24 apresenta os valores individuais de níveis de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs, expressos como Índice de Reatividade (IR). Podemos observar que os IRs de anticorpos IgG obtidos contra a MSP1₁₉ foram significativamente maiores do que os obtidos contra as demais proteínas (teste Mann-Whitney, $P < 0,001$). Os valores de IR obtidos contra a proteína FP-1 (MSP-3 β) foram significativamente menores do que os obtidos para as outras proteínas estudadas ($P < 0,001$). Quando comparamos os valores de IR entre as demais proteínas derivadas da MSP-3, observamos que a proteína FP-3 (MSP-3 β) apresentou valores mais baixos quando comparada com as proteínas FP-1 (MSP-3 α) e FP-2 (MSP-3 β) ($P < 0,05$). Por outro lado, os valores de IR de anticorpos contra as proteínas FP-1 (MSP-3 α) e FP-2 (MSP-3 β) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($P > 0,05$). Um sumário destes dados encontra-se apresentado na Tabela 9.

Figura 24. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax*. A linha tracejada indica o limite de positividade (IR=1). IR= Índice de reatividade (média da absorbância do soro testado/"cutoff").

Tabela 9 - Frequências de respondedores e IR (em mediana) de anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes que representam as MSPs em soros de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Proteína recombinante	Número de amostras positivas para IgG (%)	IR
MSP1₁₉	209 (95)	12,46
MSP-3α FP-1	150 (68,2)	1,61
MSP-3β FP-1	58 (26,4)	0,56
MSP-3β FP-2	142 (64,5)	1,38
MSP-3β FP-3	145 (65,9)	1,32

6.2. Efeito do número de episódios prévios de malária na resposta de anticorpos IgG contra as MSPs.

Com o intuito de avaliar se a frequência de respondedores contra as proteínas MSPs aumenta de acordo com o número de episódios prévios de malária, 213 indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária foram subdivididos em 2 grupos: i) primoinfectados (n=145) e ii) indivíduos que tiveram um ou mais episódios prévios de malária (n=68). A análise estatística mostrou que apenas as proporções de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) aumentam significativamente com o maior número de exposições prévias à malária (teste do qui-quadrado, $P<0,05$). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências de respondedores contra a MSP1₁₉ e FP-1 (MSP-3 α e MSP-3 β), nos dois grupos estudados ($P>0,05$). É importante ressaltar que a análise da porcentagem de indivíduos que apresentam anticorpos IgG contra a MSP1₁₉ no grupo primoinfectado já é bastante alta (93,1%).

Figura 25. Análise comparativa da resposta de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs quanto à frequência de episódios prévios de malária vivax. Foram analisadas 213 amostras de soro de indivíduos que informaram o número de episódios prévios de malária quanto à presença de anticorpos IgG específicos por ELISA. Todos os soros foram testados em duplicata na diluição final de 1:100. O asterisco representa na figura a porcentagem de respondedores que se mostrou estatisticamente significativa em relação à frequência de episódios prévios de malária frente às proteínas recombinantes.

MSP1 ₁₉	$\chi^2 = 1,79$	$P = 0,1815$
MSP-3 α FP-1	$\chi^2 = 1,23$	$P = 0,2674$
MSP-3 β FP-1	$\chi^2 = 1,73$	$P = 0,1884$
MSP-3 β FP-2	$\chi^2 = 19,3$	$P < 0,0001$
MSP-3 β FP-3	$\chi^2 = 7,44$	$P = 0,0064$

6.3. Comparação da longevidade da resposta de anticorpos IgG contra as MSPs em indivíduos expostos à malária.

Com o intuito de avaliar a persistência da resposta de anticorpos contra as MSPs após o tratamento contra malária, comparamos a reatividade dos soros de indivíduos de São Jorge ($n=33$), dos quais foram coletadas duas amostras de soro. A primeira amostra foi coletada durante a infecção aguda por *P. vivax*, confirmada por análise de microscopia, antes do tratamento quimioterápico. Nove meses após o tratamento, foi realizada a segunda coleta de soro. As amostras coletadas foram analisadas quanto à frequência de respondedores contra as proteínas que representam as MSPs.

Como demonstrado na Figura 26, durante a infecção as proporções de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas MSP1₁₉, FP-1 (MSP-3 α) e FP-2 (MSP-3 β) foram significativamente maiores do que nove meses após o tratamento ($P<0,05$). Por outro lado, as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos específicos contra as proteínas recombinantes FP-1 e FP-3 (MSP-3 β) foi similar durante a infecção e nove meses após o tratamento ($P>0,05$).

Quando comparamos os IRs de anticorpos IgG obtidos contra as proteínas MSP1₁₉, FP-1 (MSP-3 α) e FP-1 e FP-2 (MSP-3 β) durante a infecção, observamos que a intensidade da resposta foi significativamente maior do que os valores obtidos nove meses após o tratamento (teste Mann-Whitney, $P<0,05$). Contudo, os valores de IR de anticorpos contra a proteína FP-3 (MSP-3 β) não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com infecção aguda e após o tratamento com quimioterápicos ($P>0,05$) (Figura 27). Um sumário destes dados encontra-se apresentado na Tabela 10.

Figura 26. Avaliação comparativa da longevidade da resposta de anticorpos específicos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em indivíduos com infecção patente e após o tratamento. Foram analisadas 33 amostras de soro de indivíduos de São Jorge durante a infecção patente e nove meses após o tratamento. O asterisco representa na figura a porcentagem de respondedores que se mostrou estatisticamente significativa em relação à longevidade da resposta de anticorpos frente às proteínas recombinantes.

MSP1 ₁₉	$X^2 = 1,79$	$P < 0,0001$
MSP-3 α FP-1	$X^2 = 1,23$	$P = 0,0015$
MSP-3 β FP-1	$X^2 = 1,73$	$P = 0,1859$
MSP-3 β FP-2	$X^2 = 19,3$	$P = 0,0067$
MSP-3 β FP-3	$X^2 = 7,44$	$P = 0,2131$

Figura 27. Comparação dos valores individuais de IR de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em soros de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* e nove meses após o tratamento. Trinta e três amostras de soros foram analisadas quanto à presença de anticorpos IgG específicos contra as proteínas recombinantes MSP1₁₉ (A), FP-1 (MSP-3 α) (B), FP-1 (MSP-3 β) (C), FP-2 (MSP-3 β) (D) e FP-3 (MSP-3 β) (E). A linha indica o limite de positividade (IR=1). IR= Índice de reatividade (média da absorbância do soro testado/"cut off").

Tabela 10 - Frequências de respondedores e IR (em mediana) de anticorpos IgG contra as proteínas que representam as MSPs em soros de indivíduos infectados por *P. vivax* e nove meses após o tratamento (n=33).

Proteína recombinante	Número de amostras positivas (%)		IR	
	Durante a infecção	Nove meses após tratamento	Durante a infecção	Nove meses após tratamento
MSP1₁₉	33 (100,0)	19 (57,6)*	7,80	1,42*
MSP-3α FP-1	17 (52,0)	4 (12,1)*	0,93	0,29*
MSP-3β FP-1	8 (24,0)	3 (9,0)	0,67	0,24*
MSP-3β FP-2	22 (66,7)	10 (33,3)*	1,54	0,70*
MSP-3β FP-3	17 (52,0)	11 (33,3)	1,00	0,85

O asterisco representa na tabela a frequência de respondedores e IR que se mostraram estatisticamente significativas em relação à longevidade da resposta de anticorpos frente às proteínas recombinantes.

V. Discussão

Nos últimos anos, estudamos diversos aspectos da resposta imune humana naturalmente adquirida contra proteínas recombinantes representando diferentes regiões da MSP-1, MSP3 α e MSP3 β de *P. vivax*. Estes estudos demonstraram que: (i) a proteína recombinante correspondente à região C-terminal da MSP-1 (MSP1₁₉) de *P. vivax* foi a mais imunogênica; (ii) os títulos de anticorpos IgG contra a MSP1₁₉ foram mais altos do que os títulos contra as demais proteínas recombinantes; (iii) anticorpos citofílicos do tipo IgG1 e IgG3 foram as subclasses de anticorpos que predominaram na resposta imune anti-MSP-1 e anti-MSP-3 (α e β); (iv) a resposta imune de anticorpos contra a MSP1₁₉ diminuiu significativamente poucos meses após o tratamento antimalárico (CUNHA, 2001; SOARES et al., 1997, 1999a, 1999b).

O fato da MSP1₁₉ ter sido reconhecida por uma frequência maior de indivíduos pode significar que esta apresente uma conformação mais semelhante à proteína nativa do que as demais proteínas recombinantes, uma vez que a conformação tridimensional desta proteína é extremamente relevante para o seu reconhecimento e imunogenicidade. Baseado na sequência de aminoácidos, a MSP1₁₉ contém dois domínios do tipo EGF contendo cada um 3 ligações dissulfídicas. Este tipo de conformação foi confirmado pela análise cristalográfica de proteínas recombinantes representando a MSP1₁₉ de *P. cynomolgi* (CHITARRA et al., 1999) e *P. knowlesi* (GARMAN et al., 2003). A estrutura tridimensional da MSP1₁₉ de *P. cynomolgi* demonstrou que estes domínios estão intimamente em contato um com o outro possuindo uma interface de resíduos altamente conservados, originando uma estrutura compacta e rígida (CHITARRA et al., 1999).

Visando caracterizar estruturalmente a MSP1₁₉ de *P. vivax* e, após diversas tentativas não sucedidas de obtenção de cristais, desenvolvemos um modelo por

homologia com a MSP1₁₉ de *P. cynomolgi*, tendo em vista que as duas proteínas têm um alto grau de identidade, com apenas 11 resíduos de diferença. A avaliação da estrutura final revelou que as substituições introduzidas não resultaram em alterações na conformação da cadeia principal da proteína, o que havia sido anteriormente previsto (CHITARRA et al., 1999). Observou-se que a maioria dos resíduos alterados encontrava-se em regiões de alças da molécula, concentradas em uma superfície exposta ao solvente. A análise revelou ainda que nenhum resíduo mutado alteraria de forma significativa os contatos que mantêm os domínios “EGF-like”. Estes resultados foram confirmados recentemente após resolução da estrutura da MSP1₁₉ de *P. vivax* por RMN (BABON et al., 2007). A comparação entre as três estruturas da MSP1₁₉ revelou que estas são muito similares (comparação de desvios em relação a MSP1₁₉ de *P. vivax*: *P. knowlesi* 2,2; *P. cynomolgi* 2,1 e *P. falciparum* 4,1 Å) (BABON et al., 2007). Entretanto, um sítio de ligação para histidina presente na molécula de *P. knowlesi* está ausente nas demais espécies (GARMAN et al., 2003).

Ao contrário da MSP1₁₉, pouco se sabe sobre a conformação estrutural das proteínas da família MSP-3 de *P. vivax*. A análise da estrutura primária das proteínas que compõem esta família revelou que estas contêm um domínio central rico em alaninas que estão organizados como motivos “heptads” (GALINSKI et al., 1999, 2001). Este tipo de estrutura primária favorece a formação de estruturas terciárias do tipo “coiled-coil”. Os “coiled-coils” consistem em duas ou mais α -hélices, superespiraladas umas sobre as outras que se associam de forma paralela ou anti-paralela (KIM; OAKLEI, 2002). Apesar do alto grau de polimorfismo na sequência de nucleotídeos que codificam as proteínas MSP3 α e MSP3 β em isolados naturais, ambas mantêm a característica predita para a formação de estrutura terciária do tipo

“coiled-coil” (RAYNER et al., 2002, 2004), sugerindo que este tipo de estrutura pode ter importância funcional para o parasita, incluindo o favorecimento de interações proteína-proteína que podem levar a formação de oligômeros.

Outra questão importante é o impacto da conformação estrutural destas proteínas no seu reconhecimento imune. No caso específico de nossos experimentos anteriores (CUNHA, 2001), a baixa frequência de indivíduos que apresentaram anticorpos IgG contra as proteínas recombinantes representando a MSP-3 α ou MSP-3 β (40 a 50%) pode estar relacionada com a conformação destas. É possível que no sistema de expressão bacteriano em fusão com GST estas proteínas não retenham conformações semelhantes às das proteínas nativas. Para responder esta questão, no presente estudo geramos novos plasmídeos recombinantes para expressão em *E. coli* utilizando vetores pET, os quais expressam a proteína em fusão com 6 resíduos de histidina. Estas novas proteínas recombinantes foram caracterizadas, inicialmente, do ponto de vista biofísico e estrutural através de ensaios de: i) Dicroísmo Circular; ii) Espectrometria de emissão de fluorescência do triptofano; iii) Espectrometria de massas; iv) Espalhamento dinâmico de luz; v) Cromatografia em Gel-filtração; vi) Ultracentrifugação Analítica e vii) Cristalografia de Raios X. Posteriormente, analisamos comparativamente o reconhecimento destas por anticorpos IgG de indivíduos infectados por *P. vivax*.

Um total de nove plasmídeos recombinantes foi gerado, os quais codificam diferentes regiões das proteínas MSP-3 α (incluindo regiões promissoras para formação de “coiled-coil”) e MSP-3 β . Do ponto de vista da expressão, todos os vetores geraram proteínas recombinantes solúveis, em grau de pureza e rendimento satisfatórios para os experimentos propostos, exceto a proteína MSP-3 α (FP-2) que, por esta razão, foi descartada deste estudo.

Com o intuito de caracterizar preliminarmente a composição da estrutura secundária das proteínas MSP-3 α e MSP-3 β , realizamos ensaios de DC na região do UV distante. Os dados de DC foram utilizados para se estimar a porcentagem dos tipos de estruturas secundárias presentes em cada proteína (BOHM et al., 1992). Os espectros de DC obtidos revelaram que estruturas do tipo α -hélice são predominantes na composição das estruturas secundárias das proteínas baseadas na MSP-3 α , com exceção de CC4 (Figura 10). Os espectros das proteínas FP-1 e CC3-6, as quais diferem em apenas 10 resíduos e foram geradas a partir de vetores distintos (pHISa e pET-28a, respectivamente), foram semelhantes. A mais alta proporção de α -hélice foi encontrada na proteína CC4-5 (76%). Este tipo de conformação pode ter importância funcional, uma vez que esta proteína recombinante representa uma região altamente conservada da região C-terminal da MSP-3 α em isolados naturais (RAYNER et al., 2002). Alternativamente, este efeito pode ser resultante da presença de produtos de degradação (PERSSON et al., 2001) da proteína CC4-5, uma vez que foi observado uma discrepância entre a deconvolução do espectro de DC e a análise visual do espectro (Figura 10).

O espectro de DC da proteína baseada na região N-terminal da MSP-3 β (FP-1) indicou que esta proteína apresenta uma conformação intermediária de estruturação. Por outro lado, a proteína baseada na região C-terminal da MSP-3 β (FP-2) revelou um predomínio de estruturas secundárias do tipo folha- β e randômico, demonstrando que esta se encontra parcialmente estruturada. Em relação à proteína MSP-3 β inteira (FP-3), foi demonstrado um predomínio de estruturas do tipo α -hélice, indicando que esta proteína se mantém altamente estruturada (Tabela 5). Comparando-se o conteúdo relativo de estruturas secundárias das proteínas CC5, CC4-5, CC3-6, FP-1 (MSP-3 α) e FP-3 (MSP-3 β) com os dados recentemente

publicados da proteína homóloga de *P. falciparum* (BURGESS et al., 2005) observamos resultados semelhantes com relação ao predomínio de estruturas do tipo α -hélice da proteína inteira (47%).

Kelly; Price (2000) destacaram vantagens e desvantagens em relação aos ensaios de DC como técnica de análise estrutural. A técnica de DC não requer altas concentrações de amostra e é uma técnica rápida quando comparada com cristalografia ou RMN. No entanto, esta técnica fornece a caracterização apenas da estrutura secundária da proteína não definindo através deste ensaio a exata localização de cada tipo de estrutura secundária. Portanto o espectro de DC pode sofrer interferência de resíduos adjacentes às estruturas secundárias caracterizadas. Uma hipótese para a presença de proteínas caracterizadas neste estudo como parcialmente estruturadas é que esta interferência tenha ocorrido para as proteínas CC4-5 e CC3-6 (MSP-3 α) e FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) devido à presença de resíduos adjacentes não estruturados e produtos de degradação apresentados por estas proteínas (KELLY; PRICE, 2000).

Estruturas do tipo “coiled-coil” favorecem interações proteína-proteína que podem levar a formação de estruturas quaternárias homólogas ou heterólogas do tipo dímeros, trímeros ou tetrâmeros. Com base nessas informações, decidimos investigar a presença de possíveis interações entre as regiões promissoras para a formação de “coiled-coil” da MSP-3 α de *P. vivax*. Para esta análise, selecionamos os fragmentos recombinantes CC4 e CC5, os quais representam regiões da MSP3 α com predição para formação deste tipo de estrutura (GALINSKI et al., 1999). As massas moleculares de CC4 e CC5, determinadas por espectrometria de massa, foram semelhantes às sugeridas por suas seqüências primárias apresentando 10.176 kDa e 19.427 kDa, respectivamente (figura 15). Os dados de cromatografia

10.176 kDa e 19.427 kDa, respectivamente (figura 15). Os dados de cromatografia em Gel-filtração obtidos neste estudo sugeriram que ambas as proteínas formam oligômeros (figuras 16 a 18), semelhante ao descrito previamente para diferentes regiões da MSP-3 de *P. falciparum* (proteína inteira e regiões associadas ao zíper de leucina), com exceção da região contendo exclusivamente a sequência de “coiled-coil” (BURGESS et al. 2005). No entanto, ao contrário da PfMSP-3, as regiões de zíper de leucina não são essenciais para a oligomerização, uma vez que a MSP-3 de *P. vivax* não possui este tipo de estrutura (GALINSKI et al., 1999; 2001).

Com base na informação de que as estruturas oligoméricas identificadas na PfMSP-3 são do tipo dímero e tetrâmero (BURGESS et al. 2005), analisamos as proteínas CC4 e CC5 por EDL a fim de verificar a possível existência de mais de uma espécie de cada proteína. Entretanto, nossos dados revelaram que ambas formam uma única espécie de molécula (figura 19). No caso específico do fragmento CC5, a análise por ultracentrifugação analítica confirmou que esta proteína apresenta oligômeros alongados na forma tetramérica (figura 20).

Encontramos uma divergência no Raio de Stokes analisado nas proteínas CC4 e CC5 quando comparamos os ensaios de EDL e cromatografia em Gel-filtração. Um fato que poderia esclarecer a discrepância dos dados obtidos é o modelo matemático utilizado, pois por este modelo interpreta-se que a forma da proteína analisada aproxima-se de uma esfera, ou seja, se a proteína avaliada não possuir a forma esférica, o modelo matemático utilizado será incorreto. Outra característica geradora de erros na cromatografia em Gel-filtração é a possível presença de artefatos e a associação inespecífica das moléculas com a matriz, alterando a leitura no volume e número de picos da eluição. Por esta razão, a

A partir dos dados obtidos por ultracentrifugação analítica com a proteína recombinante CC5 (MSP-3 α), podemos concluir que esta proteína é alongada, aproximando-se mais à formação de domínios do tipo “coiled-coil” do que de uma proteína esférica. Sabe-se que algumas proteínas contendo estes domínios são conhecidas por interagirem com outras proteínas localizadas na membrana do merozoíta, formando uma complexa superfície estrutural observada através de microscopia eletrônica e podendo participar do processo de invasão do eritrócito (revisto por GALINSKI; BARNWELL, 1996).

Do ponto de vista biológico, a invasão dos eritrócitos pelos merozoítas representa um processo complexo, de várias etapas, provavelmente similares entre as espécies de *Plasmodium*. Na primeira etapa ocorre a interação entre proteínas da superfície do merozoíta com moléculas da superfície do eritrócito. O contato inicial pode ocorrer em qualquer parte da superfície do merozoíta sendo este processo reversível. A segunda etapa compreende a reorientação apical e posterior formação de uma ligação irreversível com o eritrócito (revisto por GAUR et al., 2004). Durante a etapa inicial de invasão, as MSPs possivelmente interagem com a superfície do eritrócito, no entanto suas funções na invasão ainda são desconhecidas (LÓPEZ et al., 2006). Algumas MSPs (1, 2, 4, 5, 8 e 10) são ancoradas à membrana do parasita através de âncora de GPI. No entanto, outras MSPs (3, 6, 7 e 9) são solúveis e encontram-se associadas à superfície do merozoíta (revisto por GAUR et al., 2004), como por exemplo, as proteínas de *P. falciparum* MSP-6 e MSP-7. Estas proteínas não possuem região transmembrana ou ancora de GPI, entretanto, associam-se à subunidades da proteína de superfície MSP-1 através de ligação não covalente. Este fato ressalta a importância da região promissora para formação de “coiled-coil” da proteína MSP-6. Sendo esta crucial, não apenas para a estruturação da molécula,

como também para a sua associação com a MSP-1 (KAUTH et al., 2006). Estes dados, adicionados ao sugerido durante nosso trabalho em relação à formação de domínios do tipo “coiled-coil” da proteína MSP-3 α , reforçam a hipótese da proteína MSP-3 de *P. vivax* realizar associação com outras proteínas presentes na superfície do merozoíto e com o eritrócito. No entanto, embora existam evidências da associação entre proteínas de membrana de *Plasmodium*, a via de interação de algumas destas proteínas permanece desconhecida (revisto por O'DONNELL; BLACKMAN, 2005).

A importância das MSPs para a sobrevivência do parasita é ainda desconhecida. Tentativas de deletar os genes que codificam para as proteínas de *P. falciparum* (MSP-1, MSP-2, MSP-4, MSP-10, RAMA e Pf92) resultaram em parasitas inviáveis, sugerindo que estas proteínas são importantes para a sobrevivência do parasita (DREW et al., 2004; O'DONNELL et al., 2000; SANDERS et al., 2006). Em contraste, a deleção dos genes que codificam para as proteínas MSP-5 e MSP-8 sugerem que estas proteínas não são essenciais a sobrevivência do parasita (BLACK et al., 2005; SANDERS et al., 2006). Gilson et al. (2006) utilizaram ferramentas de proteômica e computacionais para identificação e quantificação de proteínas de superfície de *P. falciparum* ancoradas à membrana através de âncoras de GPI, as quais demonstraram que as proteínas MSP-1 e MSP-2 apresentam um número similar de cópias e representam dois terços do total das proteínas ancoradas, ressaltando a importância destas proteínas e, conseqüentemente, de proteínas a elas associadas.

Tendo em vista a complexidade referente às MSPs em relação a sua função e à associação com outras MSPs e com eritrócitos, decidimos avaliar não somente a interação ocorrida entre as regiões da proteína individualmente, mas também a

Tendo em vista a complexidade referente às MSPs em relação a sua função e à associação com outras MSPs e com eritrócitos, decidimos avaliar não somente a interação ocorrida entre as regiões da proteína individualmente, mas também a interação entre regiões adjacentes. Realizamos diversas tentativas no sentido de demonstrar uma possível interação entre as diferentes regiões das proteínas MSP-3 α (CC4 e CC5) ou MSP-3 β (FP-1 e FP-2) por DC. Entretanto, quando comparamos os espectros dessas proteínas em associação com o espectro das proteínas que representam ambas as regiões analisadas individualmente (CC4-5 ou FP-3) ou a soma teórica destas (CC4+CC5 ou FP-1+FP-2), observamos uma perda de estrutura secundária. O que significa que nossos dados não são confiáveis ou essas interações que podem levar a formação de hetero-dímeros ou hetero-trímeros não ocorrem entre as proteínas analisadas. De forma semelhante, nenhum resultado conclusivo foi obtido utilizando outras estratégias (cromatografia em gel-filtração ou EDL).

A princípio, apesar da proteína CC4 parecer dependente estruturalmente dos resíduos adjacentes para a formação de estrutura secundária do tipo α -hélice, a análise biofísica evidenciou que esta região da proteína independe de resíduos adjacentes para sua oligomerização sugerida por experimentos de gel-filtração. Do mesmo modo, a proteína CC5 possui a capacidade de oligomerização independente de resíduos adjacentes, formando um tetrâmero de estrutura alongada, conforme demonstrado por experimentos de ultracentrifugação.

Em relação às tentativas de cristalização, somente as proteínas recombinantes que apresentaram um alto nível de estrutura α -hélice foram capazes de formar cristais. Dentre as proteínas que formaram cristais, FP-1 e CC3-6 (MSP-3 α) apresentaram cristais aptos para serem encaminhados para a linha de difração

por raios X (BARBOSA et al., 2006), enquanto a proteína CC4-5 (MSP-3 α) apresentou apenas formações cristalinas. Apesar das proteínas FP-1 e CC3-6 terem formado cristais em dimensões aceitáveis para serem analisadas por raios X, as difrações obtidas para cada uma delas foi muito baixa, impedindo a resolução estrutural dos mesmos. Uma das razões que podem ter dificultado a formação de cristais ordenados é a alta complexidade das proteínas analisadas (RODGER et al., 2006). Aparentemente a região C-terminal da proteína é estruturalmente mais estável, devido ao fato de apresentarem maior facilidade no crescimento de cristais, sendo esta também a região mais conservada da proteína. Por outro lado, a proteína MSP-3 β não apresenta um domínio polimórfico específico, sugerindo que, em relação à estrutura secundária, as duas regiões da proteína N-terminal (FP-1) e C-terminal (FP-2) poderiam ser dependentes uma da outra para a estruturação da proteína inteira (FP-3) (RAYNER et al., 2002, 2004).

Na segunda parte deste estudo, realizamos uma avaliação comparativa da antigenicidade das proteínas que representam regiões maiores das proteínas MSP-3. A resposta de anticorpos IgG anti-MSP-3 α (FP-1) e anti-MSP-3 β (FP-1, FP-2 e FP-3) foi avaliada em 220 indivíduos expostos à malária procedentes da Região Amazônica. Para efeito de comparação, utilizamos também a proteína recombinante MSP1₁₉. Inicialmente confirmamos que a frequência de indivíduos com infecção patente por *P. vivax* que apresentaram anticorpos IgG contra a proteína MSP1₁₉ foi alta (95%). Uma alta frequência de respondedores contra esta proteína recombinante já havia sido demonstrada anteriormente pelo nosso grupo (RODRIGUES et al., 2003, 2005). Por outro lado, em relação à resposta de anticorpos contra proteínas da família MSP-3 de *P. vivax*, existem poucos dados na literatura (CUNHA, 2001).

23). No geral, as frequências de indivíduos que apresentaram anticorpos contra as proteínas MSP-3 α e MSP-3 β variaram entre 26,4% para MSP-3 β (FP-1) a 68,2% para MSP-3 α (FP-1), sendo estas frequências significativamente mais baixas do que contra a proteína MSP1₁₉. O número de indivíduos que responderam para pelo menos uma das proteínas recombinantes foi mais alto do que os dados anteriormente demonstrados por Cunha (2001), onde foram utilizadas as mesmas proteínas em fusão com GST, o que sugere que as proteínas fusionadas com 6 resíduos de histidina foram mais antigênicas em infecções naturais do que as proteínas anteriormente analisadas.

Com o intuito de avaliarmos o efeito do número de episódios de malária na resposta de anticorpos contra as proteínas MSP1₁₉, MSP-3 α e MSP-3 β , utilizamos soros de 213 indivíduos separados em dois grupos: primo e multi-infectados. Foi observado que a proporção de indivíduos que apresentam anticorpos IgG contra as proteínas FP-2 e FP-3 (MSP-3 β), aumenta de acordo com o maior número de exposições prévias ao *P. vivax*, enquanto que não houve diferença entre as proporções de respondedores contra a MSP1₁₉ e FP-1s (MSP-3 α e MSP-3 β) nos dois grupos estudados (Figura 25). Os resultados sugerem que a resposta de anticorpos IgG contra as proteínas FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) parece estar associado com a intensidade de exposição ao parasita, o que já havia sido observado anteriormente por Cunha (2001).

A longevidade da resposta de anticorpos contra as proteínas recombinantes MSP1₁₉, (FP-1) e MSP-3 β (FP-1, FP-2 e FP-3) também foi avaliada. Através da análise dos níveis de anticorpos (estimados por DO₄₉₂), observamos que não houve diferença significativa entre estes durante a infecção patente e nove meses após o tratamento no que se refere à resposta de anticorpos anti-MSP-3 β (FP-3), indicando

que a resposta de anticorpos mantém-se mesmo nove meses após o tratamento (Figura 27). No entanto, as frequências de respondedores contra a MSP1₁₉, e FP-1s (MSP-3 α e MSP-3 β) foram significativamente maiores durante a infecção do que após nove meses do início do tratamento (Figura 26). Esta observação confirma os dados que obtivemos anteriormente, os quais demonstraram que a resposta de anticorpos contra MSP1₁₉, MSP-3 α (FP-1) e MSP-3 β (FP-2) é de curta duração (SOARES et al., 1999b; CUNHA, 2001).

Resumidamente, observamos que as regiões C-terminais das MSP-3s (FP-1, MSP-3 α e FP-2, MSP-3 β) foram mais imunogênicas em infecções naturais, quando comparadas à região N-terminal (FP-1) da MSP-3 β . Uma possível explicação para a baixa frequência de respondedores observada contra esta proteína poderia ser o fato de esta ter se mostrado desestruturada nos ensaios de DC, apresentado apenas 17% de α -hélice em sua estrutura secundária. Por outro lado, a proteína MSP-3 β (FP-2), que também apresentou baixa porcentagem de α -hélice, foi altamente reconhecida por soros de indivíduos infectados por *P. vivax*. O que significa que, aparentemente, não existe uma associação direta entre antigenicidade e conformação estrutural das duas proteínas recombinantes analisadas (FP-1 e FP-2). Com base nesta observação parece que a resposta de anticorpos IgG contra a MSP-3 β está mais relacionada a diversidade antigênica das regiões N e C-terminais da proteína encontrada em isolados naturais (RAYNER et al., 2004), do que com a conformação estrutural dos recombinantes. Por outro lado, uma alta prevalência de anticorpos IgG foi observada para a proteína inteira (65,9%), a qual mostrou-se estruturada (49 % de α -hélice) nos ensaios de DC.

Os resultados obtidos neste estudo representam a primeira caracterização estrutural e biofísica das proteínas MSP-3 α e MSP-3 β de *P. vivax*. No entanto,

---

diversos aspectos biofísicos relacionados às proteínas MSP-3 α inteira e fragmentos menores da MSP-3 β ainda necessitam ser investigados. Além disso, é necessária a realização de análises mais detalhadas com essas amostras (pureza, monodispersividade, oligomerização), visando futuros estudos estruturais. Atualmente, uma das principais limitações em relação às pesquisas nesta área focando proteínas de *P. vivax*, uma vez que não dispomos de um sistema eficiente de cultivo do parasita. Um exemplo disso é que, em *P. falciparum*, foi possível analisar a ligação não covalente entre a MSP-1 e outras duas MSPs, MSP-6 e MSP-7 (PACHEBAT et al., 2001; TRUCCO et al., 2001), auxiliando na compreensão da função e estrutura dessas proteínas.

VI. Conclusões

---

1. Um total de dez proteínas recombinantes baseadas na MSP-3 α , MSP-3 β e MSP1₁₉ foram expressas e purificadas a partir de *Escherichia coli*,
2. As proteínas recombinantes CC4, CC5, CC4-5, CC3-6 e FP-1 (MSP-3 α) e FP-1, FP-2 e FP-3 (MSP-3 β) foram caracterizadas preliminarmente em relação à composição de suas estruturas secundárias, apresentando uma porcentagem de estrutura do tipo α -hélice variando entre 17 e 76%;
3. A massa molecular das proteínas recombinantes CC4 e CC5 (MSP-3 α) foi determinada por espectrometria (10,176 kDa e 19,428 kDa, respectivamente). Durante a cromatografia em Gel-filtração, foi demonstrado que estas proteínas formam oligômeros e, no caso específico da CC5, o ensaio de Ultracentrifugação Analítica confirmou que esta proteína forma tetrâmeros alongados;
4. Os ensaios imunológicos confirmaram dados prévios que as MSPs são imunogênicas em infecções naturais. Em conjunto, nossos resultados sugerem que, assim como a MSP1₁₉, proteínas recombinantes baseadas na MSP-3 α e MSP-3 β podem ser exploradas em futuros estudos de indução de imunidade protetora contra a malária *vivax* em primatas não humanos.

VII. Referências bibliográficas

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. 1997. *Biologia molecular da célula*. 3ª edição. **Editora Artes Médicas**: 111-28.
- AMINO, R.; THIBERGE, S.; MARTIN, B.; CELLI, S.; SHORTE, S.; FRISCHKNECHT, F.; MENARD, R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. **Nat Med**. **12(2)**: 220-24.
- BABON, J.J.; MORGAN, W. D.; KELLY, G.; ECCLESTON, J. F.; FEENEY, J.; HOLDER, A. A. 2007. Structural studies on *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-1. **Mol Biochem Parasitol**. **153(1)**: in process.
- BAI, T.; BECKER, M.; GUPTA, A.; STRIKE, P.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F.; BATCHELOR, A. H. 2005. Structure of AMA1 from *Plasmodium falciparum* reveals a clustering of polymorphisms that surround a conserved hydrophobic pocket. **Proc Natl Acad Sci USA** **102**: 12736-41.
- BARBOSA, J. A.; NETTO, L. E.; FARAH, C. S.; SCHENKMAN, S.; MENECHINI, R. 2006. The structural molecular biology network of the State of Sao Paulo, Brazil. **An Acad Bras Cienc**. **2**: 241-53.
- BARNWELL, J.W.; NICHOLS, M.E.; RUBINSTEIN, P. 1989. In vitro evaluation of the role of the Duffy Blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. **J Exp Med**. **169**: 1795-1802.
- BARNWELL, J. W.; GAKINSKI, M. R.; DE SIMONE, S. G.; PERLER, F.; INGRAVALLO, P. 1999. *Plasmodium vivax*, *P. cynomolgi*, and *P. knowlesi*: Identification of homologue proteins associated with the surface of merozoites. **Exp Parasitol**. **91**: 238-49.
- BARRERO, C. A.; DELGADO, G.; SIERRA, A. Y.; SILVA, Y.; PARRA-LOPEZ, C.; PATARROYO, M. A. 2005 Gamma interferon levels and antibody production induced by two PvMSP-1 recombinant polypeptides are associated with protective immunity against *P. vivax* in *Aotus* monkeys. **Vaccine** **23**: 4048-53.

BENTLEY, G. A. 2006. Functional and immunological insights from the threedimensional structures of *Plasmodium* surface proteins. **Curr Opin Microbiol.** **9**: 1-6.

BERKOWITZ, S. A. 2006. Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals. **AAPS J.** **8(3)**: 590-605.

BLACK, C. G.; BARNWELL, J. W.; HUBER, C. S.; GALINSKI, M. R.; COPPEL, R. L. 2002. The *Plasmodium vivax* homologues of merozoite surface proteins 4 and 5 from *Plasmodium falciparum* are expressed at different locations in the merozoite. **Mol Biochem Parasitol.** **120**: 215-24.

BLACK, C. G.; WU, T.; WANG, L.; TOPOLSKA, A. E.; COPPEL, R. L. 2005. MSP8 is a non-essential merozoite surface protein in *Plasmodium falciparum*. **Mol Biochem Parasitol.** **144(1)**: 27-35.

BLACKMAN, M. J.; HEIDRICH, H.; DONACHIE, S.; McBRIDE, J. S.; HOLDER, A. A. 1990. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. **J Exp Med.** **172**: 379-82.

BOHM, G.; MUHR, R.; JAENICKE, R. 1992. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. **Protein Eng.** **5(3)**: 191-95.

BRUCE, M. C.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; SNOUNOU, G.; DAY, K. P. 1999. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 α locus of *Plasmodium vivax*: Global and local diversity. **Am J Trop Med Hyg.** **61(4)**: 518-25.

BRUCE, M. C.; DONNELLY, C. A.; ALPERS, M. P.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W.; WALLIKER, D.; DAY, K. P. 2000. Cross-species interactions between malaria parasites in humans. **Science** **287**: 845-48.

BURGESS, B. R.; SCHUCK, P.; GARBOCZI, D. N. 2005. Dissection of merozoite surface protein 3, a representative of a family of *Plasmodium falciparum* surface proteins, reveals an oligomeric and highly elongated molecule. **J Biol Chem.** **280(44)**: 37236-45.

BURKHARD, P.; STETEFELD, J.; STRELKOV, S. V. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. **Trends Cell Biol.** **11**: 82-8

CAÑAS, B.; LOPEZ-FERRER, D.; RAMOS-FERNANDEZ, A.; CAMAFEITA, E.; CALVO, E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. **Brief Funct Genomic Proteomic.** **4(4)**: 295-320.

CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. Size and shape of macromolecules. 1980. Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function. **LW McCombs editors**: 539-90.

CARUCCI, D. J. 2004. *Plasmodium* post-genomics: an update. **Trends Parasitol.** **20**: 558-61.

CATTERUCCIA, F. 2007. Malaria vector control in the third millennium: Progress and perspectives of molecular approaches. **Pest Manag Sci.** (*in press*)

CHANG, S. P.; GIBSON, H. L.; LEE-NG, C. T.; BARR, P. J.; HUI, G. S. N. 1992. A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth. **J Immunol.** **149**: 548-55.

CHAPPEL, J. A. & HOLDER, A. A. 1993. Monoclonal antibodies that inhibit *Plasmodium falciparum* invasion in vitro recognize the first growth factor-like domain of merozoite surface protein-1. **Mol Biochem Parasitol.** **60**: 303-12.

CHENG, Q.; SAUL, A. 1994. Sequence analysis of the apical membrane antigen 1 (AMA-1) of *Plasmodium vivax*. **Mol Biochem Parasitol.** **65**: 183-84.

CHITARRA, V.; HOLM, I.; BENTLEY, G. A.; PETRES, S.; LONGACRE, S. 1999. The crystal structure of C-terminal merozoite surface protein 1 at 1.8 Å resolution, a highly protective malaria vaccine candidate. **Mol Cell** **3**: 457-64.

COELHO, J. S.; SOARES, I. S.; LEMOS, E. A.; JIMENEZ M. C. S.; KUDO, M. E.; MORAES, S. L.; FERREIRA, A. W.; SANCHEZ, M. C. A. 2007. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. **Diagn Microbiol Infect Dis.** (in press).

COLLINS, W. E.; BARNWELL, J. W.; SULLIVAN, J. S.; NACE, D.; WILLIAMS, T.; BOUNNGASENG, A.; ROBERTS, J.; STROBERT, E.; MCCLURE, H.; SAUL, A.; LONG, C. A. 2006. Assessment of transmission-blocking activity of candidate Pvs25 vaccine using gametocytes from chimpanzees. **Am J Trop Med Hyg.** **74**(2): 215-21.

CUI, L.; MASCORRO, C. N.; FAN, Q.; RZOMP, K. A.; KHUNTIRAT, B.; ZHOU, G.; CHEN, H.; YAN, G.; SATTABONGKOT, J. 2003. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in Western Thailand. **Am J Trop Med Hyg.** **68**(5): 613-19.

CUNHA, M. G. 2001. Resposta imune humana contra proteínas recombinantes correspondentes a antígenos de superfície do merozoíta de *Plasmodium vivax*: ênfase ao desenvolvimento de uma vacina contra malária. Tese de doutorado, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

CUNHA, M. G.; RODRIGUES, M. M.; SOARES I. S. 2001. Comparison of the immunogenic properties of recombinant proteins representing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed in distinct bacterial vectors. **Vaccine** **20**: 385-96.

DAFFORN, T. R. 2007. So how do you know you have a macromolecular complex? **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** **63**: 17-25.

DEKKER, C.; UTHAIPIBULL, C.; CALDER, L. J.; LOCK, M.; GRAINGER, M.; MORGAN, W. D.; DODSON, G. G.; HOLDER, A. A. 2004. Inhibitory and neutral antibodies to *Plasmodium falciparum* MSP119 form ring structures with their antigen. **Mol Biochem Parasitol.** **137**: 143-49.

DEL PORTILLO, H. A.; LONGACRE, S.; KHOURI, E.; DAVID, P. H. 1991. Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species. **Proc Natl Acad Sci. USA** **88**: 4030-34.

DEV, S.; SUROLIA, A. 2006. Dynamic light scattering study of peanut agglutinin: size, shape and urea denaturation. **J Biosci.** **31(5)**: 551-6.

DREW, D. R.; SANDERS, P. R.; CRABB, B. S. 2005. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 8 is a ring-stage membrane protein that localizes to the parasitophorous vacuole of infected erythrocytes. **Infect Immun.** **73(7)**: 3912-22.

DURASINGH, M.; FERDIG, M. T.; STOECKERT, C. J.; , VOLKMAN, S. K.; MCGOVERN, V.P. 2006. *Plasmodium* research in the postgenomic era. **Trends Parasitol.** **22**: 1-4.

DUTTA, S.; WARE, L. A.; BARBOSA, A.; OCKENHOUSE, C. F.; LANAR, D. E. 2001. Purification, characterization, and immunogenicity of a disulfide cross-linked *Plasmodium vivax* vaccine candidate antigen, merozoite surface protein 1, expressed in *Escherichia coli*. **Infect Immun.** **69(9)**: 5464-70.

DUTTA, S.; KAUSHAL, D. C.; WARE, L. A.; PURI, S. K.; KAUSHAL, N. A.; NARULA, A.; UPADHYAYA, D. S.; LANAR, D. E. 2005. Merozoite surface protein 1 of *Plasmodium vivax* induces a protective response against *Plasmodium cynomolgi* challenge in rhesus monkeys. **Infect Immun.** **73(9)**: 5936-44.

FANG, X. D.; KASLOW, D. C.; ADAMS, J. H.; MILLER, L. H. 1991. Cloning of the *Plasmodium vivax* Duffy receptor. **Mol Biochem Parasitol.** **44**: 125-32.

FENG, Z. P.; KEIZER, D. W.; STEVENSON, R. A.; YAO, S.; BABON, J. J.; MURPHY, V. J.; ANDERS, R. F.; NORTON, R. S. 2005. Structure and inter-domain interactions of domain II from the blood-stage malarial protein, apical membrane antigen 1. **J Mol Biol** **350**: 641-56.

FERREIRA, M. U. & SOARES, I. S. 2000. The merozoite surface protein-1 (MSP-1) as a human malaria vaccine candidate: Geographic patterns of allelic diversity and immune recognition. **Ciência e Cultura** **52**: 254-68.

GALINSKI, M. R.; CORREDOR-MEDINA, C.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. 1992. A reticulocyte-binding proteins complex of *Plasmodium vivax* merozoites. **Cell** **69**: 1213-26.

GALINSKI, M. R.; P.; BARNWELL, J. W. 1996. *Plasmodium vivax*: Merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for malaria vaccine development. **Parasitol Today** **12**: 20-9.

GALINSKI, M. R.; CORREDOR-MEDINA, C.; POVOA, M.; CROSBY, J.; INGRAVALLO, P.; BARNWELL, J. W. 1999. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. **Mol Biochem Parasitol.** **101**: 131-47.

GALINSKI, M. R.; INGRAVALLO, P.; CORREDOR-MEDINA, C.; AI-KHEDERY, B.; POVOA, M.; BARNWELL, J. W. 2001. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3beta and-3gamma share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3alpha and define a new gene family. **Mol Biochem Parasitol.** **115**: 41-53.

GARMAN, S. C.; SIMCOKE, W. N.; STOWERS, A. W.; GARBOCZI, D. N. 2003. Structure of the C-terminal domains of merozoite surface protein-1 from *Plasmodium knowlesi* reveals a novel histidine binding site. **J. Biol. Chem.** **278**: 7264-69.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook, **Humana Press**: 571-607.

GAUR, D.; MAYER, D. C.; MILLER, L. H. 2004. Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by *Plasmodium* merozoites. **Int J Parasitol.** (13-14): 1413-29.

GEL filtration principles and methods. GE Healthcare. número de catálogo 18-1022-18 (<http://www.gelifesciences.com>) acessado em abril de 2007.

GIBSON, H. L.; TUCKER, J. E.; KASLOW, D. C.; KRETTLI, A. U.; COLLINS, W. E.; KIEFER, M. C.; BATHUST, L. C.; BARR, P. J. 1992. Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 50: 325-34.

GILSON, P. R.; NEBL, T.; VUKCEVIC, D.; MORITZ, R. L.; SARGEANT, T.; SPEED, T. P.; SCHOFIELD, L.; CRABB, B. S. 2006. Identification and stoichiometry of glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol Cell Proteomics.** 5(7):1286-99.

GREENWOOD, B. M.; BOJANG, K.; WHITTY, C. J.; TARGETT, G. A. 2005. Malaria. **Lancet** 365(9469): 1487-98.

HAN, H.; PARK, S.; KIM, S.; HWANG, S.; HAN, J.; TRAICOFF, J.; KHO, W.; CHUNG, J. 2004. Epidermal growth factor-like motifs 1 and 2 of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 are critical domains in erythrocyte invasion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 320: 563-570.

HAN, E. T.; SONG, T. E.; PARK, J. H.; SHIN, E. H.; GUK, S. M.; KIM, T. Y.; CHAI, J. Y. 2004. Allelic dimorphism in the merozoite surface protein-3alpha in Korean isolates of *Plasmodium vivax*. **Am J Trop Med Hyg.** (6): 745-49.

HERRERA, S.; CORRADIN, G.; AREVALO-HERRERA, M. 2007. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. **Trends Parasitol.** 23(3): 122-28.

HILL, A. V. 2006. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. **Nat Rev Immunol.** 6(1): 21-32.

HOFFMAN, S. L.; SUBRAMANIAN, G. M.; COLLINS, F. H.; VENTER, J. C. 2002. *Plasmodium*, human and *Anopheles* genomics and malaria. **Nature** **415**: 702-709.

HOLDER, A. A.; FREEMAN, R. R. 1982. Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognized by immune serum and a monoclonal antibody. **J. Exp. Med.** **156**: 1528-1538.

HOLDER, A. A.; SANDHU, J. S.; HILLMAN, Y.; DAVEY, L. S.; NICHOLLS, S. C.; COOPER, H.; LOCKYER, M. J. 1987. Processing of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology** **(2)**:199-208.

HOLDER, A. A.; BLACKMAN, M. J. 1994. What is the function of MSP1 on the malaria merozoite? **Parasitol. Today** **10**: 182-84.

HOLDER, A. A.; RILEY, E. M. 1996. Human immune response to MSP-1. **Parasitol Today** **(5)**: 173-74.

HWANG, J. I.; SCHLESINGER, R.; KOCH, C. W. 2004. Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation. **Eur J Biochem.** **271**: 3785-93.

JOHNSON, M. L.; CORREIA, J. J.; YPHANTIS, D. A.; HALVORSON, H. R. 1981. Analysis of data from the analytical ultracentrifuge by nonlinear least-squares techniques. **Biophys J.** **36**: 575-88.

JOSHI, H. 2003. Markers for population genetic analysis of human plasmodia species, *P. falciparum* and *P. vivax*. **J Vector Borne Dis.** **40**: 78-83.

KASEHAGEN, L. J.; MUELLER, I.; KINIBORO, B.; BOCKARIE, M. J.; REEDER, J. C.; KAZURA, J. W.; KASTENS, W.; McNAMARA, D. T.; KING, C. H.; WHALEN C. C.; ZIMMERMAN P. A. 2007. Reduced *Plasmodium vivax* erythrocyte infection in png duffy-negative heterozygotes. **PLoS ONE.** **28(2)**: e336.

KAUTH, C. W.; WOHLBIER, U.; KERN, M.; MEKONNEN, Z.; LUTZ, R.; MUCKE, N.; LANGOWSKI, J.; BUJARD, H. 2006. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **J Biol Chem.** (42): 31517-27.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. 1997. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding. **Biochim Biophys Acta.** 1338(2): 161-85.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. 2000. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Curr Protein Pept Sci.** 1(4): 349-84.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. 2005. How to study proteins by circular dichroism. **Biochim Biophys Acta.** 1751(2): 119-39.

KIM, B. M.; OAKLEY, M. G. 2002. A general method for selection and screening of coiled coils on the basis of relative helix orientation. **J Am Chem Soc.** 124(28): 8237-44.

KOOIJ, T. W.; JANSE, C. J.; WATERS, A. P. 2006. *Plasmodium* post-genomics: better the bug you know? **Nat Rev Microbiol.** 4(5): 344-57.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. 1995. Princípios de bioquímica. 2ª edição. **Editora Sarvier:** 136.

LE MAIRE, M.; RIVAS, E.; MOLLER, J. V. 1980. Use of gel chromatography for determination of size and molecular weight of proteins: further caution. **Anal Biochem.** 106: 12-21.

LIM, K. J.; PARK, J. W.; SOHN, M. J.; LEE, S.; OH, J. H.; KIM, H. C.; BAHK, Y. Y.; KIM, Y. S.; 2002. A direct sandwich ELISA to detect antibodies against the C-terminal region of merozoite surface protein 1 could be a useful diagnostic method to identify *Plasmodium vivax* exposed persons. **Parasitol Res.** 88(9): 855-60.

LOPEZ, R.; VALBUENA, J.; RODRIGUEZ, L. E.; OCAMPO, M.; VERA, R.; CURTIDOR, H.; PUENTES, A.; GARCIA, J.; RAMIREZ, L. E.; PATARROYO, M. E. 2006. *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 6 (MSP-6) derived peptides bind erythrocytes and partially inhibit parasite invasion. **Peptides (7)**: 1685-92.

MASCORRO, C. N.; ZHAO, K.; KHUNTIRAT, B.; SATTABONGKOT, J.; YAN, G.; ESCALANTE, A. A.; CUI, L. 2005. Molecular evolution and intragenic recombination of the merozoite surface protein MSP-3alpha from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. **Parasitology 131(Pt 1)**: 25-35.

MENDIS, K.; SINA, B. J.; MARCHESINI, P.; CARTER, R. 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. **Am J Trop Med Hyg. 64**: 97-106.

MORAIS, C. G.; SOARES, I. S.; CARVALHO, L. H.; FONTES, C. J.; KRETTLI, A. U.; BRAGA, E. M. 2005. IgG isotype to C-terminal 19 kDa of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 among subjects with different levels of exposure to malaria in Brazil. **Parasitol Res. 95**: 420-26.

MORGAN, W. D.; BIRDSALL, B.; FRENKIEL, T. A.; GRADWELL, M. G.; BURGHHAUS, P. A.; SYED, S. E. H.; UTHAIPIBULL, C.; HOLDER, A. A.; FEENEY, J. 1999. Solution structure of an EGF module pair from the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1. **J. Mol. Biol. 289**: 113-22.

NAIR, M.; HINDS, M. G.; COLEY, A. M.; HODDER, A. N.; FOLEY, M.; ANDERS, R. F.; NORTON, R. S. 2002. Structure of domain III of the blood-stage malaria vaccine candidate. *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 (AMA1). **J Mol Biol 322**: 741-53.

NEET, E. K.; LEE, J. C. 2002. Biophysical characterization of proteins in the post-genomic era of proteomics. **Mol Cell Proteomics. 1**: 415-20.

O'DONNELL, R. A.; SAUL, A.; COWMAN, A. F.; CRABB, B. 2000. Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-1 across distantly related *Plasmodium* species. **Nature Med. 6**: 91-95.

O'DONNELL, R. A.; BLACKMAN, M. J. 2005. The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. **Curr Opin Microbiol.** (4):422-7.

OLIVEIRA, S. R. 2006. Interação de ácido algínico com surfactantes catiônicos em solução aquosa. Tese de doutorado, Departamento de Física, Instituto de Ciências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista -UNESP.

ORD, R.; POLLEY, S.; TAMI, A.; SUTHERLAND, C. J. 2005. High sequence diversity and evidence of balancing selection in the Pvmsp3alpha gene of *Plasmodium vivax* in the Venezuelan. **Amazon Mol Biochem Parasitol.** 144(1): 86-93.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS. World malaria report 2005. <http://rbm.who.int/wmr2005/> (acessado em maio de 2007).

PACHEBAT, J. A.; LING, I. T.; GRAINGER, M.; TRUCCO, C.; HOWELL, S.; FERNANDEZ-REYES, D.; GUNARATNE, R.; HOLDER, A. A. 2001. The 22 kDa component of the protein complex on the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites is derived from a larger precursor, merozoite surface protein 7. **Mol Biochem Parasitol.** 117(1): 83-9.

PARK, S. K.; LEE, K. W.; HONG, S. H.; KIM, D. S.; LEE, J. H.; JEON, B. H.; KIM, W. S.; SHIN, H. J.; AN, S. H.; PARK, H. 2003. Development and evaluation of an immunochromatographic kit for the detection of antibody to *Plasmodium vivax* infection in South Korea. **Yonsei Med J.** 44(4):747-50.

PEREZ-LEAL, O.; SIERRA, A. Y.; BARRERO, C. A.; MONCADA, C. MARTINEZ, P.; CORTEZ, J.; LOPES, Y.; SALAZAR, L. M.; HOEBEKE, J.; PATARROYO, M. A. 2005. Identifying and characterizing the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 10 *Plasmodium vivax* homologue. **Biochem Biophys Res Commun.** 311(4): 1178-84.

PERSSON, D.; THOREN, P. E.; NORDEN, B. 2001. Penetratin-induced aggregation and subsequent dissociation of negatively charged phospholipid vesicles. **FEBS Lett.** 505(2): 307-12.

PIZARRO, J. C.; CHITARRA, V.; VERGER, D.; HOLM, I.; PÊTRES, S.; DARTEVELLE, S.; NATO, F.; LONGACRE, S.; BENTLEY, G. A. 2003. Crystal structure of a Fab complex formed with PfMSP1-19, the C-terminal fragment of merozoite surface protein 1 from *Plasmodium falciparum*: a malaria vaccine candidate. **J. Mol. Biol.** **328**: 1091-103.

PIZARRO, J. C.; NORMAND, V. B.; CHESNE-SECK, M. L.; COLLINS, C. R.; WITHERS-MARTINEZ, C.; HACKETT, F.; BLACKMAN, M. J.; FABER, B. W.; REMARQUE, E. J.; KOCKEN, C. H. 2005. Crystal structure of the malaria vaccine candidate apical membrane antigen 1. **Science** **308**: 408-11.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M. M. 2006. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. **Nat Rev Microbiol.** **4(11)**: 849-56.

RAMOS, C. H. I. 2004. A spectroscopic-based laboratory experiment for protein conformational studies. **Biochem Mol Biol Educ.** **32**: 31-4.

RANUCCI, E.; FERRUTI, P.; ANNUNZIATA, R.; GERGES, I.; SPINELLI, G. 2006. NMR spectroscopy and MALDI-TOF MS characterization of end-functionalised PVP oligomers prepared with different esters as chain transfer agents. **Macromol Biosci.** **6**: 216-27.

RAYNER, J. C.; CORREDOR, V.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; IDERABDULLAH, F.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. 2002. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3alpha is limited to specific domains. **Parasitology.** **125(Pt 5)**: 393-405.

RAYNER, J. C.; HUBER, C. S.; FELDMAN, D.; INGRAVALLO, P.; GALINSKI, M. R.; BARNWELL, J. W. 2004. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3β is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions. **Infect. Genet. Evol.** **4**: 309-19.

REGIS, W. C. B.; FATTORI, J.; SANTORO, M. M.; JAMIN, M.; RAMOS, C. H. I. 2005. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. **Arch Biochem Biophys** **436**: 168-77.

RODGER, A.; MARRINGTON, R.; GEEVES, M. A.; HICKS, M.; DE ALWIS, L.; HALSALL, D. J.; DAFFORN, T. R. 2006. Looking at long molecules in solution: what happens when they are subjected to Couette flow? **Phys Chem Phys**. **8(27)**: 3161-71.

RODRIGUES, M. H. C.; CUNHA, M. G.; MACHADO, R. L. D.; FERREIRA-JR, O. C.; RODRIGUES, M. M., SOARES, I. S. 2003. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. **Malar. J.** **2**: 39.

RODRIGUES, M. H. C.; RODRIGUES, K. M.; OLIVEIRA, T. R.; CÔMODO, A. N.; RODRIGUES, M. M.; KOCKEN, C. H. M.; THOMAS, A. W.; SOARES, I. S. 2005. Antibody immune response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. **Int. J. Parasitol.** **35**: 185-92.

ROSA, D. S.; TZELEPIS, F.; CUNHA, M. G.; SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. 2004. The pan HLA DR-binding epitope improves adjuvant-assisted immunization with a recombinant protein containing a malaria vaccine candidate. **Immunol. Letters** **92**: 259-68.

ROSA, D. S.; IWAI, L. K.; TZELEPIS, F.; BARGIERI, D. Y.; MEDEIROS, M. A.; SOARES, I. S.; SIDNEY, J.; SETTE, A.; KALIL, J.; MELLO, L. E.; CUNHA-NETO, E.; RODRIGUES, M. M. 2006. Immunogenicity of a recombinant protein containing the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1(19) and two human CD4+ T-cell epitopes administered to non-human primates (*Callithrix jacchus jacchus*). **Microbes Infect.** **8(8)**: 2130-7.

RYAN, J. R.; STOUT, J. A.; AMON, J.; DUNTON, R. F.; MTALIB, R.; KOROS, J.; OWOUR, B.; LUCKHART, S.; WIRTZ, R. A.; BARNWELL, J. W.; ROSENBERG, R. 2006. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in western Kenya. **Am J Trop Med Hyg.** **75(4)**: 575-81.

SACHDEVA, S.; AHMAD, G.; MALHOTRA, P.; MUKHERJEE, P.; CHAUHAN, V. S. 2004. Comparison of immunogenicities of recombinant *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 19- and 42-kiloDalton fragments expressed in *Escherichia coli*. **Infect Immun.** **72(10)**: 5775-82.

SANDERS, P. J.; KATS, L. M.; DREW, D. R.; O'DONNELL, R. A.; O'NEILL, M.; MAIER, A. G.; COPPEL, R. L.; CRABB, B. S. 2006. A set of glycosylphosphatidyl inositol-anchored membrane proteins of *Plasmodium falciparum* is refractory to genetic deletion. **Infect. Immun.** **74(7)**: 4330-38.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2007. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/folder_malaria_2007_web.pdf (acessado em maio de 2007).

SHARMA, V. K.; KALONIA, D. S. 2003. Steady-state tryptophan fluorescence spectroscopy study to probe tertiary structure of proteins in solid powders. **J Pharm Sci.** **92**: 890-9.

SHEFFIELD, P.; GARRARD, S.; DEREWENDA, Z. 1999. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of "parallel" expression vectors. **Protein Expr Purif.** **15(1)**: 34-39.

SIEGEL, L. M., MONTY, K. J. 1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. **Biochem Biophys Acta.** **112**: 346-62.

SIERRA, A. Y.; BARRERO, C. A.; RODRIGUEZ, R.; SILVA, Y.; MONCADA, C.; VANEGAS, M.; PATARROYO, M. A. 2003. Splenectomised and spleen intact *Aotus* monkeys' immune response to *Plasmodium vivax* MSP-1 protein fragments and their high activity binding peptides. **Vaccine**. (27-30): 4133-44.

SINGH, S. K.; HORA, R.; BELRHALLI, H.; CHITNIS, C. E.; SHARMA, A. 2006. Structural basis for Duffy recognition by the malaria parasite Duffy binding-like domain. **Nature** 439: 741-44.

SOARES, I. S.; LEVITUS, G.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. 1997. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. **Infect. Immun.** 65: 1606-14.

SOARES, I. S.; OLIVEIRA, S. G.; SOUZA, J. M.; RODRIGUES, M. M. 1999a. Antibody response to the N and C-terminal regions of the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals living in an area of exclusive transmission of *P. vivax* malaria in the north of Brazil. **Acta Trop.** 72: 13-24.

SOARES, I. S.; CUNHA, M. G.; SILVA, M. N.; SOUZA, J. M.; DEL PORTILLO, H. A.; RODRIGUES, M. M. 1999b. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 60: 357-63.

SOARES, I. S.; BARNWELL, J. W.; FERREIRA, M. U.; CUNHA, M. G.; LAURINO, J. P.; CASTILHO, B. A.; RODRIGUES, M. M. 1999c. A *Plasmodium vivax* vaccine candidate displays limited allele polymorphism, which does not restrict recognition by antibodies. **Mol. Med.** 5: 459-70.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. 2002. Immunogenic properties of the *Plasmodium vivax* vaccine candidate MSP1₁₉ expressed as a secreted non-glycosylated polypeptide from *Pichia pastoris*. **Parasitology** 124: 237-46.

STURM, A.; AMINO, R.; VAN DE SAND, C.; REGEN, T.; RETZLAFF, S.; RENNENBERG, A.; KRUEGER, A.; POLLOK, J.; MENARD, R.; HEUSSLER, V. T. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite delivery into liver sinusoids. **Science** **313**: 1287-90.

TELLER, D. C.; SWANSON, E.; DEHAEN, C. 1979. The translation frictional coefficient of proteins. **Meth in Enzymol** **61**: 103-24.

TOLIA, N. H.; ENEMARK, E. J.; SIM, B. K.; JOSHUA-TOR, L. 2005. Structural basis for the EBA-175 erythrocyte invasion pathway of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell** **122**: 183-93.

TRUCCO, C.; FERNANDEZ-REYES, D.; HOWELL, S.; STAFFORD, W. H.; SCOTT-FINNIGAN, T. J.; GRAINGER, M.; OGUN, S. A.; TAYLOR, W. R.; HOLDER, A. A. 2001. The merozoite surface protein 6 gene codes for a 36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. **Mol Biochem Parasitol.** **112**: 91-101.

VARGAS-SERRATO, E.; BARNWELL, J. W.; INGRAVALLO, P.; PERLER, F. B.; GALINSKI, M. R. 2002. Merozoite surface protein-9 of *Plasmodium vivax* and related simian malaria parasites is orthologous to p101/ABRA of *P. falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.** **120**: 41-52.

VISTICA, J.; DAM, J.; BALBO, A.; YIKILMAZ, E.; MARIUZZA, R. A.; ROUAULT, T. A.; SCHUCK, P. 2004. Sedimentation equilibrium analysis of protein interactions with global implicit mass conservation constraints and systematic noise decomposition. **Anal Biochem.** **326(2)**: 234-56.

WANG, X.; GRAVELAND-BIKKER, J. F.; DE KRUIF, C. G.; ROBILLARD, G. T. 2004. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: from soluble state to self-assembly. **Protein Sci.** **13**: 810-21.

WICKRAMARACHCHI, T.; ILLEPERUMA, R. J.; PERERA, L.; BANDARA, S.; HOLM, I.; LONGACRE, S.; HANDUNNETTI, S. M.; UDAGAMA-RANDENIYA, P.V. 2007. Comparison of naturally acquired antibody responses against the C-terminal processing products of *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 under low transmission and unstable malaria conditions in Sri Lanka. **Int J Parasitol.** **37(2)**: 199-208.

XIANG, Z. 2006. Advances in Homology Protein Structure Modeling. **Curr Protein Pept Sci.** **7(3)**: 217-27.

ZAKERI, S.; BARJESTEH, H.; DJADID, N. D. 2006. Merozoite surface protein-3 alpha is a reliable marker for population genetic analysis of *Plasmodium vivax*. **Mal J.** **5**: 1-6.

VIII. Anexo

**Biophysical and antigenic characterization of the recombinant
merozoite surface protein-3 of *Plasmodium vivax***

Running Title: Biophysical and immunological properties of *P. vivax* MSP-3

MARIA CAROLINA S. JIMENEZ ^a, CARLOS HENRIQUE I. RAMOS ^{b,c}, JOÃO
ALEXANDRE R. G. BARBOSA ^b, RICARDO RICCI ^a, MARY R. GALINSKI ^{d,e},
JOHN W. BARNWELL^f, MAURICIO M. RODRIGUES ^g AND IRENE S. SOARES ^{a1*}

^a Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade
Universitária, São Paulo, SP, Brazil, 05508-900,

^b Center for Structural Molecular Biology (CeBiME), Brazilian Synchrotron Light
Laboratory, C.P. 6192, Campinas, SP, Brazil, 13084-971

^c Instituto de Química UNICAMP. C.P.6154 Campinas SP Brasil. 13084-862

^d Emory Vaccine Center and Yerkes National Primate Research Center, Emory
University, 954 Gatewood Road, Atlanta, GA 30329, USA

^e Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Emory University,
954 Gatewood Road, Atlanta, GA 30329, USA

^f Malaria Branch, Division of Parasitic Diseases, Centers for Disease Control
and Prevention, 4770 Buford Highway, Chamblee, GA 30341, USA

^g CINTERGEN, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia,
Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina,
Rua Botucatu 862, 6th floor, São Paulo, SP, Brazil, 04023-062.

¹Corresponding author. Address: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-900, Brazil; E-mail: isoares@usp.br; Tel.: 55-11-3091-3641; fax: 55-11-3813-2197.

Abstract

The *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-3 α and 3 β are members of a family of related merozoite surface proteins that contain a central alanine-rich domain, which are predicted to form α -helical secondary and coiled-coil tertiary structures with heptad repeats. To carry out a preliminary structural characterization of both proteins, seven recombinant proteins representing different regions of MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax* were expressed in *Escherichia coli* with a hexa-histidine tag. Circular dichroism spectra analysis revealed that some proteins are folded presenting a high amount of α -helices as secondary structure, whereas other showed a high content of random coil. We used mass spectrometry and size exclusion chromatography to characterize the two smaller fragments of the MSP-3 α , named CC4 and CC5 because they are predicted to form coiled-coil (CC) tertiary structures. The monomer mass assigned for the two recombinant proteins corresponded exactly to those predicted from the primary sequence (10176 kDa and 19427 kDa, respectively). During size exclusion chromatography, the proteins eluted at volumes corresponding to molecular weights that were much larger than their monomeric masses, suggesting that both proteins are oligomeric molecules. Interestingly, analytical ultracentrifugation experiments showed that the CC5 oligomers are elongated molecules. In addition, we demonstrated that MSP-3 α and MSP-3 β are immunogenic molecules during natural malaria infections. Together, these data may help to understand the important aspects of *P. vivax* biology, and contribute to the development of therapeutic and vaccination strategies against malaria.

Keywords: Malaria; *Plasmodium vivax*; Merozoite surface protein-3

1. Introduction

Malaria remains a major health problem in many developing countries. Each year, there are 300 million to 500 million cases of malaria throughout the world and more than 1 million people die, mainly of them African children. *Plasmodium vivax* is the second most prevalent species that causes malaria in humans [1]. In Brazil, *P. vivax* was responsible for approximately 70% of the almost 600,000 cases reported in 2005 [Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde - <http://www.saude.gov.br>]. Because other methods of malaria control, including drugs, insecticides, and bed nets, have not succeeded in eliminating the disease, the development of an effective vaccine is considered a high priority.

Asexual blood stages are responsible for the pathology and clinical manifestations of disease. Therefore, a vaccine against these stages would greatly aid to reduce morbidity and mortality related to malaria. Attempts have been made to identify and characterize asexual stage antigens that may induce a protective immune response against malaria. A number of *P. vivax* merozoite-specific proteins have now been described. These include the Duffy Binding Protein (PvDBP), Merozoite Surface Protein-1 (PvMSP-1), Reticulocyte Binding Proteins-1 and -2 (PvRBP-1 and PvRBP-2), Apical Membrane Antigen-1 (PvAMA-1), PvMSP-3 α , -3 β , and -3 γ , and PvMSP-9 [2]. *P. vivax* MSP-3 α and MSP-3 β are members of a family of related merozoite surface proteins that share structural similarity to *Plasmodium falciparum* MSP-3 (PfMSP-3), all of which contain a central alanine-rich domain that is predicted to form α -helical secondary and coiled-coil tertiary

structures with heptad repeats. These proteins do not have a hydrophobic region that could anchor them to the surface of the merozoite [3] and [4].

MSP-3 α is polymorphic, and has been used as a marker in *P. vivax* population studies [5], [6], [7], [8], [9] and [10]. However, this polymorphism is restricted to the N-terminal half of the predicted coiled-coil domain, which can even be absent in some alleles, while the C-terminal portion is highly conserved [9], [11] and [12]. On the other hand, analysis of the polymorphism of the MSP-3 β from *P. vivax* isolates revealed a significant diversity, mostly within the alanine-rich central region [13]. Frequent differences in MSP-3 β gene size were observed caused by the insertion and/or deletion of several large sequence blocks, as well as numerous single nucleotide polymorphisms and smaller scale insertions and deletions. In spite of this high level sequence diversity, certain physical properties of the encoded protein are maintained, particularly the ability to form coiled-coil tertiary structures, suggesting that although MSP-3 β varies widely, it is under certain functional constraints [13].

Structural studies of *Plasmodium* surface proteins can facilitate the understanding of their biological function and immunological properties [14]. The structural information available for MSP-3 of *Plasmodium* and/or its interaction with host or parasite proteins is limited at present. A single study on the structure and interactions between different regions of *P. falciparum* MSP-3 (PfMSP-3) has been published [15]. The recombinant full length of PfMSP-3 contains a large amount of α -helix and random coil secondary structure and can form highly elongated dimers and tetramers via its C terminal, which contains a predicted coiled-coil region [15].

There is no data on the interactions of MSP-3 with other merozoite proteins. However, the interaction partners between different merozoite surface proteins (MSP-1, MSP-6, and MSP-7) of *P. falciparum* have been recently studied *in vitro* [16]. These proteins form a large multiprotein complex on the merozoite surface, composed of proteolytically processed, noncovalently associated products. The PfMSP-6 is related to PfMSP-3 [17] and the C-terminal region is not only crucial for the tetramerization of the protein but also for its interaction with MSP-1 [16]. During invasion of erythrocytes, this complex is shed from the surface and only a small glycosylphosphatidylinositol-anchored portion originating from MSP-1 (MSP1₁₉) is carried into the invaded red cells [18].

In the present study, we have carried out the first assessment of biophysical characterization of recombinant proteins representing *P. vivax* MSP-3 α and MSP-3 β . We complemented these studies performing a comparative analysis of recognition of these proteins by IgG antibodies of individuals from endemic areas of *P. vivax* aiming to contribute to the development of vaccine strategies against malaria.

2. Material and methods

2.1. Generation of recombinant plasmid containing the gene of *P. vivax* MSP-3 α .

The nucleotide sequences corresponding to the C-terminal region and almost full-length protein of the *P. vivax* MSP-3 α were obtained from the plasmids pGEX-1 λ T/FP-1(aa 359 – 798) or pGEX-2T/FP-2 (aa 24 – 838) by enzymatic restriction with *Eco*RI or *Bam*HI, respectively [3]. The inserts were purified and cloned into *Eco*RI-digested pHISa (FP-1) or *Bam*HI-digested pHISb (FP-2). The pHIS plasmids we used as a bacterial expression vectors were kindly provided by Dr. P. Sheffield, University of Virginia [19]. After transformation in competent *E. coli* DH5 α , the colonies that contained the MSP-3 α gene were selected by restriction analysis.

In addition, we generated other constructs corresponding to the C-terminus of MSP3 α , which present three areas (CC4 to CC6) that are predicted to form a coiled-coil tertiary structure as previously suggested by software analyses [3]. These recombinant plasmids were generated from pET28a vector (Novagen) encoding proteins CC4-5 (aa 411-618), CC4 (aa 411-463), and CC5 (aa 478-618) in fusion with hexa-histidine tag (Fig. 1). The recombinant CC4 and CC5 contains eight and twenty heptads repeats, respectively. The three expression constructs were created by PCR amplification from the plasmid pGEX-2T/FP-2 and the following oligonucleotide primers: CC4-5 (forward: 5'- CAA GCT TGC AAA GCA TCG ATC GAA ACG ACG -3'; reverse: 5'- TGC TCG AGT TTA TGC CCC TAC

TTT TGC TGC -3'); CC4 (forward: 5'- CAA GCT TGC AAA GCA TCG ATC GAA ACG ACG -3'; reverse: 5'-TGC TCG AGT TTA GTG GGT CTT TGC CTC TTC-3'); and CC5 (forward: 5'- CAA GCT TGC TCA GAT GAA GCA CAG CAA GAA -3'; reverse: 5'- TGC TCG AGT TTA TGC CCC TAC TTT TGC TGC -3'). Each oligonucleotide primer was synthesized with *Hind*III (forward) or *Xho*I (reverse) restriction sites (underlined). The resulting PCR amplification products were cloned into pET28a digested with the same enzymes.

2.2. Generation of recombinant plasmids containing the gene of *P. vivax* MSP-3 β

The nucleotide sequences corresponding to the N and C-terminal regions of the *P. vivax* MSP-3 β were obtained from the plasmids pGEX-1 λ T/FP-1(aa 35 – 375) or pGEX-2T/FP-2 (aa 385 – 654), respectively [4]. Both inserts were removed by enzymatic restriction with the enzyme *Eco*RI. The inserts were purified and cloned into the vector pHISa (FP-1) or pHISb (FP-2) digested with this same enzyme. After transformation in competent *E. coli* DH5 α , the colonies that contained the different fragments of the MSP-3 β gene were selected by restriction analysis.

The nucleotide sequence corresponding to the full-length of *P. vivax* MSP-3 β (aa 35 – 654) were obtained by PCR amplification from the plasmid pGEX-1 λ T (FP-3) [4]. The sense (5'- ATG GAT CCG AAC TTG AGA AAC GGA TGG TCA -3') and anti-sense (5'- CGG ATC CTC TGC GAG TGT TTT ATG CGC TTC -3') oligonucleotides contained the restriction site for the enzyme *Bam*HI (underlined).

The PCR product was separated on agarose gel and the 1.8 kb band was removed using the Geneclean kit (BIO101). DNA was cloned into the commercial vector pMOS-Blue (Amersham Biosciences) following the manufacturer's instructions. The sequence encoding MSP-3 β was confirmed by DNA sequencing. The MSP-3 β gene was removed from the pMOS vector by digestion with *Bam*HI and cloned into the vector pET14b (Novagen) digested with this same enzyme. After transformation in competent *E. coli* DH5 α , the colonies that contained the MSP-3 β gene were selected by restriction analysis.

The recombinant proteins based on MSP-3s that we used in the present study are presented in Fig. 1.

2.3. Expression and purification of *E. coli* recombinant proteins MSP-3 α and MSP-3 β

E. coli BL21-DE3 (Novagen) containing the recombinant plasmids pHISa-MSP-3 α (FP-1), pET28a-MSP-3 α (CC4-5), pET28a-MSP-3 α (CC4), pET28a-MSP-3 α (CC5), pHISa-MSP-3 β (FP-1), pHISb-MSP-3 β (FP-2) and pET14b-MSP-3 β (FP-3) were cultivated in 1 liter of LB-ampicillin (100 μ g/ml) at 37°C shaken until they reached an OD₆₀₀ of 0.6-0.8. Recombinant protein synthesis was induced by the presence of 0.01 to 1 mM isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen, Auckland, New Zealand). After 3 hours, bacteria were pelleted by centrifugation and resuspended in sonication buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mg/ml lysozyme and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Invitrogen). The

bacteria were lysed on ice with the aid of a sonicator (Branson model 450, Danbury, CT). We applied 3 sonication cycles consisting of 5 min pulses at 5 min intervals. The bacterial lysate was centrifuged at 24,000 *g* for 60 min. at 4°C. The supernatant of the bacterial lysates was loaded onto a pre-equilibrated Ni²⁺ Sepharose High Performance (Amersham Biosciences) or TALON Metal Affinity resins (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, USA) and extensively washed with the wash buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM NaCl, pH 7.0, and 10% glycerin). Bound proteins were eluted with a wash buffer containing 0.3 M imidazole (USB) and the eluted material was dialyzed against 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. After centrifugation at 18,000 *g* for 30 min. at 4°C and filtration through a 0.22 μm membrane, recombinant proteins were purified by ion-exchange chromatography using a Mono Q column (Amersham Biosciences) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, coupled to an FPLC system (Amersham Biosciences). The proteins were eluted with a linear 0 to 1 M NaCl gradient in Tris-HCl buffer. Fractions were analyzed by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. Fractions containing the recombinant proteins with a high degree of purity were pooled and extensively dialyzed against PBS. The protein concentration was determined spectrophotometrically at 280 nm using the Beer-Lambert Law: $\text{Absorb(Prot)} = \epsilon \times l \times C$, where ϵ is the extinction coefficient, l is the path length in cm, and C is protein concentration (M). The extinction coefficient values were calculated by ProtParam tool [20]. Because MSP-3α (CC4) protein lacks tryptophan or tyrosine in its sequence, the protein concentration was estimated by SDS-PAGE using Bovine Serum Albumin (Sigma) as the standard.

2.4. Spectroscopy

Circular dichroism measurements were made on a JASCO-J810 spectropolarimeter equipped with a temperature control system in a continuous mode. Recombinant MSP-3 α (FP-1, CC4-5, CC4 and CC5) and MSP-3 β (FP-1, FP-2 and FP-3) were diluted to 1.4 – 35 μ M in PBS and loaded into a 1 or 5 -mm quartz cuvette. Far-UV measurements (an average of ten scans) were carried out over wavelengths 260 - 200 nm with 1 nm bandwidth, 1 s response time, and 100 nm/min scan speed at 20°C. Spectra were corrected by subtraction of the buffer signal. Molecular ellipticity, $[\theta]_{MRW}$, was calculated [21] and the secondary structure was estimated by computer analysis using CDNN software [22].

2.5. Mass Spectrometry

The monomeric mass of the two smaller fragments of the MSP-3 α (CC4 and CC5) was verified using matrix-assisted laser desorption-ionization with time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Acquisition of spectra was performed using an Ettan MALDI-ToF Pro mass spectrometer (GE healthcare) using Sinapinic acid matrix (SIN).

2.6. Size Exclusion Chromatography

Twenty μM of the recombinant MSP3- α CC4 and CC5 in PBS, pH 7.4, were loaded onto a Superdex™ prep grade 200 XK 16/70 size exclusion column, with a flow rate of 0.5 ml/min. The molecular mass and Stokes Radius (R_s) of the proteins in the different peak fractions were calculated by using a standard of globular proteins that were chromatographed under identical conditions based on [23]. Samples of all peak fractions were analyzed by SDS-PAGE for their protein composition.

2.7. Analytical ultracentrifugation

Analytical ultracentrifugation (AUC) sedimentation equilibrium experiments were done with a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge as previously described [24]. MSP-3 α CC5 was tested at concentrations from 0.25 to 1 mg/ml in Tris-HCl 20 mM and NaCl 100 mM pH 8.0, with speeds of 7,000 to 11,000 (AN-60Ti rotor), and scan data acquisition at 280 nm. Analysis of the data involved the fitting of a model of absorbance versus cell radius data using nonlinear regression. All fittings were performed using the Origin software package (Microcal) supplied with the instrument. The Self-Association method was used to analyze the sedimentation equilibrium experiments using several models of association to fit the data. The distribution of the protein throughout the cell, obtained in the equilibrium sedimentation experiments, was fitted with the following equation [25]:

$$C = C_0 \exp \left[\frac{M(1 - \bar{V}\rho)\omega^2(r^2 - r_0^2)}{2RT} \right] \quad \text{Equation 1}$$

where C is the protein concentration at radial position r , C_0 is the protein concentration at radial position r_0 , M is the molecular mass, $\bar{V}$ is the partial specific volume, ω is the centrifugal angular velocity, R is the gas constant and T is the absolute temperature. The Sednterp software (www.jphilo.mailway.com/download.htm) was used to estimate the partial specific volume at 20°C (0.7224 ml/g), the buffer density and the buffer viscosity.

2.8. Immunological assays

Human serum samples. Serum samples were collected in the period 1995 to 1999 from 220 patients with patent *P. vivax* malaria. Details on the study area, patient age and diagnosis have been reported previously [26], [27], [28] and [29]. A second group of individuals (n=26) was composed of healthy adult volunteers selected among blood donors from the city of São Paulo, State of São Paulo, in southeastern Brazil. Malaria is not present in this part of the country and these individuals had never had malaria nor traveled to malaria endemic areas. Our studies have been approved by the Ethics Committee of the University of São Paulo.

ELISA for detection of human IgG antibodies. Human IgG antibodies against MSP-3 α (FP-1) and MSP-3 β (FP-1, FP-2, and FP-3) were detected by ELISA as previously described [28] and [29]. The results were expressed as Index of

Reactivity ($IR = OD_{492}$ values of test sample divided by the cutoff value). Cutoff points were set at three standard deviations above the mean OD_{492} of sera from 26 individuals, unexposed to malaria, from the city of São Paulo. Values of $IR \geq 1.0$ were considered as positive.

2.9. Statistical analysis

Differences between proportions of responders were analyzed using the Chi-square test.

3. Results

3.1. Expression and purification of recombinant proteins corresponding to the MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax*

Four recombinant proteins representing the C-terminal region of MSP-3 α (FP-1, CC4-5, CC4, and CC5) were used in this study. Three of these recombinant proteins correspond to fragments that are predicted to form coiled-coil (CC) tertiary structures. Attempts to generate recombinant proteins representing the full-length protein were unsuccessful because this protein was always cleaved at the N-terminal generating a shorter recombinant protein (data not shown). We used three recombinant proteins representing almost the full-length protein (FP-3), the N- (FP-1) or the C-terminal (FP-2) regions of the MSP-3 β . All recombinant proteins were expressed in satisfactory amounts by *E. coli* and were soluble in aqueous buffer in the absence of detergents. We observed that each protein migrated as a single band with few degradation products, and with apparent molecular weights of ~87 kDa (MSP-3 α , FP-1), ~32 kDa (MSP-3 α , CC4-5), ~13 kDa (MSP-3 α , CC4), ~27 kDa (MSP-3 α , CC5), ~60 kDa (MSP-3 β , FP-1), ~57 kDa (MSP-3 β , FP-2), and ~104 kDa (MSP-3 β , FP-3) (Fig. 2). The proteins MSP-3 α (CC4, CC5) and MSP-3 β (FP-1, FP-2) appeared as a single band, while some degradation products were detectable to MSP-3 α (FP-1, CC4-5) and MSP-3 β (FP-3).

3.2. CD measurements of the recombinant MSP-3

To investigate the type of secondary structure present in each recombinant MSP-3, we examined them by far-UV CD spectroscopy (Fig. 3). The CD data were deconvoluted using the CDNN program, and the percentages of α -helix, other structures (anti-parallel, parallel and β -turn), and random coil were estimated. The CD spectrum for the seven recombinant proteins shows the two minima around 208 and 222 nm that are characteristic of α -helices, except MSP-3 α (CC4) and MSP-3 β (FP-2), which presented one minima characteristic of random coil. The deconvoluted CD spectrum for the recombinant proteins predicted approximately the following percentages: C-terminal of MSP-3 α (FP-1) 33% α -helix, 34% other structures, and 31% random coil; MSP-3 α (CC4-5) 76% α -helix, 15% other structures, and 9% random coil; MSP-3 α (CC4) 16% α -helix, 54% other structures, and 46% random coil; MSP-3 α (CC5) 59% α -helix, 21% other structures, and 15% random coil (Fig. 3A). Notably, there is a relevant discrepancy between the numerical analysis and visual appearance of the CD spectrum to MSP-3 α (CC4-5). The presence of degradation products detected in SDS-PAGE (Fig. 2), which may interfere in the biophysics measurements, may explain these results. The MSP-3 α (CC5) CD spectra are consistent with the emission fluorescence spectra which suggested a folded protein (data not shown).

The CD spectrum of the MSP-3 β (FP-1) protein predicts approximately 25% α -helix, 46% other structures, and 36% random coil. As such, the MSP-3 beta (FP-2) shows 16% α -helix, 53% other structures, and 44% random coil. The spectrum of full-length MSP-3 β (FP-3) exhibits a strong α -helical signature and is estimated to be 48% helical, 25% other structures, and 22% random coil (Fig. 3B). The sum of

the secondary structural elements calculated from the CD spectrum totals 95% to 116% showing confidence in the measurement and deconvolution.

3.3. Characterization of MSP3- α fragments by mass spectrometry analysis and size exclusion chromatography

To investigate possible interaction between the regions that are predicted to form coiled-coil (CC) tertiary structures, we produced three shorter recombinant proteins containing subsets of the predicted domains of the C-terminal region of MSP3- α (Fig. 1). First, we submitted the proteins CC4 and CC5 to mass spectrometry (MS) analysis. The monomer mass assigned for the two recombinant proteins corresponded exactly to those predicted from the primary sequence (10176 kDa and 19427 kDa, respectively). During size exclusion chromatography, the proteins eluted at volumes corresponding to molecular weights that were larger than their monomeric masses. The CC4 eluted in two peaks with a Stokes radius of 28.9 and 21.6 Å and apparent molecular masses of 40 and 20 kDa, respectively. These data suggested that this MSP-3 α fragment may be oligomers and the presence of these two peaks may represent different oligomeric states of the protein. In the case of CC5, after two-step chromatography to avoid artifact and unstable protein species, a single peak with a Stokes radius of 38.4 Å and apparent molecular mass in the range of 92 to 100 kDa appeared (Fig. 4). Interestingly, the dynamic light scattering (DLS) experiments performed with each fragment (CC4 or CC5) showed that these proteins represent a single species (data not shown).

3.4. Characterization of MSP3- α fragment (CC5) by Analytical ultracentrifugation

To further investigate the oligomeric state and overall shape of MSP-3 α , analytical ultracentrifugation was performed with the protein CC5. The equilibrium sedimentation profiles of CC5 were fitted to a tetrameric species at all concentrations and velocities tested (Fig. 5). This result indicated a molecular mass of 78.5 kDa from which the radius of a hypothetical rigid sphere with an identical volume as the molecule of interest (R_{hyp}) was predicted using the following equation:

$$R_{hyp} = (3 M \bar{V} / 4 \pi N)^{1/3} \quad \text{Equation 2}$$

where η is the viscosity of the solvent, M is the molecular mass, and N is the Avogadro's number. The actual hydrodynamic radius (R_H) was calculated from the size exclusion chromatograph and used to calculate the frictional coefficient (f) via Stokes equation [30]:

$$f = 6 \pi \eta R_H \quad \text{Equation 3}$$

Similarly, the predicted frictional coefficient for a rigid sphere with an identical volume as the molecule of interest (f_0) was calculated from R_{hyp} . From those results, we calculated the so-called Perrin or shape factor F , which represents a ratio of the measured frictional coefficient f to the frictional coefficient f_0 and is informative of the shape of the molecule [31]. In this way, the Perrin factor provides information about the shape of the particle because the further away it is from 1, the less spherical (globular) the shape is. Our analysis revealed a Perrin shape factor of 1.35, indicating that the protein is not globular. From this two explanations

can be drawn, one, that this domain is unfolded but such hypothesis is ruled out by circular dichroism analysis (Fig. 3A) and emission fluorescence spectra (data not shown), which indicated a well-folded protein, and the other, that the domain is elongated, which is well in agreement with these domains forming a coil-coiled structure.

3.5. Comparison of IgG antibody response of individuals during patent P. vivax infection to recombinant proteins representing MSP-3 α and MSP-3 β .

Initially, we compared the IgG antibody response of individuals during patent infection to the recombinant proteins representing MSP-3 α (FP-1) and MSP-3 β (FP-1, FP-2 and FP-3). The frequency of individuals with IgG antibodies to all four proteins during patent infection was 31.4%. There was no response to any antigen in only 1.8% of individuals. Fig. 6 shows the frequency of responders against each recombinant protein. The results showed that the frequency of responders to MSP-3 α and at least one recombinant protein representing MSP-3 β were 68.2% and 79.1%, respectively. These data indicated that both proteins are immunogenic during natural infection. The frequency of individuals that presented IgG antibodies to each recombinant MSP-3 β was 26.3% (FP-1), 64.5% (FP-2) and 65.9% (FP-3). The prevalence of antibodies against MSP-3 β (FP-1) was significantly lower than the prevalence against MSP-3 β FP-2 and FP-3 (Chi-square test, $P<0.05$). The reactivity to the MSP-3 β FP-2 and FP-3 was not statistically different among them (Chi-square test, $P>0.05$).

4. Discussion

MSP-3 α and MSP-3 β are associated with the merozoite surface of *P. vivax* [3] and [4]. Both proteins, like PfMSP-3 have neither a classical hydrophobic transmembrane domain nor a consensus sequence for post-translational modification with GPI. As reported for PfMSP-3, the central core domain is predicted to form α -helical secondary structure and coiled-coil tertiary structures. In order to make an initial characterization of the structure of MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax*, we have generated in *E. coli* seven recombinant proteins, four representing the C-terminal region of MSP-3 α and three representing different regions of MSP-3 β (N and C-terminal and almost full-length protein). Initially, we performed CD experiments with different MSP-3 recombinants. Our results indicate that: i) the proteins CC5 (MSP-3 α) and FP-3 (MSP-3 β) are well-folded; ii) some proteins, such as FP-1 and CC4-5 (MSP-3 α), and FP-1 (MSP-3 β), presented a partially folded intermediate conformation, and iii) the proteins CC4 (MSP-3 α) and FP-2 (MSP-3 β) appeared only to be partially structured. The significant percentage of α -helix estimated from the CD experiments performed on recombinant protein representing almost the full-length protein of MSP-3 β (FP-3) is consistent with many characteristics of full-length of PfMSP-3 [15].

Coiled coils are protein interaction motifs that consist of left-handed supercoiled assemblies of two or more α -helices. These protein structures are commonly involved in forming both intra- and inter-molecular binding interactions. There have been hypothesis that these proteins interact through the central

alanine-rich and terminal glutamic acid-rich domains with other proteins or positively charged moieties on the surface of the merozoite, generating the structural complexity of the coat that has been observed by electron microscopy [32]. To explore possible interactions involving predicted coiled-coil domains of MSP-3 α , we performed biophysical studies with the fragment CC5. As observed for the full length of PfMSP-3 [15], we found by size exclusion chromatography that CC5 form oligomers in solution. Most relevant was the fact that analytical ultracentrifugation experiments indicated that CC5 is a non-globular protein and probably exists as an elongated tetrameric species. However, the leucine zipper-like regions are not required for oligomer formation as observed for PfMSP-3 [15], which are absent in MSP-3 of *P. vivax* [3] and [4].

In parallel, we also performed initial crystallization trials for the different proteins. Various crystals were obtained and one of them (MSP-3 α , FP-1) diffracted X-rays only poorly (10 Å resolution). Unfortunately, after refinement of the crystallization conditions, crystal improvement was insufficient, leading to a maximum diffraction resolution of 3.87Å [33]. Determining the three-dimensional structure of *Plasmodium* proteins has been particularly complicated for many reasons, including proteins that contain large non-globular domains [34].

In the second part of this study, we selected four recombinant proteins for immunological studies: MSP-3 α (FP-1) and MSP-3 β (FP-1, FP-2, and FP-3). These recombinant proteins were compared in their ability to bind to IgG antibodies of serum samples collected from individuals exposed to *P. vivax* malaria. Initially, we demonstrated that the frequencies of individuals with IgG antibodies to MSP-3 α

and at least one recombinant protein representing MSP-3 β were relatively high (68.2% and 79.1%, respectively). Previous studies that evaluated the polymorphism of the C-terminal region of MSP-3 α found that this region of the protein is highly conserved among natural isolates [11] and [12]. This fact may account for the recognition by IgG antibodies from a relatively high percentage of individuals. In contrast to C-terminal region of MSP-3 α , a variable degree of polymorphism has been reported for the genes encoding for the MSP-3 β [13]. In spite of the high level of sequence diversity of MSP-3 β , we found a significant percentage of individuals that recognized recombinant proteins FP-2 and FP-3 (>60.0%). In contrast, we detected a lower frequency of responders to recombinant protein MSP-3 β (FP-1). The extension of the polymorphism of MSP-3 α and MSP-3 β in the studied areas is currently unknown.

To sum up, this study represents the first description of the biophysical characteristics of the *P. vivax* MSP-3 proteins expressed and purified from *E. coli*. The obtained data indicated that recombinant proteins based on predicted coiled-coil domains of MSP-3 α form oligomeric and elongated molecules consistent with previous data of PfMSP-3 [15]. In addition, our results show that MSP-3 antigens are immunogenic molecules during natural malaria infection and these recombinant proteins generated may be useful to further studies to elucidate their vaccine potential.

Acknowledgments

We are particularly grateful to Vanessa C. Tavares, Cristiane R. Guzzo, and Fabio Schaberle for their technical assistance. This work was supported by FAPESP grants 01/07535-0 (SMolBNet) and 01/08498-0 (regular), and The Millennium Institute for Vaccine Development and Technology (CNPq - 420067/2005-1). MCSJ is supported by fellowships from FAPESP. CHIR, JARGB, RR, MMR and ISS are supported by fellowships from CNPq.

References

- [1] Mendis K, Sina BJ, Marchesini P, Carter R. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 64:97-106.
- [2] Herrera S, Corradin G, Arevalo-Herrera M. An update on the search for a *Plasmodium vivax* vaccine. *Trends Parasitol* 2006; 23:122-28.
- [3] Galinski MR, Corredor-Medina C, Pova M, Crosby J, Ingravallo P, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3 contains coiled-coil motifs in an alanine-rich central domain. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 101:131-47.
- [4] Galinski MR, Ingravallo P, Corredor-Medina C, Al-Khedery B, Pova M, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface proteins-3 β and-3 γ share structural similarities with *P. vivax* merozoite surface protein-3 α and define a new gene family. *Mol Biochem Parasitol* 2001; 115:41-53.
- [5] Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Snounou G, Day KP. Polymorphism at the merozoite surface protein-3 α locus of *Plasmodium vivax*: global and local diversity. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61:518-25.
- [6] Bruce MC, Donnelly CA, Alpers MP, Galinski MR, Barnwell JW, Walliker D, Day KP. Cross-species interactions between malaria parasites in humans. *Science* 2000a; 287:845-48.

- [7] Bruce MC, Galinski MR, Barnwell JW, Donnelly CA, Walmsley M, Alpers MP, Walliker D, Day KP. Genetic diversity and dynamics of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* populations in multiply infected children with asymptomatic malaria infections in Papua New Guinea. *Parasitology* 2000b; 121:257-72.
- [8] Mueller I, Kaiok J, Reeder JC, Cortes A. The population structure of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* during an epidemic of malaria in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 67:459-64.
- [9] Ord R, Polley S, Tami A, Sutherland CJ. High sequence diversity and evidence of balancing selection in the PvmSP3 alpha gene of *Plasmodium vivax* in the Venezuelan Amazon. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 144:86-93.
- [10] Mascorro CN, Zhao K, Khuntirat B, Sattabongkot J, Yan G, Escalante AA, Cui L. Molecular evolution and intragenic recombination of the merozoite surface protein MSP-3 alpha from the malaria parasite *Plasmodium vivax* in Thailand. *Parasitology* 2005; 131:25-35.
- [11] Rayner JC, Corredor V, Feldman D, Ingravalle P, Iderabdullah F, Galinski MR, Barnwell JW. Extensive polymorphism in the *Plasmodium vivax* merozoite surface coat protein MSP-3 α is limited to specific domains. *Parasitology* 2002; 125:393-405.

- [12] Cui L, Mascorro CN, Fan Q, Rzomp KA, Khuntirat B, Zhou G, Chen H, Yan G, Sattabongkot J. Genetic diversity and multiple infections of *Plasmodium vivax* malaria in western Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:613-19.
- [13] Rayner JC, Huber CS, Feldman D, Ingravallo P, Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax* merozoite surface protein PvMSP-3 beta is radically polymorphic through mutation and large insertions and deletions. *Infect Genet Evol* 2004; 4:309-19.
- [14] Bentley GA. Functional and immunological insights from the three-dimensional structures of *Plasmodium* surface proteins. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9:395-400.
- [15] Burgess BR, Schuck P, Garboczi DN. Dissection of Merozoite Surface Protein 3, a Representative of a Family of *Plasmodium falciparum* Surface Proteins, Reveals an Oligomeric and Highly Elongated Molecule. *J Biol Chem* 2005; 280:37236-45.
- [16] Kauth CW, Woehlbier U, Kern M, Mekonnen Z, Lutz R, Mucke N, Langowski J, Bujard H. Interactions between merozoite surface proteins 1, 6, and 7 of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 2006; 281:31517-27.
- [17] Trucco C, Fernandez-Reyes D, Howell S, Stafford WH, Scott-Finnigan TJ, Grainger M, Ogun SA, Taylor WR, Holder AA. The merozoite surface protein 6 gene codes for a

36 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex. Mol Biochem Parasitol 2001; 112:91–101.

[18] Blackman MJ, Heidrich HG, Donachie S, McBride JS, Holder AA. A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red blood cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies. J Exp Med 1990; 172:379-82.

[19] Sheffield P, Garrard S, Derewenda Z. Overcoming expression and purification problems of RhoGDI using a family of “Parallel” expression vectors. Prot Exp Purif 1999; 15:34-39.

[20] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press. 2005; 571-607

[21] Ramos CHI. A spectroscopic-based laboratory experiment for protein conformational studies. Biochem Mol Biol Educ 2004; 32:31-4.

[22] Bohm G, Muhr R, Jaenicke R. Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. Protein Eng 1992; 5:191-95.

- [23] Hwang JI, Schlesinger R, Koch CW. Irregular dimerization of guanylate cyclase-activating protein 1 mutants causes loss of target activation. *Eur J Biochem* 2004; 271:3785-93.
- [24] Regis WCB, Fattori J, Santoro MM, Jamin M, Ramos CHI. On the difference in stability between horse and sperm whale myoglobins. *Arch Biochem Biophys* 2005; 436:168-77.
- [25] Johnson ML, Correia JJ, Yphantis DA, Halvorson HR. Analysis of data from the analytical ultracentrifuge by nonlinear least-squares techniques. *Biophys J* 1981; 36: 575-88.
- [26] Soares IS, Levitus G, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Acquired immune responses to the N- and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 in individuals exposed to malaria. *Infect Immun* 1997; 65:1606-14.
- [27] Soares IS, Cunha MG, Silva MN, Souza JM, Del Portillo HA, Rodrigues MM. Longevity of naturally acquired antibody responses to the N and C-terminal regions of *Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60: 357-63.
- [28] Rodrigues MHC, Cunha MG, Machado RLD, Ferreira-Jr OC, Rodrigues MM, Soares IS. Serological detection of *Plasmodium vivax* malaria using recombinant

proteins corresponding to the 19-kDa C-terminal region of the merozoite surface protein-1. *Malar J* 2003;2:39.

[29] Rodrigues MHC, Rodrigues KM, Oliveira TR, Comodo AN, Rodrigues MM, Kocken CH, Thomas AW, Soares IS. Antibody response of naturally infected individuals to recombinant *Plasmodium vivax* apical membrane antigen-1. *Int J Parasitol* 2005; 35:185-92.

[30] Teller DC, Swanson E, DeHaen C. The translation frictional coefficient of proteins, *Methods Enzymol* 1979; 61:103-24.

[31] Cantor CR, Schimmel PR. Size and shape of macromolecules. In: *Biophysical Chemistry, Part II: Techniques for the Study of Biological Structure and Function*. LW McCombs editors. WH Freeman and Company. New York, 1980: p. 539–90.

[32] Galinski MR, Barnwell JW. *Plasmodium vivax*: merozoites, invasion of reticulocytes and considerations for vaccine development. *Parasitol Today* 1996; 12:20–9.

[33] Barbosa JA, Netto LE, Farah CS, Schenkman S, Meneghini R. The structural molecular biology network of the State of Sao Paulo, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 2006; 2:241-53.

- [34] Carucci DJ. *Plasmodium* post-genomics: an update. Trends Parasitol 2004; 20:558-561.

Figure legends

Fig. 1. Schematic representation of *P. vivax* MSP-3 alpha (accession number AF093584) and MSP-3 beta (accession number AF099662). The lines above each box represent the predicted coiled-coil tertiary structure region and the arrows below show the different MSP-3 constructs produced for these experiments.

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins corresponding to the MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax*. Bacterial recombinant proteins were expressed and purified as described in Material and Methods section. Lanes, 1 and 6: Molecular mass marker; 2: MSP-3 α (FP-1); 3: MSP-3 β (FP-1); 4: MSP-3 β (FP-2); 5: MSP-3 β (FP-3). 7: MSP-3 α (CC4); 8: MSP-3 α (CC5); 9: MSP-3 α (CC4-5). Each lane was loaded with approximately 1.5 to 3.0 μ g of recombinant protein.

Fig. 3. CD spectra of the recombinants proteins corresponding to the MSP-3 α and MSP-3 β of *P. vivax*. **A.** CD spectra of MSP-3 α (FP-1, CC4-5, CC4, and CC5) recorded from 200 to 260 nm. **B.** CD spectra of MSP-3 β (FP-1, FP-2, and FP-3) recorded from 195 to 260 nm. The plot represents mean residue ellipticity (*m.r.e.*) of each recombinant protein.

Fig. 4. Size exclusion chromatography of the MSP-3 α coiled-coil regions. MSP-3 α CC4 and CC5 were analyzed on Superdex 200 column. Elution volumes

(V_e) of standard proteins: (a) Ferritin MW= 440 kDa, R_s = 5.79 nm, V_e = 160 ml; (b) Albumin MW= 67 kDa, R_s = 3.55 nm, V_e = 210 ml; (c) Ovalbumin MW= 43 kDa, R_s = 3.05 nm, V_e = 223 ml and (d) Ribonuclease A MW= 13.7 kDa, R_s = 1.64 nm, V_e = 262 ml are indicated by vertical lines.

Fig. 5. Analytical ultracentrifugation of MSP-3 α (CC5). The sedimentation equilibrium analyses were performed from 0.25-1 mg/ml in 20 mM Tris-HCl pH 8, and 100 mM NaCl, at 10°C, with speeds of 7,000, 8,000, and 9,000 rpm (AN-60Ti rotor), and scan data acquisition at 280 nm. The best fit was determined by the randomness of the distribution of the residuals and by minimization of the variation of the variance. The figure shows protein sedimentation equilibrium profiles at 0.5 mg/ml at 9,000 rpm (1) and 8,000 rpm (2). The data fit well to tetrameric species (see the residuals plot in the top panel).

Fig. 6. Antibody response to recombinant proteins corresponding to the MSP-3 α and MSP-3 β during patent *P. vivax* infection. Serum samples were tested at a dilution of 1:100. Percentage of responders was estimated from 220 individuals and it was calculated as those serum samples that presented OD₄₉₂ values 3 standard deviations above the average OD₄₉₂ obtained from serum samples from 26 healthy individuals never exposed to malaria. Values of IR > 1.0 were considered as positive.

Figure 1

Figure 2

Figure 3A

Figure 3B

Figure 4

Figure 5

Figure 6

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 22

São Paulo, 15 de Maio de 2001.

Prezada Senhora

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 7 de Maio p.passado, **aprovou** o projeto "Avaliação do potencial uso de proteínas recombinantes para imunodiagnóstico e desenvolvimento de vacina contra a malária causada pelo *Plasmodium vivax*", apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilma. Sra.
Irene da Silva Soares
Pós-Graduanda do FBC