

1 INTRODUÇÃO

1.1 - *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis, o agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), pertence à família Onygenaceae (Ordem Onygenales, Ascomycota), no mesmo grupo de fungos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi*. Os membros desse grupo apresentam muitas características micológicas e ecológicas em comum, como por exemplo, dimorfismo (formas filamentosas, na condição saprofítica e formas leveduriformes, na condição patogênica), distribuição geográfica restrita, formação de corpo de frutificação infectivo (artroconídia) e alguma afinidade por rejeitos animais, como fezes e ácido úrico [1, 2].

O nicho ecológico de *P. brasiliensis* ainda não foi determinado devido à dificuldade de isolá-lo do ambiente, ao prolongado período de latência da doença e à falta de descrições da mesma em animais domésticos ou selvagens. Esse fungo só foi isolado esporadicamente do solo, de fezes de morcegos - *Artibeus lituratus*, pingüins - *Pygoscelis adeliae*, tatus - *Dasypus novemcinctus* e de rações para cães. O grande problema está na falta de reprodutibilidade desses achados [3, 4, 5, 6, 7].

O fungo é termicamente dimórfico (Fig.1). No solo, em temperaturas próximas a 24 °C, ele cresce como um micélio saprofítico infectante com hifas septadas e presença freqüente de estruturas de resistência (clamidósporos), sofrendo influência de diferentes fatores como mudanças freqüentes na temperatura e umidade, além da competição com outros microrganismos. Com a elevação da temperatura para 37 °C quando em contato com o hospedeiro, o

fungo adota a forma leveduriforme com brotamentos característicos e ocupando diversos nichos dentro dos órgãos internos do hospedeiro, de acordo com a tolerância do mesmo a diversos fatores tais como: temperatura, influência hormonal e resposta do sistema imune [1, 8].

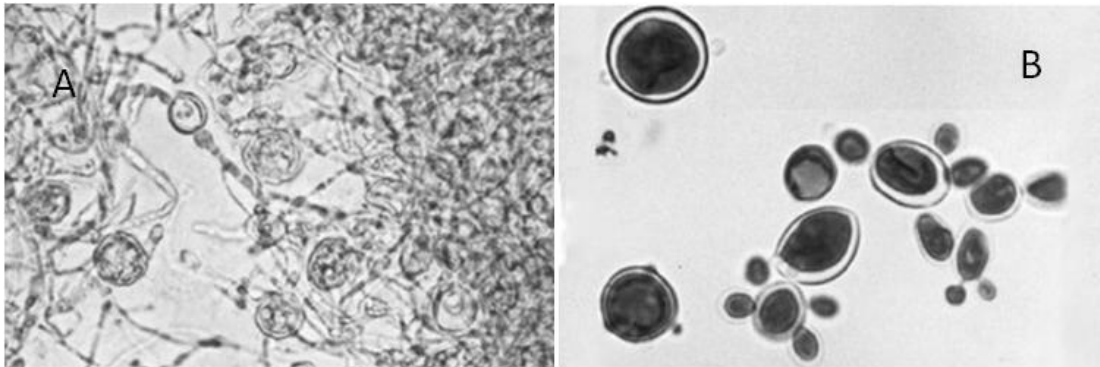


Figura 1 - Transição de fase de *Paracoccidioides brasiliensis*. A - Aparência microscópica da forma micelial do fungo *P. brasiliensis* a 24 °C onde se observa a formação de hifas septadas e clamidósporos (estruturas de resistência). B - Aparência microscópica da forma leveduriforme a 36 °C onde se observa a formação de múltiplos brotamentos, característicos de *P. brasiliensis* [4].

A parede celular do fungo, uma matriz contendo complexos proteína-polissacarídeos, é uma estrutura intercambiável cuja composição e organização estrutural são reguladas durante o ciclo celular em resposta às mudanças nas condições ambientais. As formas leveduriforme e micelial apresentam quitina como polissacarídeo comum, com o carboidrato α -1,3-glucana predominante na forma leveduriforme e β -1,3-glucana predominante na forma micelial. Esses polissacarídeos são fibrilares e determinam, em certo grau, a forma do fungo. Além disso, galactomananas são encontradas na parede celular da forma micelial [9, 10, 11]. Em 1985, San-Blas e San-Blas [12] propuseram que, pela atividade combinada de β -glucanases e dissulfeto

redutases, a parede celular da forma leveduriforme vai se tornando 'afrouxada' em torno de ilhotas discretas de β -1,3-glucanas. A 37 °C, a alta atividade das dissulfeto redutases e mais alta taxa de síntese de quitina e α -1,3-glucanas em relação às β -1,3-glucanas, resulta na forma leveduriforme. A 22 °C, as dissulfeto redutases apresentam baixa atividade e a síntese de glucanas ocorre em baixa velocidade. Assim, longas fibrilas de β -1,3-glucanas são formadas nos sítios nascentes.

A transição morfológica em *P. brasiliensis*, além da alteração na composição e estrutura dos carboidratos da parede celular, também é precedida por outras alterações moleculares, tais como: hiper expressão de enzimas do metabolismo do enxofre na fase leveduriforme, sugerindo que essa via seja importante para o processo de diferenciação; alta expressão do gene para a enzima 4-hidroxifenil piruvato desidrogenase (4-HPPD), relacionada ao catabolismo de aminoácidos aromáticos (a inibição dessa enzima por compostos específicos impede a diferenciação micélio-levedura *in vitro*) e aumento nos níveis de cAMP, sugerindo que a transição envolve a ativação de vias de sinalização mediada por esse segundo mensageiro [13].

Essa transição de fases é reversível e não é vital para o ciclo de vida do fungo, sendo mais uma adaptação oportunística às condições ambientais. Porém, a conversão para a fase leveduriforme é requisito para a progressão da infecção [13].

1.2 - Paracoccidioidomicose (PCM)

Paracoccidioidomicose é a infecção granulomatosa sistêmica causada pelo fungo *P. brasiliensis*. Primeiramente ela afeta os pulmões, de onde pode se disseminar para outros órgãos e sistemas. Lesões secundárias freqüentemente aparecem nas membranas mucosas, linfonodos, pele e adrenais [3].

Essa doença é altamente prevalente na América Latina sendo que o Brasil é o país de maior endemicidade e responde por 80% dos casos relatados. No Brasil, essa doença ocorre nas regiões centro-oeste, sudeste e sul e há relatos de ocorrências nos estados do Pará e de Rondônia (Fig. 2) [2, 10]. Dentre os estados brasileiros, o de Minas Gerais destaca-se como área endêmica de elevada incidência, precedido pelo de São Paulo e Rio de Janeiro [14].

As áreas endêmicas situam-se em regiões de florestas tropicais ou subtropicais com temperaturas médias entre 14 e 20°C, precipitações pluviométricas entre 800 e 2.000 mm e umidade do ar relativamente alta [15].

A PCM é um problema de saúde pública importante cuja magnitude a mantém entre as principais doenças endêmicas no Brasil. A mortalidade por PCM é maior que por leishmaniose, sendo a oitava causa mais comum de morte quando se consideram as doenças infecto-parasitárias crônicas e recorrentes. Além disso, é a micose sistêmica de mais alta mortalidade no país [16].

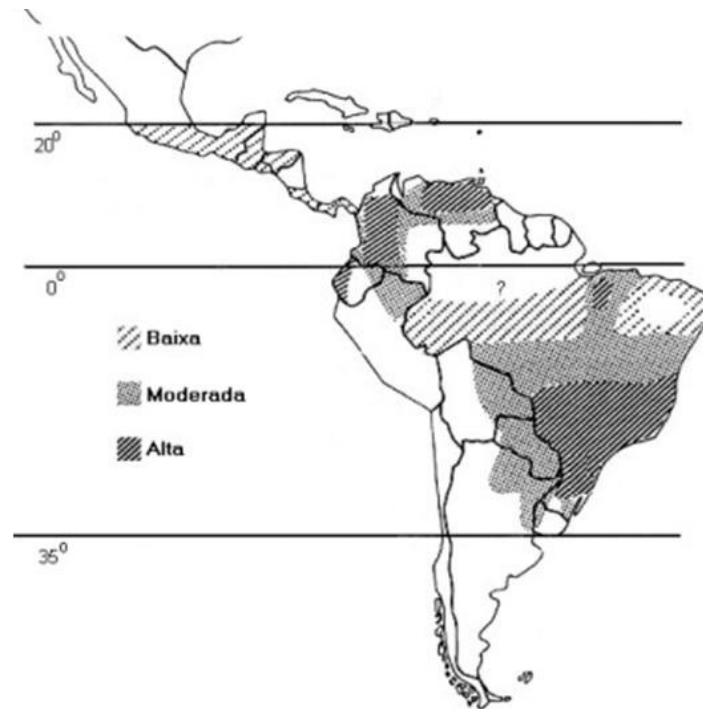


Figura 2 - Distribuição geográfica dos casos de PCM nas Américas Central e do Sul. Observa-se a alta prevalência da doença nas regiões Sul e Sudeste do Brasil [16].

1.2.1 - Infecção e formas clínicas da PCM

A infecção por *P. brasiliensis* se dá por inalação dos esporos fúngicos da fase micelial. A adesão dos propágulos infecciosos de *P. brasiliensis* durante a infecção das células hospedeiras é o passo inicial crucial para subsequente invasão, colonização e crescimento. Provavelmente, o fungo entra como protoplasto e regenera sua parede celular no citoplasma hospedeiro. Esse processo parece envolver grandes alterações no citoesqueleto do hospedeiro (interferência na morfologia da actina, tubulina e componentes da citoqueratina), sugerindo que a capacidade das células fúngicas serem

internalizadas pode ser importante no desenvolvimento da doença. A internalização de *P. brasiliensis* pelas células epiteliais e endoteliais poderia ser um mecanismo de evasão dos macrófagos, já que as células epiteliais e endoteliais do hospedeiro serviriam como reservatório para o fungo, protegendo-o dos macrófagos e permitindo seu acesso à corrente sanguínea e, conseqüentemente, aos outros tecidos (Fig. 3) [17, 18, 19].

Em um hospedeiro competente, o crescimento das leveduras fúngicas é inibido e a interação termina sem dano aparente ao hospedeiro (infecção subclínica). Nesses casos, o *foci* primário desaparece e o fungo é normalmente destruído. Porém, se o balanço hospedeiro-parasita é quebrado por imunossupressão ou outras causas, a infecção pode progredir dando origem à doença propriamente dita [2].

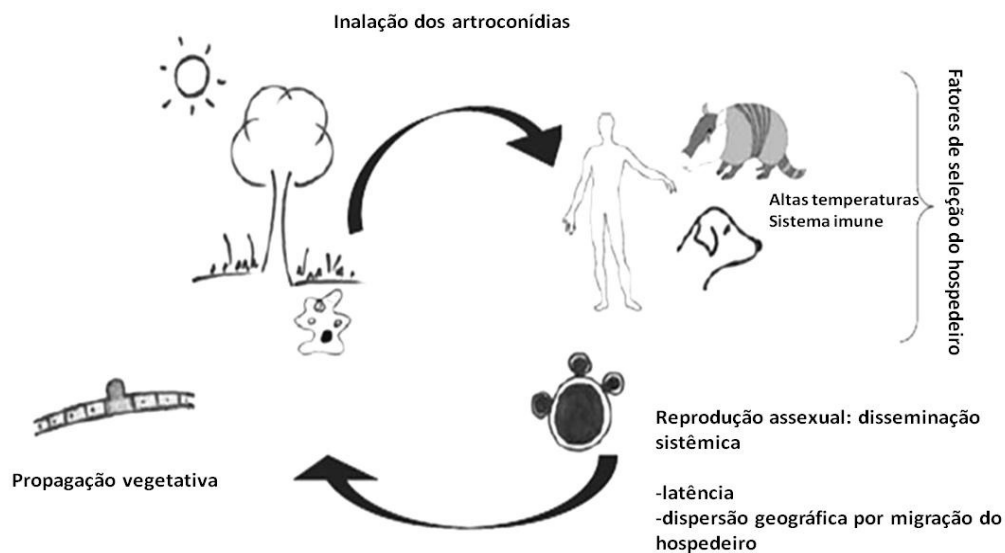


Figura 3 - Ciclo biológico hipotético de *P. brasiliensis* demonstrando a sua transição de fases. Inicialmente o fungo encontra-se no solo, sob a forma micelial. Quando os propágulos infectivos são inalados pelo hospedeiro, *P. brasiliensis* pode assumir seu estado assexuado, leveduriforme, e levar à doença clínica. Adaptado de Bagagli et al, 2008 [8].

Existem, portanto, duas formas clínicas principais de PCM: a forma aguda ou subaguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto). A primeira representa cerca de 3 a 5% dos casos e atinge principalmente crianças e adultos jovens. A infecção tem um curso rápido (semanas a meses) e é marcada pelo envolvimento do sistema reticulo-endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). A resposta imune celular é severamente deprimida nos pacientes com esta forma da doença. Já a forma adulta ocorre em mais de 90% dos pacientes, mais freqüentemente em homens. Isso porque o hormônio estrógeno inibe a transição micélio-levedura. Essa forma da doença progride lentamente podendo demorar meses ou anos até se estabelecer completamente. Além dos sintomas da fase juvenil, sintomas nos pulmões são evidentes na maioria dos casos [20].

Independentemente do órgão acometido pela infecção, a PCM geralmente causa fibrose, o que pode interferir seriamente com o bem-estar do paciente [21].

1.2.2 - Diagnóstico da PCM

Um diagnóstico rápido e preciso da PCM possibilitaria o início da terapia específica evitando maiores danos aos pulmões (sítios primários da infecção) além da disseminação para outros órgãos e desenvolvimento de fibrose [22].

Atualmente, existem vários métodos para o diagnóstico dessa micose.

Os métodos microbiológicos baseiam-se na identificação direta do fungo. O diagnóstico definitivo da PCM é tipicamente dependente da visualização do fungo em biópsias e amostras clínicas ou de seu isolamento por cultura. No entanto, esse processo consome muito tempo, além de ser pouco sensível [23].

Dentre os métodos imunológicos, baseados na detecção de anticorpos específicos, destacam-se as técnicas como fixação de complemento, imunodifusão e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Vários trabalhos têm demonstrado o uso de antígenos recombinantes derivados do fungo em ensaios imunológicos para o diagnóstico de PCM [22, 24, 25]. O uso de antígenos recombinantes facilita a purificação e o rendimento do diagnóstico, além de diminuir reatividade cruzada.

Os métodos moleculares permitem a identificação do fungo sem a necessidade de cultura. São rápidos, altamente específicos e sensíveis. O fungo *P. brasiliensis* já foi identificado utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores para seqüências específicas codificadoras de proteínas desse fungo [26, 27, 28].

1.2.3 - Tratamento da PCM

O tratamento da paracoccidiodomicose é normalmente prolongado, com muitos pacientes recebendo terapia por um ou dois anos. Na ausência de tratamento, a doença é usualmente fatal [21].

O principal tratamento contra a doença é a terapia química, com uso de antifúngicos que interferem na via metabólica de esteróides de membrana ou na síntese da β -1,3-glucana da parede celular [29, 30, 31].

A primeira classe de drogas que interferem no metabolismo dos componentes da membrana fúngica, é composta pelas sulfonamidas, pela anfotericina B e pelos derivados de imidazol [29, 30, 31]:

As sulfonamidas, que inibem competitivamente a enzima catalizadora da reação de síntese de ácido fólico (precursor de ácidos nucleicos), ultimamente complementadas com trimetopim, são normalmente eficientes, de baixo custo, com relativa baixa toxicidade e de fácil administração oral. Porém, o longo período de tratamento freqüentemente desencoraja os pacientes a segui-lo.

O antifúngico anfotericina B se liga ao ergosterol (esteróide da membrana fúngica) levando à quebra da integridade osmótica da membrana. Essa droga só é administrada intravenosamente sob condições restritas e com avaliação renal freqüente, já que é nefrotóxica. Além disso, o custo do tratamento é elevado.

A introdução dos azóis representa um avanço no tratamento das doenças fúngicas. Eles agem na biossíntese do ergosterol alterando a permeabilidade e fluidez da membrana. Imidazóis (cetoconazol) e triazóis (fluconazol, saperconazol e itraconazol) são altamente ativos contra culturas *in vivo* de *P. brasiliensis* e apresentam poucos efeitos colaterais. O tratamento dura de 2 a 12 meses com poucas recidivas.

Antifúngicos que bloqueiam a síntese de glucanas da parede celular fúngica, como as equinocandinas (micafungina – Mycamine[®], Astellas Pharma ou caspofungina – Cancidas[®], Merck) estão sendo utilizados no tratamento,

sob condições restritas, de candidíase e aspergilose. Essas drogas podem ser promissoras no tratamento de PCM por serem altamente específicas, já que as glucanas são carboidratos específicos de fungos e, portanto, ausentes em mamíferos [29, 30, 31].

A pesquisa por agentes quimioterápicos novos e mais efetivos contra *P. brasiliensis* com pouco ou nenhum efeito colateral continua, visto que as drogas atuais apresentam muitos problemas associados como longo tempo de tratamento, efeitos colaterais, alto custo do tratamento e resistência iminente [31].

1.3 - A proteína Pb27

Em 1996, McEwen et al [32], descreveram a clonagem e seqüenciamento de uma região genômica de *P. brasiliensis* que codificava para uma proteína antigênica de aproximadamente 27 kDa. Essa proteína, denominada Pb27, foi a segunda proteína recombinante de *P. brasiliensis* a ter seu gene clonado. A primeira foi a gp43, um antígeno imunodominante que teve sua seqüência nucleotídica clonada em 1996 e caracterizada por Cisalpino et al [33].

Em 1998, Ortiz et al [34] utilizaram essa proteína recombinante em ensaios de ELISA para detecção de anticorpos reativos a ela em soros de pacientes com PCM. O antígeno foi capaz de identificar a presença de anticorpos em 73,4% dos soros analisados. Mais tarde, em 2003, Díez et al [24], utilizaram a mistura da Pb27 com outra proteína recombinante de *P.*

brasiliensis com 87 kDa e observaram, em ensaios de ELISA, sensibilidade de 92% e especificidade de 88% na detecção da PCM.

A proteína recombinante Pb27 (Pb27r) também já foi utilizada como o antígeno em testes de dotblot. Nesses ensaios, soros de pacientes com PCM, utilizados em conjunto ou individualmente, reconheceram a proteína sem reação cruzada com outras micoses e tuberculose e com sensibilidade de 100%. Mais uma vez, a Pb27 recombinante foi confirmada como sendo de grande valor no sorodiagnóstico de PCM; agora em um novo formato de teste diferente do ELISA [22].

Diéz et al em 1999 [35] utilizaram a técnica de PCR para estudos ecológicos de *P. brasiliensis*. Nesse ensaio, eles testaram a amplificação da seqüência nucleotídica de Pb27 em solos artificialmente contaminados com o fungo e em tecidos de tatus capturados em uma área endêmica na Colômbia. Esse estudo mostrou que a seqüência do gene codificador da Pb27 pode ser utilizada como marcador da presença do fungo em diferentes amostras.

Em 2008, Reis et al [36] estudando a imunidade protetora induzida pela Pb27 recombinante, demonstraram que a imunização de camundongos BALB/c com essa proteína, após desafio inicial com o fungo, promoveu uma infecção pulmonar controlada associada a baixos níveis de mortalidade e à presença de granuloma compacto. Isso levou essa proteína ao nível de boa candidata para compor uma vacina contra o fungo, mesmo que seja uma vacina terapêutica; ou seja, utilizada em associação com os antifúngicos tradicionais a fim de diminuir o tempo de tratamento, enfrentar resistência aos medicamentos e diminuir a possibilidade de recaídas. Além disso, anticorpos específicos obtidos desses animais imunizados com a Pb27r foram capazes de localizar a proteína

na superfície e no citosol (co-localizadas com mitocôndrias) de células leveduriformes do fungo (Fig 4).

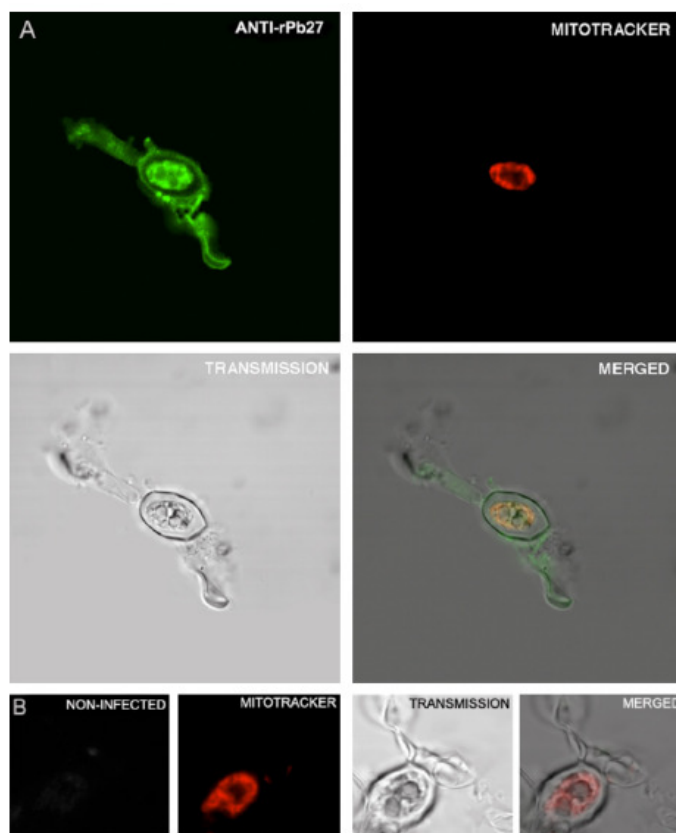


Figura 4 - Imunolocalização da Pb27 em células leveduriformes de *P. brasiliensis*. As células foram inicialmente marcadas com o corante MitoTrackerRed seguida da incubação com soro de camundongos anti-Pb27 (A) ou com soro de camundongo não imune (B). A presença de antígenos na superfície e no citosol das células de *P. brasiliensis* foi visualizada pela incubação do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo ALEXA utilizando microscopia confocal [36].

Todos os resultados apresentados demonstram que a proteína Pb27 é uma boa candidata para procedimentos imunoterapêuticos, de diagnóstico e a compreensão de sua função biológica no fungo pode ser importante para um maior entendimento da interação hospedeiro-parasita em paracoccidioomicose.

1.4 - Caracterização da estrutura tridimensional de proteínas

Muitos avanços no entendimento dos sistemas biológicos em termos moleculares se tornaram possíveis através do conhecimento detalhado das estruturas de proteínas e ácidos nucleicos [37]. A Cristalografia de Raios-X é o principal método para se obter informações estruturais com resolução atômica tanto para macromoléculas quanto para pequenas moléculas. Esta técnica tem contribuído para a resolução da maioria das estruturas depositadas no *Protein Data Bank* (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). De um total de aproximadamente 55.000 estruturas de macromoléculas biológicas depositadas no PDB até o dia 22 de janeiro de 2009, cerca de 47.000 foram resolvidas por Cristalografia de Raios-X [38].

Os modelos tridimensionais das macromoléculas são amplamente utilizados para desvendar detalhes moleculares de processos biológicos. Cientistas utilizam esses modelos para aprender como as moléculas atuam: como enzimas catalisam reações metabólicas, como proteínas transportadoras carregam suas moléculas-cargo, como anticorpos se ligam a antígenos e também, como proteínas se ligam ao DNA, por exemplo [39].

Existem muitas evidências que atestam que as estruturas cristalinas podem, seguramente, ser utilizadas para a análise da relação estrutura-função das proteínas, mesmo não estando estas em seu meio biológico natural. A primeira e mais convincente evidência é que muitas macromoléculas são ainda funcionais no estado cristalino. Por exemplo, substratos adicionados às suspensões de enzimas cristalizadas são convertidos em produtos. Outra evidência é que os modelos obtidos por Cristalografia de Raios-X são

compatíveis com modelos derivados a partir de outras técnicas, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Em alguns casos, a estrutura da proteína foi determinada a partir de mais de um tipo de cristal e o modelo resultante foi bastante similar, sugerindo que a estrutura molecular não foi alterada pela cristalização. Além disso, cristais de proteínas contêm uma grande quantidade de moléculas de água, ordenadas ou não. Assim, as proteínas em um cristal ainda estão em um ambiente aquoso, sujeitas aos mesmos efeitos do solvente que estabilizam a estrutura em solução [39].

Para determinar a estrutura de uma proteína por Cristalografia de Raios-X, em linhas bem gerais, é necessário: (1) obter cristais de qualidade da proteína purificada; (2) medir a direção e intensidade dos raios-X difratados pelo cristal; (3) utilizar programas computacionais para calcular e mostrar, por meio de imagem, a distribuição dos elétrons no espaço dentro do cristal a partir das medidas realizadas e (4) interpretar as imagens geradas, criando um modelo tridimensional da proteína consistente com estas imagens (figura 5) [39].

A cristalização é o passo-chave limitante nas análises por difração de raios-X [38]. Em média, menos de 10 % das proteínas clonadas e expressas na maioria dos centros genômicos levam a uma estrutura de alta resolução [38]. O procedimento comum tem sido a clonagem e produção de mais proteínas (de diferentes organismos) para uma quantidade maior de testes de cristalização, na esperança de que cristais apareçam e assim, sejam úteis para as análises de difração de raios-X [38].

O crescimento dos cristais se dá por precipitação lenta da proteína em solução aquosa. Para isso, uma solução precipitante é adicionada à solução da

proteína até que a concentração do precipitante seja justamente inferior àquela necessária para precipitar a proteína. À medida que parte do solvente vai sendo retirado lentamente dessa solução, as concentrações da proteína e do precipitante vão aumentando até que a cristalização da proteína possa ocorrer [39].

No método da gota suspensa, uma gota contendo uma quantidade da solução de proteína (1 ou mais μL) e a mesma quantidade da solução precipitante é colocada sobre uma lamínula de vidro silanizada. Essa lamínula é invertida sobre um reservatório contendo a mesma solução precipitante, vedando-o. Com a difusão do vapor do solvente, a gota se tornará supersaturada possibilitando a formação de cristais.

Uma vez formados os cristais, eles são submetidos à difração de raios-X para coleta dos dados e determinação da estrutura tridimensional das moléculas que o compõe.

Os raios-X difratados emergem do cristal como se fossem ondas refletidas (daí serem chamados de 'reflexões') pelas nuvens eletrônicas dos átomos presentes em cada molécula que compõe esse cristal. Cada uma dessas ondas apresenta uma amplitude e uma fase. Porém, durante o processo de difração, a informação sobre as fases é perdida e só com essas duas variáveis para cada onda difratada é possível chegar ao modelo tridimensional da proteína.

Existem vários métodos para a resolução do problema das fases: o Método do Átomo Pesado (*Heavy-Atom Method*) requer que o cristal da proteína de interesse contenha um átomo difrator forte, ou que nele seja introduzido esse átomo, cuja nuvem eletrônica seja capaz de produzir uma

perturbação nas ondas 'refletidas' pelo cristal em intensidade grande o suficiente para ser detectada. Essa perturbação serve de base para a determinação da fase de todas as ondas 'refletidas' pelo cristal. Existe também o Método do Espalhamento Anômalo (*Anomalous Scattering*), que se beneficia da capacidade que alguns átomos possuem de absorver raios-X de comprimentos de onda específicos. Em um experimento de difração, a variação nas intensidades das 'reflexões' produzidas pelo cristal, permite a determinação das fases. Já o último método utilizado é o da Substituição Molecular (*Molecular Replacement*). Nesse método, as fases calculadas computacionalmente a partir de um modelo tridimensional conhecido (e relacionado à proteína de interesse) são utilizadas como ponto de partida para a determinação das verdadeiras fases do cristal formado pela proteína de interesse [39].

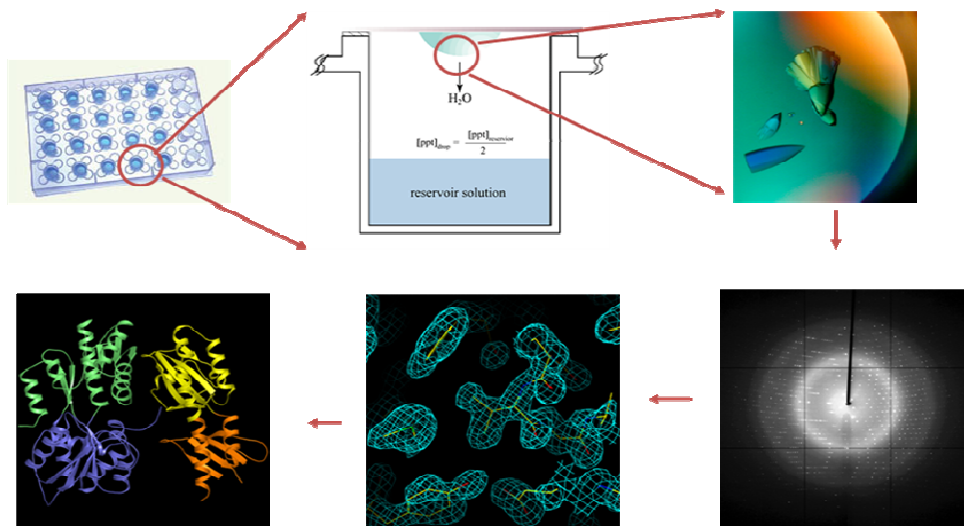


Figura 5 - Etapas da resolução de estruturas de proteínas por cristalografia de raios-X. Inicialmente, a solução de proteína é colocada em contato com uma solução precipitante que pode permitir a formação de cristais de proteínas. Esses cristais são submetidos à difração de raios-X para gerar um padrão de difração que permite a produção de um mapa de densidade eletrônica das moléculas presentes no cristal. Assim, de forma bastante simplificada, pode-se chegar à estrutura tridimensional [41, 42].

As proteínas em um cristal interagem umas com as outras primariamente por ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos da superfície da proteína. Esses cristais são bem mais frágeis que um cristal inorgânico e, portanto, seu crescimento, manuseio e mesmo a sua montagem para as análises de cristalografia requerem técnicas bastante gentis [39].

São muitos os fatores que influenciam a formação dos cristais de proteínas. Destacam-se, por exemplo, a concentração e o tipo de proteína, a temperatura, o pH, a força iônica e também as concentrações e os tipos de agentes precipitantes da solução de cristalização. Encontrar as condições exatas para produzir bons cristais de uma proteína específica requer muitos testes cuidadosos e diversificados [39].

Como não existe uma maneira de prever as condições exatas de cristalização, a forma tradicionalmente utilizada para cristalizar uma proteína é testar uma ampla variedade de condições [40]. No início da cristalização de uma nova proteína, os testes podem ser baseados no processo de tentativa e erro. Os kits de soluções precipitantes disponíveis no mercado têm sido expandidos para refletirem em coquetéis de cristalização otimizados para diferentes grupos ou tipos de proteínas [38].

Quando os testes iniciais de cristalização não forem suficientes para se produzir bons cristais, o cristalógrafo deve adotar outras medidas. Pode-se, por exemplo, variar vários fatores convencionais dos testes de cristalização iniciais na tentativa de ampliar o espaço de cristalização atingido pelo teste. Caso isso não resulte na formação de cristais, pode-se promover mudanças químicas na estrutura da proteína, seja por meio de proteólise limitada, mutação sítio dirigida, modificação química em resíduos de aminoácidos de superfície, dentre

outros. Deve-se levar em conta que estas modificações não podem, em princípio, inativar a proteína em estudo nem desnovelá-la totalmente, pois os resultados, se obtidos, não representariam a proteína nativa. Além disso, a utilização de aditivos, cofatores e substratos pode induzir a formação de um complexo proteína-ligante que seja mais cristalizável que a proteína nativa [39].

Para realizar tantos testes de cristalização, necessita-se de grandes quantidades da proteína purificada (mais que 5 mg). Assim, o uso de proteínas recombinantes para cristalização é bastante freqüente. Isso se deve às vantagens dessa técnica como: aumento considerável na quantidade de proteína obtida, fácil purificação utilizando caudas de afinidade e proteínas de fusão, possibilidade de modificação da proteína e uso de domínios isolados [40].

Em adição ao uso de proteínas recombinantes, a escolha da cauda de fusão também é importante. Cerca de 60 % dos mais recentes trabalhos em cristalografia de proteínas utilizam cauda de poli-histidinas em suas construções [40], tornando essa cauda a primeira escolha entre os cristalógrafos. As vantagens associadas são a relativa simplicidade da purificação através da cromatografia de afinidade com níquel e o fato de que essa cauda não consiste necessariamente, em um obstáculo à cristalização. Enquanto alguns grupos defendem a remoção proteolítica da cauda antes da cristalização, outros argumentam contra ou utilizam as duas formas; ou seja, realizam os testes de cristalização com a proteína fusionada às histidinas e, se a cristalização falhar, eles passam para a remoção da cauda. Existem muitos exemplos de proteínas cristalizadas juntamente com a cauda de histidinas depositadas no Protein Data Bank [38]. Essa cauda funciona bem com

proteínas solúveis de tamanho pequeno a médio, mas em muitos casos, ela pode diminuir a solubilidade da proteína fusionada [40].

Diante desses aspectos, a maioria dos centros de genômica estrutural no mundo (*The Southeast Collaboratory for Structural Genomics – SECSG*; *UCLA–DOE Center for Genomics and Proteomics*, por exemplo) utiliza um protocolo padrão para produção de proteínas para estudos cristalográficos. Esse protocolo está resumido na figura 6 onde se observa a escolha preferencial pela expressão em bactéria *Escherichia coli* BL21 da proteína fusionada com cauda de histidinas e purificação por afinidade em coluna de níquel. Essa também foi a estratégia utilizada nesse trabalho

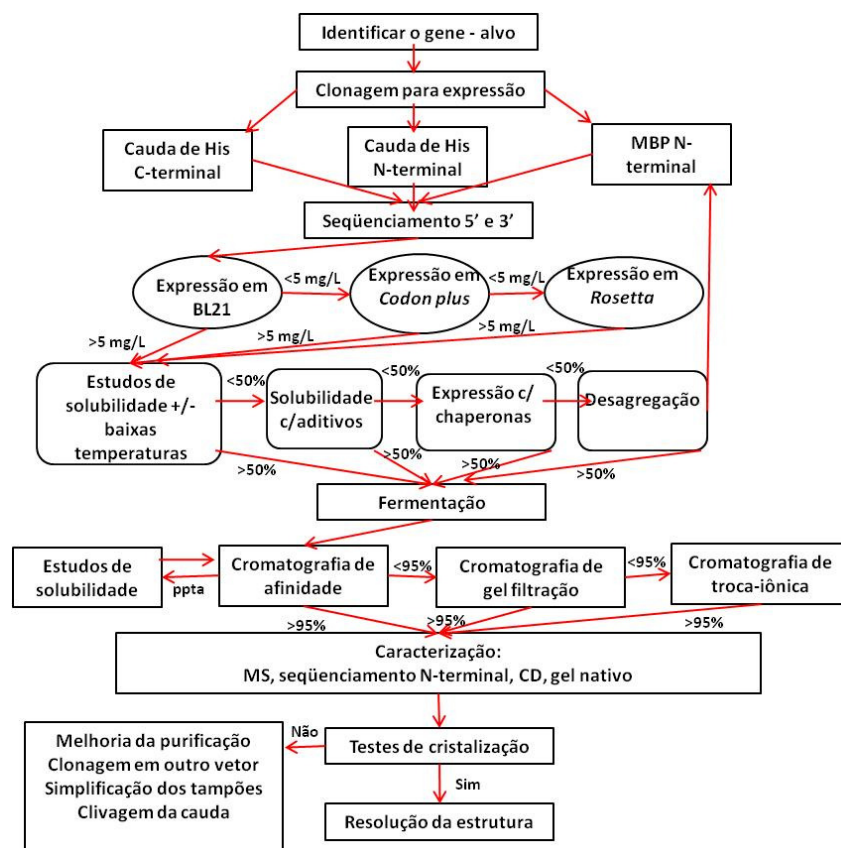


Figura 6 - Estratégias para produção de proteínas recombinantes em *E. coli*. Observa-se a preferência por expressão da proteína recombinante em fusão à cauda de histidinas e conseqüente purificação por cromatografia de afinidade [43]. His, histidina; MBP, proteína de ligação à maltose (*maltose-binding protein*); MS, espectrometria de massas (*mass spectroscopy*); CD, dicroísmo circular (*circular dichroism*)

Existem ainda outras técnicas que permitem inferir sobre a estrutura e estado de proteínas em solução. A técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) é útil para informar sobre polidispersividade de uma amostra, já que é sensível à agregação. A intensidade da luz espalhada é proporcional ao quadrado da massa da partícula solúvel. Observações empíricas sugerem que macromoléculas monodispersas (com todas as partículas do mesmo tamanho) sob condições normais de solvente, cristalizam mais facilmente [48]. Isso porque, em muitos casos, a polidispersividade origina-se de interações não específicas entre as partículas, que, em altas concentrações, permite a agregação randômica em maior quantidade que a cristalização ordenada [39].

O dicroísmo circular (CD) é uma técnica particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, tais como proteínas e carboidratos, que possuem unidades opticamente ativas. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração na luz incidente. O fenômeno do dicroísmo circular consiste da absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita por essas moléculas quirais [49].

Os espectros de CD para proteínas são geralmente divididos em três faixas de comprimentos de onda, baseados na energia das transições eletrônicas que predominam em determinada faixa: (1) UV distante, abaixo de 250 nm, onde as contribuições peptídicas dominam, caracterizando as estruturas secundárias; (2) UV próximo, entre 250 e 300 nm, onde contribuem as cadeias laterais aromáticas e estrutura terciária e (3) UV próximo – região visível, entre 300 e 700 nm, onde os grupos cromóforos são os principais contribuintes, permitindo estudo de ligantes [49].

Para proteínas, essa técnica tem sido bastante utilizada em estudos de estrutura secundária e enovelamento. Um espectro típico de α -hélice é caracterizado por duas bandas negativas próximas a 222 e 208 nm e uma banda positiva próxima a 192 nm. Um espectro de CD característico de folhas- β , apresenta uma banda negativa em 215 nm e uma banda positiva em 198 nm. Bandas pequenas adicionais são freqüentemente observadas próximo a 175 nm (negativa) e 168 nm (positiva). No entanto, espectros de CD para folhas- β são difíceis de caracterizar devido às variações na geometria da estrutura- β na cadeia polipeptídica e também devido à solubilidade limitada dos polipeptídios em estrutura- β [49].

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil não existem programas específicos de controle da PCM nem diagnóstico padronizado da doença [16]. Assim, um diagnóstico rápido e preciso se torna importante para que um tratamento específico seja iniciado, impedindo o aumento dos danos causados aos pulmões e a disseminação do fungo. O uso de proteínas recombinantes no diagnóstico da PCM permite sua rápida identificação além de reduzir as reações cruzadas com outras micoses durante o diagnóstico, o que normalmente ocorre quando se utilizam antígenos 'brutos' [22].

A Pb27 foi a segunda proteína antigênica de *P. brasiliensis* a ser clonada e seqüenciada [32]. Em estudos prévios, essa proteína foi reconhecida com alta sensibilidade e especificidade por soros de pacientes com PCM [22, 32, 36]. Isso confirma o potencial dessa proteína recombinante para utilização em ensaios de sorodiagnóstico.

O estudo da estrutura tridimensional desta proteína possibilitaria um entendimento mais detalhado desta molécula como, por exemplo, a localização dos seus epitopos e o tipo de enovelamento protéico.

Até o momento, não existem outras proteínas com seqüência de aminoácidos similar à Pb27 descritas nos bancos de dados de DNA ou de proteína. Apesar disso, experimentos de imunolocalização [36] indicam que ela é funcional e apresenta um tamanho adequado para determinação de estrutura. Assim, a Pb27 se torna uma forte candidata a estudos estruturais que permitiriam determinar sua relação estrutura/ função, de modo a dar base para o desenvolvimento, por exemplo, de vacinas terapêuticas mais eficazes bem como de kits diagnósticos mais precisos.

3 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Caracterizar as estruturas secundária e terciária de diferentes construções recombinantes da proteína Pb27 (Pb27r) de *Paracoccidioides brasiliensis*.

3.2 - Objetivos específicos

- Expressar e purificar quantidades suficientes das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis para ensaios de caracterização estrutural;

- Utilizando o programa *Surface Entropy Reduction prediction* (SERp), identificar, possíveis sítios de mutações de resíduos de superfície almejando maior sucesso na cristalização da Pb27r;

- Construção e expressão dos mutantes para análises comparativas com as proteínas recombinantes.

- Realizar ensaios de cristalização das formas Pb27r-CHis, Pb27r-NHis e Pb27r-mutada visando a determinação estrutural por difração de raios-X.

- Caracterizar a estrutura secundária das proteínas fusionadas por meio de dicroísmo circular;

- Realizar ensaios de espalhamento dinâmico da luz para averiguar estados de agregação das proteínas recombinantes em solução como parâmetro de cristalização;

- Realizar ensaios de proteólise limitada das construções protéicas a fim de identificar regiões mais compactas e estáveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 de *P. brasiliensis* em sistema de expressão procariótico com cauda de histidina C-terminal

A seqüência nucleotídica codificadora da proteína de Pb27 de *P. brasiliensis* foi obtida inicialmente por Reis, et al, 2008 [36] a partir do cDNA de células leveduriformes de *P. brasiliensis*. A amplificação do inserto por PCR utilizou iniciadores obtidos a partir da seqüência codificadora para o antígeno de 27 kDa (acesso U41503) depositada no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os amplicons foram inicialmente clonados no sistema TOPO[®] e posteriormente no plasmídeo pGEX 4T-2, que expressa a proteína de interesse ligada à proteína GST (Pb27r-GST).

Uma quantidade de 150 ng dos plasmídeos pGEX 4T-2 contendo a seqüência da Pb27 foram digeridos com 0,5 µL de cada uma das enzimas de restrição específicas *EcoRI* (5000U) e *NotI* (200 U) (Promega, Madison, USA) durante 3 h, a 37°C e 350 rpm para verificação da presença do inserto. O tampão escolhido foi o tampão D (6 mM MgCl₂, 150 mM NaCl e 1 mM DTT em 6 mM Tris-HCl pH 7,9) em que a enzima *NotI* tem 100% de atividade e a *EcoRI*, apresenta de 50 a 75 % de atividade. A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante das enzimas de restrição.

O sistema de clonagem escolhido foi o Gateway Technology com Clonase II (Invitrogen, Carlsbad, USA) que utiliza o sistema de recombinação do fago lambda para facilitar a transferência de seqüências de DNA heterólogas (flanqueadas por sítios de recombinação modificados, *att*) entre vetores [55, 56]. Esse sistema foi desenvolvido para altos níveis de expressão

da proteína clonada fusionada a uma cauda de afinidade, como por exemplo, a cauda de histidinas (His). A fusão à cauda de histidinas permite a purificação relativamente fácil da proteína, utilizando cromatografia de afinidade [10, 13].

Além disso, os vetores compatíveis com esse sistema de clonagem e utilizados nesse trabalho contêm um gene letal, o gene *ccdB* entre os sítios de recombinação. Quando as bactérias são transformadas com o plasmídeo vazio, elas não crescem devido a esse gene, cujo produto de expressão, a proteína CcdB, interfere com a DNA girase de *E. coli*. Isso permite alta eficiência na seleção de clones positivos que contenham a seqüência clonada.

Esse sistema é composto de duas reações de recombinação: BP e LR (Fig. 7).

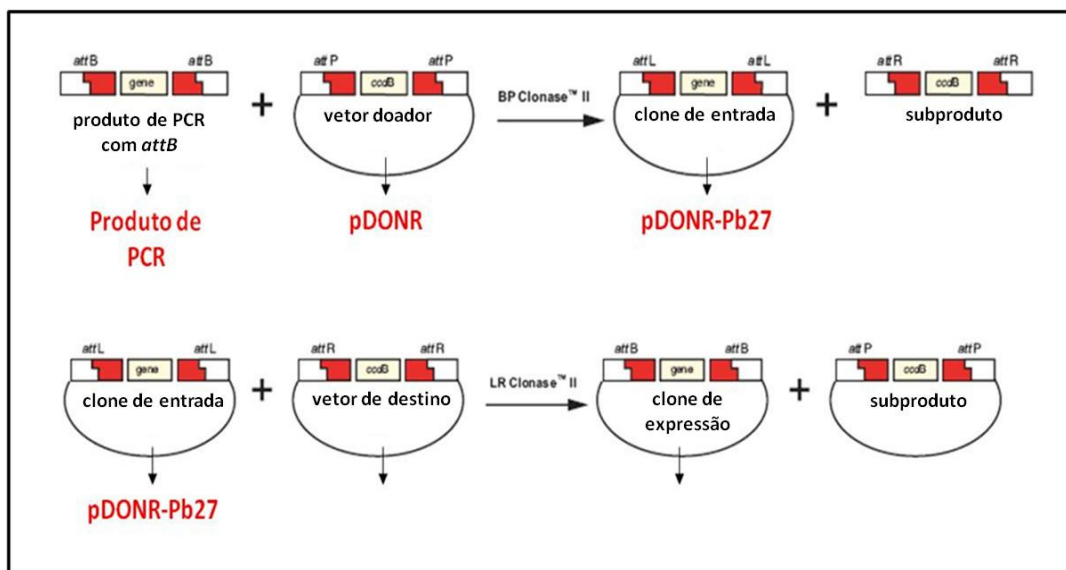


Figura 7 - Esquema representando as reações de recombinação BP e LR e os vetores envolvidos. Adaptado do manual Gateway Technology with Clonase II [56].

A amplificação para inserção de uma região de recombinação na seqüência de interesse, região essa necessária para clonagem nesse sistema foi realizada através de PCR utilizando os plasmídeos pGEX 4T-2 contendo a

seqüência da Pb27 como molde. Foi preparada uma reação de 50 µL utilizando 130 ng do plasmídeo como DNA molde, 1 pmol/µl de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Pfx DNA polimerase, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mmol/ µl da mistura dos 4 desoxinucleotídeos e 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA em 50 mM Tris-HCl pH 8,0, como tampão da enzima. A reação foi executada de acordo com o seguinte programa:

- 1- Ciclo inicial de desnaturação a 94 °C durante 2 minutos;
- 2- 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 68 °C por 1 minuto;
- 3- Ciclo final de extensão a 68 °C por 3 minutos

Os iniciadores utilizados para a amplificação foram:

Direto:

5' GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC **GAA GGA GAT AGA** ATG
GCA CGA GCG CTC AGT TC 3' T_{anelamento}: 56 °C

Reverso:

5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GTT GTG GAA GAC AGC
GCT GCA 3' T_{anelamento}: 56 °C

Os sítios *attB*, essenciais para a clonagem no sistema Gateway estão sublinhados. A seqüência Shine Dalgarno, que permite o reconhecimento da maquinaria de tradução da bactéria, está marcada em negrito.

4.1.1 - Ligação da seqüência codificadora da Pb27 no vetor doador pDONR 221 (reação BP)

O amplicom gerado foi visualizado em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e purificado por precipitação com PEG 8000 em 30 mM de MgCl₂ fornecido pelo kit.

Posteriormente, esse fragmento foi clonado no plasmídeo pDONR 221 (reação de recombinação BP). Para isso, foram utilizados 150 ng do produto de PCR contendo a região *attB*, 150 ng do vetor pDONR e tampão TE pH 8,0 para um volume final de 8 µL. Foram adicionados 2 µL da enzima de recombinação BP Clonase II e a reação foi incubada *overnight* a 25 °C.

Após esse tempo, adicionou-se 1 µL da solução de proteinase K (2 µg/µl) também fornecida pelo kit, e a reação foi incubada a 37 °C por 10 minutos para finalizar a ligação.

4.1.2 - Transformação de bactérias com o plasmídeo recombinante

Bactérias *E. coli* TOP10 eletrocompetentes foram transformadas com o plasmídeo pDONR contendo a seqüência codificadora da Pb27. Na reação, 50 µL de bactérias *E. coli* TOP10 e 1 µL da reação de ligação BP contendo os plasmídeos recombinantes foram adicionados a uma cubeta apropriada e eletroporados a 1,8 V. Logo em seguida, foram adicionados 200 µL de meio LB líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 0,5%; pH 7,4) e a mistura foi deixada sob agitação por 1 h a 37 °C para expressão do gene de

resistência. Posteriormente, a mistura foi plaqueada em meio seletivo LB/ágar 1,5% com 50 µg/ml de kanamicina e deixada em estufa, a 37 °C por 16 horas. Os clones obtidos foram analisados através do PCR de colônias utilizando os iniciadores específicos para a seqüência da Pb27 e o programa apresentado no item 4.1, seguido de ensaio eletroforético em gel de agarose para visualizar a presença do inserto.

Os clones que continham o plasmídeo com o inserto foram selecionados e cultivados por 16 horas em meio LB líquido com kanamicina na concentração de 50 µg/ml para a amplificação em pequena escala dos clones contendo os plasmídeos recombinantes.

4.1.3 - Extração de DNA plasmidial

O clone bacteriano contendo o vetor pDONR-Pb27 foi cultivado a 37 °C durante 16 horas em 5 mL de meio LB líquido com kanamicina 50 µg/ml. O precipitado bacteriano obtido, após 10 minutos de centrifugação a 5000 rpm, a temperatura ambiente foi lisado e os plasmídeos recombinantes purificados com a utilização do Kit Mini-prep QIAprep Spin miniprep 150 (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

4.1.4 - Ligação da seqüência da Pb27 no vetor de expressão pET-DEST42 (reação LR) e transformação de bactérias *E. coli* BL21 com os plasmídeos recombinantes

A construção obtida a partir da extração plasmidial do item 4.1.3 foi utilizada para fornecer a seqüência nucleotídica a ser ligada ao vetor de expressão através dessa nova reação de recombinação (LR). Para isso, foram misturados 150 ng do plasmídeo recombinante pDONR-Pb27, 150 ng do vetor de destino pET-DEST42, tampão TE (Tris-EDTA) pH 8,0 para um volume final de 8 µL e 2 µL da enzima de recombinação LR Clonase II. Novamente, a reação foi incubada a 25 °C *overnight*.

Após esse tempo, adicionou-se 1 µL de proteinase K (2 µg/µl) a 37 °C por 10 minutos de modo a parar a reação de ligação.

Os plasmídeos recombinantes obtidos através da ligação LR, foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21 por meio de eletroporação como mencionado no item 4.1.2. Contudo, utilizou-se o antibiótico ampicilina na concentração de 100 µg/mL como marcador de seleção. Os clones positivos, que continham a seqüência codificadora da proteína, foram selecionados por PCR de colônias utilizando os iniciadores específicos.

4.1.5 - Seqüenciamento do fragmento Inserido no vetor pET-DEST42

Para as análises de seqüenciamento, foi realizada a extração plasmidial de um clone contendo o vetor pET-DEST42-Pb27. Para tanto, utilizou-se um protocolo de extração plasmidial semelhante ao descrito no item 4.1.3. Os

seqüenciamentos foram realizados pelo método didesoxiterminal [44] no núcleo de Análise do Genoma e Expressão Gênica (NAGE/ICB/UFMG) com o auxílio do *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit For MegaBACE DNA Analysis* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Inglaterra) utilizando iniciadores T7 específicos para o plasmídeo:

T7 direto:

5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´

T_{anelamento}: 48 °C

T7 reverso:

5´ GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3´

T_{anelamento}: 51 °C

Os dados da seqüência do clone foram exportados e editados no programa EMBOSS *Pairwise Alignment Algorithms* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>).

4.2 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 de *P. brasiliensis* em sistema de expressão procariótico com cauda de histidina N-terminal

A seqüência codificadora da proteína Pb27 foi clonada em um vetor que expressa a proteína recombinante fusionada a uma cauda de histidina no N-terminal (Pb27r-NHis).

Para isso, uma nova amplificação foi realizada como descrito no item 4.1 utilizando, porém, um novo iniciador direto que não deve conter códon de iniciação, já que a cauda é N-terminal e sua seqüência codificadora está no plasmídeo. Outra modificação foi a utilização de outra DNA polimerase, a GoTaq (Promega, Madison, USA).

Direto:

5'GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GCA CGA GCG CTC AGT
TCC GA 3' T_{anelamento}: 58 °C

Reverso:

5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GTT GTG GAA GAC AGC
GCT GCA 3' T_{anelamento}: 56 °C

Os sítios *attB* estão sublinhados.

O programa utilizado constou das seguintes etapas:

- 1- Ciclo inicial de desnaturação a 95 °C durante 2 minutos;
- 2- 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto;
- 3- Ciclo final de extensão a 72 °C por 3 minutos

A ligação da seqüência da Pb27 no vetor doador pDONR 221 (reação BP) e a transformação de bactérias *E. coli* TOP10 foram realizados como nos itens 4.1.1 e 4.1.2. As bactérias *E. coli* TOP10 transformadas com o plasmídeo recombinante pDONR-Pb27 foram analisadas por PCR de colônias utilizando o novo iniciador direto e o reverso antigo. O programa foi o mesmo utilizado para a amplificação inicial apresentada nesse item.

A reação LR de ligação no novo vetor de expressão pDEST 17, que insere a cauda de histidinas no N-terminal da proteína heteróloga, foi realizada como já descrito no item 4.1.4. Bactérias *E. coli* BL21 foram transformadas com o plasmídeo recombinante pDEST17-Pb27 e os clones positivos selecionados por PCR de colônias.

O seqüenciamento do clone contendo o pDEST 17-Pb27 foi realizado seguindo o mesmo protocolo descrito em 4.1.5.

4.3 - Eletroforese em gel de agarose

Esse método é capaz de separar fragmentos de DNA através de sua migração diferencial na agarose. A localização do DNA é realizada diretamente através dos fluoróforos brometo de etídio e *Syber safe* (Invitrogen, Carlsbad, USA) possível devido à afinidade desses componentes por seqüência de nucleotídeos.

O gel constituiu-se de 1% de agarose dissolvida por aquecimento em tampão TAE 1X (1,14 mL ácido acético glacial; 2 mL EDTA 0,5 M e 4,8 g/L Tris-base, pH 8,0). A esta solução adicionou-se brometo de etídio (0,3 µg/µl).

ou *Sybr Safe* (1X). Todos os géis de agarose utilizados a partir da clonagem da seqüência codificadora da Pb27 com cauda de histidinas N-terminal foram corados com *Sybr Safe*, que é menos mutagênico que o brometo de etídio além de ser mais sensível.

Após a polimerização, as amostras foram aplicadas no gel. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem constante de 60 V. A visualização das bandas foi realizada utilizando-se radiação ultravioleta.

4.4 - Mini-Expressão das proteínas Pb27 recombinante com cauda de histidina C-terminal (Pb27r-CHis) e N-terminal (Pb27r-NHis)

Clones de bactérias *E. coli* BL21 contendo os plasmídeos recombinantes pET-DEST42-Pb27 ou pDEST 17-Pb27 foram cultivados em 10 ml de meio LB líquido com ampicilina 100µg/ml, à 37 °C sob agitação de 150 rpm..

Após 16 horas, as culturas foram diluídas 1:10 em 10 ml de LB/ampicilina 100µg/ml sob agitação a 37 °C. Ao atingir a D.O.600 (densidade ótica) de 0,5 foram adicionados 10 µL de IPTG 1M (USB Corporation, Cleveland, USA) para induzir a expressão das proteínas recombinantes.

Alíquotas de 1 ml foram coletadas antes e após 1, 2, 3 e 4 horas de indução. Posteriormente, as alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

O restante das culturas obtido após 4 horas de indução (5 mL) foram centrifugados durante 10 minutos a 5.000 rpm à temperatura ambiente. O precipitado de bactérias foi lisado pela adição de 0,25% de lisozima em 1 ml de

PBS 0,15 M pH 8,4 seguido de 3 ciclos de congelamento e descongelamento. Por fim, o meio foi submetido a 3 ciclos de 30 segundos de sonicação e repouso (*Ultrasonic processor*, Sigma, St. Louis, USA) à 30% de amplitude.

Os extratos obtidos de cada uma das mini-expressões foram centrifugados novamente a 10.000 rpm em centrífuga Sorvall RC5C rotor GSA durante 30 minutos, sendo o sobrenadante e o pellet submetidos à eletroforese SDS-PAGE 10 % para verificar a presença das proteínas, Pb27r-CHis ou Pb27r-NHis, no pellet ou no sobrenadante.

4.5 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida- SDS/PAGE 10%

A análise eletroforética de proteínas foi realizada em géis de poliacrilamida com SDS, como descrita por Laemmli, 1970 [45], no sistema da Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Inglaterra). As proteínas foram fervidas por 15 minutos em tampão da amostra (SDS 2%, β -mercaptoetanol 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,002% em 0,065 M Tris-HCl, pH 6,8) e separadas em gel contendo poliacrilamida 10%, bis-acrilamida 0,3% e SDS 0,1%, em 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8. O gel de empilhamento foi constituído de poliacrilamida 3%, bis-acrilamida 3% e SDS 0,1% em 0,125 M Tris-HCl pH 6,8. Os géis de separação e empilhamento foram polimerizados na presença de persulfato de amônio 0,1% e TEMED (1:2.000, v/v). A corrida foi realizada em tampão constituído de 0,192 M glicina, SDS 0,1% e 0,025 M Tris pH 8,5 em uma voltagem constante de 80 V. Após a eletroforese, os géis foram corados

pelo azul de Coomassie, ou então transferidos para membranas de nitrocelulose.

Para visualizar as bandas de proteínas, o gel foi incubado por duas horas em solução de metanol 15%, ácido acético 7% e “Coomassie Brilliant Blue” R250 0,5%. A seguir a solução metanol 10% e ácido acético 5% foi utilizada para a remoção do excesso de corante. Os géis foram então fotografados.

Os marcadores de peso molecular utilizados foram o *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, Glen Burnie, USA) com as seguintes proteínas: β -galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (66,2 kDa), ovoalbumina (45 kDa), lactato desidrogenase (35 kDa), REase Bsp981 (25 kDa), β - lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa) ou o *Prestained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas, Glen Burnie, USA), com as seguintes proteínas-padrão: β -galactosidade (~120 kDa), albumina sérica bovina (~85 kDa), ovoalbumina (~45 kDa), anidrase carbônica (~34 kDa), β - lactoglobulina (~26 kDa) e lisozima (~19 kDa). Esse último marcador foi utilizado também nos ensaios de *western blot*, já que é pré-corado.

4.6 - Western blot

Segundo a técnica adaptada de Towbin et al, 1979 [46], após a corrida eletroforética das proteínas de interesse, o gel de poliacrilamida 10% foi colocado sobre uma membrana de nitrocelulose (BioAgency, São Paulo, Brasil), ambos embebidos em tampão 0,025 M Tris, 0,192 M glicina pH 8,5 e

metanol 20%. O sistema foi colocado em uma cuba específica para eletrotransferência (BioRad, Hercules, USA) sendo submetido à uma voltagem constante de 100 V durante 1 hora em banho de gelo. Após ser retirada do sistema, a membrana foi bloqueada *overnight* em PBS 0,15 M contendo 1,6% de caseína.

Após três lavagens com Tween 0,5%, em tampão 0,05 M PBS, a membrana foi incubada por 1 hora com o anticorpo específico:

- para a Pb27r-CHis: soro de camundongos anti-Pb27 obtido por Reis et al, 2008 [36] diluído 1:100 em 0,15 M PBS contendo 0,25% de caseína.

- para a Pb27r-NHis: anticorpo anti-histidina (Sigma, St. Louis, USA) diluído 1:3.000 em PBS-caseína 0,25%.

Após três lavagens com PBS-Tween, o anticorpo secundário anti-imunoglobulina conjugado com peroxidase (Anti-mouse IgG – *whole molecule* – peroxidase conjugate, Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1: 5.000 em PBS-caseína foi adicionado e incubado por 1h.

A membrana foi revelada em tampão contendo 3,3'aminobenzidina (DAB) 600 µg/ml, 10 µl/ml cloreto de níquel e 1 µl/ml H₂O₂, diluídos em 20 ml de 0,15 M PBS. A reação foi interrompida com água deionizada e a membrana foi por fim fotografada.

4.7 - Expressão das proteínas recombinantes Pb27r-CHis e Pb27r-NHis

Os clones seqüenciados de bactérias *E. coli* BL21 contendo o inserto correspondente de cada proteína foram selecionados e cultivados em 10 ml de

meio líquido LB/ampicilina 100 µg/ml à 37 °C sob agitação. Após 16 horas, cada cultura foi diluída 1:100 em 1 litro de LB/ampicilina 100 µg/ml sob agitação de 150 rpm a 37°C. Ao atingir a D.O.600 de 0,5, 1 ml de IPTG 1 M foi adicionado para induzir a expressão das proteínas recombinantes.

Após 4 horas, o meio foi centrifugado durante 10 minutos a 5.000 rpm e o precipitado de bactérias foi lisado com tampão de lise (1% sacarose, 1% Tween 20 e 1% glicerol em 50 mM Tris-HCl pH 7,4). As células induzidas com IPTG foram sonicadas por 3 ciclos de 30 segundos intercalados por repouso de 30 segundos e o lisado celular foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos em centrífuga Sorvall RC5C rotor GSA. O sobrenadante obtido foi estocado para ser utilizado nas etapas posteriores de purificação.

4.8 - Purificação das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis em coluna His Trap HP

Para a purificação das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis por cromatografia de afinidade, cada sobrenadante obtido no item 4.7 adicionado de imidazol, para uma concentração final de 30 mM, foi aplicado em uma coluna de níquel de 5 mL His Trap HP (GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

Cada coluna foi previamente equilibrada com 25 mL de tampão de ligação contendo 0,5 M NaCl e 30 mM imidazol em 20 mM Na₂HPO₄ pH 7,4. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com o mesmo tampão de ligação até que nenhuma leitura fosse observada a 280 nm. Após esse

período, a proteína foi eluída com tampão de ligação contendo, além de 20 mM de Na₂HPO₄ pH 7,4 e 0,5 M de NaCl, imidazol na concentração de 500 mM.

As amostras recolhidas destas passagens foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 10 % para a confirmação da presença da Pb27r-CHis ou Pb27r-NHis no material obtido durante as lavagens e durante as eluições.

4.9 - Determinação da concentração de proteínas

A concentração das proteínas em solução foi determinada pelo método de Bradford [47]. As amostras de 20 µl em diferentes diluições foram distribuídas em duplicata em placas de 96 poços com adição de 180 µL de reagente de Bradford (0,1% Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução aquosa contendo 5% etanol e 10% ácido fosfórico, filtrado em papel de filtro número 1). Uma curva padrão também foi realizada para cada placa utilizando solução de BSA 0,1% em diferentes diluições como proteína padrão. A leitura das absorvâncias a 595 nm foi realizada em espectrofotômetro (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) e os valores obtidos comparados com a curva padrão como objetivo de expressar a concentração de proteínas na amostra em mg/mL.

Outro método utilizado para dosagem das proteínas foi através da medida da absorvância a 280 nm. Como as proteínas já tiveram suas sequências determinadas, fica fácil obter o coeficiente de extinção molar de cada uma e aplicar a seguinte fórmula: $A = \epsilon * l * C$, onde A, é a absorvância a 280 nm; ϵ , o coeficiente de extinção molar; l , o caminho ótico da cubeta em

cm, e C, a concentração molar da proteína. Para a Pb27r-CHis, $\epsilon = 20065 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e para a Pb27r-NHis, $24535 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Esses dados foram obtidos pelo servidor ExPASy – ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>).

4.10 - Testes de cristalização

Os ensaios iniciais de cristalização da Pb27r-CHis e Pb27r-NHis foram realizados por meio da técnica da gota suspensa na qual a solução de proteína, juntamente com uma solução precipitante adequada, são adicionadas a uma lamínula na forma de uma gota invertida sobre um recipiente contendo a mesma solução precipitante, vedando-o. Com a difusão do vapor do solvente, a gota se torna supersaturada possibilitando a formação de cristais.

A proteína Pb27r-CHis foi concentrada em Centricon YM-30 (Amicon – Millipore, Billerica, USA) com membrana de 30 kDa.

A proteína Pb27r-NHis foi concentrada por diálise contra PEG composto (PM 6.000 – 8.000). Nessa técnica, o PEG é colocado sobre a membrana de diálise contendo a proteína até cobri-la e coloca-se dentro de uma placa de Petri à 4 °C até que o volume atinja o desejado. Como o polímero é bastante higroscópico, ele absorve água e outras substâncias de peso molecular menor que o diâmetro da membrana de diálise, concentrando a proteína.

Foram utilizados nos ensaios iniciais, os kits Crystal Screen HR2-110 e HR2 -112 (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) com gotas contendo 2 μL da solução protéica e 2 μL da solução precipitante. Um total de quatro placas de

48 poços foram feitas e mantidas a 18 °C na sala de cristalização de proteínas do grupo de Cristalografia de Proteínas do ICB.

Os cristais formados foram submetidos à difração de raios-X nas facilidades do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

A Pb27r-CHis purificada em uma concentração de 7,5 mg/mL e dialisada em 20 mM Tris-HCl pH 7,4 foi submetida a testes automatizados de cristalização pelo uso do robô Honeybee do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Nestes ensaios, as gotas de cristalização foram preparadas a partir de 0,3 µL da solução da proteína e 0,3 µL da solução precipitante. A realização dessa etapa teve a colaboração de Andreia Navarro Meza.

As condições testadas foram as presentes nos seguintes kits:

- i - Crystal Screen e Crystal Screen 2 reestruturado (96 condições) – Hampton Research;
- ii - Wizard I e II reestruturado (96 condições) – Emerald BioSystems;
- iii - PACT reestruturado (96 condições) – Nextal/Qiagen
- iv - ICSG reestruturado (96 condições) – Nextal/Qiagen
- v - SaltRx (96 condições) – Hampton Research;
- vi - Precipitant Synergy (64 condições) – Emerald BioSystems;

4.11 - Espalhamento dinâmico da luz (DLS – *dynamic light scattering*)

Para as análises estruturais por espalhamento dinâmico da luz (DLS) e dicroísmo circular (CD), as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis, após serem

purificadas, foram dialisadas contra tampão fosfato 20 mM pH 7,4 com NaCl 50 mM utilizando membrana Spectra/Por 6 (Spectrum Labb, Greensboro, USA) de 1000 Da de diâmetro de poros e concentradas por diálise contra PEG composto (PM 6.000 – 8.000). Essas amostras foram liofilizadas e levadas para análises de DLS e dicroísmo circular ao Laboratório Nacional de Luz Síncronon sob orientação da técnica Renata Rocha.

Uma quantidade de cada proteína foi ressuspensa em 1 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 e as concentrações obtidas foram de 9,8 μ M para a Pb27r-CHis e 2,3 μ M para a Pb27r-NHis.

Para as análises de DLS, a proteína Pb27r-CHis foi diluída duas vezes no mesmo tampão e a Pb27r-NHis não foi diluída. Cada amostra protéica foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente para retirar qualquer material suspenso. Um volume de 80 μ L do sobrenadante de cada proteína foi colocado em uma cubeta de quartzo de 3 mm de caminho ótico. A cubeta foi acoplada no aparelho DynaPro (DynaPro, Hampshire, Inglaterra) com temperatura controlada em 18 °C e também foram realizadas medidas a 40 °C. Os dados coletados após 300 medidas foram analisados no programa Dynamics V6. O valor médio do raio da molécula foi expresso em nanômetros e seu peso molecular em kDa.

4.12 - Dicroísmo circular (CD – *circular dichroism*)

Para estudos de estrutura secundária, as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis obtidas após ressuspensão do material liofilizado (item 4.12) foram

diluídas três vezes em tampão fosfato 20 mM pH 7,4 com 50 mM NaCl e centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente para retirar qualquer material suspenso. Um volume de 250 μ L foi submetido ao dicroísmo circular. Os espectros de dicroísmo circular foram medidos com o espectropolarímetro Jasco 810 (Jasco corporation, Tóquio, Japão) com a temperatura variando de 20 a 70 °C em uma cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho ótico, entre 190 a 260 nm de comprimento de onda. Cada espectro foi corresponde à diferença entre a média das 10 varreduras realizadas para cada proteína e as 10 varreduras realizadas para o tampão em que elas estavam diluídas.

Os parâmetros utilizados foram os seguintes: sensibilidade: standard (100 mdeg); início: 260 nm; fim: 190 nm; *data pitch*: 0,2 nm; modo de varredura: contínuo; velocidade de varredura: 50 nm/min; resposta: 4 s; raio: 1 nm e acumulação: 10.

4.13 – Mutação sítio dirigida

Segundo Derewenda, 2004 [50], a formação de cristais de proteínas envolve o ordenamento das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de superfície gerando perda de entropia conformacional, que é, sob o ponto de vista termodinâmico, um processo desfavorável. A modificação da superfície das proteínas pela troca local e limitada de resíduos hidrofílicos grandes, desfavoráveis ao contato proteína-proteína, por resíduos menores de baixa entropia conformacional pode permitir a obtenção de cristais de qualidade pela

facilitação da formação de superfícies de contato, passo inicial na formação do cristal.

Sendo a mutação sítio dirigida cuidadosamente desenhada, evitando-se alterações em resíduos funcionalmente importantes, a função da proteína não é alterada e nem ocorrem alterações estruturais significantes.

Como a estrutura da Pb27 ainda é desconhecida, utilizou-se o servidor SER-Server (<http://nihserver.mbi.ucla.edu>) para predição dos possíveis resíduos de superfície susceptíveis à mutação.

Com base nos resultados obtidos, ensaios de mutação sítio dirigida foram realizados utilizando a técnica do *megaprimer* [51].

Nessa técnica são utilizados um iniciador direto com a mutação e um reverso que alinhe no final da sequência em uma reação de PCR inicial. Essa reação gera um fragmento nucleotídico (*megaprimer*) que contém a mutação. Esse *megaprimer* é utilizado como o iniciador reverso em uma segunda reação de PCR, que utiliza um iniciador direto que alinhe no começo da sequência. Essa nova PCR irá gerar a sequência completa do gene codificador da proteína com a devida mutação (Fig. 8).

A reação de PCR inicial constituiu de 50 µL de volume total contendo 170 ng do plasmídeo pDONR-Pb27 obtido no item 4.2 como DNA molde, 1pmol/µl de cada iniciador, 0,5 U de Platinum Pfx DNA polimerase, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mmol/µl da mistura dos 4 desoxinucleotídeos e 50 mM KCl, 1 mM DTT e 0,1 mM EDTA em 50 mM Tris-HCl pH 8,0 como tampão da enzima.

O iniciador utilizado para a troca dos aminoácidos Lys (160) e Glu (161) por duas Ala foi:

Direto:

5' T AGT CGC **GCA GCA** GGA ACC GAT A 3'

T_{anelamento}: 59 °C

Reverso:

5' GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GTT GTG GAA GAC AGC
GCT GCA 3'

T_{anelamento}: 56 °C

O iniciador reverso foi o mesmo utilizado nas subclonagens anteriores.

O programa utilizado na primeira PCR foi o mesmo do item 4.2 para subclonagem no pDEST 17.

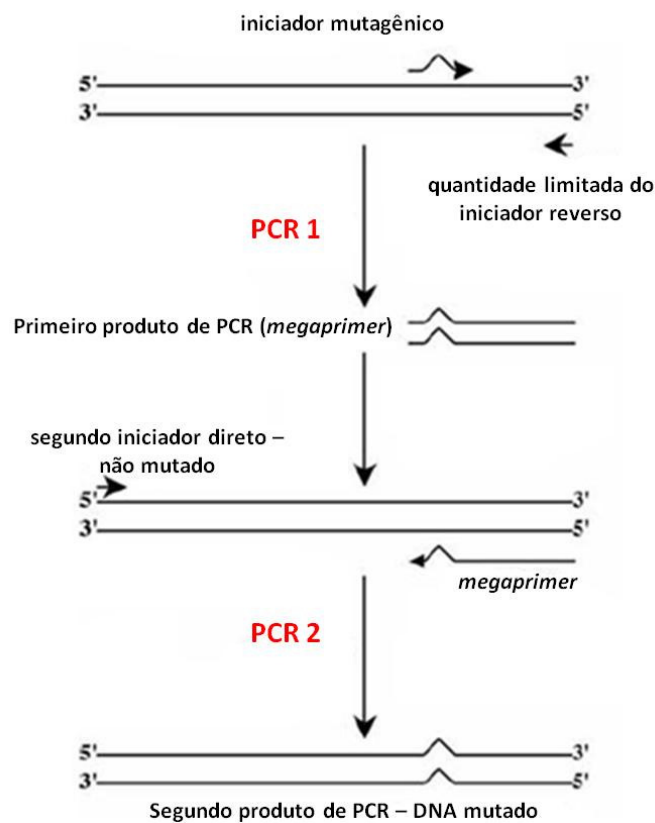


Figura 8 - Esquema do protocolo de mutação sítio dirigida. Uma primeira PCR é utilizada para gerar o *megaprimer* que contém a mutação desejada. Na segunda PCR, o *megaprimer* é utilizado para se conseguir toda a seqüência de interesse modificada com a mutação. Adaptado de Ke & Madison, 1997 [52].

O *megaprimer* obtido conforme descrito nas etapas anteriores foi purificado a partir de um gel de agarose 1% utilizando o Gel Purification Kit (Quiagen, Hilden, Alemanha).

A segunda PCR foi realizada utilizando o *megaprimer* purificado e o iniciador desenhado para subclonagem no pDEST 17 que insere cauda de histidinas N-terminal. A reação de 50 μ L continha 170 ng/ μ L do plasmídeo pDONR-Pb27 obtido no item 4.2 como DNA molde, 10 μ L de cada iniciador na concentração 10 pmol/ μ L, 0,5 U de Platinum Pfx DNA polimerase, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mmol/ μ l da mistura dos 4 desoxinucleotídeos e 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA em 50 mM Tris-HCl pH 8,0 como tampão da enzima. O programa utilizado nessa segunda PCR foi quase o mesmo da primeira, com mudança na temperatura de anelamento para 50 °C e no número de ciclos para 30.

O produto gerado nessa segunda PCR foi utilizado em uma nova reação de ligação no pDONR, como relatado no item 4.1.1. Bactérias *E. coli* TOP 10 foram transformadas com essa ligação e os clones positivos foram selecionados através de PCR de colônias utilizando os iniciadores utilizados na subclonagem no pDEST 17.

Após confirmação da clonagem no vetor pDONR, a seqüência mutada foi clonada no vetor de expressão pDEST17 para expressão da proteína mutada com cauda de histidinas N-terminal. Todos os procedimentos adotados em seguida foram idênticos aos já descritos. Os clones positivos tiveram seus plasmídeos extraídos e estão sendo submetidos ao seqüenciamento.

Assim, a proteína mutada foi expressa pela indução com IPTG de um clone contendo o plasmídeo pDEST17-Pb27mut. A expressão foi observada

por SDS-PAGE 10% e por *Western blot* utilizando anticorpo anti-histidina como apresentado nos itens 4.4 e 4.5.

4.14 - Proteólise limitada

A presença de regiões flexíveis na estrutura de uma proteína pode interferir no empacotamento ordenado que ocorre durante a cristalização.

A clivagem proteolítica limitada e específica ocorre normalmente em regiões flexíveis e acessíveis ao solvente, como C- e N- terminais desordenados, *loops* expostos ou regiões de ligação entre domínios globulares. Intermediários estáveis gerados por proteólise podem ser analisados por espectrometria de massas através das técnicas de MALDI (*matrix-assisted laser desorption ionization*) ou ESI (*electrospray ionization*) e podem ser mais fáceis de serem cristalizados [53].

Inicialmente, um volume de 10 mL de cada uma das soluções das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis foram dialisadas *overnight* em 2 litros de tampão formiato de amônio 50 mM, seguida de mais duas trocas de tampão com intervalos de 3 h. As soluções das proteínas foram concentradas por PEG composto (item 4.10) até uma concentração de 3,10 µg/µL (Pb27r-CHis) e 2,95 µg/µL (Pb27r-NHis).

Essas soluções foram submetidas à dessalinização por Zip-Tip (Millipore, Billerica, USA) conforme manual do fabricante. Assim, 1 µL de cada amostra contendo mais 1 µL da matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico - HCCA (em solução de 50% ACN e 0,3% TFA) em duplicata foram submetidos ao

MALDI-MS. Como branco, utilizamos somente a matriz e como padrões, proteínas de peso molecular conhecido.

Após essa análise inicial, as proteínas foram submetidas à proteólise limitada utilizando a enzima tripsina na diluição 1(tripsina):100 (Pb27) (p/p). A reação constituiu-se de um volume de solução protéica correspondente a 200 µg e 1 µL da tripsina 0,2 µg/µL para que a proporção 1:100 fosse respeitada. Os tubos contendo as reações foram incubados à temperatura ambiente e agitação constante de 300 rpm em termomixer. A cada 5, 10 e 30 minutos e a cada 1, 2, 3, 4 e 24 horas foi retirado um tubo e a reação paralisada pela adição de 1 µL de TFA 3%.

As alíquotas foram mantidas a 4 °C até serem analisadas por MALDI-MS e por SDS-PAGE 15%. Nessa etapa, utilizamos um gel mais concentrado para que fosse possível visualizar bandas menores, resultantes da proteólise limitada.

4.15 - Imunização de coelho com a proteína Pb27r-NHis

Para obtenção de soro anti-Pb27, um coelho macho foi imunizado com a Pb27r-NHis purificada. Foram três imunizações intramusculares com intervalos de 15 dias. Na primeira, foram aplicados 500 µg da proteína diluída em PBS 0,05 M para um volume final de 500 µL e esse volume foi emulsificado com 500 µL de Adjuvante Completo de Freund (Sigma, Saint Louis, USA).

A segunda imunização constituiu-se de 350 µg da proteína, 10 µL de hidróxido de alumínio diluídos com PBS 0,05 M para um volume final de 500

μL . Essa mistura também foi emulsificada com 500 μL de adjuvante Incompleto de Freund (Sigma, Saint Louis, USA). A terceira imunização foi semelhante à segunda com alteração na quantidade de proteína para 250 μg .

Após 15 dias da última imunização coletamos aproximadamente 5 mL de sangue da orelha do coelho e o soro obtido após centrifugação a 3000 rpm por 10 min à temperatura ambiente foi utilizado para testes de ELISA.

Após essa coleta inicial e dosagem de anticorpos, coletas regulares de sangue estão sendo realizadas a cada 15 dias para obtenção de quantidade de soro suficiente para outros testes.

4.15.1 - ELISA para dosagem de anticorpos

Para realizar a quantificação dos anticorpos anti-Pb27 produzidos pelo coelho, foi realizada a técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Conforme a técnica descrita por Lunde et al, 1979 [54], placas de microtitulação PoliSorp™ Surface (NUNC Brand Products, Rochester, NY, USA) contendo 96 poços foram sensibilizadas *overnight* à 4 °C com 1 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ de antígeno (Pb27r-NHis) diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6.

Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com 0,5% Tween em tampão 0,05 M PBS pH 7,4 e bloqueadas através da incubação durante 1 hora com 150 μl de solução de 1,6% caseína em 0,15 M PBS. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas cinco vezes, e posteriormente, foram adicionados em cada poço 100 μl do soro de coelho obtido em diluições seriadas variando de 1/50 até 1/3.200. O período de incubação com os soros

foi de 1 hora e em seguida as placas foram lavadas por 10 vezes com PBS-Tween.

Após essa etapa, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário marcado com a enzima peroxidase na diluição 1: 5.000 em PBS-caseína 0,25% (Anti-coelho IgG – whole molecule – peroxidase conjugate, Sigma, Saint Louis, USA) com tempo de incubação de 1 hora.

Para revelação, 100µl da solução do reagente 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados em cada poço e após 10 minutos, a reação foi paralisada com 20 µl de H₂SO₄ diluído 20 vezes.

Os resultados foram obtidos através da absorvância medida no aparelho leitor de ELISA (Elx800, Bio-Tek Instruments, Inc. Winooski, Vermont, USA) utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Todos os ensaios realizados foram acompanhados de controles sem proteína, sem soro e apenas com o conjugado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Pb27r-CHis

5.1.1 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 no plasmídeo pET-DEST 42 e seqüenciamento

Para garantir que o plasmídeo pGEX 4T-2 utilizado como molde para a subclonagem realmente continha a seqüência codificadora da Pb27, foi realizada uma dupla digestão com as enzimas EcoRI e NotI que liberariam o fragmento correspondente.

Esse fragmento de aproximadamente 700 pb corresponde ao tamanho do fragmento de DNA codificador para a Pb27 depositada no banco de dados sob o código de consulta U41503 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1778407>). O fragmento obtido com o ensaio da dupla digestão pode ser visualizado na figura 9. Logo acima desse fragmento observam-se os plasmídeos não digeridos.

Para subclonar a seqüência codificadora da proteína Pb27 a partir do plasmídeo pGEX 4T-2 foram utilizados os iniciadores apresentados no item 4.1.

Esses iniciadores contêm a seqüência de recombinação *attB* que deve ser inserida na seqüência codificadora da proteína a ser clonada. Além disso, no iniciador direto, foram adicionados a seqüência Shine-Dalgarno, que permite o reconhecimento da origem de tradução pela maquinaria de tradução bacteriana, e o códon de iniciação.

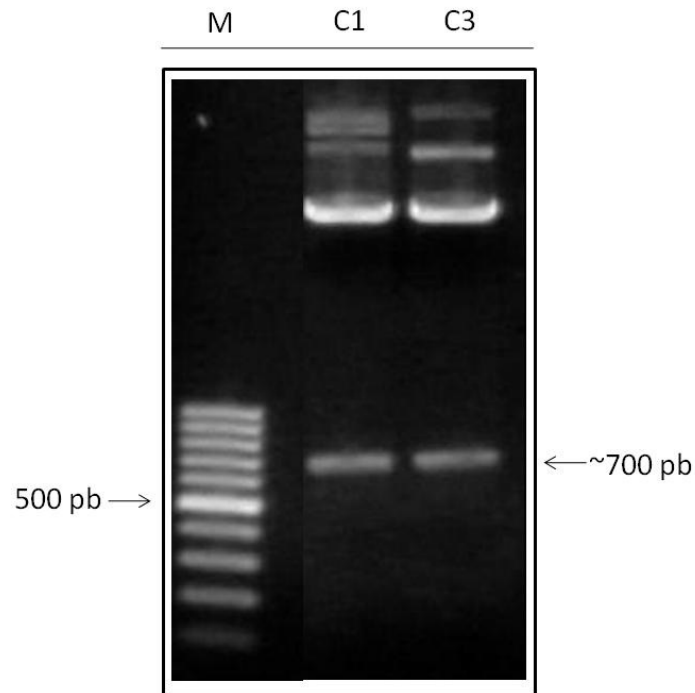


Figura 9 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a digestão do plasmídeo recombinante pGEX-Pb27 com as enzimas *EcoRI* e *NotI*. Foram aplicados 20 μL da reação de digestão dos clones 1 e 3, misturados com 4 μL de tampão de corrida 6X. M - Padrão 100 pb (Promega, Madison, USA); C1 e C3 - plasmídeos purificados dos clones 1 e 3, respectivamente.

A primeira reação de recombinação é a BP, entre sítios *attB* presentes na seqüência a ser clonada, e sítios *attP* presentes no primeiro vetor utilizado, o vetor doador (pDONR). A segunda recombinação, LR, ocorre entre os sítios *attL*, formados anteriormente e sítios *attR* presentes no vetor de destino.

Como já mencionado, a seqüência codificadora da Pb27 já havia sido clonada no plasmídeo pGEX 4T-2 e a proteína recombinante era expressa fusionada à GST. A obtenção da Pb27r pura, a partir da expressão da Pb27 fusionada com GST [36], seguida da clivagem dessa proteína de fusão, é um processo relativamente caro. Além disso, problemas de importação da trombina (enzima que cliva a proteína fusionada liberando GST) têm dificultado a execução desse protocolo. É importante salientar ainda que testes de

cristalização utilizando a Pb27r obtida por este procedimento ainda não resultaram em cristais.

Na figura 10 podemos verificar o produto de PCR gerado durante a amplificação inicial para geração de sítios *attB* na seqüência de interesse.

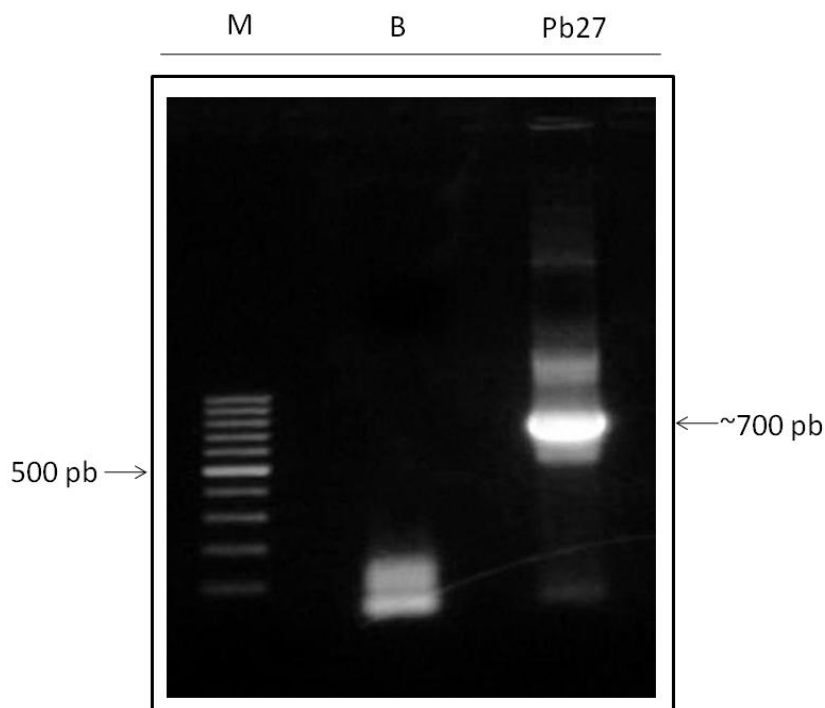


Figura 10 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação da seqüência codificadora para Pb27. A amplificação foi realizada utilizando os iniciadores apresentados no item 4.1. M - padrão 100 pb; B - branco (não continha o molde de DNA); Pb27 - fragmento de aproximadamente 700 pb.

Esse produto de PCR foi purificado por precipitação com PEG e utilizado na reação de ligação ao plasmídeo pDONR que contém regiões de recombinação *attP*. Bactérias *E. coli* TOP 10 foram transformadas com o produto dessa ligação. A reação de recombinação BP (*attB* X *attP*) facilita a transferência do gene de interesse para um vetor doador inicial. Os clones resistentes que cresceram em placa LB-ágar/kanamicina foram submetidos a PCR de colônias para escolha dos clones positivos (Fig. 11).

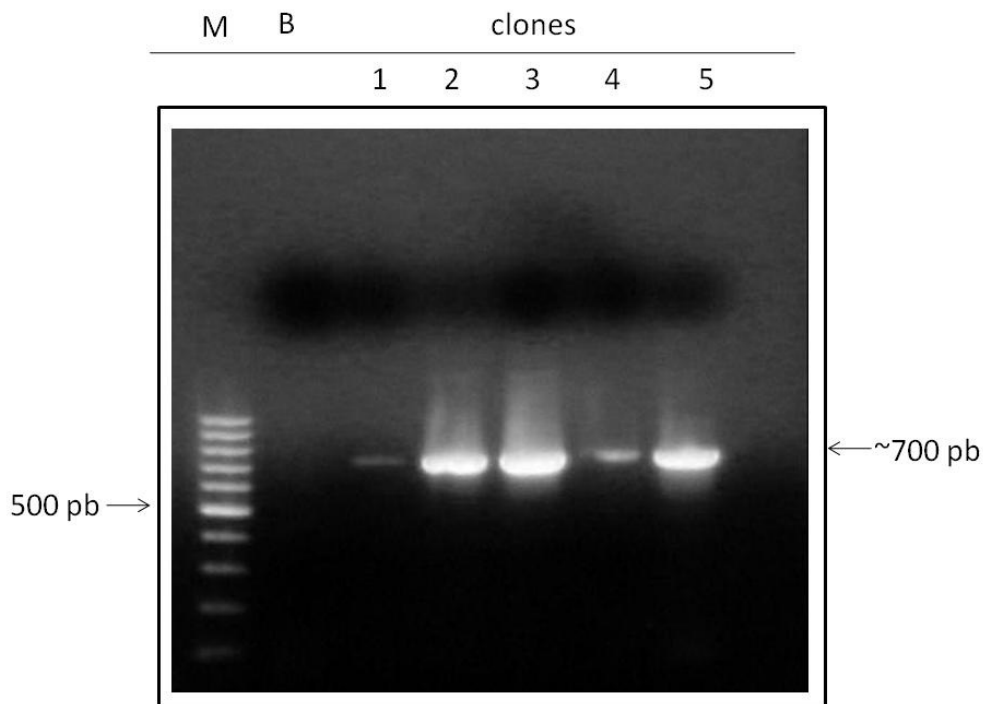


Figura 11 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDONR-Pb27 para clonagem da seqüência da Pb27 com cauda de histidinas C-terminal. Foram aplicados 10 μ L do produto da PCR de colônias dos clones selecionados por kanamicina resultantes da transformação de bactérias TOP10 com o plasmídeo pDONR-Pb27. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); 1 a 5 - clones testados.

Pode-se observar na figura 11 que todos os clones testados foram positivos; ou seja, continham uma seqüência nucleotídica amplificada com o uso de iniciadores específicos para a seqüência codificadora da Pb27. O clone 3 foi escolhido para extração plasmidial e subsequente ligação no vetor de destino.

Após obter o clone de entrada pDONR-Pb27, a reação de recombinação LR (*attL* X *attR*) foi realizada para gerar o clone de expressão. O vetor escolhido foi o pET-DEST42 que permite a expressão da proteína com uma cauda de histidinas fusionada ao C-terminal.

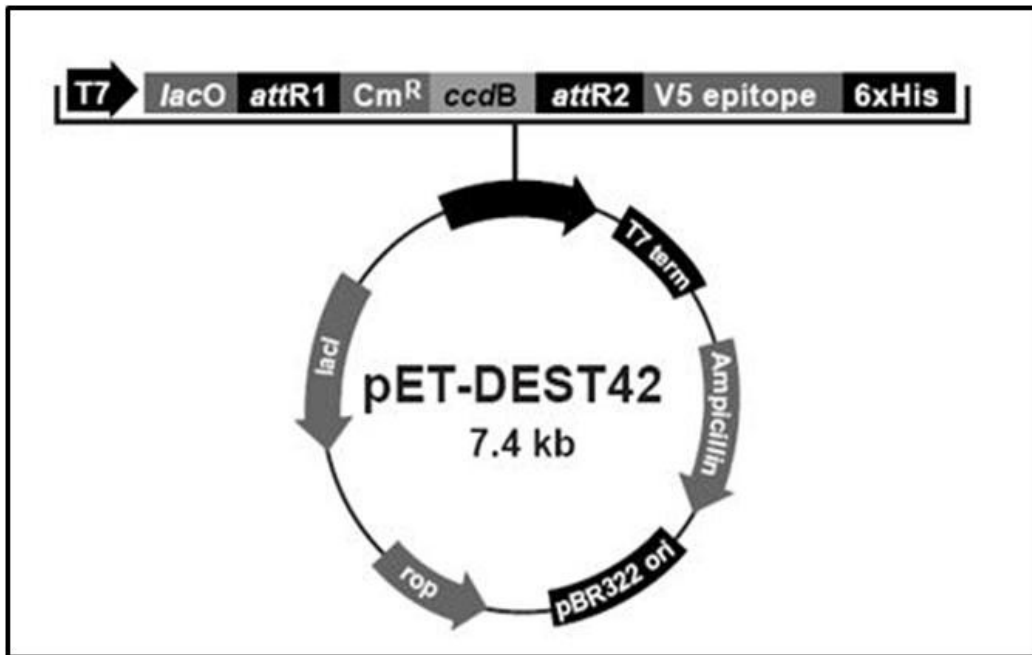


Figura 12 – Desenho esquemático do plasmídeo pET-DEST42. Neste plasmídeo, observam-se os sítios de recombinação *attR1* e *attR2*, o gene letal *ccdB*, o V5 epitopo e a cauda de histidinas C- terminal.

Esse vetor contém um gene de resistência à ampicilina, o promotor T7, que permite a expressão induzível por IPTG em altos níveis da proteína recombinante e a cauda de histidinas C-terminal.

Novamente, os clones resistentes à ampicilina foram submetidos a PCR de colônias para escolha daqueles positivos (Fig 13).

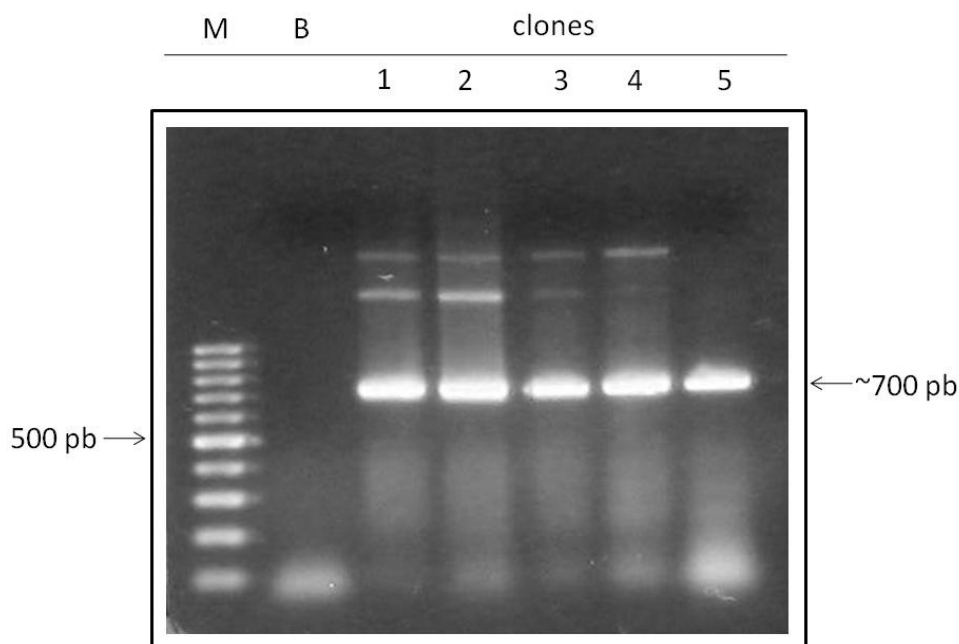


Figura 13 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio do PCR de colônias contendo o plasmídeo pET-DEST42-Pb27 para clonagem da seqüência da Pb27 com cauda de histidinas C-terminal. Foram aplicados 10 μ L do produto da PCR de colônias dos clones selecionados por ampicilina resultantes da transformação de bactérias BL21 com o plasmídeo pET-DEST42-Pb27. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); 1 a 5 - clones testados.

Aqui também, todos os clones testados foram positivos. O clone 5 foi escolhido para ser seqüenciado e utilizado para expressão da Pb27 recombinante com cauda de histidinas C-terminal.

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático Mega BACE 1000 (NAGE-ICB-UFMG) utilizando iniciadores T7 direto e T7 reverso. Estes iniciadores alinham no plasmídeo (na região do promotor T7) permitindo a análise da entrada da seqüência no plasmídeo (em fase ou não). O resultado do seqüenciamento está apresentado na figura 14.

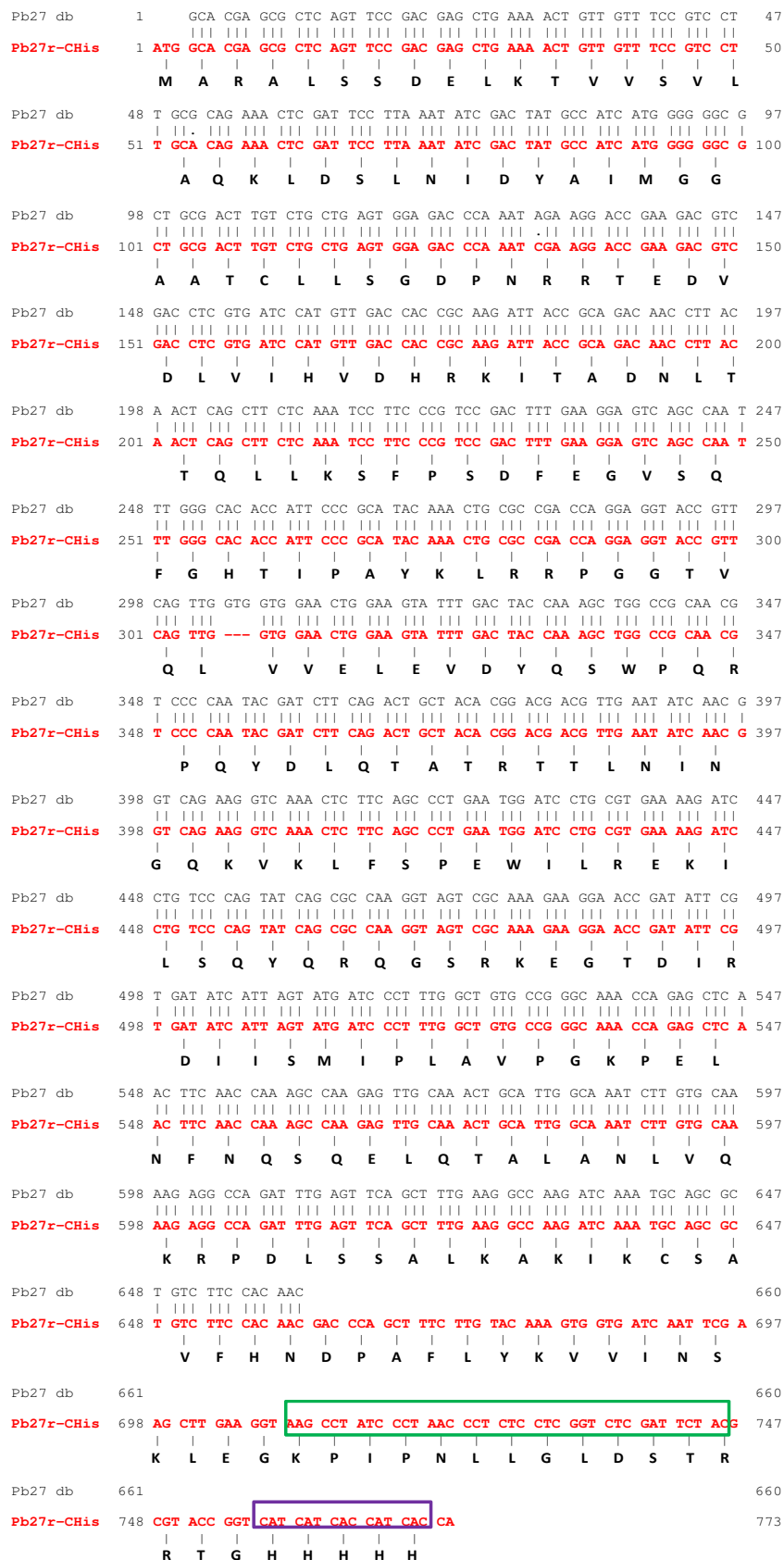


Figura 14 - Alinhamento da seqüência depositada para a Pb27 e do clone 5 contendo o plasmídeo pET-DEST42-Pb27 e a tradução dos códons correspondentes. Bases idênticas são unidas por traços e os *gaps*, por ponto. Em verde está destacado o V5 epitopo e em roxo, a cauda de histidinas.

A comparação da seqüência obtida com a seqüência da Pb27 depositada no banco de dados com o código U41503 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1778407>) foi realizada através do programa EMBOSS *Pairwise Alignment Algorithms* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>). Observa-se um alinhamento quase perfeito entre as duas seqüências, com uma deleção de um códon GTG na posição 306-308 da seqüência obtida. Esse códon já não existia na seqüência utilizada como molde na primeira reação de recombinação (BP). No final da seqüência, observa-se o V5 epitopo e a cauda de histidinas inseridos pelo plasmídeo.

5.1.2 - Expressão da proteína Pb27r-CHis e purificação por cromatografia de afinidade

O clone 5 pET-DEST42-Pb27 foi induzido com IPTG para expressar a proteína Pb27 recombinante contendo a cauda de histidinas no C-terminal (Pb27r-CHis). O IPTG é um indutor do promotor T7 que comanda a expressão da proteína clonada no vetor pET-DEST42 em bactérias que expressam a T7 RNA-polimerase. Na figura 15 pode-se observar um gel SDS-PAGE dessa expressão corado com Coomassie blue. Observa-se nessa figura o aparecimento, após a indução (tempos 1, 2, 3 e 4h), de uma banda de aproximadamente 27 kDa, ausente no controle negativo (bactérias BL21 não transformadas). No tempo zero, observamos uma expressão basal da proteína recombinante.

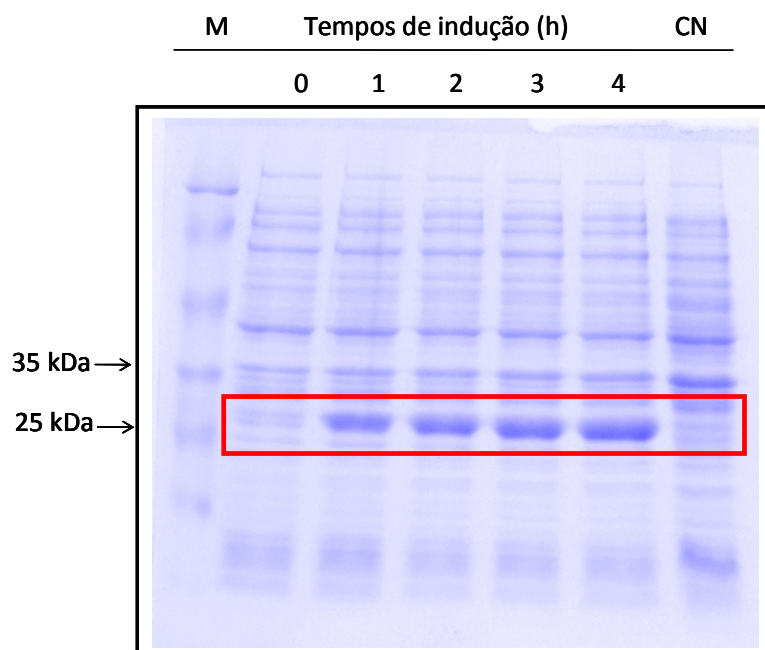


Figura 15 - SDS-PAGE 10% contendo o extrato bacteriano do clone 5 pET-DEST42-Pb27 antes da indução (0h) e após 1, 2, 3 e 4h de indução com IPTG (destacados pelo quadrado vermelho). M - marcador de peso molecular; CN - Controle negativo (bactérias não transformadas).

Para confirmar essa expressão, foi realizado um *Western blot* utilizando soro de camundongos anti-Pb27 já existente em nosso laboratório (Reis et al, 2008 [36]). Foram reconhecidas as bandas de expressão já identificadas no SDS-PAGE (Fig. 16). O controle negativo, bactérias não transformadas, não foi reconhecido, demonstrando que a proteína expressa é realmente a Pb27r-CHis.

Após confirmação da expressão da proteína, foi realizada uma maxi-expressão em 1L de meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL. Após 4h de indução com IPTG (concentração final 1 mM), as células foram recuperadas por centrifugação e lisadas. O sobrenadante obtido após a lise foi utilizado na cromatografia de afinidade.

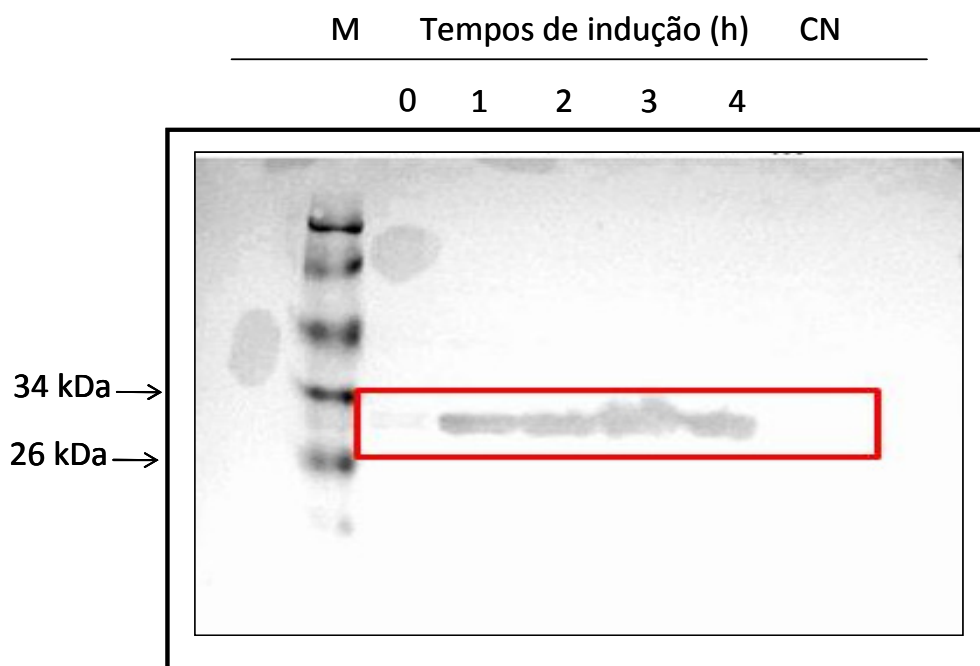


Figura 16 - Western blot da expressão da Pb27r-CHis utilizando soro de camundongos imunizados com Pb27. O soro anti-Pb27 foi diluído 1:5.000 em PBS-caseína. M - marcador de peso molecular; CN - controle negativo.

A coluna His Trap HP contém níquel ligado à Sepharose o que permite a ligação da resina às histidinas da proteína de interesse. À solução contendo a Pb27r-CHis foi adicionado imidazol na concentração final de 30 mM. A coluna foi pré-equilibrada com tampão de ligação contendo também 30 mM de imidazol. Após aplicação da amostra, a proteína que fica ligada na resina é eluída pelo aumento da quantidade de imidazol do tampão (500 mM). Essa maior quantidade de imidazol (composto que contém radical semelhante ao da histidina) permite, por competição, a liberação da proteína ligada à coluna.

A amostra recolhida foi submetida ao SDS-PAGE confirmando a presença de uma forte banda de aproximadamente 27 kDa no material obtido após a eluição (Fig. 17).

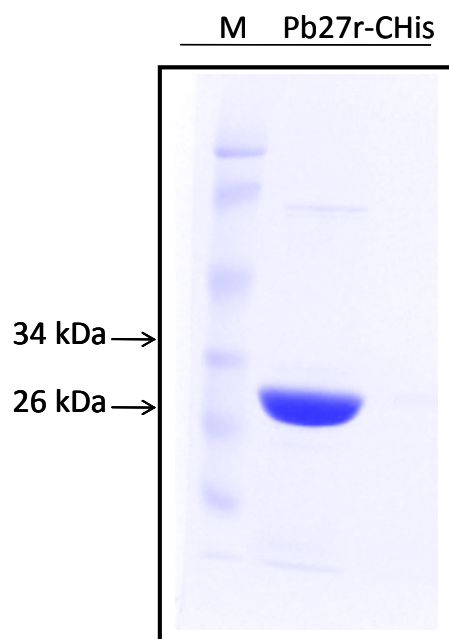


Figura 17 - SDS-PAGE 10% contendo a Pb27r-CHis após purificação em coluna de afinidade HisTrap HP. M - marcador de peso molecular; Pb27r-CHis - proteína purificada.

A amostra protéica foi concentrada a 10 mg/mL em Centricon YM-30 com membrana de 30 kDa e então, submetida aos primeiros testes de cristalização.

5.1.3 - Testes de cristalização da Pb27r-CHis

Os ensaios iniciais de cristalização da Pb27r-CHis foram realizados por meio da técnica da gota suspensa utilizando os kits Crystal Screen HR2-110 e HR2 -112 com aproximadamente 200 condições. As gotas continham 2 μ L da solução de proteína 10 mg/mL e 2 μ L da solução precipitante correspondente.

Cristais foram formados nas seguintes condições:

- 1,5 M LiSO_4 monohidratado em 0,1 M HEPES sódio pH 7,5;

- metil-pentanediol 30 %, 0,2 M acetato de magnésio tetrahidratado em 0,1 M cacodilato de sódio trihidratado pH 6,5;

- PEG 4000 30 %, 2 M cloreto de magnésio hexahidratado em 0,1 M HEPES sódio pH 7,5.

Essas condições foram amplificadas, ou seja, explorou-se variações nas concentrações e/ou valores de pH das soluções e os cristais obtidos foram submetidos à difração de raios-X nas facilidades do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). Porém, nenhum dos cristais testados eram cristais de proteína.

A proteína Pb27r-CHis, na concentração de 7,5 mg/mL em Tris-HCl 20 mM pH 7,4 também foi testada em 544 condições diferentes. Para isso foi utilizado um robô que realiza todo o processo de preparação das caixinhas de cristalização de forma automatizada. Esse robô prepara nanogotas de cristalização e testa as quase 600 condições seguindo o método da difusão de vapor com a gota 'depositada' (*sitting drop*). Esse método é uma variação do método da gota invertida utilizado nos testes de cristalização iniciais. Esse equipamento proporciona o aumento da eficiência dos ensaios de cristalização, reduzindo a quantidade de amostra necessária e o tempo para a preparação dos ensaios, além de aumentar a reprodutibilidade dos experimentos.

Mesmo com tantas condições testadas, ainda não foi possível o aparecimento de cristais de proteína. Isso pode ser devido à agregação da proteína em solução ou ao fato de que a verdadeira condição de cristalização ainda não foi testada, já que as possibilidades de combinação de diferentes soluções, em várias concentrações e pH são muitas.

5.2 - Pb27r-NHis

5.2.1 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 no plasmídeo pDEST 17 e seqüenciamento

Para verificar uma possível influência da posição da cauda de histidinas na flexibilidade e capacidade de cristalização da proteína, a seqüência codificadora da Pb27 também foi clonada no vetor pDEST 17 que permite a expressão da proteína fusionada à histidinas no N-terminal.

Para isso, como procedimento do sistema Gateway utilizado, a seqüência foi amplificada (Fig. 18) com iniciadores contendo sítios de recombinação *attB* para que estes sejam inseridos na seqüência codificadora. Para este procedimento, foi necessário um novo iniciador direto, pois o códon de iniciação presente no plasmídeo pDEST 17 deve estar antes da cauda de histidinas N-terminal. O iniciador reverso foi o mesmo do item 4.1.

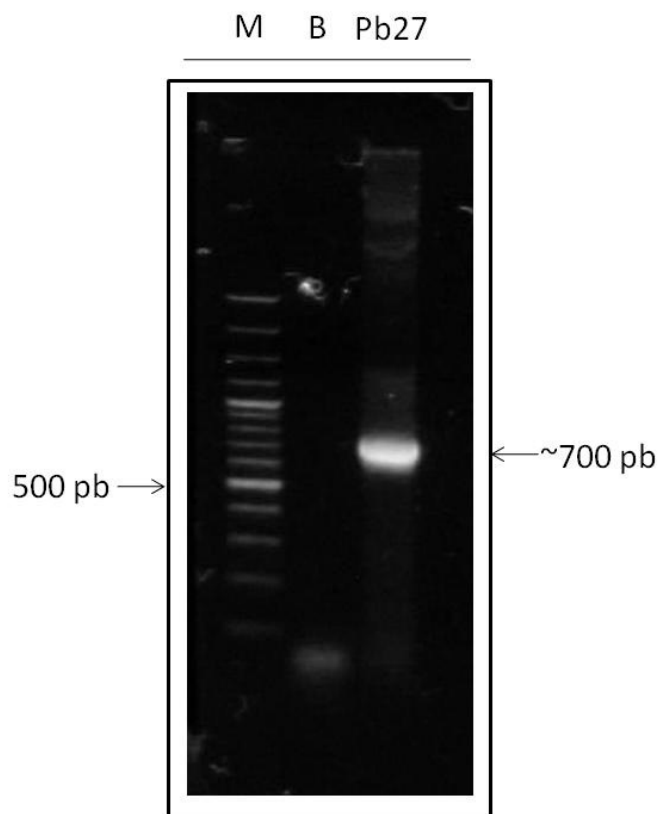


Figura 18 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® mostrando a amplificação da seqüência codificadora para Pb27. A amplificação foi realizada utilizando os iniciadores apresentados no item 4.2. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); Pb27 - produto da amplificação da seqüência codificadora da Pb27.

Após essa amplificação, o produto de PCR gerado foi ligado no plasmídeo pDONR 221, na reação de recombinação BP, como apresentado no item 4.1.2, e os clones obtidos após transformação de bactérias TOP10 com o pDONR-Pb27 e seleção em placa LB-ágar/kanamicina foram testados por PCR de colônias (Fig. 19).

O clone 2 foi escolhido para extração plasmidial e os plasmídeos pDONR-Pb27 foram utilizados na ligação ao pDEST 17, conforme descrito anteriormente.

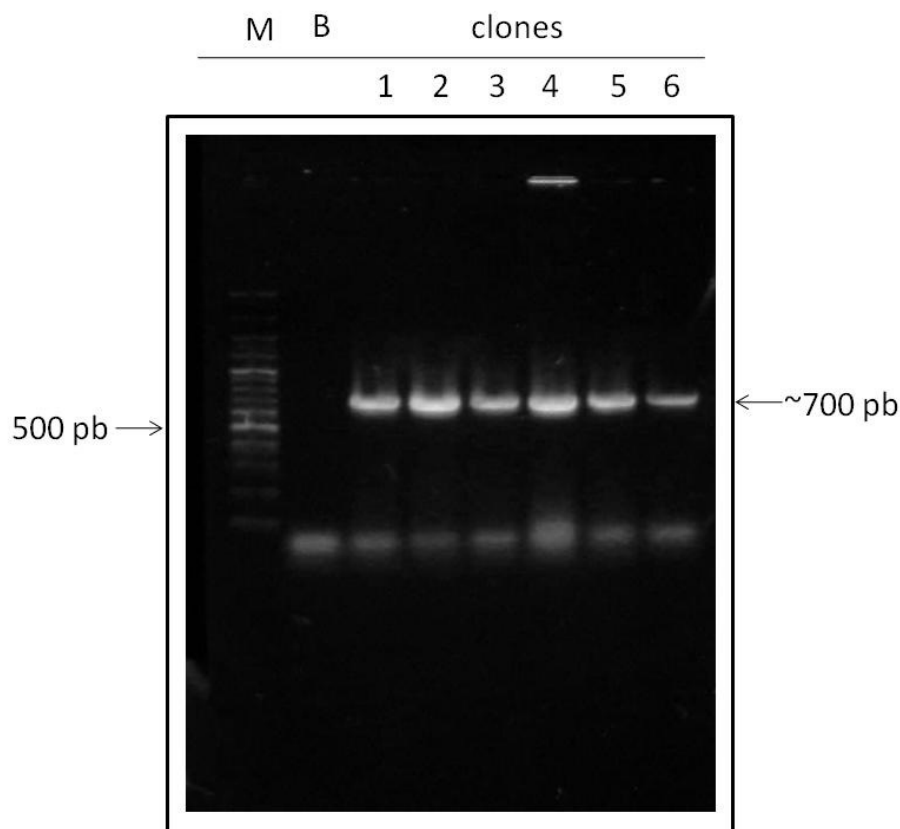


Figura 19 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDONR-Pb27 para clonagem da seqüência da Pb27 com cauda de histidinas N-terminal. Foram aplicados 10 μ L do produto da PCR de colônias dos clones selecionados por kanamicina resultantes da transformação de bactérias TOP10 com o plasmídeo pDONR-Pb27. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); 1 a 6 - clones testados.

O plasmídeo pDEST 17, assim como o pET-DEST42, contém um gene de resistência à ampicilina e o promotor T7 induzível por IPTG. Além disso, ele já possui a seqüência Shine-Dalgarno ou RBS (*ribosome binding sequence*) e a cauda de histidinas é inserida no N-terminal da proteína (Fig. 20).

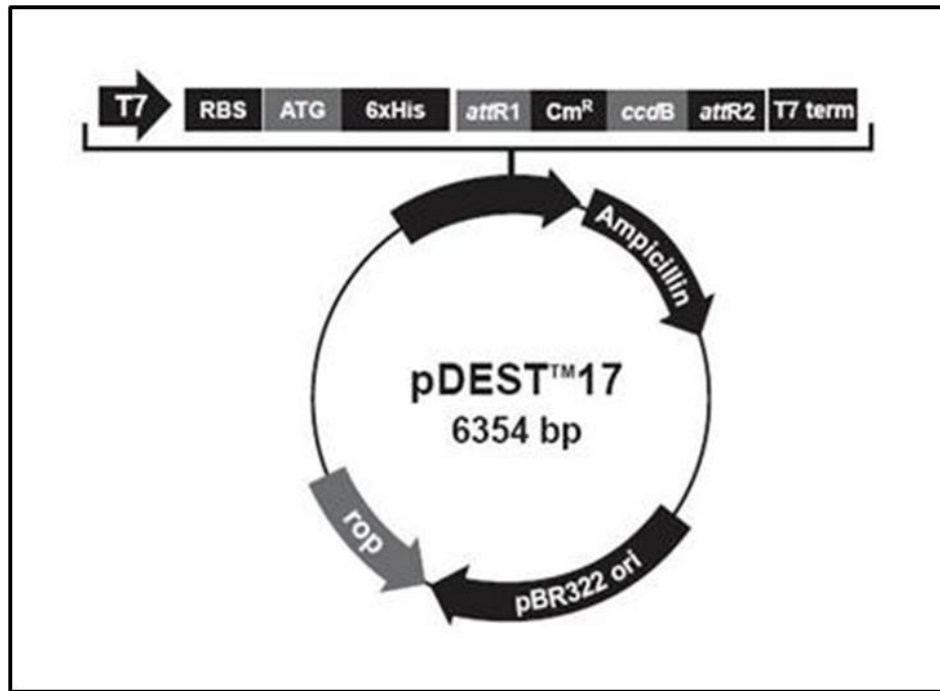


Figura 20 - Mapa molecular do plasmídeo pDEST 17. Neste plasmídeo observam-se o códon de iniciação para a cauda de histidinas N-terminal, os sítios de recombinação *attR1* e o gene letal *ccdB*.

Os clones resistentes à ampicilina foram submetidos a PCR de colônias para escolha daqueles que contêm o plasmídeo com a seqüência de interesse. Como todos os clones testados foram positivos (Fig. 21), os clones 2, 4 e 5 foram testados para expressão da Pb7r-NHis. Somente o clone 2 teve a expressão de uma banda do tamanho aproximado de 27 kDa visível em SDS-PAGE. O clone 2 foi então seqüenciado utilizando iniciadores T7 direto e T7 reverso que alinham no plasmídeo permitindo análise da janela de leitura em que a seqüência foi inserida.

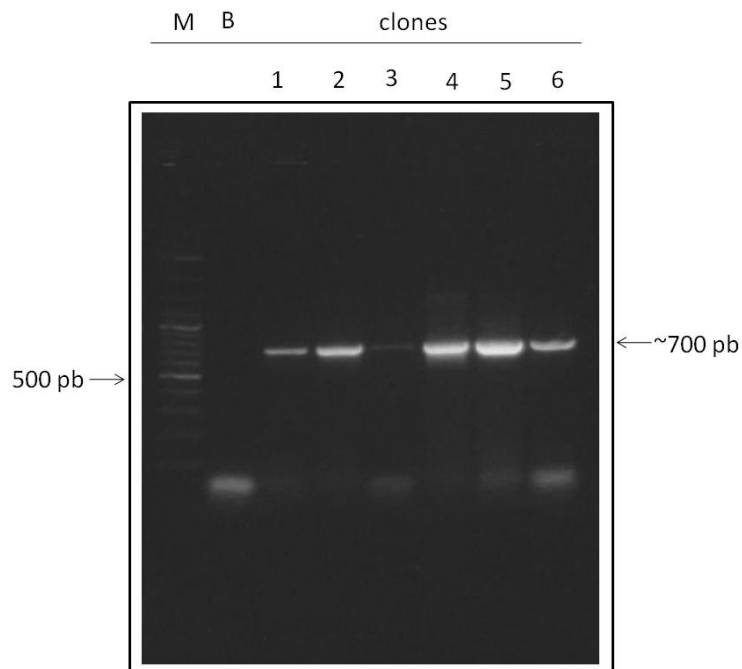


Figura 21 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDEST 17-Pb27 para clonagem da seqüência da Pb27 com cauda de histidinas N-terminal. Foram aplicados 10 µL do produto da PCR de colônias dos clones selecionados por ampicilina resultantes da transformação de bactérias BL21 com o plasmídeo pDEST 17-Pb27. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); 1 a 6 - clones testados.

Na figura 22, observa-se o alinhamento da seqüência obtida do clone 2 pDEST 17-Pb27 com a seqüência da Pb27 depositada no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&id=1778407>) utilizando novamente o programa EMBOSS Align. Observa-se, novamente, a ausência de um códon de valina na posição 306-308 da seqüência depositada já existente na seqüência-molde (pGEX-Pb27). É possível verificar também uma substituição do códon para valina por um alanina (106-108) e outra de uma asparagina por um aspártico (460-462) na seqüência obtida nesse trabalho. Um possível causa para essas mudanças pode ser a utilização de uma polimerase (GoTaq, Promega, Madison, USA) sem revisão de erros para a clonagem, de forma diferente da clonagem da Pb27r-CHis, onde foi utilizada a

polimerase *Platinum Pfx* (Invitrogen, Carlsbad, USA). No entanto, apesar dessas duas mudanças, a proteína continuou solúvel e expressando em altos níveis.



Figura 22 - Alinhamento das seqüências depositada para a Pb27 e do clone 2 contendo o plasmídeo pDEST 17-Pb27 e a tradução dos códons correspondentes. Bases idênticas são unidas por traços e os *gaps*, por ponto. Em verde está destacada a cauda de histidinas.

5.2.2 - Expressão e purificação da proteína Pb27r-NHis

Após seqüenciamento, iniciou-se a expressão da Pb27r-NHis, seguindo os mesmos procedimentos adotados para a outra construção, Pb27r-CHis.

Na figura 23, observa-se o SDS-PAGE da expressão do clone 2 contendo o plasmídeo pDEST 17-Pb27. Após indução com IPTG, verifica-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 27 kDa correspondente à Pb27r-NHis que está ausente no controle negativo (bactérias *E. coli* BL21 não transformadas).

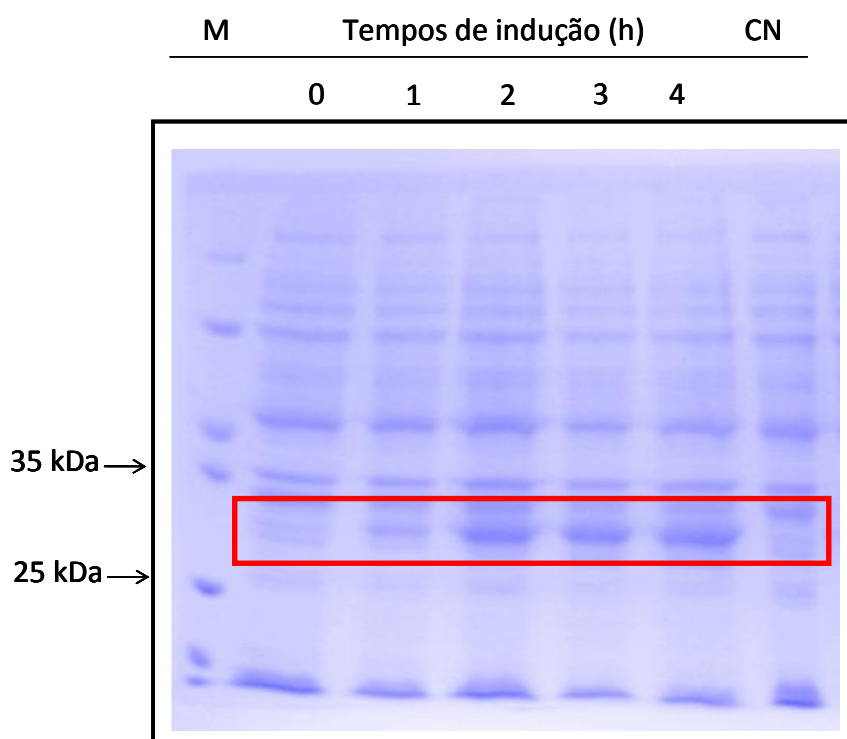


Figura 23 - SDS-PAGE 10% contendo o extrato bacteriano do clone 2 pDEST 17-Pb27 antes da indução (0h) e após 1, 2, 3 e 4h de indução com IPTG (destacados pelo quadrado vermelho). M - marcador de peso molecular; CN – Controle negativo (bactérias não transformadas).

Um *western blot* (fig. 24) foi realizado com o tempo de 4h após a indução com IPTG dos clones 2, 4 e 5. Apesar de somente o clone 2 ter tido a expressão detectada em SDS-PAGE, todos os clones testados tiveram uma banda de aproximadamente 27 kDa detectada no *western blot* utilizando anticorpo anti-histidina. Pode-se observar, na figura 25, uma possível degradação da proteína ou um produto de tradução precoce. O clone 2 foi o escolhido por apresentar uma expressão maior da Pb27r-NHis

Após a confirmação da expressão, uma maxi-expressão foi realizada em 1 L de meio para posterior purificação da proteína. A purificação da Pb27r-NHis foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel His Trap HP conforme já descrito (Fig. 25).

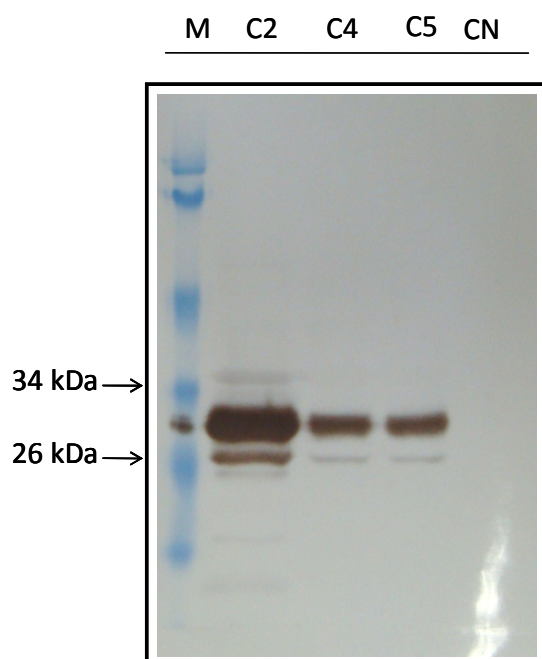


Figura 24 - *Western blot* da expressão da Pb27r-NHis utilizando anticorpo anti-His diluído 1:3.000 em PBS-caseína. M - marcador de peso molecular; C2, C4 e C5 - clones 2, 4 e 5; respectivamente, após 4 h de indução com IPTG.

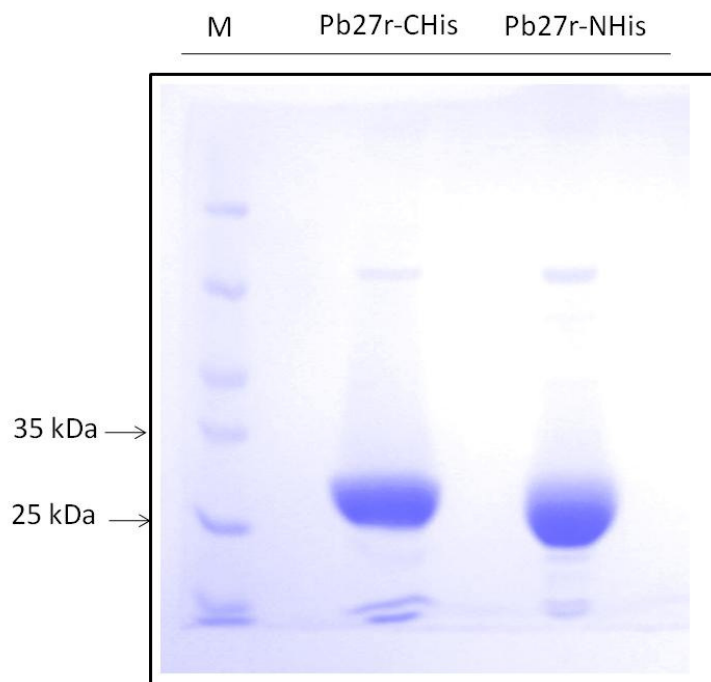


Figura 25 - SDS-PAGE 10% contendo a Pb27r-NHis após purificação em coluna de afinidade HisTrap HP. M – marcador de peso molecular; Pb27r-CHis – proteína Pb27r-CHis purificada, como parâmetro; Pb27r-NHis – proteína purificada.

Assim como para a Pb27r-CHis, a Pb27 com cauda de histidinas N-terminal foi submetida a testes de espalhamento dinâmico da luz e dicroísmo circular. Esses ensaios comparativos possibilitaram analisar a estabilidade das duas proteínas fusionadas e a influência da localização da cauda de histidinas.

5.2.3 - Testes de cristalização da Pb27r-NHis

Os kits Crystal Screen HR2-110 e HR2 -112 também foram utilizados para os testes iniciais de cristalização da Pb27r-NHis. Cada gota continha 1 μ L

da solução de proteína na concentração de 10 mg/mL e o mesmo volume da solução precipitante correspondente. Até o momento, nenhum cristal foi observado em qualquer uma das condições.

5.3 - Caracterização estrutural das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis

Como os testes de cristalização iniciais ainda não possibilitaram o aparecimento de cristais de proteína, um dos motivos pode ser que ainda não foram testadas todas as condições de cristalização.

Outra possibilidade é a proteína estar agregando em solução. Assim, as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis foram analisadas em solução por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz – DLS (*dynamic light scattering*).

A técnica de DLS é utilizada para medir estados de agregação em amostras protéicas. Esse estado de polidispersão é importante em cristalografia de proteínas, pois a agregação das moléculas de proteína em solução pode impedir a formação de cristais. Assim, essa técnica é bastante utilizada para caracterização de proteínas antes dos testes de cristalização, pois é simples e rápida e não causa a perda da amostra.

Foram realizadas 300 medidas de cada proteína a 18 °C no equipamento Dyna-Pro. Analisando a figura 26 obtida com o uso do programa Dynamics V6, observa-se a presença de vários picos correspondente a raios diferentes para cada proteína. Ou seja, as proteínas estão parcialmente polidispersas em solução, apresentando graus de agregação que são correspondentes aos picos menores, referentes a raios diferentes. Para a

Pb27r-CHis, quando aumenta-se a temperatura para 40 °C, a polidispersividade diminui, pois observa-se um número de picos menor, que correspondem a raios diferentes e, portanto, a espécies diferentes em solução. Para a Pb27r-NHis isso se repete, mas em menor grau. A sua polidispersividade parece não ser tão influenciada pela temperatura. O aumento da temperatura é devido a um maior grau de agitação das moléculas em solução. Essa maior agitação pode evitar que as moléculas se agreguem.

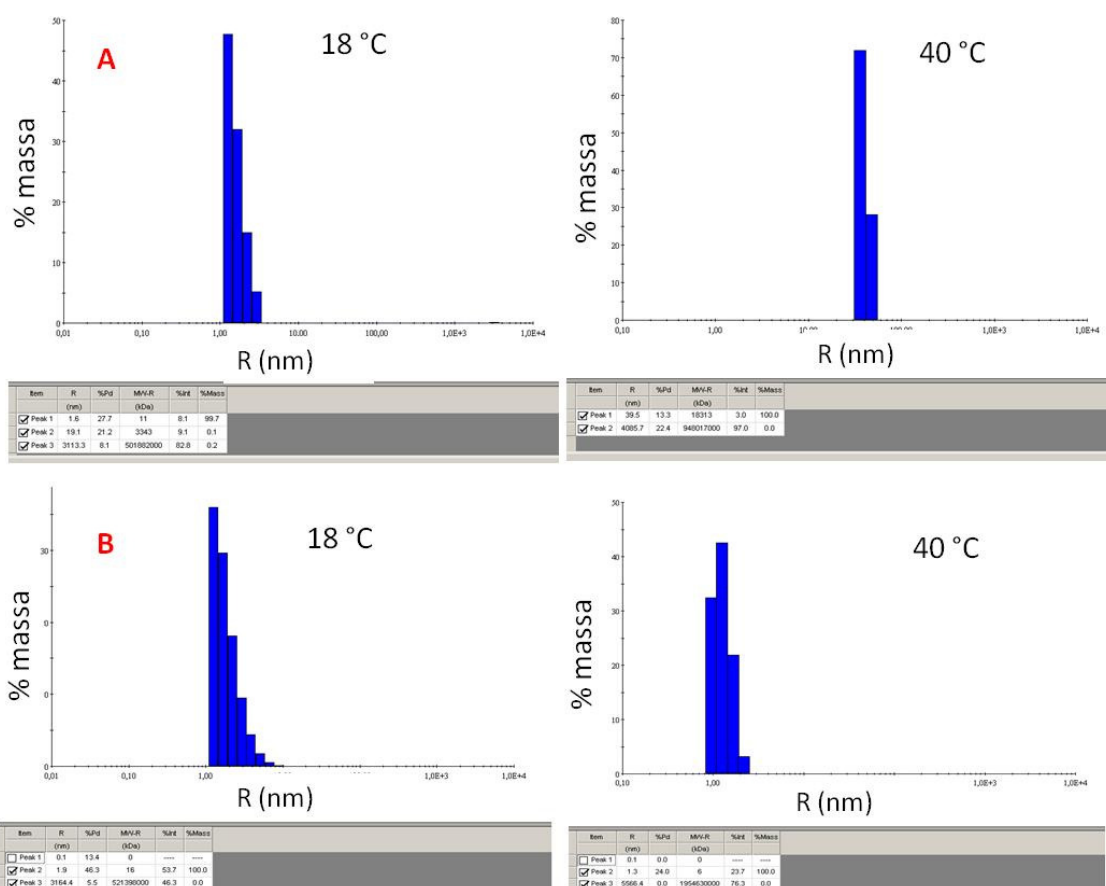


Figura 26 – Análise das proteínas Pb27r-CHis (A) e Pb27r-NHis (B) por espalhamento dinâmico da luz (DLS) à 18 °C e à 40 °C. Os dados foram plotados como raio (nm) em função da massa aparente (%).

Apesar dessa polidispersividade, as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis apresentam estrutura secundária bem definida. Isso foi observado após o teste de dicroísmo circular. Essa técnica mede a atividade ótica de moléculas assimétricas em solução. Proteínas com α -hélices apresentam um forte e característico espectro de absorção na região do UV distante (abaixo de 250 nm) [49].

Os resultados da atividade ótica das proteínas, medidos pela elipcidade molar, em diferentes temperaturas (entre 20 e 70 °C) foram plotados em função dos comprimentos de onda (Fig. 27). Os dados obtidos pelos espectrômetros são em termos de elipcidade (θ), expressa em milidegrees (mdeg). Para macromoléculas como as proteínas, é mais aceitável expressar em termos de elipcidade molar, que considera a massa molecular da proteína e seu número de resíduos [49]. A conversão é simples:

$$[\theta] = \theta / (10 * Cr * l)$$

$$Cr = (n * 1000 * c) / Mr$$

$[\theta]$ é a elipcidade molar em mdeg.cm².dmol⁻¹;

θ é a elipcidade obtida pelo espectropolarímetro em mdeg;

Cr = fator de correção

l = caminho ótico da cubeta, em cm.

n = número de resíduos da proteína;

c = concentração em g/mL da proteína

Mr = massa molecular da proteína

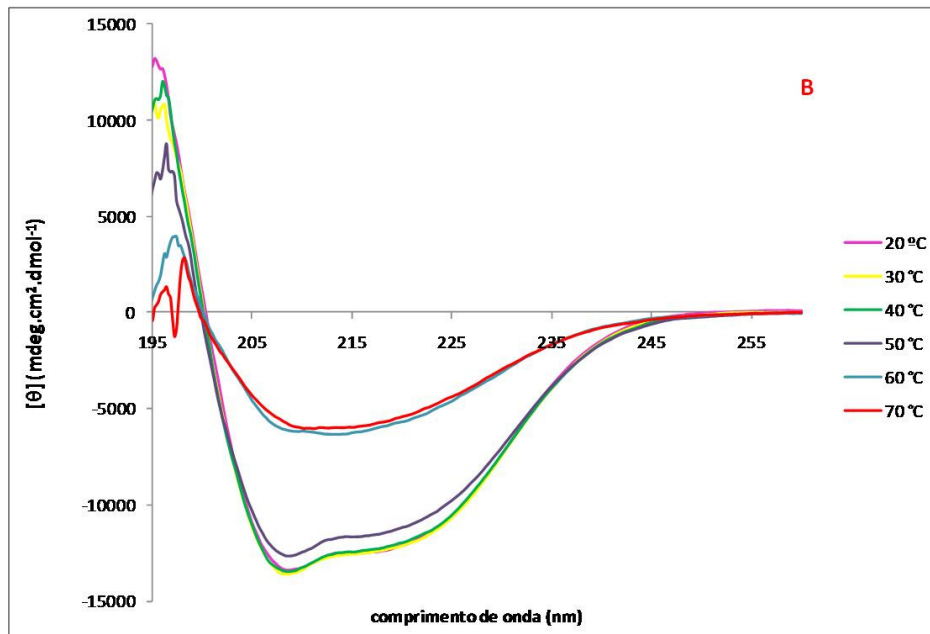
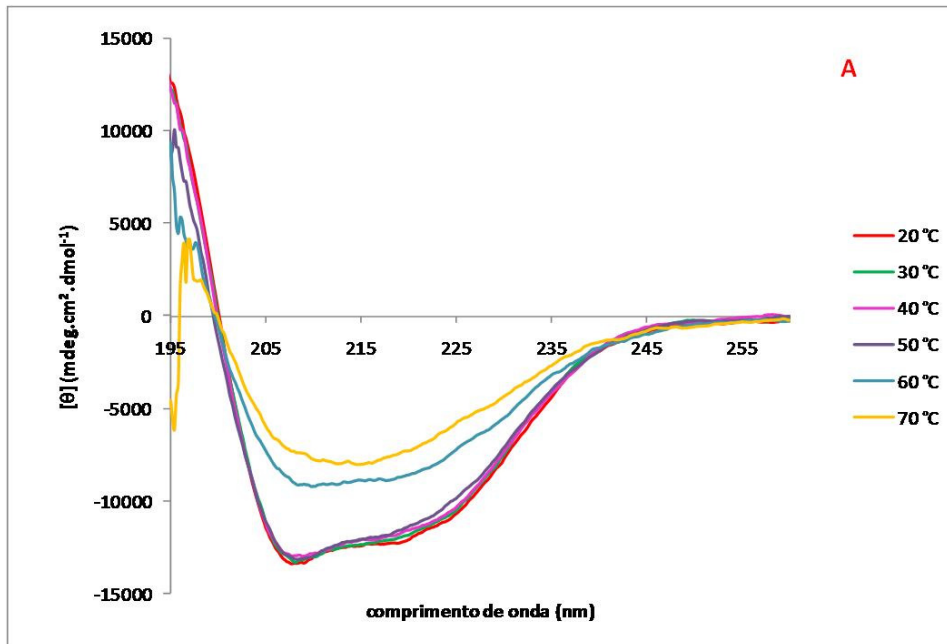


Figura 27 - Análise de dicroísmo circular das proteínas Pb27r-CHis (A) e Pb27r-NHis (B) em diferentes temperaturas. Os dados foram plotados em função de elipicidade molar $[\theta]$ versus comprimento de onda (190 a 260nm) em temperaturas variando de 20 a 70 °C.

Observa-se um espectro bem definido característico de proteínas com α -hélice nas temperaturas entre 20 e 50 °C e, após a temperatura ser elevada

para 60 e 70 °C, as duas proteínas perdem boa parte de sua estrutura secundária. Essa perda parece ser mais acentuada para a Pb27r-NHis que para a Pb27r-CHis.

Esses resultados são confirmados quando se faz um gráfico (Fig. 28) que relaciona porcentagem de estrutura secundária (dados obtidos após deconvolução dos dados pelo programa CDNN Versão 2) em função da temperatura.

Observa-se que as duas proteínas são predominantemente constituídas de α -hélices, cerca de 40%. Porém, as duas proteínas apresentaram um nível considerável de *random coil*, ou seja, regiões desestruturadas. Quando a temperatura se eleva para mais que 60 °C nota-se um aumento da porcentagem de regiões desorganizadas, caracterizando assim a desnaturação da proteína.

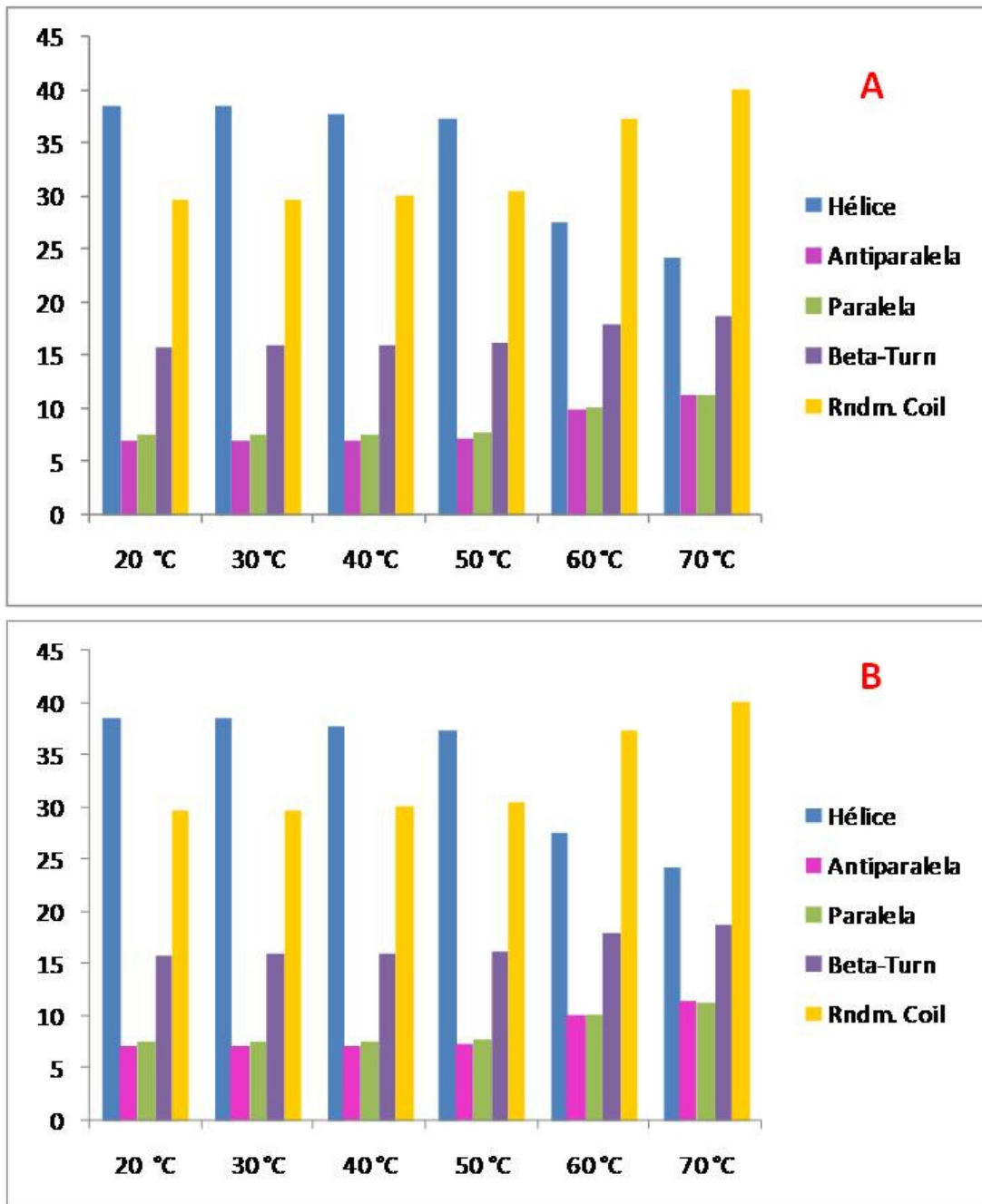


Figura 28 – Resultados da deconvolução dos espectros apresentados na figura 27 pelo programa CDNN versão 2. Esses gráficos correlacionam temperatura e porcentagem de estrutura secundária para as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis.

5.4 - Mutação sítio dirigida

Segundo Derewenda, 2004 [50], a formação de cristais de proteínas envolve o ordenamento das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de superfície e isso gera perda de entropia conformacional, que  , sob o ponto de vista termodinâmico, um processo desfavorável. A modificação da superfície das proteínas pela troca local e limitada de resíduos hidrofílicos grandes, desfavoráveis ao contato proteína-proteína, por resíduos menores de baixa entropia conformacional permite a preparação de cristais de qualidade pela facilitação da formação de superfícies de contato; passo inicial na formação do cristal.

Assim, na tentativa de promover a formação de cristais por minimização da entropia de superfície da proteína Pb27r, foi realizada uma mutação sítio dirigida para trocar os resíduos teoricamente de superfície: lisina (Lys ou K) e ácido glutâmico (Glu ou E) (160 e 161) por dois resíduos de alanina (Ala ou A).

A escolha desses resíduos foi realizada através do servidor *Surface Entropy Reduction prediction* (SERp) versão 1,20, (<http://nihserver.mbi.ucla.edu>). Por meio de c culos de predição de estrutura secundária, perfil entrópico da proteína e comparação com outras seq ncias, o programa sugere algumas regiões mais favoráveis a receberem a mutação (Fig. 29). Esse servidor sugere regiões baseadas em *scores*. Quanto mais próximo o *score* estiver do valor 5, melhor é a sugestão.

Para a seq ncia da Pb27 foram sugeridas três regiões para a mutação. Inicialmente, optou-se pela primeira sugestão; de maior *score*.

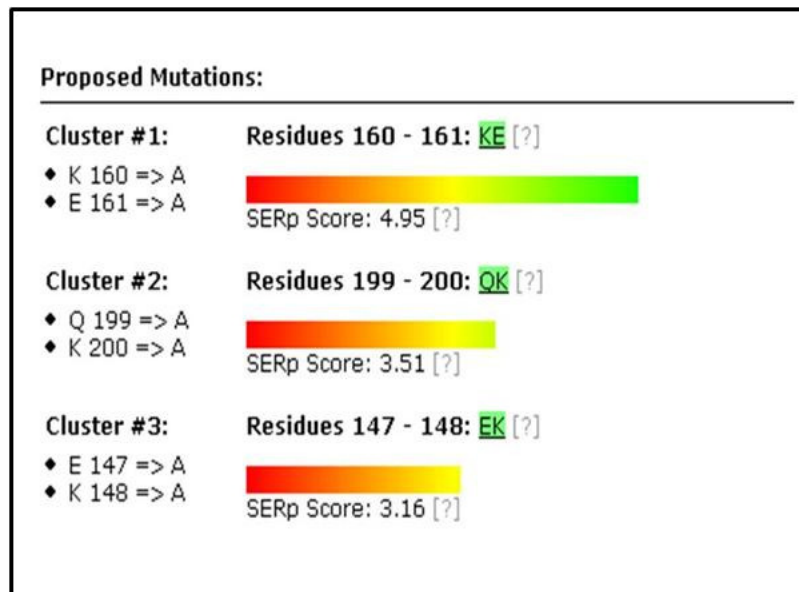


Figura 29 - Mutações propostas pelo servidor SER-Server para a Pb27. Três regiões para mutação foram propostas, porém optou-se pela primeira sugestão, que apresentou um score maior.

Para realizar a mutação, foi desenhado um iniciador direto contendo os códons para Ala ao invés dos códons para Lys e Glu.

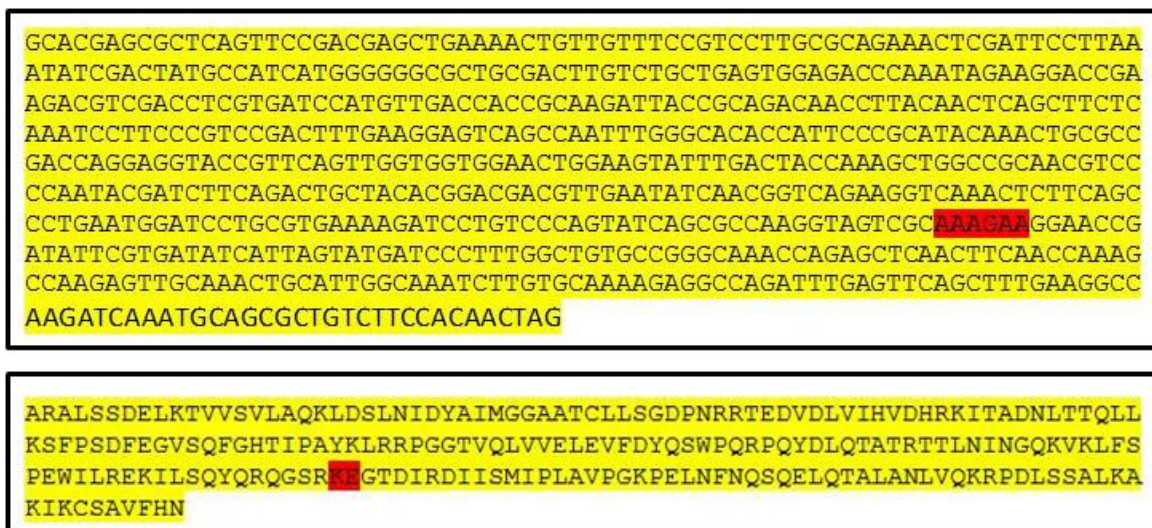


Figura 30 - Sequências de aminoácidos e de nucleotídeos para a Pb27 a serem mutados. Em vermelho, encontram-se destacados os locais escolhidos para mutação.

Na figura 30 observamos os aminoácidos KE na seqüência original da Pb27 e os códons correspondentes logo acima. O iniciador foi desenhado para alinhar na região da seqüência a ser mutada contendo, porém, novos códons, como apresentado abaixo:.

Pb27r-mut - 5' T AGT CGC GCA GCA GGA ACC GAT A 3'

Essa seqüência foi utilizada na primeira PCR como iniciador direto junto com o iniciador reverso utilizado nas clonagens das Pb27r-CHis e Pb27r-NHis. Essa reação de PCR gerou o *megaprimer* (Fig. 31).

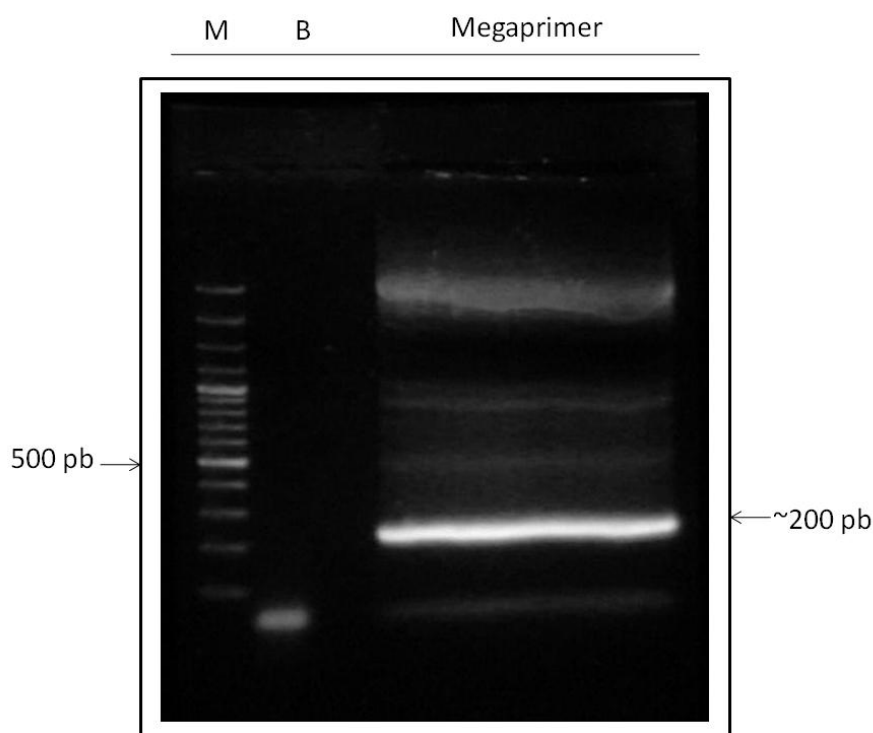


Figura 31 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® contendo do produto da primeira PCR necessária para a mutação (*megaprimer*). Foram aplicados 50 µL da reação de PCR com 10 µL de tampão de amostra em uma canaleta única do gel (para posterior purificação). M - marcador de peso molecular 100 pb; B - branco (não continha o molde de DNA); megaprimer - seqüência contendo a mutação.

Na segunda reação de PCR (Fig. 32), o *megaprimer*, após ser purificado do gel, foi utilizado como iniciador reverso juntamente com o iniciador direto utilizado na clonagem da Pb27r-NHis (item 4.2). Logo, espera-se que a Pb27 mutada (Pb27r-mut) seja expressa com cauda de histidinas N-terminal, uma vez que ela será clonada no vetor de expressão pDEST 17.

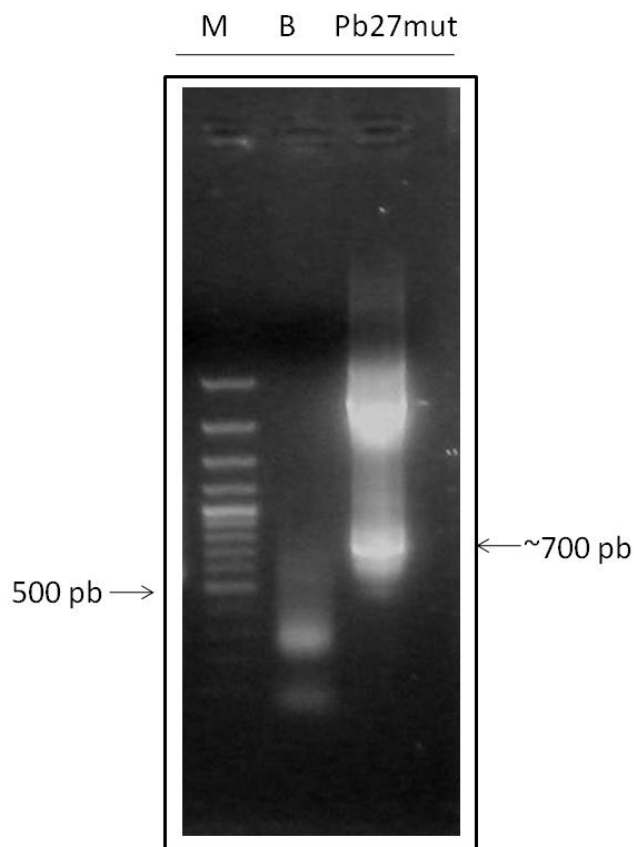


Figura 32 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® contendo do produto da segunda reação de PCR para amplificação da seqüência da Pb27 mutada. Foram aplicados 10 μ L da reação de PCR com 2 μ L de tampão de amostra. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); Pb27 mut - reação de PCR para amplificação da seqüência da Pb27 mutada.

A seqüência da Pb27 mutada foi ligada no plasmídeo pDONR 221 utilizando, novamente, o sistema Gateway de clonagem. Bactérias *E. coli* TOP 10 foram transformadas com o plasmídeo recombinante pDONR-Pb27mut. Os clones resultantes e selecionados pelo antibiótico kanamicina foram testados

por PCR de colônias para identificar aqueles que continham uma seqüência de aproximadamente 700 pb correspondente à seqüência codificadora da Pb27. Assim, 9 dos 13 clones testados foram positivos (Fig. 33).

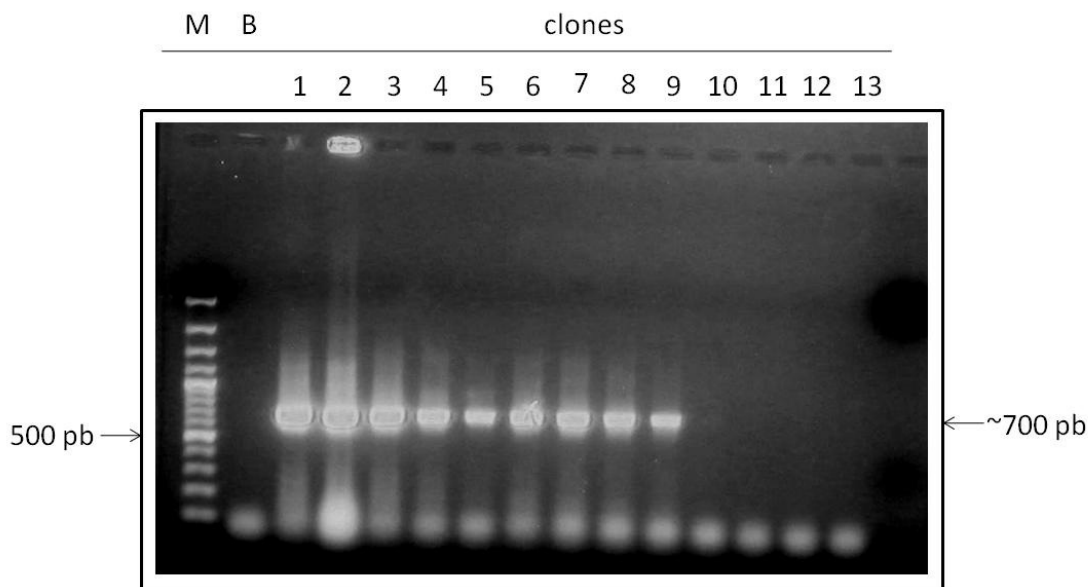


Figura 33 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDONR-Pb27mut. Foram aplicados 10 μ L do produto da PCR de colônias dos clones selecionados por kanamicina resultantes da transformação de bactérias BL21 com o plasmídeo pDONR-Pb27mutada. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); 1 a 13 - clones testados.

Os clones positivos 1, 2 e 3 foram utilizados para extração plasmidial e subsequente ligação no vetor pDEST 17. Bactérias *E. coli* BL21 foram transformadas com a ligação resultante e os clones resistentes à ampicilina foram testados por PCR de colônias. Todos os clones testados foram positivos (Fig. 34).

Os clones positivos estão em fase de seqüenciamento para confirmação da presença da mutação. Mesmo antes do resultado do seqüenciamento, optou-se por iniciar a etapa de expressão da proteína mutada.

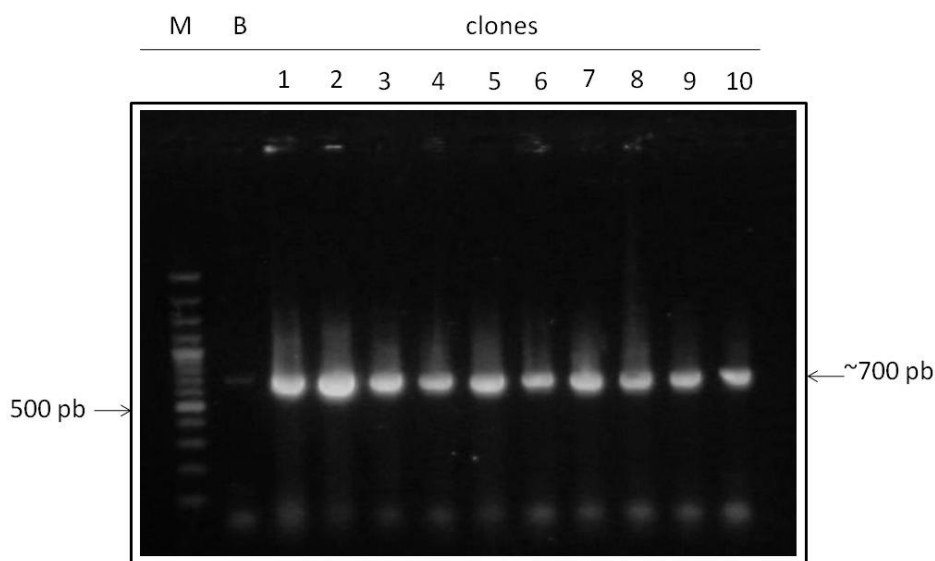


Figura 34 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDEST-Pb27mut. Foram aplicados 10 μ L do produto da PCR de colônias dos clones selecionados por ampicilina resultantes da transformação de bactérias BL21 com o plasmídeo pDEST 17-Pb27mut. M - marcador de peso molecular 100 pb; B – branco (não continha o molde de DNA); 1 a 10 - clones testados.

O clone 1 contendo o plasmídeo pDEST 17-Pb27mut foi induzido com IPTG para expressar a proteína Pb27 recombinante mutada contendo a cauda de histidinas no N-terminal (Pb27r-mut-NHis).

Na figura 35 observa-se o aparecimento, após a indução (tempos 1, 2, 3 e 4h), de uma banda de aproximadamente 27 kDa, ausente no controle negativo (bactérias BL21 não transformadas). De forma interessante e contrária às outras duas construções, a proteína mutada apresentou-se insolúvel; ou seja, presente no pellet resultante após a lise das bactérias e não no sobrenadante, como nos outros casos.

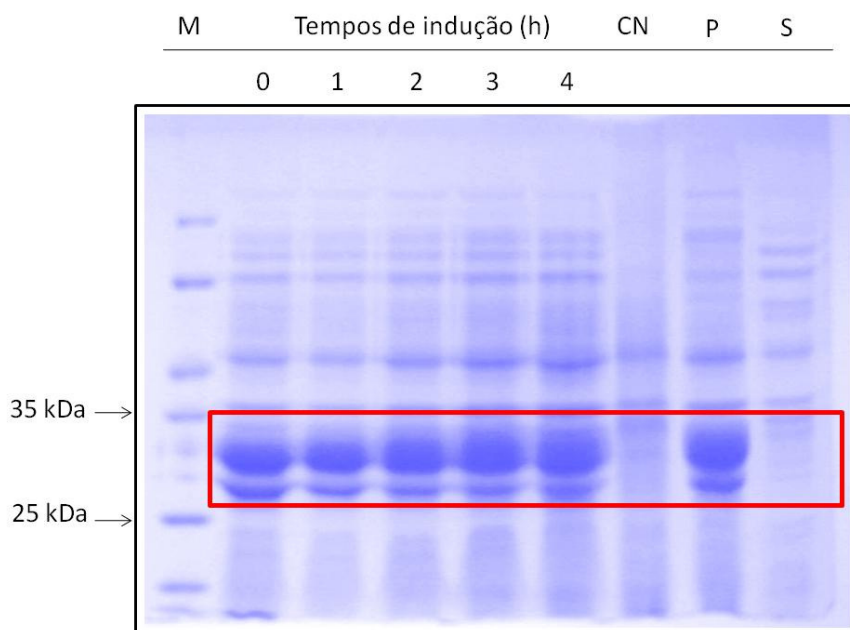


Figura 35 - SDS-PAGE 10% contendo o extrato bacteriano do clone 1 pDEST 17-Pb27mut antes da indução (0h) e após 1, 2, 3 e 4h de indução com IPTG (destacados pelo quadrado vermelho). M - marcador de peso molecular; CN – Controle negativo (bactérias não transformadas); P - pellet; S - sobrenadante.

Para confirmar essa expressão, um *western blot* utilizando anticorpo anti-histidina foi realizado. Na figura 36 observa-se que existe certa quantidade da proteína Pb27r-mut no sobrenadante (não detectada no SDS-PAGE). Porém, a quantidade no pellet é muito maior e comparável à quantidade que as outras construções (Pb27r-CHis e Pb27r-NHis) expressam no sobrenadante. Observamos, novamente, uma expressão basal da proteína recombinante (tempo zero).

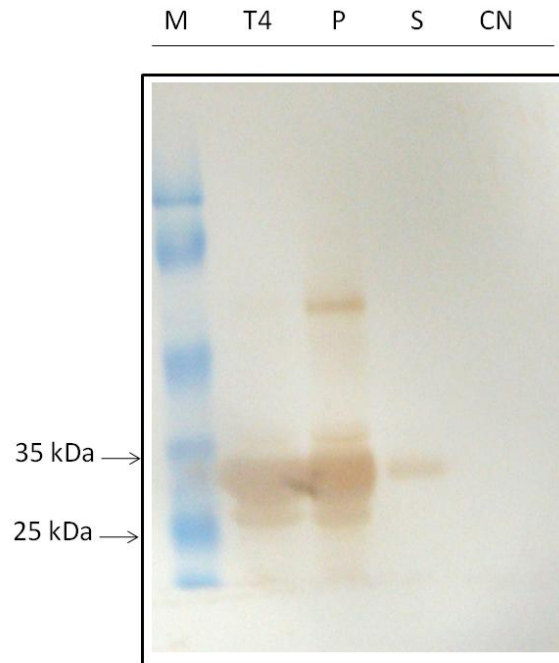


Figura 36 - Western blot da expressão da Pb27r-mut utilizando anticorpo anti-His diluído 1: 3.000 em PBS-caseína. M - marcador de peso molecular; T4 - clone 1 após 4 h de indução com IPTG; P- pellet; S – sobrenadante; CN - controle negativo.

Assumindo-se que os resíduos de aminoácidos mutados sejam realmente de superfície, pois essa é a proposta do programa utilizado para prever os locais de mutação, a mudança de cargas provocada pela troca de dois aminoácidos carregados (Lys e Glu), por duas Ala, pode ter diminuído a solubilidade da proteína fazendo com que ela, que antes era bastante solúvel, se apresentasse em maior quantidade no pellet.

5.5 - Proteólise limitada

Normalmente, as regiões mais flexíveis em uma proteína dificultam o empacotamento ordenado necessário para a formação e difração em alta resolução de cristais deste tipo de molécula. A proteólise limitada permite que essas regiões flexíveis sejam clivadas através de uma reação em que a proteína em teste é colocada em contato com uma protease e essa reação é, de alguma forma, limitada para permitir que somente as regiões mais susceptíveis sejam removidas.

Unidades peptídicas enterradas no *core* protéico e elementos de estrutura secundária regulares são menos acessíveis à ação de proteases e, portanto, não são clivados tão rapidamente. Assim, se poderia esperar que as clivagens observadas nesse tipo de experimento ocorressem em regiões de superfície que estão mais expostas ao solvente circundante, como as alças e/ou *loops*. No caso de estruturas de proteínas globulares, espera-se que a proteólise ocorra primariamente nas regiões flexíveis de superfície e no caso de proteínas multi-domínios, nas regiões ligadoras móveis entre esses domínios. Assim, a proteólise limitada pode ser usada para monitorar regiões de superfície protéica, mudanças conformacionais induzidas por ligantes, domínios de ligação e dobramento protéico [57, 58].

As condições de reação para a proteólise limitada são escolhidas para garantir que a degradação completa não ocorra. Desse modo, limita-se a razão enzima:substrato para valores entre 1:50 e 1:1.000, para que a proteólise seja incompleta e os intermediários possam ser observados ao longo do tempo.

Técnicas adicionais também são utilizadas como a digestão em baixas temperaturas e em pH não ótimo para a enzima [57, 58].

Na tentativa de identificar regiões mais compactas da Pb27, foi realizada a proteólise limitada das duas construções: Pb27r-CHis e Pb27r-NHis utilizando tripsina. A reação foi limitada pela temperatura, já que foi realizada a 25 °C e não na temperatura ótima de ação da tripsina (37 °C). Além disso, limitou-se a reação também pelo tempo, já que a reação foi realizada durante intervalos entre 5 minutos e 24 horas.

Em cada tempo, um tubo era retirado e a reação paralisada com TFA 3%. Desse tubo, 4 µL eram retirados para a eletroforese e o restante utilizado nos ensaios de espectrometria de massas. Após um teste inicial, foi realizada uma diluição de 10 vezes em TFA 0,1 % para, assim, submeter a amostra à espectrometria de massas.

A análise dos resultados possibilitou verificar que as duas proteínas apresentaram perfis semelhantes tanto no SDS-PAGE quanto no espectro de massas.

No SDS-PAGE 15% (Fig. 37), as duas proteínas apresentaram uma banda de aproximadamente 25 kDa que se manteve constante em todos os tempos de reação, diminuindo, porém, à medida que esse intervalo de tempo era aumentado. Notou-se também que em 24h a banda de 25 kDa era bem mais fraca. Foi possível observar a presença de bandas menores nas canaletas de todos os tempos de proteólise e ausentes na das proteínas não digeridas. Esses fragmentos são provavelmente, resultantes da quebra de regiões mais flexíveis e expostas da proteína.

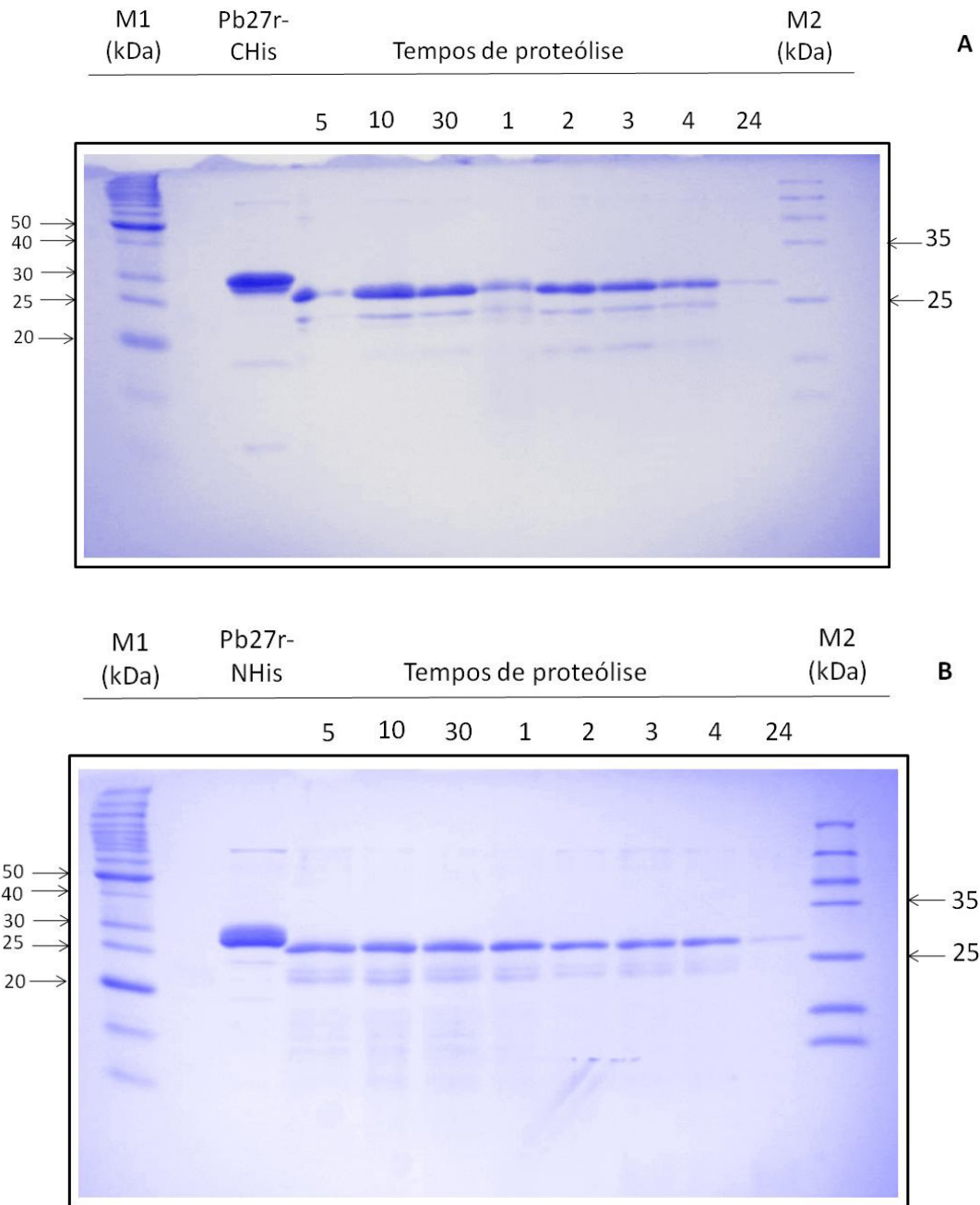


Figura 37 - SDS-PAGE 15% contendo o resultado da ação da tripsina sobre a Pb27r-CHis (A) e Pb27r-NHis (B). Nota-se o aparecimento de uma banda de aproximadamente 25 kDa após a proteólise e de outras bandas menores. M1 e M2 - marcadores de peso molecular; Pb27r-CHis e Pb27r-NHis - proteínas não lisadas; Tempos de proteólise: 5, 10 e 30 minutos e 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a ação da enzima.

Pelas análises dos perfis de massas (Fig. 38) obtidos a partir da proteólise com a tripsina, todos os tempos de reação apresentaram resultados semelhantes para as duas construções, Pb27r-CHis e Pb27r-NHis. Aparentemente, a posição da cauda de histidinas não teve influência sobre o número de regiões flexíveis, já que o tamanho da região que se manteve constante foi bastante semelhante para as duas proteínas: Pb27r-CHis, 24794,14 Da e Pb27r-NHis, 25208,3 Da. Esses valores foram obtidos através da média das maiores massas observadas em cada tempo de proteólise. Observam-se ainda diversos picos correspondentes às massas menores, assim como foi verificado no SDS-PAGE. Essas massas menores foram ausentes quando as proteínas inteiras foram submetidas ao espectrômetro de massas (dados não mostrados).

Nas tabelas 1 e 2 estão descritas as massas teóricas dos peptídeos gerados a partir da proteólise total das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis com tripsina. Nessa tabela, os peptídeos foram ordenados a partir do N-terminal da proteína madura. Essas massas foram obtidas através do programa PeptideMass (<http://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html>). Nesse programa deposita-se a seqüência de aminoácidos da proteína de interesse e ele fornece as massas dos prováveis peptídeos obtidos após clivagem com uma determinada protease. Ainda de acordo com esse programa, a massa teórica total das proteínas são 28752,12 Da e 28239,67 Da para a Pb27r-CHis e para a Pb27r-NHis, respectivamente.

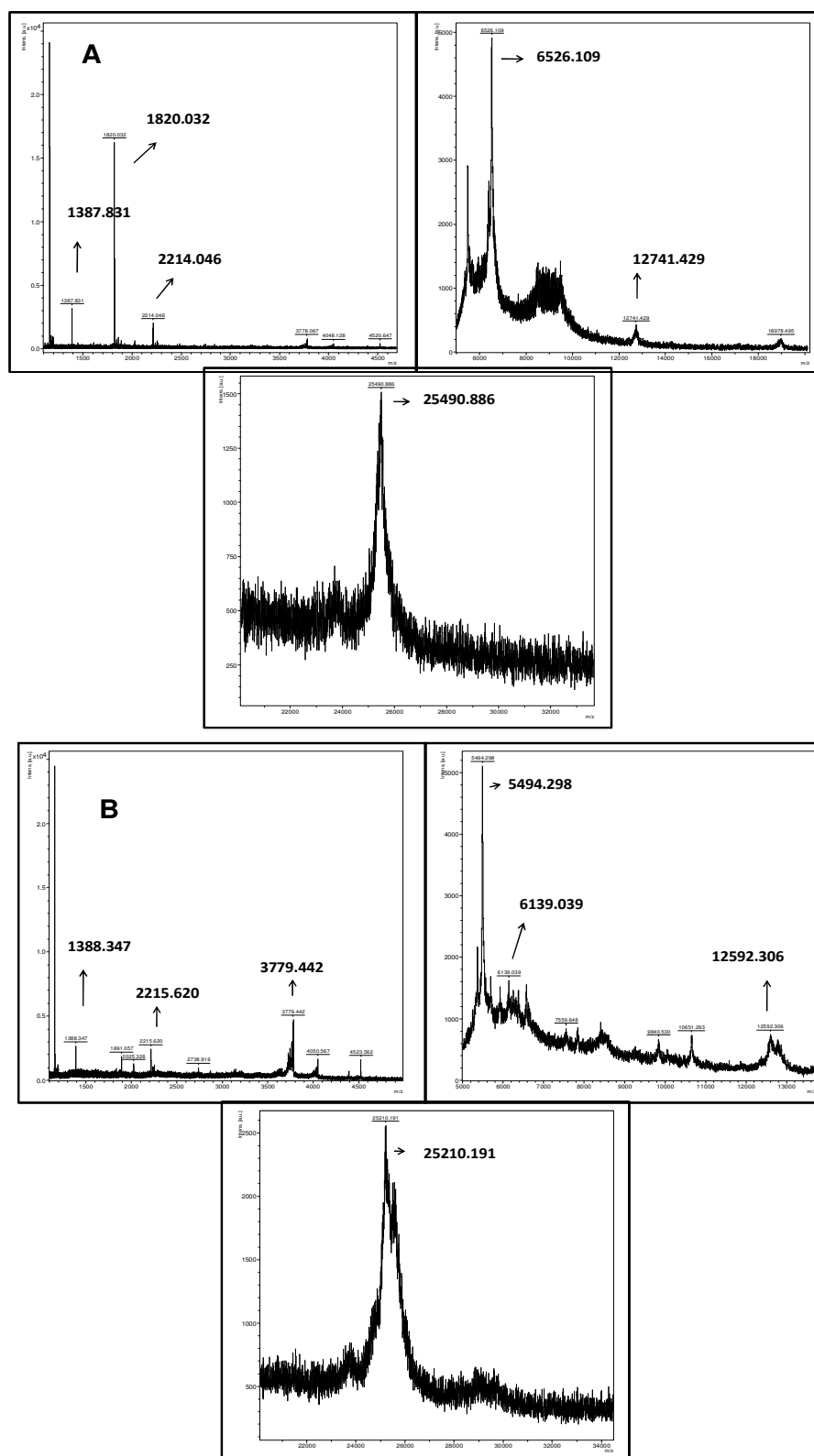


Figura 38 - Perfil de massas da Pb27r-CHis após 1 h de ação da tripsina (A) e da Pb27r-NHis após 4 h de ação da tripsina (B). Esses perfis exemplificam as massas dos vários fragmentos obtidos após a proteólise limitada das duas construções em cada tempo indicado Todos os tempos de reação: 5, 10 e 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 24 horas apresentaram perfis semelhantes e por isso não estão aqui apresentados.

Tabela 1: Seqüência de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela clivagem teórica da proteína Pb27r-CHis por tripsina e suas respectivas massas.

Ordem	Massa	Seqüência peptídica
1	377.1965	MAR
2	862.4516	ALSSDELK
3	944.5775	TVVSVLAQK
4	2580.243	LDSLNIIDYAIMGGAATCLLSGDPNR
5	175.1189	R
6	1547.781	TEDVDLVIHVDHR
7	147.1128	K
8	1330.758	ITADNLTTQLLK
9	2214.05	SFPSDFEGVSQFGHTIPAYK
10	288.203	LR
11	3729.898	RPGGTVQLVVELEVYQSWPQRQPQYDLQTATR
12	988.5422	TTLNINGQK
13	246.1812	VK
14	1160.646	LFSPEWILR
15	276.1554	EK
16	907.4996	ILSQYQR
17	447.231	QGSR
18	147.1128	K
19	690.3417	EGTDIR
20	2196.21	DIISMIPLAVPGKPELNFNK
21	986.5629	RPDLSSALK
22	218.1499	AK
23	260.1968	IK
24	1611.762	CSAVFHNDPAFLYK
25	659.4086	VVINSK
26	1820.028	LEGKPIPPLLGLDSTR
27	862.3815	TGHHHHH

Subtraindo-se da massa total de cada proteína o valor médio das massas dos maiores fragmentos obtidos pela proteólise limitada, tem-se 3957,98 Da e 3031,37 Da para as construções C- e N-terminal, respectivamente.

Tabela 2: Seqüência de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela clivagem teórica da proteína Pb27r-NHis por tripsina e suas respectivas massas.

Ordem	Massa	Seqüência peptídica
1	2307.051	MSYYHHHHHLESTSLYK
2	147.1128	K
3	521.283	AGFAR
4	862.4516	ALSSDELK
5	916.5462	TVASVLAQK
6	147.1128	K
7	2580.243	LDSLNIDYAIMGGAATCLLS GDPNR
8	175.1189	R
9	1547.781	TEDVDLVIHVDHR
10	1330.758	ITADNLTTQLLK
11	2214.05	SFPSDFEGVSQFGHTIPAYK
12	288.203	LR
13	3777.898	RPGGTVQLVELEVFDYQSWP QRPQYDLQTATR
14	989.5262	TTLNIDGQK
15	246.1812	VK
16	1160.646	LFSPEWILR
17	276.1554	EK
18	907.4996	ILSQYQR
19	447.231	QGSR
20	147.1128	K
21	690.3417	EGTDIR
22	3720.004	DIISMIPLAVPGKPELNFNQ SQELQTALANLVQK
23	986.5629	RPDLSSALK
24	218.1499	AK
25	260.1968	IK
26	1694.811	CSAVFHNTQHFLYK
27	175.1077	VG

Ao simular uma proteólise ocorrendo a partir das extremidades de cada proteína, pode-se sugerir, através de uma combinação das massas das extremidades, que, para a Pb27r-CHis, os fragmentos clivados pela tripsina poderiam ser os de número 1, 2, 26 e 27 totalizando 3922,06 Da e para a Pb27r-NHis, os fragmentos poderiam ser os de número 1, 2, 3 e 27 totalizando 3150,55 Da. Esses valores se aproximam daqueles resultantes da subtração da massa total das proteínas pela massa média dos maiores fragmentos resultantes da proteólise. Por meio desse raciocínio, os fragmentos retirados

através dessa hipótese correspondem principalmente às regiões inseridas pelo plasmídeo durante as clonagens. Se essas regiões são aquelas que impedem a cristalização dessas moléculas, seria esperado que a Pb27 sem qualquer região extra fosse mais facilmente cristalizável. Porém, como já mencionado anteriormente, a Pb27 que foi expressa por Reis, et al 2008 [36] e que teve a proteína de fusão GST retirada, também não foi cristalizada após vários ensaios robotizados.

No entanto, conclusões mais concretas poderão ser tomadas quando essas regiões forem devidamente seqüenciadas ou outras bandas menores forem analisadas.

5.6 - Imunização de coelho com a proteína Pb27r-NHis

Diante o insucesso, até o momento, em se obter cristais da proteína Pb27 recombinante, optou-se também pela tentativa de cristalizar a proteína nativa. Para isso, decidiu-se purificar, por afinidade, a Pb27 nativa pela imobilização de anticorpos anti-Pb27 obtidos pela imunização de coelho com a Pb27 recombinante.

Assim, um coelho foi imunizado três vezes com intervalos de 15 dias, com quantidades decrescentes de Pb27r-NHis. Quinze dias após a última imunização, coletou-se uma amostra de sangue para dosagem de anticorpos anti-Pb27 presentes no soro (Fig. 39).

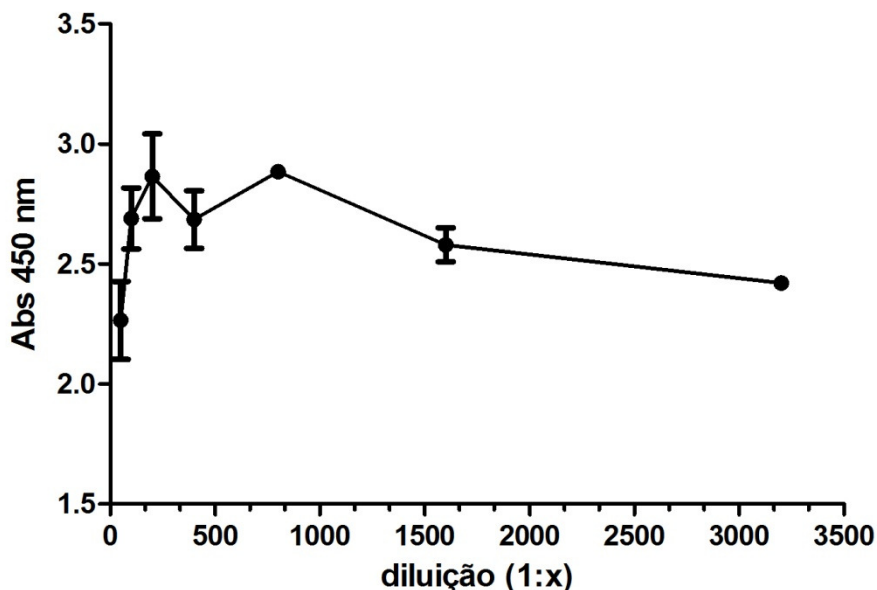


Figura 39 - Titulação de anticorpos anti-Pb27r em soro de coelho imunizado com a proteína Pb27r-NHis. O soro foi diluído serialmente até 1: 3.200.

Pela análise do gráfico apresentado na figura 40, observou-se que a imunização do coelho com a proteína Pb27r-NHis foi eficiente na produção de anticorpos anti-Pb27r. Pela dosagem apresentada, observamos pouca diferença entre os altos valores de absorvância obtidos entre as diluições de 1: 200 até 1:3.200 indicando alta quantidade de anticorpos presente no soro imune.

A disponibilidade de um anticorpo específico que reconheça a proteína de interesse, seja esse anticorpo poli ou monoclonal, permite o uso da purificação por imunoafinidade. Devido às propriedades únicas da interação antígeno-anticorpo, nenhum outro tipo de cromatografia permite tão altos níveis de purificação (1.000 a 10.000 vezes) em um único passo [59].

A imobilização de proteínas em uma fase sólida é uma técnica útil para separação de biomoléculas, ensaios de atividade enzimática e análises de reações de ligação. Muitas dessas técnicas utilizam membranas funcionais nas

quais uma molécula é aderida e serve, por exemplo, na purificação por afinidade de outra molécula [59, 60].

Outras técnicas utilizam matrizes que contenham reagentes que ligam anticorpos específicos para a proteína de interesse. As matrizes mais comumente utilizadas nesse caso são as *beads* de proteína A, que contém quatro sítios que ligam especificamente ao domínio Fc das imunoglobulinas [61].

Existem assim diversas técnicas que permitem a imobilização dos anticorpos anti-Pb27 para a purificação da proteína nativa. Esta etapa do projeto ainda não foi finalizada. Outros ensaios estão sendo realizados para a obtenção de grandes quantidades de soro para a purificação da Pb27 nativa.

6 DISCUSSÃO

A Cristalografia de Proteínas tem contribuído expressivamente no entendimento de processos biológicos básicos, como os mecanismos de reações bioquímicas, interações proteínas-ligantes e proteínas-DNA, permitindo estudos mais avançados, como, por exemplo, o desenho de drogas baseado em estruturas, os processos que desencadeiam doenças, dentre outros. Isso porque é mais fácil entender um processo quando se é capaz de visualizar a posição exata e função de cada componente químico participante.

Diante disso, a elucidação de estruturas de proteínas novas e importantes para determinados organismos é desafiante, mas ao mesmo tempo fundamental para o entendimento dessas novas proteínas. No caso do fungo termo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que causa a paracoccidioidomicose (PCM), novas formas de diagnóstico e tratamento devem ser buscadas e fatalmente, essa busca cai em proteínas fúngicas com alto grau de imunogenicidade e antigenicidade. Essas proteínas, muitas vezes não têm sua função determinada.

A PCM é uma micose sistêmica de grande incidência no Brasil e em outros países da América Latina. Ela é adquirida pela inalação dos esporos do *P. brasiliensis*. A infecção atinge primeiramente os pulmões, mas pode disseminar para outros órgãos e tecidos levando a lesões secundárias.

O diagnóstico da PCM é difícil, sendo realizado principalmente através da observação do fungo em biópsias e amostras clínicas. Também tem sido utilizada a detecção de anticorpos específicos para proteínas do fungo. O tratamento da doença é realizado com antifúngicos e é bastante prolongado podendo durar vários meses a anos. Além disso, existe sempre a possibilidade de diversos efeitos colaterais.

A proteína Pb27 de *P. brasiliensis* tem demonstrado características interessantes do ponto de vista imunológico. Ela é reconhecida com alta sensibilidade por soros de pacientes com PCM e é capaz de diferenciar essa doença de outras micoses sistêmicas, demonstrando sua alta especificidade. Sendo assim, ela é uma forte candidata para uso em diagnóstico da doença. Além disso, essa proteína mostrou-se bastante imunogênica; ou seja, induziu alta produção de anticorpos em camundongos imunizados com esse antígeno [22, 24, 34, 36]. Em camundongos infectados com *P. brasiliensis* e imunizados com a Pb27, essa proteína foi capaz de levar a uma infecção mais controlada associada a baixos níveis de mortalidade e presença de granuloma compacto [36].

Contudo, até o momento, não se tem qualquer informação a respeito da sua função no fungo. Além disso, não há registro de qualquer outra proteína com similaridade significativa em bancos de dados. Assim, a Pb27 constitui-se um desafio interessante para estudos cristalográficos. Estes estudos poderiam permitir a dedução de domínios funcionais e, finalmente, indicar algo sobre sua função.

Diante dessas características interessantes do ponto de vista imunológico, o gene para a Pb27 foi clonado no vetor de expressão pGEX para expressão da proteína fusionada à GST [36].

Como as tentativas de cristalizar a Pb27r após clivagem da GST ainda não apresentaram resultados positivos, decidimos testar novas construções a fim de determinarmos a estrutura da proteína e talvez a sua função no fungo. Assim, o gene para a Pb27 foi subclonado no vetor de expressão pET-DEST42 para expressão da proteína com cauda de histidinas C-terminal.

A Pb27r-CHis foi expressa em *E. coli* BL21 e purificada utilizando cromatografia de afinidade. Sua expressão foi confirmada por *western blot* utilizando soro de camundongos anti-Pb27.

Várias condições foram testadas na tentativa de cristalizar a Pb27r-CHis, mas, até o momento, em nenhum dos casos surgiram cristais.

Uma nova construção foi então produzida. O gene da Pb27 foi subclonado em outro vetor de expressão (pDEST 17) com cauda de histidinas N-terminal (Pb27r-NHis). Novamente os testes iniciais de cristalização dessa proteína não resultaram em cristais. No entanto, ainda não foram realizados testes automatizados de cristalização dessa construção.

Em experimentos de DLS (espalhamento dinâmico da luz), as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis apresentaram-se parcialmente polidispersas, com o grau de polidispersão diminuindo com o aumento da temperatura. Porém, apesar dessa agregação em solução, as proteínas são estruturadas, apresentando cerca de 40 % de α -hélices, como observado nos experimentos de CD (dicroísmo circular). As duas construções, no entanto, apresentaram um nível considerável de estruturas randômicas e isso, juntamente com a polidispersividade, pode ser a causa da não cristalização das duas construções.

Assim, buscou-se melhorar as características da Pb27 de modo torná-la mais facilmente cristalizável.

Para facilitar a formação de cristais pela minimização da entropia de superfície da proteína Pb27r, fato que permitiria a formação de superfícies de contato favoráveis à agregação ordenada das moléculas e à produção de cristais, foi realizada uma mutação (K160A e E161A) para troca de dois

resíduos teoricamente de superfície. Os resíduos de lisina e aspartato possuem cadeias laterais grandes e isso poderia impedir a formação de cristais. Teoricamente, a substituição por alanina, que possui cadeia lateral pequena, facilitaria a ordenação das moléculas de proteína na forma cristalina. Até o momento, o seqüenciamento dessa construção não foi concluído. Porém, de forma contrária às outras duas construções, a Pb27r mutada tornou-se insolúvel após ser expressa.

Além disso, foi realizado um ensaio de proteólise limitada com as duas construções Pb27r-CHis e Pb27r-NHis com o objetivo de determinar uma região dessa proteína que seja mais compacta e de importância crucial para sua função e para a cristalização. Isso porque regiões mais compactas de uma proteína são menos susceptíveis à proteólise limitada, que deve ocorrer principalmente em regiões mais flexíveis [57]. Essas regiões poderiam ser as responsáveis pela não formação de cristais dessas construções. Os resultados preliminares destes ensaios mostraram que uma região de aproximadamente 25 kDa se manteve constante quando o produto da proteólise foi analisado tanto por SDS-PAGE quanto por MALDI-MS. Isto sugere que as regiões clivadas mais facilmente correspondem àquelas inseridas pelos plasmídeos durante as clonagens e, aparentemente, elas poderiam estar impedindo o ordenamento correto das moléculas de proteína no cristal. Contudo, outras análises precisam ser realizadas para que conclusões mais precisas possam ser feitas.

Apesar de suas características bastante favoráveis, como altos níveis de expressão e alta solubilidade, todas as tentativas de cristalização da Pb27 recombinante foram mal sucedidas, até o momento.

Outra abordagem iniciada nesse trabalho foi a tentativa de purificação da Pb27 nativa para posteriores testes de cristalização. Isso seria feito através da purificação por afinidade utilizando anticorpos específicos para a Pb27. Estes anticorpos seriam obtidos da imunização de coelho com a Pb27 recombinante (Pb27r-NHis, no caso). Nessa etapa inicial, verificou-se uma alta produção de anticorpos pelo coelho imunizado com a proteína.

Nesse trabalho foram apresentadas várias tentativas de caracterização estrutural da forma recombinante da Pb27. Um grande esforço foi concentrado nas tentativas de cristalização e modificação estrutural da própria proteína para torná-la mais susceptível à cristalização. É sabido, porém, que existem ainda muitos testes a serem realizados e isso torna esse trabalho apenas o início de um grande desafio.

7 CONCLUSÕES

- Em experimentos de DLS, as duas proteínas apresentaram-se parcialmente polidispersas, com a polidispersividade diminuindo com o aumento da temperatura;

- Porém, apesar dessa agregação em solução, as proteínas estão estruturadas, apresentando cerca de 40 % de α -hélices, como observado nos experimentos de CD;

- A mutação (K160A e E161A), a princípio, provocou a insolubilidade da proteína Pb27r-mut;

- Em análises por SDS-PAGE e espectrometria de massas, uma região de aproximadamente 25 kDa se manteve constante quando as proteínas, Pb27r-CHis e Pb27r-NHis, sofreram proteólise limitada;

- A imunização de coelho com a Pb27r-NHis levou à produção de grande quantidade de anticorpos anti-Pb27.

7 PERSPECTIVAS

- Melhorar o grau de polidispersividade das duas construções, Pb27r-CHis e Pb27r-NHis através do teste de novos tampões, com diferentes valores de pH.

- Seqüenciar a proteína mutada – Pb27r-mut e realizar testes de reconhecimento por anticorpos anti-Pb27.

- Identificar a região da proteína menos susceptível à proteólise através do seqüenciamento de seus aminoácidos

- Imobilizar anticorpos anti-Pb27 e utilizá-los para purificação da Pb27 nativa a partir do extrato do fungo *P. brasiliensis*.

- Insistir em testes de cristalização para as duas construções.

- Realizar espectrometria de massas para as proteínas marcadas com Se-Met para confirmação dessa marcação;

- Seqüenciar os fragmentos obtidos pela proteólise limitada das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis;

- Realizar proteólise limitada da Pb27r-GST clivada e comparar com o perfil apresentado pelas proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis.

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] SAN BLAS, G., NINO-VEGA, G., ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol** 2002; 40:225–42.
- [2] BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGILL A, DOMINIK. B. Small Subunit Ribosomal DNA Sequence Shows *Paracoccidioides brasiliensis* Closely Related to *Blastomyces dermatitidis* **Journal of Clinical Microbiology** 2000, 38 (9): 3190-3193.
- [3] BRUMMER, E., CASTANEDA, E., RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin. Microbiol. Rev** 1993, 6: 89–117.
- [4] CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, L. A., 1, DÍEZ, S., ARANGO, M., MCEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev Iberoam Micol** 1999, 16: 216-220.
- [5] SHOME, S. K., BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev Fac Med Univ Fed Ceara** 1963, 3: 90–4.
- [6] GROSE, E., TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. **Sabouraudia** 1965, 4: 124–5.
- [7] FERREIRA, M. S., FREITAS, L. S., LACAZ, C. S., DEL NEGRO, G. M., AIELO, N. T., GARCIA, M. N., ASSIS, C. M., SALEBIAN, A., HEINS-VACCARI, E. M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain

from dog food probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **J Med Vet Mycol** 1990, 38: 253–6.

[8] BAGAGLI, E., THEODORO, R. C., BOSCO, S. M. G., MCEWEN, J. G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia** 2008, 165: 197–207.

[9] KANETSUNA F, CARBONELL LM, AZUMA I, YAMAMURA Y. Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol** 1972, 110:208–18.

[10] RESTREPO-MORENO, A. Paracoccidioidomycosis. In: **Fungal Infections and Immune Responses**, 1993, 251-276.

[11] SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. **Mycopathologia**, 1977; 62: 77-86.

[12] SAN-BLAS, G., SAN-BLAS, F. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Fungal Dimorphism (Szaniszlo, P., ed.). **Plenum Press** 1985, New York, NY, USA, 93.

[13] SAN-BLAS, G., NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and host response. In: Cihlar RL, Calderone RA, editors. **Fungal pathogenesis: principles and clinical applications** 2001, New York: Marcel Dekker.

[14] FAVA, S. C., FAVA NETTO, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1998 40: 155–164.

[15] HAMDAN, J. S., ROCHA, R. I. Epidemiologia da Paracoccidioidomicose. **An. Fac. Med. UFMG** 1987 36(1/2): 52-61.

- [16] COUTINHO, Z. F., SILVA, D., LAZÉRA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R. M., SABROZA, P. C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública** 2002, 18: 1441-54.
- [17] MENDES-GIANNINI, M. J., SOARES, C. P., MONTEIRO DA SILVA, J. L., ANDREOTTI, P. F. Interaction of pathogenic fungi with host cells: Molecular and cellular approaches. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 2005, 45: 383–94.
- [18] FILLER, S. G., SHEPPARD, D. C. Fungal invasion of normally nonphagocytic host cells. **PLoS Pathog.** 2006, 2:e129.
- [19] MENDES-GIANNINI, M. J., HANNA, S.A., MONTEIRO DA SILVA, J. L., ANDREOTTI, P. F., BENARD, G., LENZI, H. L., SOARES, C. P. Invasion of epithelial mammalian cells by *Paracoccidioides brasiliensis* leads to cytoskeletal rearrangement and apoptosis of the host cell. **Microb Infect.** 2004, 6: 882–91.
- [20] FRANCO, M. F., MONTENEGRO, M. R., MENDES, R. P., MARQUES, S. A., DILLON, N. L., MOTA, N. G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med trop** 1987 20(2): 129-32.
- [21] BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN, D., SHU, X., WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **TRENDS in Microbiology** 2002. 10(2).
- [22] CORREA, M. M., BEDOYA, A. M., GUERRERO, M. P., MENDEZ, J., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. **Mycoses** 2006, 50: 41–47.
- [23] LONDERO, A. T. Paracoccidioidomicose. I – Patogenia, formas clínicas, manifestações pulmonares e diagnóstico. **J Pneumol.** 1986, 12(1): 41-60.

- [24] DÍEZ, S., GOMEZ, B. L., MCEWEN, J. G., RESTREPO, A., HAY, R. J., HAMILTON, A. J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-Kilodalton antigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology** 2003, 41(4): 536–1542.
- [25] ALBUQUERQUE, C. F., MARQUES DA SILVA, S. H., CAMARGO, Z. P. Improvement of the Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis **Journal of Clinical Microbiology** 2005, p. 1944–1946
- [26] GOLDANI, L. Z., SUGAR, A. M. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg.** 1998, 58: 152-153.
- [27] GOMES, G. M., CISALPINO, P. S., TABORDA, C. P., CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol.** 2000, 38: 3478-3480.
- [28] ITANO, E. N., UNO, J., SANO, A., YARITA, K., KAMEI, K., MIYAJI, M., NISHIMURA, K., MIKAMI, Y. Detection of the gp43 gene and (1,3) - β - D glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. **J Med Mycol** 2002, 43: 29-35.
- [29] ODDS, F. C., BROWN, A. J. P., GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends Microbiol** 2003, 11: 272–9.
- [30] SHIKANAI-YASUDA, M. A., QUEIROZ-TELLES, F., MENDES, R. P., COLOMBO, A. L., MORETTI, M. L. Consenso em paracoccidioidomicose. **Rev Soc Bras Med Trop** 2006, 39: 297–310.

- [31] SAN-BLAS, G., NINO-VEJA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia** 2008, 165: 183–195.
- [32] MCEWEN, J. G., ORTIZ, B. L., GARCIA, A. M., FLOREZ, A. M., BOTERO, S., RESTREPO, A. Molecular Cloning, Nucleotide Sequencing, and Characterization of a 27-kDa Antigenic Protein from *Paracoccidioides brasiliensis* **Fungal Genetics and Biology** 1996, 20: 125–131.
- [33] CISALPINO, P. S., PUCCIA, R., YAMAUCHI, L. M., CANO, M. I. N., FRANCO DA SILVEIRA, J., TRAVASSOS, L. R.. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Biol. Chem.** 1996, 271: 4553–4560.
- [34] ORTIZ, B. L., GARCIA, A. M., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G.. Immunological characterization of the recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 1996, 3: 239–241.
- [35] DÍEZ, S., GARCIA, E. A., PINO, P. A., BOTERO, S., CORREDOR, G. G., PERALTA, L. A., CASTAÑO, J. H., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potencial use in ecological studies. **Rev. Inst. Med. Trop.** 1999, 41 (6): 351-357.
- [36] REIS, B. S., FERNANDES, V. C., MARTINS, E. M. N., SERAKIDES, R., GOES, A. M. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine** 2008, 26 (46): 5461-5469.
- [37] DURBIN, S. D.; FEHER, G. Protein crystallization. **Annu. Rev. Phys. Chem.** 1996, 47:171–204.

- [38] PUSEY, M. L.; LIU, Z-J, TEMPEL, W., PRAISSMAN, J., LIN, D., WANG, B-C., GAVIRA, J. A., NG, J. D. Life in the fast lane for protein crystallization and X-ray crystallography. **Progress in Biophysics and Molecular Biology** 2005, 88 : 359–386.
- [39] RHODES, G. Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models. 2^a ed. **Academic Press** 2000.
- [40] DEREWENDA, Z. S. The use of recombinant methods and molecular engineering in protein crystallization. **Methods**, 2004, 34: 354–363.
- [41]<http://www.doembi.ucla.edu/~sawaya/m230d/Crystallization/crystallization.html>. Acesso em dezembro de 2007.
- [42] <http://www.molbio1.princeton.edu/macro/about.html>. Acesso em dezembro de 2007.
- [43] GOULDING, C. W., PERRY, L. J. Protein production in *Escherichia coli* for structural studies by X-ray crystallography. **Journal of Structural Biology** 2003, 142: 133–143
- [44] SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1977, 74 (12): 5463-5467.
- [45] LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** 1970, 227: 680-683.
- [46] TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)** 1979, 76: 4350- 4354.

- [47] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal Biochem.** 1976, 72: 248-254.
- [48] FERRÉ-D'AMARÉ, A. R., BURLEY, S. K. Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies. **Structure** 1994, 2: 357-359.
- [49] SREERAMA, N., WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. **Methods in Enzymology** 2004; 383: 318-351
- [50] DEREWENDA, Z. S. Rational Protein Crystallization by Mutational Surface Engineering. **Structure** 2004, 12: 529–535.
- [51] SARKAR, G., SOMMER, S. S. The "megaprimer" strategy of site directed mutagenesis. **BioTechniques** 1990, 8: 404-407.
- [52] TYAGI, R., LAI, R., DUGGLEBY, R. G. A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. **BMC Biotechnology** 2004, 4: 1-6.
- [53] GAO, X., BAIN, K., BONANNO, J. B., BUCHANAN, M., HENDERSON, D., LORIMER, D., MARSH, C., REYNES, J. A., SAUDER, J. M., SCHWINN, K., THAI, C., BURLEY, S. K. High-throughput limited proteolysis/mass spectrometry for protein domain elucidation. **Journal of Structural and Functional Genomics** 2005, 6: 129–134.
- [54] LUNDE, M. N., OTTESEN, E. A., CHEEVER, A. W. Serological Differences between Acute and Chronic Schistosomiasis *Mansoni* Detected by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 1979, 28(1): 87-91

- [55] HARTLEY, J. L., TEMPLE, G. F., BRASCH, M. A. DNA Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. **Genome Research** 2000, 10: 1788-1795.
- [56] HANDBOOK: Gateway® Technology with Clonase™ II Version A 24 June 2004 25-0749 - <http://www.invitrogen.com>
- [57] HUBBARD, S. J. The structural aspects of limited proteolysis of native proteins. **Biochimica et Biophysica Acta** 1998, 1382: 191-206.
- [58] FONTANA, A., POLVERINO DE LAURETO, P., DE FILIPPIS, V., SCARAMELLA, E., ZAMBONIN, M. Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. **Folding and Design** 1997, 2 (2): R17-R26
- [59] ROSENBERG, I. M. Protein Analysis and Purification – Benchtop Techniques. **Birkhauser Boston** 1996.
- [60] ZOU, H., LUO, Q., ZHOU, DONGMEI. Affinity membrane chromatography for the analysis and purification of proteins. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods** 2001, 19 (1-3): 199-240.
- [61] CHARCOSSET, C. Purification of proteins by membrane chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 1998, 71: 95-110.