

Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Bioquímica e Imunologia

**Caracterização estrutural da forma recombinante
da proteína Pb27 de *Paracoccidioides
brasilensis***

Juliana Barbosa Coitinho

Belo Horizonte

2009

Juliana Barbosa Coitinho

**Caracterização estrutural da forma recombinante
da proteína Pb27 de *Paracoccidioides
brasilensis***

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Estrutura e função de proteínas e peptídeos

Orientador:

Ronaldo Alves Pinto Nagem

Co-orientador:

Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2009

Dedico aos meus pais, minhas
irmãs e a todos aqueles que tornaram tudo isso
possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me dá forças quando tudo parece grande demais para ser alcançado;

Aos meus pais, Advarte e Nalzirene, pelo amor e apoio incondicionais, responsáveis pela base de tudo o que sou;

Às minhas irmãs, Luciana e Tatiane, por serem imprescindíveis em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem, pela boa convivência, amizade e ensinamentos científicos;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Alfredo de Miranda Góes, por sua simplicidade grandiosa e por me aceitar como agregada em seu laboratório;

Aos meus amigos de Viçosa, especialmente as atuais republicanas Lu e Fê, pelos anos maravilhosos juntos;

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Luara, Cris, Caryne, Jonas, Alê Zonari, Alê, Estefânia, Débora, Mário, Paula, Elis, Vivi Gomide, Carol, Ju Lott, Rafa, Suzana, Gui, Tércio, Naira, Inácio, Jankerle, Gerluza, Luciana, Pat. Em especial à Vivi, por ser minha irmãzinha querida; Cíntia, pelas gargalhadas juntas; Marina, por sua amizade gratuita; Luiza e Nati, por sua alegria e Betinha, por ser nossa fada-madrinha.

A todos os amigos de Bases, em especial: Flávia, Louisa, Luara, Natássia e Paula pela amizade e momentos de alegria inesquecíveis.

Ao pessoal do Laboratório de Físico-Química de Proteínas, em especial: Polly, Denise, Thaís, Felipe, Jamil, Kaká e Cecília. Ao Agenor, pela essencial ajuda na espectrometria de massas;

Ao recente Laboratório de Biologia Estrutural, do qual participo junto com Jacque, Débora e Simara;

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pelas contribuições grandiosas e por permitirem a realização desse trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, por permitir a realização de diversos experimentos.

Ao Prof. Dr. Chuck Farah e à doutoranda Cristiane Guzzo, por me acolherem tão bem em seu laboratório, mesmo que pelo curto período;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento da bolsa e apoio financeiro.

A sabedoria: 'Ela o cumula de alegrias, desvenda-lhe seus segredos e enriquece-o com tesouros de ciência, de inteligência e de justiça' (Ecle. 4, 22)

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do
Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

COITINHO, J. B. **Caracterização estrutural da forma recombinante da proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2009. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma das mais importantes micoses sistêmicas do Brasil. O agente etiológico da doença é o fungo termo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A infecção causa lesões nos pulmões e pode disseminar para outros órgãos e tecidos. No entanto, ainda não existe um protocolo específico de controle da doença nem diagnóstico padronizado ou protocolo de tratamento. O antígeno recombinante de 27k-Da (Pb27r) tem sido utilizado com alta especificidade e sensibilidade no diagnóstico da PCM, mas sua função biológica no fungo é desconhecida. Além disso, nenhuma outra proteína similar foi descrita nos bancos de dados. O gene para a Pb27 foi inicialmente clonado em nosso laboratório no vetor de expressão fusionado à GST, mas as tentativas de cristalizar a proteína purificada falharam e construções diferentes foram preparadas. O gene para a Pb27 foi subclonado no vetor de expressão pET-DEST42 com cauda de histidinas C-terminal. Pb27r-CHis foi expressa em *E. coli* BL21 e purificada utilizando cromatografia de afinidade. Para confirmar a expressão da proteína, foi realizado um *Western blot* utilizando soro de camundongos anti-Pb27. Ensaios de cristalização da Pb27r-CHis foram inicialmente realizados através de kits de cristalização utilizando a técnica de difusão de vapor, mas nenhum cristal de proteína foi observado. Outras 544 condições foram testadas automaticamente, mas novamente, cristais não se formaram. Nesse meio tempo, o gene da Pb27 foi subclonado em outro vetor de expressão (pDEST 17) com cauda de histidina N-terminal (Pb27r-NHis). Essa proteína foi expressa e purificada seguindo o mesmo protocolo para a Pb27r-CHis, mas, novamente, nenhum cristal foi observado. Os resultados dos experimentos de espalhamento dinâmico da luz (DLS) e dicroísmo circular (CD) indicaram que as duas proteínas, apesar de parcialmente polidispersas em solução, apresentavam-se estruturadas, com cerca de 40 % de α -hélices. Na tentativa de facilitar a formação de cristais pela minimização da entropia de superfície da proteína Pb27r, foi realizada mutação sítio dirigida para trocar dois resíduos teoricamente de superfície, K e E por duas A. Essa proteína (Pb27r-mut) foi clonada no vetor pDEST 17 mas se tornou insolúvel. Para remover regiões protéicas mais flexíveis que dificultam a formação de cristais, as proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis foram submetidas à proteólise limitada com tripsina. Uma região de aproximadamente 25 kDa se manteve constante nas duas construções quando analisadas por SDS-PAGE e MALDI-MS. Como até o momento, todas as tentativas de cristalizar a Pb27 recombinante não foram bem sucedidas, tentativas de cristalização da proteína

nativa através de sua purificação por afinidade utilizando anticorpos anti-Pb27 obtidos da imunização de coelho serão realizadas. O estudo da estrutura tridimensional desta proteína permitirá um entendimento mais detalhado desta molécula, tal como a localização de seus epitopos e seu dobramento. Além disso, a informação estrutural dessa proteína provavelmente ajudaria a identificar sua função no fungo *P. brasiliensis*.

Palavras chave: Paracoccidoidomicose, Pb27, cristalização

ABSTRACT

COITINHO, J. B. Structural characterization of recombinant form of the protein Pb27 from *Paracoccidioides brasiliensis*. 2009. Dissertation (Masters). Departamento de Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most important systemic mycoses in Brazil. The etiologic agent of the disease is the thermal dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The infection causes lesions in the lungs and can disseminate to other organs and tissues. So far, there is no specific control program, standardized diagnostic or treatment protocol for this disease. The recombinant 27-kDa antigen (Pb27r) has been used with high sensibility and specificity in the diagnosis of PCM but its biological function in the fungus is unknown. Besides, no other similar protein has been described so far in databases. The gene of Pb27 was initially cloned in our laboratory into the expression vector pGEX with a GST-tag, but the attempts to crystallize the purified protein were unsuccessful and different constructs have been prepared. The gene was subcloned into the expression vector pET-DEST42 with a His-tag at the C-terminus. Pb27r-CHis was expressed in *E. coli* BL21 and purified using a metal-affinity chromatography. To confirm the Pb27r expression, a Western blot using mouse anti-Pb27 serum was performed. Crystallization of Pb27r-CHis was initially performed with commercially available sparse-matrix screens using the hanging-drop vapour diffusion technique. So far, no protein crystals have been observed and others 544 conditions were tested automatically, but no crystals were formed again. In the mean time, the Pb27 gene was also subcloned into another expression vector (pDEST 17) with an N-terminal His-tag (Pb27r-NHis). This protein was expressed and purified using the same protocol for Pb27r-CHis but the initial crystallization attempts did not produce crystals. The results of the experiments of dynamic light scattering (DLS) and circular dichroism (CD) showed that the proteins, although partially polydispersed in solution, were structured, with about 40% of α -helix. In an attempt to facilitate the formation of crystals by minimizing the entropy of the Pb27r surface, site directed mutation was held to exchange two theoretically surface residues, E and K for two A. This protein (Pb27r-mut) was cloned in the vector pDEST 17 but became insoluble. To remove more flexible protein regions that hinder the formation of crystals, the proteins Pb27r-CHis and Pb27r-NHis were subjected to limited proteolysis with trypsin. A region of approximately 25 kDa remained constant in the two constructs when analyzed by SDS-PAGE and MALDI-MS. As so far, all attempts to crystallize the recombinant Pb27 failed, the crystallization of the native protein through its affinity purification by using anti-Pb27 antibodies obtained from the immunization of rabbits will be performed. The study of the three-dimensional

structure of this protein will enable a more detailed understanding of this molecule, such as the location of their epitopes and its folding. Besides, structural information about this protein could probably help to identify its biological function on *P. brasiliensis*.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, Pb27, crystallization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transição de fase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	3
Figura 2 - Distribuição geográfica dos casos de PCM nas Américas Central e do Sul. .	6
Figura 3 - Ciclo biológico hipotético de <i>P. brasiliensis</i> demonstrando a sua transição de fases.....	7
Figura 4 - Imunolocalização da Pb27 em células leveduriformes de <i>P. brasiliensis</i>	13
Figura 5 - Etapas da resolução de estruturas de proteínas por cristalografia de raios-X	17
Figura 6 - Estratégias para produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	20
Figura 7 - Esquema representando as reações de recombinação BP e LR e os vetores envolvidos.....	30
Figura 8 - Esquema do protocolo de mutação sítio dirigida	49
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.	57
Figura 10 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando a amplificação da seqüência codificadora para Pb27.	58
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.	59
Figura 12 - Desenho esquemático do plasmídeo pET-DEST42.	60
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.	61
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.....	62
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.....	64
Figura 16 - <i>Western blot</i> da expressão da Pb27r-CHis utilizando soro de camundongos imunizados com Pb27.....	65
Figura 17 - SDS-PAGE 10% contendo a Pb27r-CHis após purificação em coluna de afinidade HisTrap HP.....	66
Figura 18 - Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® mostrando a amplificação da seqüência codificadora para Pb27	69
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	70
Figura 20 -.Desenho esquemático do plasmídeo pDEST 17.....	71

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	72
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 ...	73
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.....	74
Figura 24 - Western blot da expressão da Pb27r-NHis utilizando anticorpo anti-His diluído 1:3.000 em PBS-caseína.....	75
Figura 25 -.SDS-PAGE 10% contendo a Pb27r-NHis após purificação em coluna de afinidade HisTrap HP.....	76
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	78
Figura 27 -.Análise de dicroísmo circular das proteínas Pb27r-CHis (A) e Pb27r-NHis (B) em diferentes temperaturas	80
Figura 28 -.Resultados da deconvolução dos espectros apresentados na figura 28 pelo programa CDNN versão 2.....	82
Figura 29 –Mutações propostas pelo servidor SER-Server para a Pb27.....	84
Figura 30 -.Seqüências de aminoácidos e de nucleotídeos para a Pb27 a serem mutados.....	84
Figura 31 -Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® contendo do produto da primeira PCR necessária para a mutação (megaprimer).	85
Figura 32 -Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® contendo do produto da segunda reação de PCR para amplificação da seqüência da Pb27 mutada	86
Figura 33 -.Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDONR-Pb27mut.	87
Figura 34 -.Gel de agarose 1% corado com SyberSafe® do PCR de colônias contendo o plasmídeo pDEST-Pb27mut.	88
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.....	89
Figura 36 - Western blot da expressão da Pb27r-mut utilizando anticorpo anti-His diluído 1: 3.000 em PBS-caseína.....	90
Figura 37 -.SDS-PAGE 15% contendo o resultado da ação da tripsina sobre a Pb27r-CHis (A) e Pb27r-NHis (B)	93
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)	95
Figura 39 -.Titulação de anticorpos anti-Pb27r em soro de coelho imunizado com a proteína Pb27r-NHis	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela clivagem teórica da proteína Pb27r-CHis por tripsina e suas respectivas massas.	96
Tabela 2: Seqüência de aminoácidos dos peptídeos obtidos pela clivagem teórica da proteína Pb27r-NHis por tripsina e suas respectivas massas..	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetronitrila
cAMP	AMP cíclico
CD	dicroísmo circular
Da	Dalton
kDa	quiloDalton (10^3 Da)
DAB	3,3'-aminobenzidina
DLS	espalhamento dinâmico da luz
DNA	ácido desoxirribonucléico
D.O.	densidade ótica
DTT	ditiotreitól
et al.	e demais colaboradores
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	imunoensaio enzimático
g	grama
GST	glutathione S-transferase
HCCA	ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
mg	miligrama (10^{-3} g)
μ g	micrograma (10^{-6} g)
ng	nanograma (10^{-9} g)
°C	graus Celsius
h	hora
L	litro
ml	mililitro (10^{-3} L)
μ l	microlitro (10^{-6} L)

LB	meio de cultura Luria-Bertani
nm	nanômetro (10^{-9} m)
M	concentração molar (moles/L)
MALDI	ionização a laser assistida por matriz
MS	espectrometria de massas
mM	concentração milimolar (10^{-3} moles/L)
mmol	milimol (10^{-3} moles)
μ M	concentração micromolar (10^{-6} moles/L)
nM	concentração nanomolar (10^{-9} moles/L)
pmol	picomol (10^{-12} moles)
min	minuto
s	segundo
PBS	tampão fosfato-salina
PCR	reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
pH	potencial hidrogeniônico
pI	potencial isoelétrico
PM	peso molecular
%	porcentagem
% (p/v)	porcentual peso por volume
% (p/p)	porcentual peso por peso
% (v/v)	porcentual volume por volume
rpm	rotações por minuto
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
TE	tampão TE (Tris-EDTA)
TEMED	N,N,N',N' – tetrametiletilenodiamina
TFA	ácido trifluoracético

TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
U	unidade de atividade enzimática
V	Volts
W	Watts

As demais abreviaturas e siglas serão explicadas quando forem citadas pela primeira vez no texto.

Abreviações (em uma e três letras) dos resíduos de aminoácidos

A	Ala	Alanina
C	Cys	Cisteína
D	Asp	Aspartato
E	Glu	Glutamato
F	Phe	Fenilalanina
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
K	Lys	Lisina
L	Leu	Leucina
M	Met	Metionina
N	Asn	Asparagina
P	Pro	Prolina
Q	Gln	Glutamina
R	Arg	Arginina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
V	Val	Valina

W	Trp	Triptofano
Y	Tyr	Tirosina
	MSE	Selênio-metionina (Se-Met)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	2
1.2 - Paracoccidioidomicose (PCM)	5
1.2.1 - Infecção e formas clínicas da PCM.....	6
1.2.2 - Diagnóstico da PCM	8
1.2.3 - Tratamento da PCM	9
1.3 - A proteína Pb27	11
1.4 - Caracterização da estrutura tridimensional de proteínas.....	14
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 - Objetivo geral.....	26
3.2 - Objetivos específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 de <i>P. brasiliensis</i> em sistema de expressão procariótico com cauda de histidina C-terminal.....	29
4.1.1 - Ligação da seqüência codificadora da Pb27 no vetor doador pDONR 221 (reação BP)	32
4.1.2 - Transformação de bactérias com o plasmídeo recombinante	32
4.1.3 - Extração de DNA plasmidial	33
4.1.4 - Ligação da seqüência da Pb27 no vetor de expressão pET-DEST42 (reação LR) e transformação de bactérias <i>E. coli</i> BL21 com os plasmídeos recombinantes	34
4.1.5 - Seqüenciamento do fragmento inserido no vetor pET-DEST42.....	34
4.2 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 de <i>P. brasiliensis</i> em sistema de expressão procariótico com cauda de histidina N-terminal.....	35
4.3 - Eletroforese em gel de agarose	37
4.4 - Mini-Expressão das proteínas Pb27 recombinante com cauda de histidina C-terminal (Pb27r-CHis) e N-terminal (Pb27r-NHis).....	38
4.5 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida- SDS/PAGE 10%.....	39
4.6 - <i>Western blot</i>	40
4.7 - Expressão das proteínas recombinantes Pb27r-CHis e Pb27r-NHis	41
4.8 - Purificação das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis em coluna His Trap HP ..	42
4.9 - Determinação da concentração de proteínas	43
4.10 - Testes de cristalização.....	44
4.11 - Espalhamento dinâmico da luz (DLS – <i>dynamic light scattering</i>).....	45
4.12 - Dicroísmo circular (CD – <i>circular dichroism</i>).....	46

4.13 – Mutação sítio dirigida.....	47
4.14 - Proteólise limitada.....	51
4.15 - Imunização de coelho com a proteína Pb27r-NHis.....	52
4.15.1 - ELISA para dosagem de anticorpos.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 - Pb27r-CHis	56
5.1.1 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 no plasmídeo pET-DEST 42 e seqüenciamento	56
5.1.2 - Expressão da proteína Pb27r-CHis e purificação por cromatografia de afinidade.....	63
5.1.3 - Testes de cristalização da Pb27r-CHis	66
5.2 - Pb27r-NHis	68
5.2.1 - Subclonagem do gene codificador da proteína Pb27 no plasmídeo pDEST 17 e seqüenciamento	68
5.2.2 - Expressão e purificação da proteína Pb27r-NHis.....	74
5.2.3 - Testes de cristalização da Pb27r-NHis	76
5.3 - Caracterização estrutural das proteínas Pb27r-CHis e Pb27r-NHis.....	77
5.4 - Mutação sítio dirigida	83
5.5 - Proteólise limitada.....	91
5.6 - Imunização de coelho com a proteína Pb27r-NHis.....	98
6 DISCUSSÃO.....	101
7 CONCLUSÕES.....	107
8 PERSPECTIVAS.....	109
9 BIBLIOGRAFIA.....	111