

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

ALINE MENDES DA ROCHA

**ESTUDO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA Pb27 DE *Paracoccidioides
brasiliensis* COM UM LIGANTE NUCLEOTÍDICO E DE SUA
APLICAÇÃO EM UM BIOSSENSOR**

**Belo Horizonte,
Minas Gerais - Brasil
2020**

ALINE MENDES DA ROCHA

ESTUDO DE INTERAÇÃO DA PROTEÍNA Pb27 DE *Paracoccidioides brasiliensis* COM UM LIGANTE NUCLEOTÍDICO E DE SUA APLICAÇÃO EM UM BIOSSENSOR

Versão Final

**Orientador: Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem
Co-orientadora: Dr^a. Mariana Amalia Figueiredo Costa**

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2020**

043 Rocha, Aline Mendes da.
Estudo de interação da proteína Pb27 de *Paracoccidoides brasiliensis* com um ligante nucleotídico e de sua aplicação em um biossensor [manuscrito] / Aline Mendes da Rocha. - 2020.
101 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Ronaldo Alves Pinto Nagem. Co-orientadora: Mariana Amalia Figueiredo Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica. 2. Paracoccidiodomicose. 3. Nucleotidiltransferases. 4. Proteínas Recombinantes. 5. Técnicas Biossensoriais. I. Nagem, Ronaldo Alves Pinto. II. Costa, Mariana Amalia Figueiredo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ALINE MENDES DA ROCHA. Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de 2020 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" Estudo de interação da proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* com um ligante nucleotídico e de sua aplicação em um biossensor"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Ronaldo Alves Pinto Nagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Rafael Pinto Vieira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Rafaela Salgado Ferreira (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Mariana Amália Figueiredo Costa - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2020.

Dr. Rafael Pinto Vieira (UFMG)

Dr. Rafaela Salgado Ferreira (UFMG)

Dr. Mariana Amália Figueiredo Costa - Coorientadora (UFMG)

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem - Orientador (UFMG)

Prof. Lídia Quirino Vianna
 Coordenadora do Curso de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Geraldo e Perpétua, e ao meu irmão, Alan, por todo apoio que sempre forneceram, de todas as formas; por sempre estarem comigo e me incentivarem durante o mestrado.

Ao meu orientador, Prof. Ronaldo Nagem, por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela orientação e por todo suporte para a realização deste trabalho. À minha co-orientadora Mariana Costa, pelo treinamento, pela orientação e ajuda na execução deste trabalho.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Biologia Estrutural (Bioest): Marina, Ludmila, Arthur, Renato, Débora, Karim, Brisa, Tarcísio e Fernandes. Por toda a ajuda, por estarem disponíveis para discussões enriquecedoras, e por fazerem o ambiente de trabalho tão agradável. Também ao Téc. Jamil, por toda a ajuda que sempre disponibilizou ao nosso grupo.

À Prof. Mariana Quezado, pela colaboração nos ensaios de interação, em particular nos ensaios de ITC, e pela disponibilidade para discussões. Também ao Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt) e à Téc. Adriana, pela colaboração na realização dos ensaios de ITC, espectrometria de massas e dicroísmo circular.

Ao Dr. Luiz Heneine, e a todo o grupo do Serviço de Imunologia Aplicada da FUNED, Robson, Verônica, Rejane, Jean e Tiago, pelo acolhimento e colaboração no trabalho com biossensores.

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), pela infraestrutura aberta aos pesquisadores brasileiros. Ao LNLS, onde realizamos experimentos de Difração de Raios-X, e ao Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do LNBio, onde alguns ensaios de ITC foram realizados.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, incluindo professores, funcionários e técnicos-administrativos, por trabalharem pelo bom funcionamento do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

À CAPES, pela bolsa concedida, e às demais agências financiadoras.

A todos os que lutam pelo ensino superior gratuito, de qualidade e acessível, e pelo desenvolvimento da pesquisa científica de qualidade no Brasil.

Muito obrigada!

RESUMO

A proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* é um antígeno que tem sido estudado para a produção de vacinas e no diagnóstico da Paracoccidioidomicose (PCM), principal micose sistêmica da América Latina, cuja importância epidemiológica se deve à extensa área de endemicidade no Brasil, e ao acometimento de trabalhadores rurais em idade ativa. Recentemente, o primeiro modelo de estrutura da Pb27 foi determinado por cristalografia por difração de raios-X, e através de estudos de homologia estrutural a proteína foi classificada como uma nucleotidiltransferase de função desconhecida. Além disso, a triagem virtual de ligantes e estudos de ressonância nuclear magnética identificaram o nucleotídeo citidina trifosfato (CTP) como provável ligante da proteína. A fim de caracterizar quantitativamente a interação da Pb27 com esse nucleotídeo, foram realizados ensaios de interação por supressão de fluorescência de triptofano, fluorimetria diferencial de varredura e calorimetria de titulação isotérmica. Os resultados indicaram uma interação fraca, com constante de dissociação da ordem de 10^{-3} M, exotérmica ($\Delta H = -34,3$ KJ/mol) e exergônica ($\Delta G = -15,9$ KJ/mol). Além disto, foram feitos estudos preliminares da utilização da proteína para a detecção de anticorpos anti-Pb27 em um biossensor impedimétrico, para futura utilização no diagnóstico da PCM. Os resultados indicaram o reconhecimento dos anticorpos pela proteína, por análise de espectroscopia de impedância eletroquímica. Porém, ainda são necessários mais estudos para a padronização dos biossensores, e futuros testes com o soro de pacientes.

Palavras-chave: *Paracoccidioidomicose, Pb27, nucleotidiltransferase, proteína recombinante, interação proteína-ligante, constante de dissociação, biossensores.*

ABSTRACT

The protein Pb27 from *Paracoccidioides brasiliensis* is an antigen that has been studied for the production of vaccines and in the diagnosis of Paracoccidioidomycosis (PCM), the main systemic mycosis in Latin America, which epidemiological importance is due to its extensive area of endemicity in Brazil, and to the involvement of active age rural workers. Recently, the first structure model of Pb27 was determined by X-ray diffraction crystallography, and by structural homology studies the protein was classified as a nucleotidyltransferase of unknown function. In addition, virtual ligand screening and nuclear magnetic resonance studies have identified cytidine triphosphate (CTP) nucleotide as a likely protein ligand. In order to characterize quantitatively Pb27's interaction with this nucleotide, interaction assays were performed by quenching of tryptophan fluorescence, differential scanning fluorimetry and isothermal titration calorimetry. The results indicated a weak interaction, with a dissociation constant of 10^{-3} M order, exothermic ($\Delta H = -34,3$ KJ/mol) and exergonic ($-15,9$ KJ/mol). Moreover, we carried out preliminary studies on the protein's use in detection of anti-Pb27 antibodies in an impedimetric biosensor, for future use in PCM diagnosis. The results indicated the recognition of antibodies by the protein, by electrochemical impedance spectroscopy analysis. However, more studies are still needed for the standardization of biosensors, and future tests with patient sera.

Keywords: *Paracoccidioidomycosis, Pb27, nucleotidyltransferase, recombinant protein, protein-ligand interaction, dissociation constant, biosensors.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação em <i>cartoon</i> da estrutura tridimensional da proteína Pb27 de <i>P. brasiliensis</i>	19
Figura 2	<i>Docking</i> do nucleotídeo CTP no provável sítio de ligação da Pb27....	20
Figura 3	Espectro de RMN (¹ H- ¹⁵ N HSQC) da Pb27 na presença de CTP.....	21
Figura 4	Curva genérica de ocupação de sítio por ligante.....	23
Figura 5	Espectro de absorção na região do ultravioleta de aminoácidos aromáticos.....	25
Figura 6	Exemplo de gráfico de Stern-Volmer.....	27
Figura 7	Curva de desnaturação térmica de proteínas utilizando SYPRO® Orange.....	29
Figura 8	Exemplo de curva para determinação da constante de dissociação por TSA.....	30
Figura 9	Calorimetria de titulação isotérmica.....	32
Figura 10	Diagramas de Nyquist (a) e Bode (b).....	36
Figura 11	Circuito equivalente de Randles simplificado.....	37
Figura 12	Organização do plasmídeo pET28a(TEV)-Pb27.....	39
Figura 13	Sensor utilizado nos testes de imobilização.....	51
Quadro 1	Alinhamento da sequência de aminoácidos da rPb27 com a sequência de referência XP_010763645.1.....	53
Figura 14	Colônias de <i>E. coli</i> BL21(DE3) selecionadas em ágar LB + KAN.....	54
Figura 15	Eletroforese da expressão de rPb27.....	54
Figura 16	Cromatograma da primeira cromatografia de afinidade ao níquel para purificação da rPb27.....	55
Figura 17	Cromatografia de dessalinização para purificação da rPb27.....	56
Figura 18	Cromatograma da segunda cromatografia de afinidade ao níquel para purificação da Pb27.....	57
Figura 19	Cromatografia da gel-filtração para purificação da rPb27.....	58
Figura 20	Eletroforese das etapas de purificação da rPb27.....	58
Figura 21	Espectro de massa da proteína rPb27.....	59
Figura 22	Resultados da análise de DLS da rPb27.....	60
Figura 23	Análise de dicroísmo circular da proteína rPb27 (25 °C).....	61
Figura 24	Localização dos resíduos de triptofano e dos resíduos do sítio de ligação putativo da rPb27.....	62
Figura 25	Gráficos de emissão de fluorescência da rPb27 na presença de CTP e CMP.....	63
Figura 26	Gráfico de Stern-Volmer para a interação Pb27 com os nucleotídeos CTP e CMP.....	64
Figura 27	Isotermas para estimativa do K _d por fluorimetria da interação rPb27:CTP e rPb27:CMP.....	65
Figura 28	Curvas de desnaturação térmica da rPb27 na presença de CTP.....	66
Figura 29	Curva para determinação do K _d da interação Pb27:CTP por TSA.....	67
Figura 30	Curvas de desnaturação térmica da rPb27 na presença de CMP.....	68
Figura 31	Variação de T _m da rPb27 em função da concentração de CMP.....	69
Figura 32	Termograma e isoterma da titulação de Pb27 com CTP.....	70
Figura 33	Estruturas químicas dos nucleotídeos CTP e CMP.....	73
Figura 34	Resultados do reconhecimento de anticorpos anti-Pb27 por ELISA....	75
Figura 35	Diagrama de Nyquist e circuito elétrico equivalente do sensor N18.....	77

Figura 36	Resultados de resistência à transferência de carga (R_{tc}) e impedância (Z) do sensor N18.....	78
Figura 37	Diagrama de Nyquist e circuito elétrico equivalente do sensor G4.....	79
Figura 38	Resultados de resistência à transferência de carga (R_{tc}) e impedância (Z) do sensor G4.....	79
Figura 39	Diagrama de Nyquist dos sensores N20 e N27.....	80
Figura 40	Resultados de resistência à transferência de carga (R_{tc}) e impedância (Z) dos sensores N20 e N27.....	81
Figura 41	Diagrama de Nyquist e circuito elétrico equivalente dos sensores R01 e R36.....	81
Figura 42	Resultados de resistência à transferência de carga (R_{tc}) e impedância (Z) dos sensores R01 e R36.....	82

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1	Quantidade de proteína obtida após as etapas de cromatografia para a purificação da rPb27.....	59
Tabela 2	Valores estimados de K_{sv} e K_q para os nucleotídeos CTP e CMP.....	64
Tabela 3	Parâmetros termodinâmicos de interação da rPb27 com CTP estimados por diferentes técnicas.....	71

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	Absorbância
ACN	Acetonitrila
ATP	Adenosina trifosfato
c	Concentração
CD	Dicroísmo circular (<i>Circular Dichroism</i>)
C_{dc}	Capacitância de dupla camada
CMP	Citidina monofostato
CPE	Elemento de fase constante (<i>Constant Phase Element</i>)
CTP	Citidina trifosfato
d	Caminho ótico
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (<i>Dinamic Light Scattering</i>)
DSF	Fluorimetria Diferencial de Varredura (<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>) = TSA
D_T	Coefficiente de difusão translacional
DTT	Ditiotreitol
E	Potencial elétrico
EIE	Espectroscopia de impedância eletroquímica
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado a enzima (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
F_0	Fluorescência na ausência de ligante/ <i>quencher</i>
F ou $F_{[L]}$	Fluorescência sob determinada concentração de ligante/ <i>quencher</i>
F_c	Fluorescência após supressão máxima pelo ligante/ <i>quencher</i>
FI	Fração insolúvel
FPLC	Cromatografia Líquida Rápida de Proteína (<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
FS	Fração solúvel
FT	<i>Flow-Through</i>
g	Gramas
g	Unidade de aceleração (gravidade)
i	Número de injeção
I	Corrente elétrica
IFN- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil β -1-D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)
j	Número imaginário
K_a	Constante de associação
KAN	Canamicina
K_b	Constante de Boltzmann
K_d	Constante de dissociação
k_{off}	Constante cinética de dissociação
k_{on}	Constante cinética de associação
K_q	Constante de velocidade de supressão bimolecular
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
L	Ligante
l	Caminho ótico
LB	Meio Luria-Bertani
m	massa

M	Concentração molar
mg	miligrama
mL	mililitros
mM	milimolar
MS	Espectrometria de massa (<i>Mass Spectrometry</i>)
Mw	Peso molecular (<i>Molecular Weight</i>)
MRW	Massa média residual
p/v	Peso por volume
P	Proteína
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
pTEV	Protease de <i>Tobacco etch Virus</i>
q	Calor
Q	Supressor de fluorescência (<i>quencher</i>)
R	Resistência (eletroquímica)
R	Constante universal dos gases perfeitos (termodinâmica)
R _e	Resistência do eletrólito
R _h	Raio hidrodinâmico
RMN	Ressonância magnética nuclear
R _{tc}	Resistência à transferência de carga
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil- sulfato de sódio
T	Temperatura
TFA	Ácido Trifluoroacético
T _m	Temperatura de desnaturação (<i>melting temperature</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Ensaio de <i>Thermal Shift (Thermal Shift Assay)</i> = DSF
v	Volume
v/v	Volume por volume
X _c	Reatância
Z	Impedância
Z _{im}	Impedância imaginária
Z _{re}	Impedância real
Z _w	Impedância de Warburg
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Entalpia
ΔS	Entropia
ε	Coefficiente de extinção molar
η	Viscosidade
θ	Fração de sítios ocupados
θ	Elipticidade (em dicroísmo circular)
[θ] _{mrw}	Elipticidade residual média
λ	Comprimento de onda
τ ₀	Tempo de vida do fluoróforo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
φ	Ângulo de fase
ω	Frequência
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 <i>Paracoccidoides brasiliensis</i> e Paracoccidiodomicose.....	14
2.2 Proteína Pb27 de <i>Paracoccidoides brasiliensis</i>: características imunológicas e estruturais.....	16
2.3 Interação entre proteínas e ligantes.....	21
2.3.1 Supressão (<i>quenching</i>) da fluorescência intrínseca de proteínas.....	24
2.3.2 Fluorimetria diferencial de varredura ou ensaio de <i>thermal shift</i>	28
2.3.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	30
2.4 Biossensores eletroquímicos em imunodiagnóstico.....	33
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivos gerais.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Expressão e purificação da proteína rPb27.....	39
4.1.1 Transformação da <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) e expressão da rPb27	39
4.1.2 Purificação da Proteína rPb27.....	41
4.1.3 Eletroforese das amostras proteicas.....	42
4.2 Caracterização da rPb27.....	43
4.2.1 Avaliação da massa molecular por espectrometria de massa.....	43
4.2.2 Avaliação do estado oligomérico e enovelamento da proteína.....	43
4.3 Análises da interação da rPb27 com nucleotídeos de citidina.....	45
4.3.1 Análise de interação por supressão da fluorescência de triptofano.....	46
4.3.2 Análise de interação por TSA.....	47
4.3.3 Análise de interação por ITC.....	48
4.4 Análise da detecção de anticorpos anti-Pb27.....	49
4.4.1 Análise da detecção de anticorpos anti-Pb27 por ELISA.....	49
4.4.2 Construção e teste do biossensor para detecção de anticorpos anti-rPb27.....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Produção e caracterização da Pb27 recombinante.....	53
5.2 Interação da rPb27 com nucleotídeos de citidina.....	62
5.2.1 Resultados da fluorimetria intrínseca de triptofano.....	62
5.2.2 Resultados de TSA.....	66
5.2.3 Resultados de ITC.....	69
5.2.4 Interação entre rPb27 e CTP.....	71
5.3 Construção e análise do biossensor.....	75
5.3.1 Reconhecimento dos anticorpos por ELISA.....	75
5.3.2 Construção e teste dos biossensores.....	76
6 CONCLUSÕES.....	84
7 PERSPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICES.....	97
ANEXOS.....	98

1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) constitui a principal micose sistêmica da América Latina, sendo causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*. Como uma doença infecciosa tropical e de caráter ocupacional, que afeta principalmente trabalhadores rurais em idade ativa, ainda são necessários esforços para o controle público da doença (Martinez, 2017; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017). Diversos fatores dificultam seu diagnóstico e levantamento epidemiológico: a falta de informação, acesso ou procura por atendimento clínico; a progressão lenta, com frequente ausência de sinais e sintomas; ou ainda presença de sintomas inespecíficos, e por fim, a ausência de notificação compulsória. Apesar de possuir as características de uma doença tropical negligenciada, ainda é necessário o reconhecimento oficial da PCM como tal pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Griffiths *et al.*, 2019).

Com relação ao diagnóstico da doença, a aplicação de métodos sorológicos se faz necessária, como alternativa à pouca sensibilidade dos métodos micológicos, e à inespecificidade dos exames clínicos. O último consenso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical sobre o manejo clínico da PCM aponta a necessidade de “prover antígenos estáveis e reprodutíveis de *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* na rede pública de saúde”, e de “padronizar uma técnica sorológica para diagnóstico e acompanhamento a nível nacional” (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017), devido à ausência de padronização ou oferta comercial de antígenos, e consequente variabilidade nos resultados de diagnóstico.

Antígenos recombinantes têm sido investigados como alternativa para a obtenção de moléculas estáveis com aplicações clínicas. Dentre eles, a proteína Pb27 de *P. brasiliensis* tem se demonstrado útil no reconhecimento de anticorpos do soro de pacientes infectados (Ortiz *et al.*, 1998; Correa *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2011a), além de promover proteção contra lesões quando utilizada na PCM experimental (Reis *et al.*, 2008; Fernandes *et al.*, 2011b; Morais *et al.*, 2015).

Muitas moléculas identificadas como antígenos não têm sua função biológica conhecida. A caracterização estrutural e bioquímica dessas moléculas permite um maior entendimento sobre sua função, seu reconhecimento pelo sistema imune, e sua estabilidade a nível molecular. Presume-se que o antígeno Pb27 seja um fator de virulência e tenha importância na interação patógeno-hospedeiro (Matute *et al.*, 2008). Recentemente, Coitinho *et al.* (2019) publicaram um trabalho sobre a caracterização

imunológica e estrutural da Pb27, onde pela primeira vez um modelo estrutural da proteína foi gerado, e uma possível função enzimática foi atribuída com base em sua estrutura: uma provável nucleotidiltransferase ligadora de CTP.

Devido à hipótese de que a função biológica da Pb27 envolve a atividade de nucleotidiltransferase e sua ligação com o nucleotídeo CTP, foi proposta a realização de estudos de interação da proteína com nucleotídeos de citidina, através de métodos fluorimétricos e calorimétricos. Além disso, como os bons resultados do uso da Pb27 no reconhecimento de anticorpos de pacientes com PCM indicam que ela pode ser uma boa candidata para uso no imunodiagnóstico da doença, também foi proposta uma investigação inicial de sua aplicação em um biossensor para reconhecimento de anticorpos anti-Pb27, testado inicialmente com soro de camundongos imunizados, para futuramente ser testado com amostras de pacientes.

Este trabalho se justifica pela obtenção de informações que auxiliem na caracterização funcional de uma nova classe de nucleotidiltransferases fúngicas, que possam ajudar a esclarecer a importância da proteína para o patógeno. Outro motivo é a necessidade de obtenção e caracterização de antígenos estáveis que possam ser utilizados em aplicações clínicas para o diagnóstico e prevenção da PCM, em métodos mais robustos e acessíveis. A PCM tem impacto social e econômico no Brasil, e a produção de um dispositivo para um exame rápido e fácil poderia impactar positivamente na saúde dos indivíduos infectados, permitindo um diagnóstico precoce e rápida triagem dos infectados para o tratamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Paracoccidioides brasiliensis* e Paracoccidioidomicose

O fungo ascomiceto *Paracoccidioides brasiliensis* constitui o principal agente etiológico da Paracoccidioidomicose (PCM), a mais prevalente micose sistêmica da América Latina, descrita pela primeira vez em 1908 pelo médico brasileiro Adolfo Lutz, e endêmica em quase todo o país. Estima-se que a prevalência no Brasil seja de 3360 a 5600 casos/ano, tendo sido registradas 168 mortes/ano no período de 1996-2006, o que corresponde a uma taxa de letalidade de 3 a 5% (Martinez, 2017). Porém, como a doença não é de notificação compulsória, os dados epidemiológicos disponíveis podem estar subestimados.

Uma das principais características desse fungo é o dimorfismo térmico: apresenta-se na forma saprofítica, filamentosa, em temperatura ambiente (26 °C), e na forma leveduriforme no organismo hospedeiro (37 °C). A fase leveduriforme tem como característica a formação de brotamentos de células-filhas na reprodução assexuada, que conferem às células formato de “roda de leme” quando visualizadas no microscópio ótico. Os conídios produzidos pela forma filamentosa, encontrada em solos úmidos, são dispersos por meio do ar, e são considerados a forma infectante do microrganismo, sendo inalação a principal forma de contágio, e os pulmões o primeiro sítio de infecção (de Oliveira *et al.*, 2015).

A resposta imunológica do hospedeiro contra o parasita envolve a ativação da resposta imune adaptativa tipo Th1, tendo a ativação de macrófagos mediada por IFN- γ e TNF- α atuando no combate inicial da infecção, com formação de granulomas para controle da replicação fúngica. Já nas formas mais graves, há um declínio da resposta Th1 frente à Th2, com indução da formação de anticorpos, principalmente IgG4, IgA e IgE, o que não é favorável ao controle da infecção (Fortes *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2012)

Apenas uma pequena parte dos infectados manifesta a doença, que tem os trabalhadores de ambientes rurais e atividades agrícolas, além de pessoas imunodeprimidas, como os mais acometidos pela doença. Crianças e jovens são os principais acometidos pela forma aguda e sub-aguda da doença, que correspondem a até 25% dos casos, e se manifestam principalmente por linfadenomegalia e lesões muco-cutâneas, podendo evoluir para lesões em outros órgãos, como

hepatoesplenomegalia. Já a forma crônica é de progressão lenta e pode se instalar silenciosamente, atingindo principalmente adultos do sexo masculino. Manifesta-se principalmente por lesões pulmonares e do trato respiratório em geral, causando sintomas como tosse, rouquidão, dispneia, lesões muco-cutâneas, podendo acometer também o sistema digestório, sistema nervoso e demais órgãos, causando prejuízo funcional e estético aos acometidos, além de poder evoluir para óbito. Pelas características da PCM, como lesões granulomatosas, lesões da pele e acometimento pulmonar, faz-se necessária a diferenciação entre outras doenças infecciosas, como tuberculose, leishmaniose, histoplasmose, e algumas não infecciosas, como sarcoidose e neoplasias (Mendes *et al.*, 2017; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017; Taborda *et al.*, 2018).

Apesar de seu tratamento estar disponível no sistema público de saúde, ainda são necessárias melhorias na vigilância epidemiológica da PCM, devido às dificuldades no diagnóstico e à sua subnotificação. A análise inicial envolve a identificação da doença em pacientes apresentando sinais e sintomas inespecíficos. Testes clínicos iniciais como radiografia torácica, hemograma, e testes de avaliação da função hepática e renal podem ser solicitados, porém o padrão ouro no diagnóstico da PCM é o exame micológico, que apresenta a desvantagem de ser pouco sensível e demandar a visualização do parasita em amostras biológicas. A cultura do parasita também pode ser usada como alternativa, porém o crescimento do microrganismo pode demorar semanas. Exames sorológicos, como ensaios de imunodifusão, contraímuno eletroforese e ELISA, além de um teste intradérmico rápido, têm se mostrado adequados no diagnóstico da doença e acompanhamento do tratamento, demonstrando maior sensibilidade e rapidez. Métodos moleculares, como PCR, também podem ser utilizados na detecção do parasita, mas não se encontram disponíveis na rotina clínica (da Silva *et al.*, 2016; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017; Rocha-Silva *et al.*, 2018).

Antígenos da parede celular de *P. brasiliensis* têm sido utilizados em estudos para o imunodiagnóstico da doença, como as proteínas gp43 (Cisalpio *et al.*, 1996), gp87 (Diez *et al.*, 2002) e HSP70 (Bisio *et al.*, 2005). Atualmente, a glicoproteína gp43, também conhecida como paracoccidioidina, tem sido o antígeno de referência utilizado na detecção e acompanhamento da doença, podendo ser obtida pela purificação a partir de culturas fúngicas ou produção recombinante. Apresenta bom reconhecimento de pacientes infectados, mas apresenta glicosilações e diferentes

isoformas extracelulares, o que pode conferir variabilidade estrutural e reatividade cruzada (Cisalpino *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 2008). Um dos desafios do diagnóstico da PCM é a ausência de antígenos comerciais disponíveis para uso, e na prática do diagnóstico clínico a obtenção dos antígenos tem sido feita a partir de preparações de exoantígenos da cultura do parasita, que são de difícil padronização, levando à variabilidade no diagnóstico realizado em diferentes laboratórios (Camargo *et al.*, 2003; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2017).

O uso de proteínas recombinantes apresenta benefícios em relação ao uso de antígenos provenientes de extratos fúngicos, como a menor reatividade cruzada, produção em maior quantidade, maior estabilidade e reprodutibilidade. Alguns dos antígenos recombinantes de *Paracoccidioides* que estão sendo investigados para diagnóstico incluem as proteínas recombinantes Pb40 (Fernandes *et al.*, 2011a), HSP60 (Cunha *et al.*, 2002) e Pb27, sendo esta última o alvo de nossos estudos e será abordada adiante.

2.2 Proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis*: características imunológicas e estruturais

A proteína Pb27 de *P. brasiliensis* foi caracterizada pela primeira vez por McEwen *et al.* (1996), que realizaram a clonagem e sequenciamento do gene da proteína antigênica de aproximadamente 27 KDa, além dos primeiros testes de expressão da proteína recombinante em *Escherichia coli* SURE e DH5 α (Ortíz *et al.*, 1998), caracterizando uma proteína nativa de 25 KDa.

O mesmo grupo realizou os primeiros testes de reconhecimento de anticorpos do soro de pacientes com PCM pelo antígeno recombinante. Utilizando a proteína em testes de *immunoblotting*, ela foi capaz de reconhecer 91% dos soros de pacientes infectados, com a vantagem de não apresentar reação cruzada com pacientes portadores de outras micoses ou tuberculose (Ortíz *et al.*, 1996). Ao utilizar o antígeno em testes de ELISA, os pesquisadores obtiveram cerca de 70% de sensibilidade, e >80% de especificidade ao avaliar o soro de pacientes com diferentes formas de PCM (Ortíz *et al.*, 1998).

Mais recentemente, outros estudos têm confirmado os bons resultados do uso da proteína recombinante para detecção de anticorpos em pacientes infectados. O uso

da Pb27 em um ensaio de *Dot Blot* resultou em total sensibilidade e 98% de especificidade, frente a controles de pacientes com histoplasbose e tuberculose, utilizando apenas 0,25 µg de proteína (Correa *et al.*, 2006). Outra abordagem utilizada foi a combinação com outra proteína recombinante, a Pb40, novamente em um ensaio de ELISA, onde obtiveram sensibilidade de 96%, e especificidade de 100% em relação a pacientes com outras micoses sistêmicas (Fernandes *et al.*, 2011a).

Já Santos *et al.* (2012) utilizaram a proteína para avaliar a detecção de diferentes classes de IgG em pacientes com a forma crônica da doença, também por ensaio imunoenzimático, encontrando diferenças significativas entre pacientes não tratados e o grupo controle com relação às classes IgG1, IgG2, IgG4 e IgG total. Contudo, em alguns casos os valores obtidos para pacientes infectados foram menores que o valor de *cut-off*. Utilizando métodos semelhantes, Coitinho *et al.* (2019) conseguiram utilizar o antígeno para distinguir entre pacientes infectados tratados, não tratados e não infectados, além de identificar três peptídeos consenso derivados da Pb27 que poderiam ser utilizados para os mesmos propósitos. Em síntese, esses dados demonstram que a proteína é uma boa candidata para o uso no desenvolvimento de biossensores para imunodiagnóstico da PCM, o que é uma das propostas desta dissertação.

Além do uso em imunodiagnóstico, a Pb27 recombinante vem sendo investigada para o desenvolvimento de vacinas protetoras contra a PCM. Reis *et al.* (2008) detectaram aumento significativo de INF-γ em camundongos imunizados com o antígeno após infecção com o fungo, em comparação com os baixos níveis da citocina observados em camundongos não imunizados, indicando uma diferença na resposta ativadora de macrófagos entre os grupos. A imunização resultou em um menor número de granulomas no pulmão, baço e fígado, organizados de forma mais compacta, de modo a delimitar as células parasíticas, e circundados por infiltrados de células mononucleares. Já os não imunizados apresentaram granulomas maiores, com um maior número de fungos viáveis e significativa destruição tecidual.

Utilizando novamente uma combinação de Pb27 e Pb40, Fernandes *et al.* (2011b) obtiveram melhor resultado no tratamento com fluconazol de camundongos infectados quando estes foram submetidos a vacinação com os antígenos, reduzindo o tempo necessário para a remoção total de colônias fúngicas e preservando a estrutura dos órgãos comumente afetados pela doença. Resultados promissores

também foram encontrados por Morais *et al.* (2013, 2015, 2018) com diferentes formulações utilizando o polipeptídeo, incluindo a manutenção da regularidade da via de sinalização do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), diminuição da fibrose pulmonar, aumento da capacidade fungicida de macrófagos, com redução considerável e a curto prazo da carga fúngica.

Apesar de suas potenciais aplicações biotecnológicas no desenvolvimento de vacinas e testes para diagnóstico, pouco se sabia até então sobre a função biológica da proteína. Além de ser um antígeno de superfície de *P. brasiliensis*, a Pb27 é encontrada ubiquamente, também na região citoplasmática e mitocondrial das células leveduriformes do parasita (Reis *et al.*, 2008; García Blanco *et al.*, 2011). Presume-se que a proteína seja um fator de virulência cujo gene está sob seleção positiva, apresentando sequência altamente conservada entre as linhagens S1, PS2 e PS3 de *P. brasiliensis*, apesar de apresentar polimorfismo em *Paracoccidioides lutzii* (Matute *et al.*, 2008; García Blanco *et al.*, 2011).

Um estudo de *knockdown* do gene da Pb27 utilizando a tecnologia do RNA anti-senso (Torres *et al.*, 2014) reduziu em até 70% sua expressão pelas células fúngicas, e obteve achados interessantes. A diminuição da expressão do antígeno resultou em alteração da morfologia celular, com perda do formato arredondado e de “roda de leme”, alongamento das células filhas, e redução da aderência. Queda do metabolismo de glicose, com manutenção da taxa de crescimento celular, também foi observada. Além disso, houve redução do número de células aderidas ou internalizadas por macrófagos recuperadas em situação viável em comparação com células *wild type*, indicando um provável papel da Pb27 na interação entre o fungo e o sistema mononuclear fagocitário, como fator de sobrevivência.

Através do alinhamento da sequência da Pb27, Coitinho (2013) verificou sua similaridade com proteínas putativas de outros fungos, como *Uncinocarpus reesii*, *Ajellomyces dermatitidis*, *Ajellomyces capsulatus* e *Coccidioides immitis*, sendo o primeiro um fungo saprofítico, e os três últimos, fungos dimórficos. As proteínas apresentaram alta conservação da estrutura primária, porém as estruturas tridimensionais das proteínas putativas não estão disponíveis até o momento.

Recentemente, a primeira estrutura tridimensional da proteína recombinante foi determinada pelo grupo de Biologia Estrutural do ICB/UFMG (PDB: 5UVD). Este é o único modelo disponível até então no *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>). O trabalho publicado por Coitinho *et al.* (2019) apresenta a proteína composta por dois

domínios, entrepostos por uma fenda que corresponde a um provável sítio de ligação (**Figura 1**). Além disso, íons magnésio foram identificados na estrutura, sendo um mais próximo ao sítio presumido.

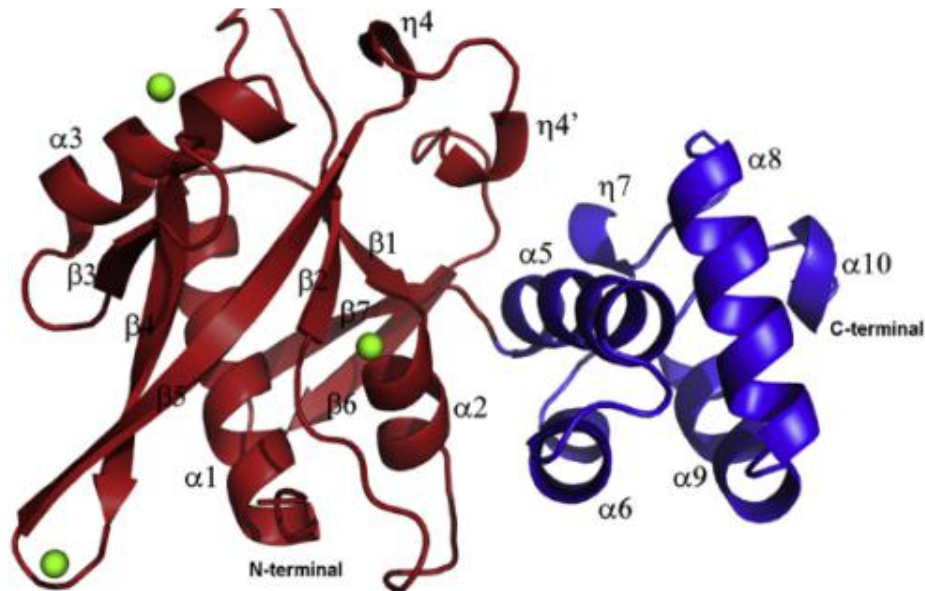


Figura 1 - Representação em *cartoon* da estrutura tridimensional da proteína Pb27 de *P. brasiliensis*. São mostrados os domínios N-terminal, com topologia $\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ (**vermelho**), e C-terminal (**azul**). Íons Mg^{2+} são representados em verde (Coitinho *et al.*, 2019).

Homólogos estruturais da Pb27 foram identificados principalmente pela semelhança no domínio N-terminal, que possui topologia $\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ característica de uma família de nucleotidiltransferases, e incluem proteínas procarióticas de função desconhecida, como a JHP933 de *Helicobacter pylori* (Kuchta *et al.*, 2009; Coitinho *et al.*, 2019). A família havia sido classificada como domínio de função desconhecida (DUF1814) na base de dados Pfam (<https://pfam.xfam.org/>), mas foi posteriormente renomeada como família AbiEii (PF08843), que compreende toxinas cognatas do sistema abortivo de infecção bacteriana, um tipo de imunidade inata presente em procariotos que promove a morte celular programada em caso de infecção por bacteriófagos (Dy *et al.*, 2014). Já os domínios C-terminais são variáveis entre os homólogos, indicando sítios de ligação (e conseqüentemente funções) diferentes entre as proteínas.

Para melhor investigar essa possível função de nucleotidiltransferase, foi realizada uma predição virtual de ligantes e o *docking* dos possíveis candidatos a ligante à estrutura da proteína (**Figura 2**). Como resultados, os nucleotídeos adenosina trifosfato (ATP) e citidina trifosfato (CTP) foram identificados como possíveis ligantes da Pb27, mas estudos experimentais de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) por correlação heteronuclear de um único quantum (^1H - ^{15}N HSQC) demonstraram que apenas o último causou uma mudança no deslocamento químico dos resíduos de triptofano da proteína, indicando-o como provável ligante (**Figura 3**).

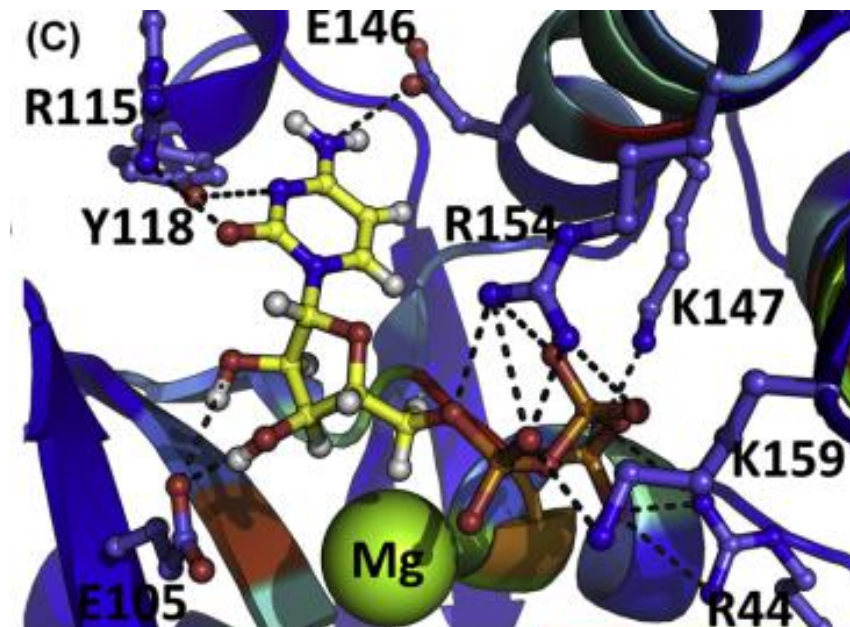


Figura 2 - Docking do nucleotídeo CTP no provável sítio de ligação da Pb27. Foi utilizada a ferramenta DockThor para o atracamento, e são observados os possíveis grupos químicos e resíduos de aminoácidos participantes da interação, com sua respectiva numeração (Coitinho *et al.*, 2019).

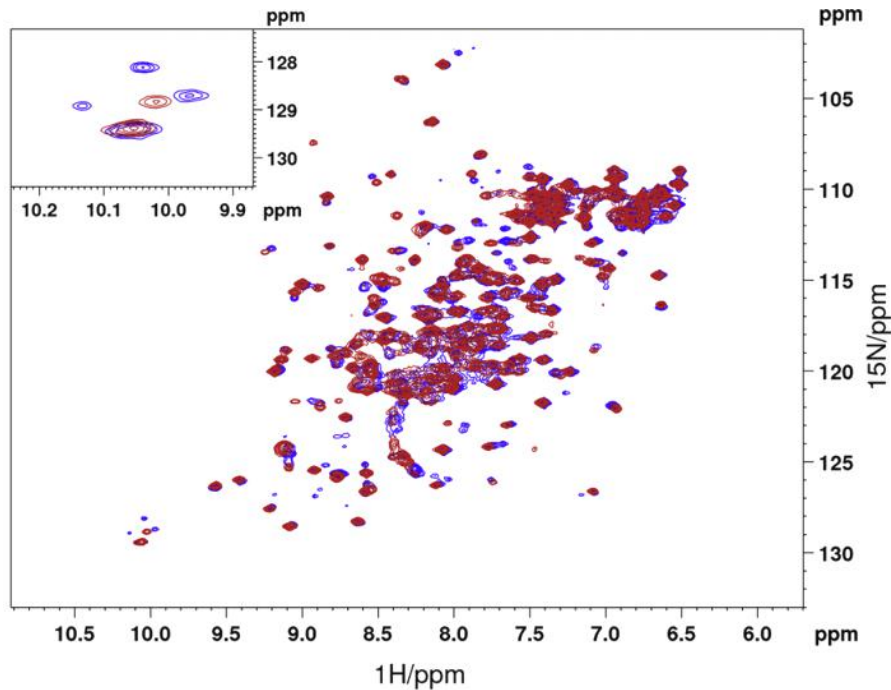


Figura 3 - Espectro de RMN (^1H - ^{15}N HSQC) da Pb27 na presença de CTP. O espectro correlaciona os sinais de deslocamento químico dos átomos de nitrogênio (eixo vertical) e hidrogênio (eixo horizontal) ligados. Em azul são mostrados os sinais de deslocamento químico da proteína apo, e em vermelho os sinais da proteína com CTP. No canto superior esquerdo, é mostrada a região dos sinais de triptofano com ampliação (Coitinho *et al.*, 2019).

Os estudos estruturais com a Pb27 indicam que ela pertence a uma classe nova de proteínas fúngicas, porém sua provável atividade como nucleotidiltransferase ainda precisa ser melhor caracterizada. Nesse sentido, a realização de ensaios de interação proteína-ligante poderia confirmar a ligação ao CTP de forma quantitativa, e fornecer informações que possam ajudar a entender o mecanismo da interação.

2.3 Interação entre proteínas e ligantes

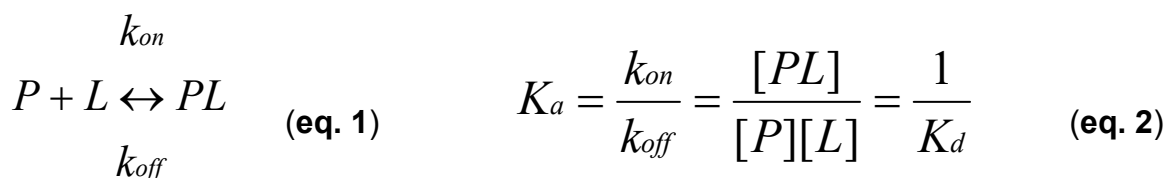
As proteínas desempenham diversos e importantes papéis biológicos, como catalisadores de reações químicas (enzimas), transportadores de nutrientes e moléculas, receptores, componentes estruturais de células e tecidos, hormônios e moléculas sinalizadoras, defesa contra patógenos (anticorpos), dentre outras. A função biológica de uma proteína pode ser caracterizada pela interação que esta realiza com outra(s) molécula(s), seja ela um substrato, uma outra proteína ou

macromolécula biológica, um cofator ou uma outra molécula pequena (Alberts *et al.*, 2002).

Estudos de interação têm sido úteis na atribuição de funções a proteínas e outras moléculas biológicas, determinação de afinidades e busca por ligantes de maior avidéz, além de servir de base para a proposição de modificações moleculares em substratos e receptores, para a modulação da afinidade de interação. Além disso, a automatização de ensaios de interação em escala ampliada tem despertado interesse na indústria farmacêutica e biotecnológica para identificação de fármacos e alvos terapêuticos (Entzeroth *et al.*, 2009; Legrain & Rain, 2014; Andrei *et al.*, 2017; Gavande *et al.*, 2017).

A Teoria do Encaixe Induzido foi proposta por Koshland *et al.* (1966) para explicar como ocorre a interação específica de uma proteína com seu ligante, utilizando um sistema enzima-substrato como modelo. Essa teoria traz extensões ao conceito de complementaridade entre enzima e substrato proposto anteriormente no modelo “Chave-Fechadura”. A enzima é considerada flexível, podendo assumir diversas conformações, e a orientação precisa de seus grupos catalíticos é necessária para sua função. A ligação a um substrato induz mudanças conformacionais no sítio ativo, que permitem o melhor ajuste entre os grupos catalíticos e o desencadeamento da reação (Koshland, 1995).

A formação de complexos proteína-ligante segue os princípios termodinâmicos gerais das ligações. Esse tipo de interação é normalmente caracterizado por ligações não covalentes, como ligações de hidrogênio, interações de van der Waals, interações entre nuvens de elétrons π e interações eletrostáticas (Verli & Barreiro, 2005). A interação de uma molécula de proteína (P), contendo um único sítio de ligação, com uma molécula de ligante (L), pode ser descrita da seguinte forma:



$$K_a = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad (\text{eq. 2})$$

Os parâmetros k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) e k_{off} (s^{-1}) são constantes cinéticas de interação, e definem a taxa de associação e de dissociação entre proteína e ligante, respectivamente. Já as constantes de equilíbrio de associação e dissociação são

definidas por K_a (M^{-1}) e K_d (M), e são importantes parâmetros para se caracterizar a afinidade da interação (Du *et al.*, 2016). A partir da **eq. 2**, pode ser derivada uma relação entre a constante de dissociação e a fração de sítios ocupados na proteína, θ :

$$\theta = \frac{[L]}{[L] + K_d} \quad (\text{eq. 3})$$

O número de sítios ocupados em uma proteína aumenta com a adição de ligante, de acordo com a afinidade deste, até atingir a saturação (**Figura 4**). Pela **eq. 3**, percebemos que quando a metade dos sítios de ligação estiver ocupada ($\theta = 0,5$), a concentração de ligante no equilíbrio será igual à constante de dissociação. Dessa forma, métodos cujo sinal produzido ao se adicionar ligante à proteína se relacione com a fração de sítios ocupados podem ser utilizados na determinação da constante de afinidade de um sistema (Lehninger, 2008; Renaud & Delsuc, 2009).

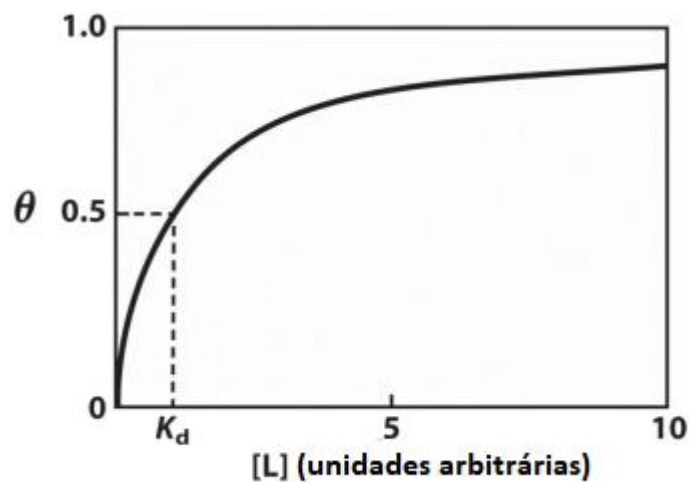


Figura 4 - Curva genérica de ocupação de sítio por ligante. O eixo X representa a concentração de ligante adicionada, e o eixo Y a fração de sítios ocupados. A concentração de ligante na qual metade dos sítios são ocupados corresponde à constante de dissociação (adaptado de Lehninger, 2008).

Além das constantes de associação/dissociação, outros parâmetros são úteis na interpretação termodinâmica de interações. Em um sistema contendo uma solução de proteína e seu ligante, ocorrem vários tipos de interações e trocas de energia

entre macromolécula, ligante, íons e solvente, que dirigem o estado do sistema. A energia livre de Gibbs (ΔG) mede a capacidade de um sistema realizar trabalho, e determina a espontaneidade do processo (Du *et al.*, 2016). A constante de afinidade de ligação entre proteína e ligante pode ser utilizada para se determinar a energia de Gibbs padrão de ligação, de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta G = - R T \ln K_a \quad (\text{eq. 4})$$

Outros parâmetros termodinâmicos importantes são a variação de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) de ligação. A entalpia corresponde a energia térmica do sistema, que pode ser trocada na forma de calor, e é avaliada por métodos calorimétricos pela variação da energia entre o estado final, após a quebra e formação de novas ligações e interações, e inicial do sistema. Já a entropia determina o quão uniformemente a energia térmica será distribuída no sistema, sendo também definida como uma medida de desordem (Du *et al.*, 2016). Ao contrário da entalpia, a entropia não pode ser determinada experimentalmente, sendo obtida pela relação abaixo, onde T corresponde à temperatura em Kelvin:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{eq. 5})$$

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a determinação de parâmetros de interação entre moléculas, dentre elas técnicas espectrométricas e calorimétricas. A seguir são apresentados os princípios das técnicas que foram utilizadas neste trabalho para avaliação quantitativa da interação da proteína rPb27 com nucleotídeos.

2.3.1 Supressão (*quenching*) da fluorescência intrínseca de proteínas

A fluorescência pode ser definida como um fenômeno no qual elétrons de uma molécula são excitados após a absorção de radiação ultravioleta, transitando para níveis mais elevados de energia, e relaxam, voltando ao seu estado fundamental a partir da emissão de radiação de maior comprimento de onda. Resíduos de

aminoácidos aromáticos de proteínas (triptofano, tirosina e fenilalanina) possuem propriedades de fluorescência. Em particular, a fluorescência intrínseca de triptofano é muito utilizada na espectroscopia de fluorescência de proteínas, devido a sua maior absorvidade molar, seu bom rendimento quântico, e ao fato de poder ser excitado seletivamente por radiações de ~ 295 nm (**Figura 5**), emitindo a radiação na faixa em torno de 300-430 nm, com emissão máxima em 348 nm (Mocz & Ross, 2013).

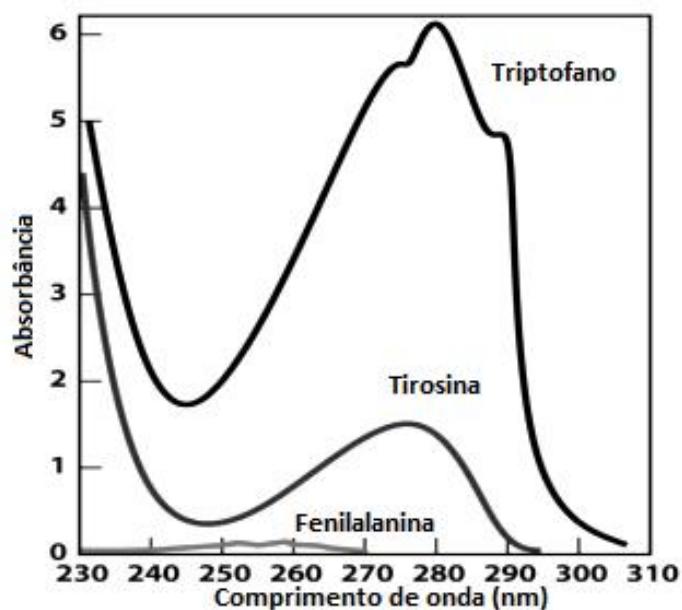


Figura 5 - Espectro de absorção na região do ultravioleta de aminoácidos aromáticos. Observa-se a maior absorção pelo triptofano em relação aos outros aminoácidos aromáticos, com máximo em torno de 280 nm (adaptado de Nelson *et al.*, 2017).

Alterações no ambiente químico do sítio de ligação de proteínas podem levar a alterações na fluorescência dos resíduos aromáticos, quando estes estão presentes em regiões próximas ao sítio. Por isso, a diminuição ou supressão (*quenching*) da fluorescência dos resíduos de triptofano e tirosina pode ser utilizada em ensaios de interação proteína-ligante, para a determinação de constantes de afinidade (Lakowicz, 2007; Mocz & Ross, 2013).

A supressão da fluorescência numa solução contendo uma macromolécula e seu ligante pode se dar por diferentes mecanismos. Primeiramente, a diminuição pode acontecer por colisão de partículas, sem ocorrência de interação (*quenching*

colisional). Outra forma é pelo efeito de filtro interno, quando existe a presença de espécies que absorvam radiação nos comprimentos de excitação ou emissão, interferindo na quantidade de luz detectada. Já um fluoróforo no seu estado excitado pode ter sua energia dissipada de forma não radiativa, através de ligação ou transferência de energia (*quenching* dinâmico). Mudanças estruturais induzidas por ligação podem causar alterações no ambiente químico do fluoróforo. A ligação pode levar ainda à formação de um complexo entre o ligante e o fluoróforo no estado fundamental, perdendo sua capacidade de fluorescência (*quenching* estático) (van de Weert & Stella, 2011).

Nos ensaios de supressão da fluorescência para determinação da afinidade de interação, é avaliada a fluorescência de uma solução de proteína e ligante a diferentes concentrações, como uma titulação. A relação da fluorescência da proteína em concentrações crescentes de ligante, no comprimento máximo de emissão, é utilizada para a produção do gráfico de Stern-Volmer (**Figura 6**), de onde se extrai a constante de Stern-Volmer (K_{sv}) e a constante de velocidade de supressão bimolecular (K_q), que se relacionam à acessibilidade do *quencher* ao fluoróforo e ao mecanismo de supressão (van de Weert & Stella, 2011; Mocz & Ross, 2013).

Essa relação normalmente é linear quando há a presença de uma única classe de fluoróforos, com mesma acessibilidade ao *quencher*, e pode ser descrita pela **eq. 6**, para a extração dos parâmetros K_{sv} e K_q . Relações não-lineares podem ocorrer na presença de mais de um tipo de fluoróforo, ou quando a supressão ocorre por mais de um mecanismo. Descrições desses casos podem ser encontradas em Lakowicz (2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{eq. 6})$$

Onde F_0 é a fluorescência no comprimento de emissão máximo, na ausência de *quencher* ou ligante; F é a fluorescência no comprimento de emissão máximo sob determinada concentração de *quencher*; $[Q]$ é a concentração de *quencher*, ou ligante; τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo.

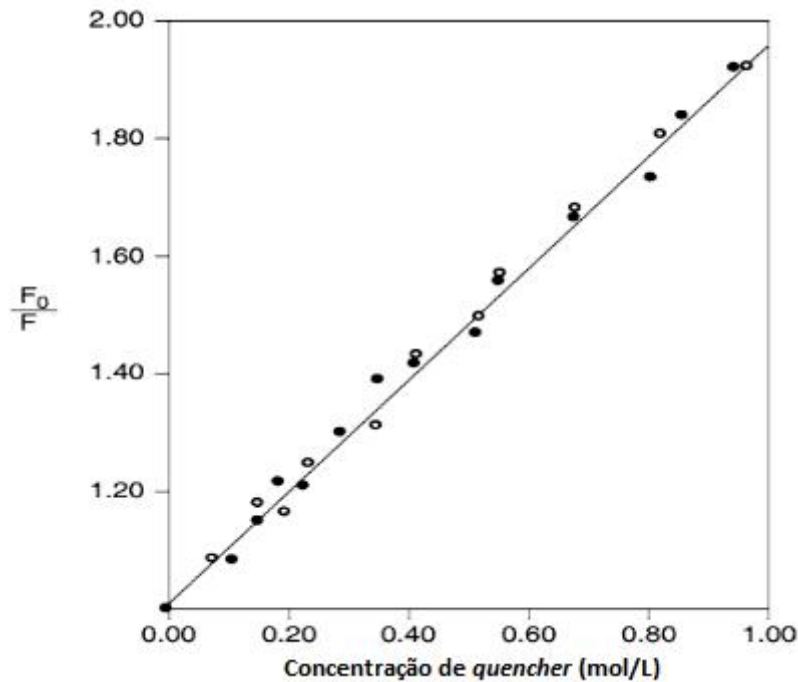


Figura 6 - Exemplo de gráfico de Stern-Volmer. O gráfico relaciona a razão da fluorescência da proteína na ausência supressor pela fluorescência em concentrações crescentes de supressor, em função da concentração de supressor adicionada. O aumento da razão F_0/F com a concentração indica o acesso deste ao fluoróforo, causando diminuição da fluorescência da proteína (adaptado de Pain, 2004).

Para a extração da constante de dissociação a partir dos dados de fluorimetria, pode-se interpretar a equação geral do equilíbrio de ligação (eq. 2) da seguinte forma:

$$K_d = \frac{([P] - [PL])([L] - [PL])}{[PL]} \quad (\text{eq. 7})$$

Onde $([P] - [PL])$ corresponde à concentração de sítios livres; $([L] - [PL])$ é a concentração de ligante livre e $[PL]$ é a concentração de complexos formados no equilíbrio.

A resolução dessa equação resulta em uma equação quadrática, que pode ser aplicada na extração de constantes de dissociação por diversos métodos (Copeland, 2000). No caso da fluorimetria, a fração de sítios livres é proporcional à fluorescência, e a equação quadrática pode ser interpretada da seguinte maneira para o ajuste dos

dados experimentais, onde o primeiro termo corresponde à fração de sítios ocupados:

$$\frac{(F_0 - F_{[L]})}{(F_0 - F_C)} = \frac{[P] + [L] + K_d - \sqrt{([P] + [L] + K_d)^2 - 4 * [P] * [L]}}{2 * [P]} \quad (\text{eq. 8})$$

Onde F_C é a fluorescência máxima da proteína após saturação total pelo ligante; $[P]$ é a concentração de proteína total; F_0 é a fluorescência máxima da proteína na ausência de ligante; $F_{[L]}$ é a fluorescência máxima da proteína em determinada concentração de ligante; $[L]$ é a concentração de ligante utilizada.

2.3.2 Fluorimetria diferencial de varredura ou ensaio de *thermal shift*

A Fluorimetria Diferencial de Varredura (DSF, *Differential Scanning Fluorimetry*), mais conhecida como Ensaio de *Thermal Shift* (TSA, *Thermal Shift Assay*) ou Termofluor, é utilizada para a determinação da temperatura de desnaturação térmica (T_m , *melting temperature*) de proteínas em diferentes condições. Pode ser aplicada na determinação de condições estabilizadoras de proteínas, por exemplo na triagem de tampões, e também na triagem de ligantes e estimativa de suas afinidades. Apresenta as vantagens de baixo consumo de amostra e possibilidade de uso em ensaios de alto rendimento (Niesen *et al.*, 2007; Vivoli *et al.*, 2014).

O ensaio é realizado em equipamentos de PCR em tempo real (RT-PCR), que possuem a capacidade de aquecer a amostra gradativamente até temperaturas acima da T_m normalmente observada para proteínas. Também possui filtros para a captação de sinais de fluorescência emitidos por uma sonda hidrofóbica, que é adicionada à amostra para a detecção da desnaturação. Uma das sondas mais utilizadas é a SYPRO® Orange, que possui faixa de emissão compatível com os equipamentos disponíveis, e têm afinidade pelos sítios hidrofóbicos de proteínas. À medida que a proteína é aquecida e desnatura, as regiões hidrofóbicas da proteína são expostas e ligadas pela sonda, que têm seu rendimento quântico de fluorescência aumentado pela ligação (**Figura 7**). Assim, a fluorescência emitida aumenta gradativamente conforme a proteína é aquecida, até atingir um valor

máximo, após o qual a fluorescência começa a decair, devido à agregação e precipitação da proteína desnaturada (Huynh & Partch, 2015).

O registro da fluorescência ao longo do aquecimento gera uma curva de desnaturação térmica, que têm forma sigmoide. Como a T_m pode ser definida como a temperatura na qual 50% de uma população de proteínas encontra-se no estado desnaturado, ela pode ser determinada no experimento de TSA como a temperatura correspondente à metade do sinal máximo de fluorescência, ou o ponto de inflexão da curva, podendo também ser determinado pela primeira derivada (Huynh & Partch, 2015).

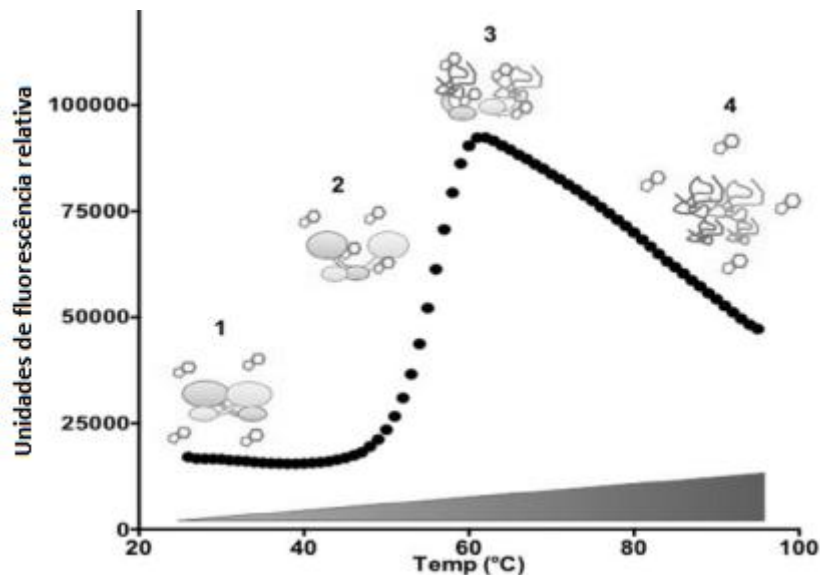


Figura 7 - Curva de desnaturação térmica de proteínas utilizando SYPRO® Orange. A medida que a proteína é aquecida, a sonda se liga às suas regiões hidrofóbicas (2), aumentando sua fluorescência, até o ponto máximo de exposição dos sítios (3). Após a desnaturação, a fluorescência diminui devido à formação de agregados proteicos (4) (adaptado de Abbott *et al.*, 2017).

A interação de um ligante com uma macromolécula pode causar a sua estabilização, caso induza a formação de uma conformação mais estável, aumentando assim a sua T_m . Pode ainda causar a diminuição da T_m , caso se ligue a uma forma menos estável da proteína, ou ainda não causar mudança alguma. No ensaio de *thermal shift*, de forma semelhante a outros métodos, a variação da T_m da proteína na presença de ligante em relação à T_m da proteína sem ligante é avaliada em função da concentração de ligante adicionado. A concentração de ligante na qual

a fração de proteína desenovelada é metade da observada na ausência de ligante, ou ainda a concentração que induz um aumento da T_m da proteína de 50% em relação à T_m máxima na presença de ligante, correspondem à constante de dissociação estimada (Vivoli et al., 2014).

Na **Figura 8** é apresentado um exemplo de gráfico para a análise de dados experimentais de *thermal shift*. A relação entre a variação de T_m da proteína em função da concentração de ligante adicionado foi ajustada de acordo com um modelo de equação quadrática para a determinação da constante de dissociação (Vivoli et al., 2014).

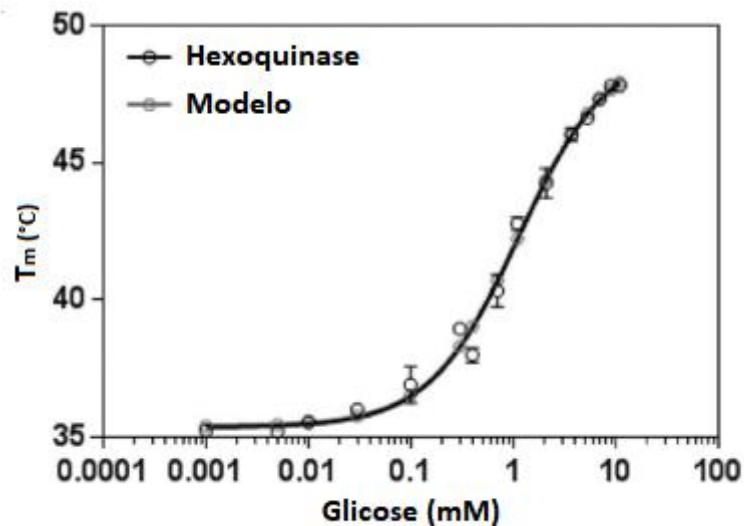


Figura 8 - Exemplo de curva para determinação da constante de dissociação por TSA. A variação da T_m da hexoquinase em função da concentração de glicose adicionada é apresentada. O K_d da interação hexoquinase:glicose foi estimado após ajuste pelo ponto médio da curva em $1,12 \pm 0,05$ mM (adaptado de Vivoli *et al.*, 2014).

2.3.3 Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC, *Isothermal Titration Calorimetry*) é considerada o padrão-ouro na análise termodinâmica de interação, permitindo uma determinação direta (K_d , ΔH , estequiometria) e indireta (ΔG e ΔS) de importantes parâmetros termodinâmicos. Constitui-se basicamente da medida do calor trocado durante a titulação entre duas espécies, normalmente tendo o ligante como titulante,

e a macromolécula como titulado. A técnica é realizada em um calorímetro composto por duas células, a célula de trabalho, onde fica o titulado, e a célula de referência, normalmente preenchida com água (**Figura 9a**). Uma seringa automática contendo o titulante é acoplada à célula de trabalho, e deposita injeções regulares na célula (Freire *et al.*, 1990; Serdyuk *et al.*, 2007).

Ao longo da titulação, o sistema mantém a temperatura das duas células constante, variando o calor fornecido à célula de trabalho para que essa permaneça igual à célula de referência. Esse calor retirado ou inserido corresponde ao inverso do calor das reações, incluindo interações e ligações, ocorrendo dentro da célula de trabalho a cada quantidade de ligante adicionado. O *software* do equipamento registra em um termograma a taxa de calor trocado na titulação ao longo do tempo (**Figura 9b**). Esse calor é integrado através da **eq. 9**, gerando uma isoterma de ligação (**Figura 9c**) que mostra a variação da energia do sistema (entalpia) em relação a quantidade de ligante adicionada (Freire *et al.*, 1990; Serdyuk *et al.*, 2007).

$$q_i = v\Delta H\Delta[L_{i, \text{ligado}}] \quad (\text{eq. 9})$$

Onde q_i é a quantidade de calor absorvido ou liberado na injeção i ; i é o número da injeção; v é o volume da célula; ΔH é a variação da entalpia por mol de ligante ligado; $\Delta[L_{i, \text{ligado}}]$ é a variação da concentração de ligante ligado após a injeção i .

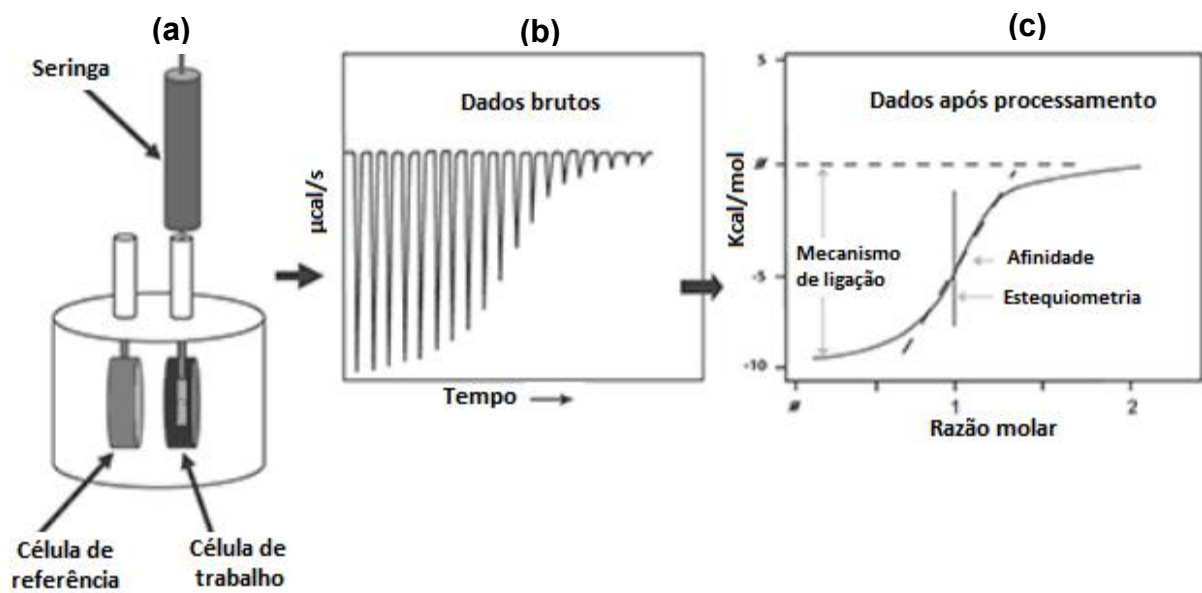


Figura 9 - Calorimetria de titulação isotérmica. (a) Representação geral do equipamento de ITC, contendo uma célula de referência, uma célula de trabalho e a seringa de titulação; (b) Termograma da titulação, representando a variação do calor trocado ao longo do tempo da titulação; (c) Isoterma de ligação, obtido após a integração do termograma. A variação da entalpia é apresentada em função da razão molar de ligante em relação ao receptor (adaptado de Marvern Panalytical, s. d.).

A titulação deve ser procedida até o ponto mais próximo possível da saturação do sistema. A entalpia de ligação é determinada pela diferença da entalpia no começo e no final (após saturação) da titulação, após descontar-se também a entalpia dos controles. A constante de afinidade/dissociação pode ser extraída da inclinação da isoterma, e pode ser descrita pela **eq. 10** (Serdyuk *et al.*, 2007):

$$q_i = \nu (\Delta H) P_{total} \left(\frac{K_a [L]_i}{1 + K_a [L]_i} - \frac{K_a [L]_{i-1}}{1 + K_a [L]_{i-1}} \right) \quad (\text{eq. 10})$$

O ponto de inflexão determina a estequiometria da interação (para isotermas sigmóides). Já os parâmetros termodinâmicos ΔG e ΔS podem ser obtidos indiretamente, a partir das **eq. 4 e 5** apresentadas anteriormente.

2.4 Biossensores eletroquímicos em imunodiagnóstico

Os biossensores podem ser definidos como dispositivos com receptor e transdutor integrados, capazes de prover análises quantitativas ou semi-quantitativas utilizando um elemento de reconhecimento biológico, como enzimas, anticorpos, antígenos, receptores, ácidos nucleicos e até mesmo células inteiras e tecidos biológicos, podendo ser utilizado para o monitoramento de matrizes biológicas ou não biológicas (Thévenot *et al.*, 1999).

Um dos primeiros biossensores utilizados na prática é o biossensor de glicose, baseado no eletrodo desenvolvido por Clark & Lyons (1962), que aplicaram a enzima glicose oxidase como elemento de reconhecimento, através da reação específica de oxidação da glicose e avaliação do consumo de oxigênio. Tal conceito foi aperfeiçoado ao longo dos anos, dando origem a produtos de baixo custo que são utilizados atualmente no mundo inteiro para o acompanhamento da glicemia de pacientes diabéticos (Wang, 2008).

Esses dispositivos têm sido pesquisados para diversas aplicações, como em usos ambientais, na pesquisa por metais pesados e outros poluentes (Brayner *et al.*, 2011), pesquisas de fármacos e substâncias tóxicas (Mehennaoui *et al.*, 2019; Stevenson *et al.*, 2019), e no diagnóstico clínico, como pesquisa por patógenos (Faria & Zucolloto, 2019; Santos *et al.*, 2019), marcadores de doenças (Jayanthi *et al.*, 2017) e em imunodiagnóstico.

Essa última classe de aplicações refere-se aos biossensores que utilizam anticorpos ou antígenos como elemento de reconhecimento (imunossensores), e podem ser utilizados, por exemplo, no diagnóstico e acompanhamento de doenças infecciosas e autoimunes, intoxicações, dentre outras (Florea *et al.*, 2019; Mollarasouli *et al.*, 2019). Um exemplo de aplicação é o desenvolvimento de um dispositivo para a detecção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos, utilizando proteína A e um anticorpo específico contra a toxina (Pimenta-Martins *et al.*, 2012). Outro exemplo é o uso de um sistema microfluídico para a determinação do tipo sanguíneo através da reação de aglutinação de antígenos de hemácias com seus anticorpos específicos (Chang *et al.*, 2018). Já Faria & Mazon (2019) utilizaram a estratégia de imobilização de anticorpos monoclonais anti-NS1 de Zika Vírus para detectar o antígeno ZIKV-NS1 na urina de pacientes, e diagnosticar a arbovirose.

Na prática clínica, uma das vantagens da utilização desses dispositivos é o uso no *point-of-care*, ou seja, são dispositivos portáteis que podem ser utilizados para diagnóstico do paciente no local onde o indivíduo se encontra, facilitando o seu acesso. Outras vantagens incluem a maior especificidade/seletividade e sensibilidade com o uso de elementos de reconhecimento biológico, a ausência de necessidade de marcação, e detecção mais rápida, utilizando técnicas simples (Contreras-Naranjo & Aguilar, 2019; Poschenrieder *et al.*, 2019).

Diversos podem ser os mecanismos de transdução de sinais aplicados a sensores, como mecanismos óticos, magnéticos, piezoelétricos, calorimétricos, além dos mais utilizados, os eletroquímicos. Os biossensores eletroquímicos se baseiam numa reação com o analito que produz um sinal elétrico proporcional à sua concentração, como corrente elétrica, impedância ou carga (Hammond *et al.*, 2016). O sensor eletroquímico geralmente tem uma configuração de três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e contra-eletrodo), e é confeccionado com materiais condutores ou semicondutores como carbono/grafite e seus nanomateriais, nanopartículas de ouro e outros metais nobres, óxidos de metais e polímeros condutores (Maduraiveeran *et al.*, 2018).

Nesse substrato é imobilizado o elemento de reconhecimento biológico, por interações que dependem dos grupos químicos presentes no substrato e na molécula e do tipo de *linker* utilizado, como ligações covalentes aos grupos -OH, -NH ou -SH de proteínas, ou empilhamento de elétrons π de grupos aromáticos. A formação de monocamadas automontadas de moléculas na funcionalização dos eletrodos, com a utilização de moléculas espaçadoras, também é uma estratégia para melhorar a orientação, e conseqüentemente o reconhecimento por tais elementos (Gooding & Darwish, 2011).

Uma das formas utilizada para a análise de sensores eletroquímicos é a Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE). A impedância é um tipo genérico de resistência de um sistema à passagem de uma corrente alternada, e corresponde a uma grandeza vetorial composta de um componente real (Z_{Re}), relacionado à resistência (R), e um componente imaginário (Z_{im}), correspondente à reatância (X_C) (Bard & Faulkner, 2001). Ela pode ser descrita por uma Lei de Ohm genérica (**eq. 11**):

$$Z = \frac{E}{I} = R - jX_c \quad (\text{eq. 11})$$

$$Z(\omega) = Z_{re} - jZ_{im} \quad (\text{eq. 12})$$

Onde Z é a impedância; E é o potencial elétrico; I é a corrente elétrica; R é a resistência; j é o valor imaginário $\sqrt{-1}$; Xc é a reatância; ω é a frequência.

Na análise de EIE, determina-se a impedância real e imaginária resultante da aplicação de um potencial elétrico a diferentes frequências, que são representadas em um Diagrama de Nyquist (**Figura 10a**). Os pontos correspondentes às frequências elétricas maiores estão mais próximos à origem e os correspondentes às frequências menores estão mais à direita do gráfico. A impedância total corresponde ao vetor que pode ser calculada pelos valores dos eixos e pelo ângulo de fase. Outra forma de apresentação dos dados na EIE é o Diagrama de Bode (**Figura 10b**), onde a impedância total e o ângulo de fase são apresentados em função da frequência elétrica. A interpretação desses diagramas permite a obtenção dos parâmetros eletroquímicos do sistema e a avaliação da resposta dos biossensores (Bard & Faulkner, 2001).

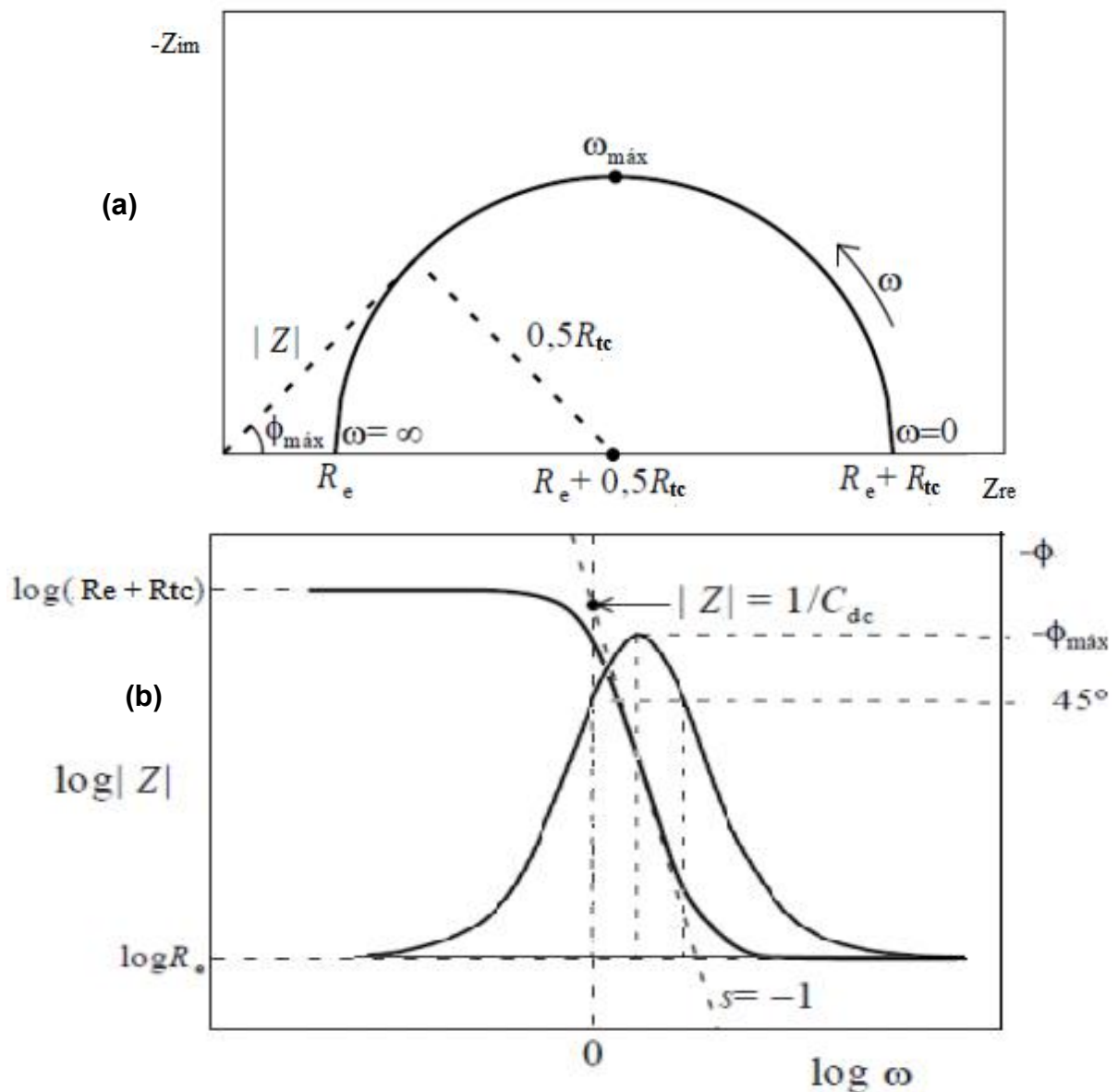


Figura 10- Diagramas de Nyquist (a) e Bode (b). No Diagrama de Nyquist, o eixo X se refere à impedância real Z_{re} , e o eixo Y à impedância imaginária, $-Z_{im}$. As frequências elétricas (ω) aumentam da direita para a esquerda. A impedância é determinada pelo vetor $|Z|$, e ϕ corresponde ao seu ângulo de defasagem. No Diagrama de Bode, o logaritmo da impedância e o ângulo de fase são apresentados em função do logaritmo da frequência elétrica. A interpretação dos diagramas permite o cálculo de componentes do sistema em análise, como os parâmetros R_e , R_{tc} e C_{dc} (adaptado de Wolyneć, 2003).

Uma das formas de interpretação dos resultados de EIE é através da sua tradução em um Circuito Elétrico Equivalente, no qual os fenômenos que ocorrem na superfície do eletrodo são representados por componentes elétricos. Diferentes tipos de circuitos equivalentes podem ser necessários para explicar os resultados obtidos em diferentes perfis de diagramas. Bertok *et al.* (2019) apresentam vários desses

circuitos. Um dos circuitos mais básicos para a interpretação dos biossensores é o Circuito de Randles, apresentado na **Figura 11**:

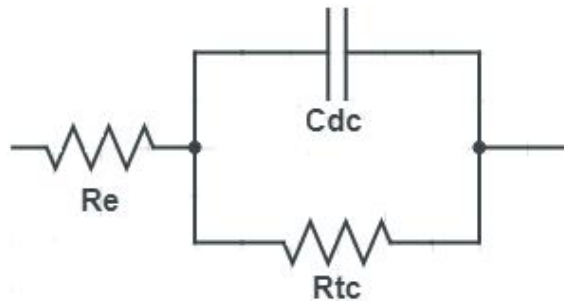


Figura 11 - Circuito equivalente de Randles simplificado. Neste circuito, são representados os fenômenos básicos que ocorrem na interface eletrodo-solução: a resistência do eletrólito (R_e), a capacitância de dupla camada elétrica (C_{dc}) e a resistência à transferência de carga do eletrodo de trabalho (R_{tc}).

Nesse circuito, o primeiro componente elétrico é um resistor (R_e), que se refere à resistência do eletrólito onde a análise de EIE é realizada. O segundo componente é um capacitor (C_{dc}), que se refere à capacitância da dupla camada eletroquímica formada na interface do eletrodo com a solução, devido à separação de cargas entre os diferentes condutores. Esse elemento normalmente é substituído por um elemento de fase constante (CPE) na interpretação de biossensores sólidos, devido a um comportamento não ideal de capacitor (Bard & Faulkner, 2001; Bertok *et al.*, 2019).

Um outro resistor adicionado em paralelo à capacitância corresponde à resistência à transferência de carga (R_{tc}), e corresponde aos fenômenos ocorrendo no eletrodo de trabalho, onde o elemento de reconhecimento está localizado. Esta resistência aumenta com a ligação de moléculas não condutoras ao elemento de reconhecimento, como ocorre nos sensores de anticorpos, e é o sinal normalmente utilizado para a detecção nesse tipo de biossensor (Ohno *et al.*, 2013). Outros efeitos ainda podem ocorrer nos circuitos, como a impedância de Warburg (Z_w), que é um tipo de resistência à transferência de massa que ocorre em baixas frequências, e o efeito capacitivo de camadas superficiais dielétricas, que podem estar presentes em circuitos mais complexos (Bard & Faulkner, 2001; Bertok *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Caracterizar quantitativamente a interação entre a proteína recombinante Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* com o nucleotídeo CTP, e seu análogo citidina monofosfato (CMP). Utilizar a proteína na confecção de um biossensor para o reconhecimento de anticorpos anti-Pb27, como teste inicial para a produção de um dispositivo para diagnóstico da paracoccidioidomicose.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir e purificar a proteína recombinante Pb27 de *P. brasiliensis* em sistema de expressão procarioto, obtendo quantidades suficientes para os estudos de interação e de confecção do biossensor.

- Caracterizar quantitativamente a interação da proteína Pb27 com o nucleotídeo CTP (e seu análogo CMP), obtendo parâmetros termodinâmicos de interação por meio das técnicas de supressão da fluorescência intrínseca de proteína, fluorimetria diferencial de varredura, e calorimetria de titulação isotérmica.

- Construir um biossensor com a proteína e avaliar sua capacidade de reconhecimento de anticorpos de soro de camundongo imunizado com Pb27, através da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Expressão e purificação da proteína rPb27

4.1.1 Transformação da *Escherichia coli* BL21(DE3) e expressão da rPb27

A produção e purificação da proteína Pb27 recombinante (rPb27) foi feita conforme o método descrito por Coitinho (2013). Para a expressão da rPb27, foi utilizado o plasmídeo pET28a(TEV) (Carneiro *et al.*, 2006) contendo o gene da proteína, pET28a(TEV)-Pb27 (**Figura 12**), construído anteriormente. Essa construção adiciona uma cauda de histidinas e um sítio de clivagem pela protease do *Tobacco etch virus* (pTEV) à proteína, de modo a facilitar as etapas de purificação, além de conferir ao microrganismo um gene de resistência à canamicina, e permitir o controle da expressão da proteína pelo *operon lac*, que pode ser induzido por análogos da lactose .

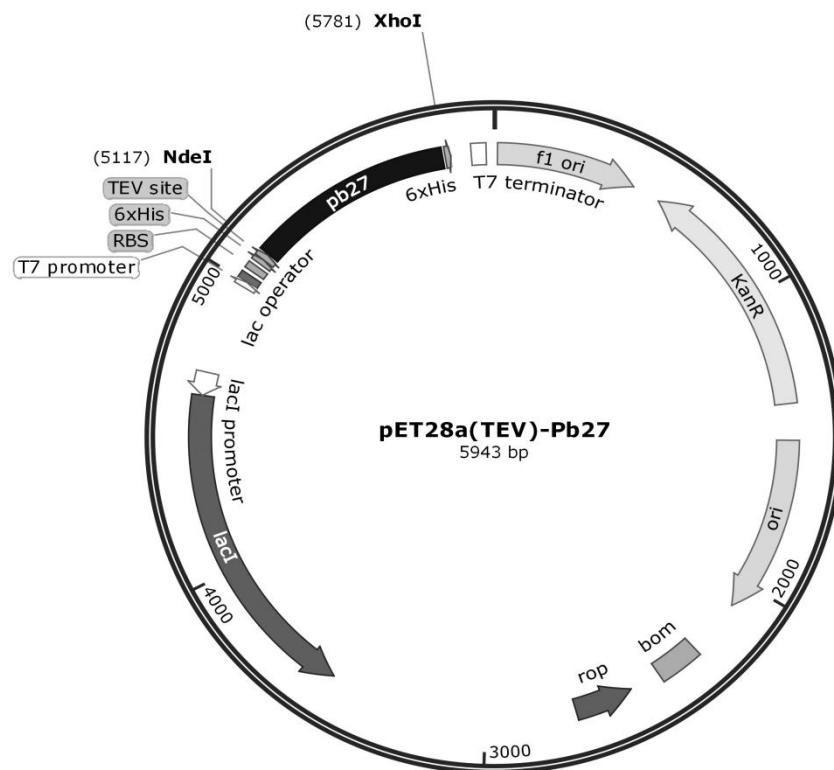


Figura 12 - Organização do plasmídeo pET28a(TEV)-Pb27. A sequência da Pb27 foi introduzida entre os sítios de clivagem das enzimas de restrição NdeI e XhoI. Outras regiões importantes do vetor incluem o promotor T7, operon *lac*, cauda de histidinas, sítio de clivagem pela protease TEV, e gene de resistência à canamicina (KanR).

A confirmação da sequência clonada no plasmídeo foi feita antes da etapa de transformação, por empresa terceirizada (Myleus Biotechnology), por eletroforese capilar em aparelho ABI3730, utilizando-se primers T7 (direto: 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3', $T_{\text{anelamento}} = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$; reverso: 5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3', $T_{\text{anelamento}} = 51\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os resultados foram verificados através do *software* Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems). A sequência obtida foi traduzida e alinhada com sequências de referência da Pb27 utilizando-se as ferramentas do SIB ExPASy Bioinformatics Resources Portal (<https://web.expasy.org/translate/>) e *Basic Local Alignment Search Tool* - BLAST (NCBI), respectivamente.

Células de *E. coli* BL21(DE3) eletrocompetentes foram transformadas com o vetor pET28a(TEV)-Pb27. Foram utilizados 50 μL de bactéria em meio LB (Luria Bertani) líquido e 1 μL de plasmídeo (68 ng/ μL). A transformação foi realizada em cubeta de eletroporação, aplicando-se um pulso de $\sim 2,5\text{ mV}$, em eletroporador MicroPulser (Bio-Rad).

Imediatamente após a eletroporação, 500 μL de meio LB foram adicionados às células, que foram incubadas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1h. Após a incubação, as células foram plaqueadas em ágar LB com 50 $\mu\text{g/mL}$ de canamicina (KAN), e incubadas *overnight* ($16 \pm 2\text{ h}$) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uma colônia isolada foi selecionada e incubada novamente, em meio LB líquido + KAN, com agitação a 200 rpm. As células foram armazenadas em alíquotas com meio LB + glicerol 25% (v/v), a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a expressão da proteína, foi preparado um inóculo adicionando-se 50 μL de células bacterianas transformadas a cada 20 mL de meio LB + KAN. A bactéria foi incubada *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob agitação a 200 rpm. Após o crescimento, 20 mL de inóculo foram adicionados a cada litro de meio de cultura, que foi novamente incubado até OD_{600} entre 0,4 e 0,8. Em seguida, adicionou-se isopropil β -1-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 0,5 mM para indução da expressão, e incubou-se por mais 4 h. Ao final, as células foram coletadas após 10 minutos de centrifugação a 5.000 g e $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de células resultante foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior purificação.

4.1.2 Purificação da Proteína rPb27

Os *pellets* resultantes da expressão foram ressuspensos em 9 mL tampão de lise (Tris.HCl 50 mM pH7,5; sacarose 1% (p/v), Tween 20 1% (v/v) e glicerol 1%(v/v)) para cada grama de célula. As células foram lisadas em homogeneizador de células de alta pressão (Avestin EmulsiFlex C3), em três ciclos a 15.000-20.000 psi. Em seguida, foram centrifugadas por 1 hora a 10.000 *g* e 4 °C para recuperação da fração solúvel, que foi utilizada na purificação da rPb27 por Cromatografia Líquida Rápida de Proteína (FPLC).

Adicionou-se 30 mM de imidazol à amostra, para purificação inicial por cromatografia de afinidade ao níquel, utilizando-se coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare Biosciences) e cromatógrafo ÄKTA Prime (GE Healthcare Biosciences) com detector de condutividade e absorvância UV (280 nm). Utilizou-se gradiente linear de eluição a 5 mL/min, iniciando-se com 100% de tampão A (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; cloreto de sódio 500 mM e imidazol 30 mM) para lavagem da amostra, até 100% de tampão B (tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; cloreto de sódio 500 mM e imidazol 500 mM) para a recuperação da proteína ligada.

Em seguida, a amostra foi submetida a cromatografia de dessalinização utilizando-se coluna HiPrep 26/10 de 50 mL (GE Healthcare Biosciences), eluindo-se isocriticamente a 5 mL/min com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 e cloreto de sódio 50 mM. Após essa etapa, a amostra foi submetida a clivagem da cauda de histidinas, sendo incubada com a protease TEV na proporção de 1:5 em relação a quantidade estimada de proteína, e ditioneitol (DTT) 1 mM, a 30 °C *overnight*.

Após a clivagem, foi realizada uma nova cromatografia de afinidade, dessa vez com a proteína sendo eluída no tampão A, para retirada da cauda de histidinas clivada da amostra, e também da pTEV, que também contém cauda de histidinas. Por fim, foi realizada uma cromatografia de gel-filtração em coluna HiLoad 16/60 Superdex 200 Prepgrade (GE Healthcare Biosciences), eluindo-se a amostra isocriticamente a 1 mL/min em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4; cloreto de sódio 50 mM e cloreto de magnésio 5 mM, filtrado em membrana de 0,45 µm e degaseificado.

Quando necessário, a amostra purificada foi concentrada utilizando-se concentrador Vivaspín 6 (GE Healthcare), com valor de *cut-off* de 10 kDa, por centrifugação a 5.000 *g*. A quantidade de proteína obtida na amostra foi calculada

através da absorbância obtida nos cromatogramas ou através de leitura em espectrofotômetro Biochrom (Libra) a 280 nm, utilizando-se a equação de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon lc \quad \text{ou} \quad m = \left(\frac{\text{Área}}{\varepsilon l} \right) * M_w \quad (\text{eq. 13})$$

Onde A é a absorbância (au); ε é o coeficiente de extinção molar da proteína ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$); l é o caminho ótico (cm); c é a concentração molar (M); m é a massa (mg); Área é a área do pico do cromatograma (au * mL); M_w é a massa molecular da proteína (Da).

Para o cálculo, utilizou-se o coeficiente de extinção molar teórico da rPb27 obtido com a ferramenta ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005), que é de $19.940 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a proteína com a cauda de histidinas, e $18.450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para a proteína clivada. A massa molecular da proteína é de 26.518 Da e de 24.712 Da para a proteína com e sem *cauda*, respectivamente. Essas informações podem ser encontradas nos **Anexos I e II**.

4.1.3 Eletroforese das amostras proteicas

As etapas de expressão e purificação da rPb27 foram acompanhadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). As amostras dos *pellets* da expressão foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e ressuspendidas em água mili-Q antes da análise. Já amostras da cromatografia foram utilizadas sem preparo prévio.

Adicionou-se tampão de amostra (Tris HCl 65 mM pH 6,8; glicerol 10% (v/v), dodecilsulfato de sódio (SDS) 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,02 mg/mL) às amostras, que foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos antes da aplicação. Foram utilizados os marcadores de peso molecular “*Precision Plus Protein Dual Color Standards*” (Bio-Rad) ou “*Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker*” (Thermo Scientific), e foram aplicados volumes fixos de amostra (5-10 μL) em cada canaleta do gel.

Os géis foram corridos a 180 V, em tampão Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM e SDS 0,1% (p/v), e corados em solução hidrometanólica de Comassie Blue 0,1% (p/v). O excesso do corante foi removido em solução de etanol 30% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), seguido por reidratação do gel com água ultrapura.

4.2 Caracterização da rPb27

4.2.1 Avaliação da massa molecular por espectrometria de massa

Para a análise por espectrometria de massa (MS), amostras da rPb27 purificada foram preparadas por dessalinização utilizando-se ponteira ZipTip com resina C18 (Merck Millipore), previamente lavada/ativada com acetonitrila (ACN) 50% (v/v) e ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v). A amostra foi resuspendida 50x com a ponteira da pipeta, carregando-se e descarregando-se volumes de 10 µL. Após desprezar o volume de amostra, a ponteira foi então lavada 15x com 10 µL de TFA 0,1%. Ao final, a amostra dessalinizada foi recuperada em 2 µL de ACN 80% (v/v), à qual se adicionou o mesmo volume de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico 1% (p/v). Foi aplicado 1 µL da amostra preparada em cada *spot* da placa tipo *AnchorChip* para análise.

A massa molecular total da proteína foi avaliada em equipamento Autoflex III (Bruker), através da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e detecção em analisador do tipo tempo de voo (MALDI-ToF), no Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt) do ICB-UFMG. A técnica consiste no uso de uma forma branda de ionização para proteínas. Após ionização, as moléculas são introduzidas no analisador, onde íons resultantes são separados por sua razão massa/carga. Os dados foram coletados no *software* do equipamento (*flexControl*), e os gráficos foram gerados com o *software* Origin 7.0 (OriginLab Cooperation).

4.2.2 Avaliação do estado oligomérico e enovelamento da proteína

Para realizar os ensaios de interação, é importante que o estado de agregação, dispersão e enovelamento da amostra seja avaliado, já que podem interferir na

atividade enzimática e na interação com ligantes. Para verificar a estabilidade/alteração do estado da amostra ao longo do tempo, foram realizadas análises nos dias 1, 2, 3 e 10 após a purificação, com a amostra a 1,04 mg/mL, no mesmo tampão utilizado na gel-filtração, previamente centrifugada a 10.000 g por 5 minutos.

O estado oligomérico da proteína foi avaliado por Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS), em equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Esta técnica permite a determinação do coeficiente de difusão translacional (D_T) de partículas em solução, através da incidência de um feixe de luz monocromático na amostra, e detecção do espalhamento dinâmico da luz.

A intensidade da luz espalhada flutua devido à variação das distâncias entre as partículas, que permanecem em Movimento Browniano, e essa flutuação pode ser analisada por uma função de autocorrelação de tempo para extração de informações sobre a difusão e tamanho das partículas, e conseqüentemente sobre sua dispersividade e estado de agregação (Lorber *et al.*, 2012). O coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao tamanho da partícula (partículas menores se movem mais rápido), e é utilizado para determinação do raio hidrodinâmico da partícula a partir da relação de Stokes-Einstein:

$$D_T = K_b T / 6\pi\eta R_h \quad (\text{eq. 14})$$

Onde D_T é o coeficiente de difusão translacional; K_b é a constante de Boltzmann; T é a temperatura em graus Kelvin; η representa a viscosidade do solvente e R_h é o raio hidrodinâmico.

As análises de DLS foram realizadas com a amostra em cubetas de vidro de 1 cm, a 25 °C. Os dados foram coletados e analisados no *software* do próprio equipamento, pelo qual se obteve a distribuição de intensidade e volume por tamanho das partículas e o grau de dispersividade da amostra.

Para a avaliação do estado de enovelamento da proteína ao longo do tempo, foram realizadas análises de dicroísmo circular (CD). A técnica se baseia na absorção molecular diferencial da luz circularmente polarizada à direita ou à esquerda, propriedade característica de estruturas quirais. Estruturas secundárias de proteínas possuem absorção diferencial e característica na região do ultravioleta

distante (180-240 nm) da luz polarizada, que corresponde à absorção das ligações peptídicas. Essas assinaturas no espectro de dicroísmo circular podem ser utilizadas para determinar a quantidade de estruturas secundárias, e conseqüentemente, o estado de enovelamento das proteínas (Kelly & Price, 2000; Sreerama & Woody, 2004).

As análises de CD foram realizadas com o espectropolarímetro J-815 (Jasco), utilizando-se cubeta de quartzo de 0,1 cm, varrendo-se o comprimento de onda de 260 nm a 185 nm, a cada 1 nm, a 25 °C e 37 °C. Os dados obtidos em dicroísmo circular (elipticidade, em mdeg) foram convertidos em elipticidade residual média (deg.cm².dmol⁻¹) de acordo com a fórmula:

$$[\theta]_{\text{MRW}, \lambda} = \text{MRW} \theta / 10 d c \quad (\text{eq. 15})$$

Onde $[\theta]_{\text{MRW}, \lambda}$ é a elipticidade residual média no comprimento de onda λ ; θ é a elipticidade observada (deg); d é o caminho ótico (cm); c é a concentração da proteína (g/mL) e MRW é a massa média residual (massa molecular da proteína dividida por $N-1$, onde N é o número de aminoácidos).

A deconvolução dos espectros e obtenção do percentual de estruturas secundárias foi obtido com o *servidor* K2D3 (Louis-Jeune *et al.*, 2012). Os gráficos das análises de CD e DLS foram gerados utilizando-se Origin 7.0 (OriginLab).

4.3 Análises da interação da rPb27 com nucleotídeos de citidina

A interação da proteína rPb27 com nucleotídeos de citidina (CTP e CMP) foi analisada por meio de três técnicas: Supressão (*Quenching*) da Fluorescência Intrínseca de Triptofano, Fluorimetria Diferencial de Varredura ou Ensaio de *Thermal Shift* (TSA) e Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).

As análises foram realizadas com proteína em solução, após purificação conforme descrito no item 4.1.2, em tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 contendo 50 mM de NaCl e 5 mM de MgCl₂. Os nucleotídeos citidina 5'-trifosfato e citidina 5'-monofosfato dissódicos foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich), e também foram preparados no mesmo tampão (mesmo lote) da rPb27, para evitar efeitos de

incompatibilidade de tampões. As amostras foram filtradas em filtro de 0,22 μm e dosadas por espectrometria de absorção molecular ($\lambda_{\text{máx}} = 271 \text{ nm}$; CTP: $\epsilon_{271\text{nm}} = 8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; MW: 527,12 Da; CMP: $\epsilon_{271\text{nm}} = 8740 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; MW: 367,16), e diluídas quando necessário. Para todas as análises, os dados foram ajustados utilizando-se estequiometria de interação 1:1.

4.3.1 Análise de interação por supressão da fluorescência de triptofano

No ensaio de supressão da fluorescência intrínseca de triptofano, avaliou-se a alteração da fluorescência dos resíduos de triptofano da rPb27 na presença de concentrações crescentes dos candidatos a ligante.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços opacas (pretas) e de fundo redondo, onde adicionou-se em cada poço solução da proteína em concentração final de 7 μM , e concentrações crescentes de ligante, de 39 μM até 5 mM, com o volume final de 100 μL . Também foram feitos os controles da proteína na ausência de ligante, e os brancos com o ligante na ausência de proteína, e do tampão titulado em tampão. As placas foram mantidas em ausência de luz por no mínimo meia hora antes das leituras. Foi feita a varredura da fluorescência com o equipamento Varioskan Flash (Thermo Scientific), utilizando-se comprimento de excitação de 298 nm, e detectando-se a emissão de 300 a 400 nm, em intervalos de 2 nm, a 25 °C.

Os dados foram tratados obtendo-se a média da fluorescência de cada ponto teste (com proteína), corrigida pela fluorescência dos brancos (ligante sem proteína), para cada concentração de ligante e cada comprimento de emissão. As fluorescências obtidas no comprimento de emissão máximo foram utilizadas para a determinação da Constante de Stern-Volmer (K_{SV}) e a Constante de Dissociação (K_{d}). A K_{SV} e a constante de velocidade de supressão bimolecular (K_{q}) foram obtidas a partir da regressão linear do gráfico gerado a partir dos dados tratados, de acordo com a relação apresentada anteriormente (**eq. 6, p. 25**) (Lakowicz, 2006).

Para a determinação do K_{d} , assumiu-se que a concentração de ligante adicionada é muito maior que a concentração de proteína, o que possibilitou o uso da simplificação da equação quadrática apresentada anteriormente (**eq. 8**) (van de Weert & Stella, 2011):

$$\frac{(F_0 - F_{[L]})}{(F_0 - F_C)} = [L] / (K_d + [L]) \quad (\text{eq. 16})$$

Onde F_0 é a fluorescência da proteína na ausência de ligante; $F_{[L]}$ é a fluorescência da proteína a determinada concentração de ligante; F_C é a fluorescência estimada da proteína após supressão máxima; $[L]$ é a concentração de ligante.

Os gráficos foram plotados e o K_d foi estimado através de regressão não linear, pelo modelo de *One Site Binding* do software Origin 7.0 (OriginLab).

4.3.2 Análise de interação por TSA

O ensaio de *Thermal Shift* foi realizado para estimativa da constante de dissociação dos nucleotídeos, através da análise da estabilização da proteína rPb27 na presença de seus candidatos a ligante, o que é avaliado por mudanças na temperatura de desnaturação proteica (Vivoli *et al.*, 2014; Huynh & Partch, 2016).

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços para PCR em tempo real. Foi utilizada uma solução da proteína rPb27 a 5 μM na presença da sonda SYPRO Orange 5x (ThermoFischer Scientific). Também foram adicionados à proteína concentrações crescentes de nucleotídeos, com volume final de 25 μL /poço, em triplicata. Foram feitos poços controle com proteína na ausência de ligante, ligante na ausência de proteína, proteína na ausência de sonda, e sonda na ausência de ligante e proteína. Após o preparo, as placas foram cobertas por um filme selante ótico, e mantidas ao abrigo da luz. Imediatamente antes da análise, as placas foram centrifugadas a 500 g por 2 minutos, para remoção de bolhas. A leitura das placas foi realizada em equipamento para RT-PCR CFX-96 Touch (Bio-Rad), utilizando-se uma rampa de aquecimento de 25 °C a 95 °C, com aquecimento a 1°C/minuto e intervalo entre leituras de 1°C. Foi utilizado o filtro para SYBR Green para a detecção de fluorescência.

Os dados das curvas de *melting* foram processados subtraindo-se dos valores médios de fluorescência para cada curva teste os valores dos controles (ligante + sonda sem proteína; proteína sem sonda). As curvas resultantes foram normalizadas de acordo com os pontos máximo e mínimo de cada uma. A análise para

determinação do T_m a cada concentração de ligante foi feita utilizando-se o *software* Origin 7.0 (OriginLab), sendo o T_m o ponto médio da curva obtido por regressão não linear utilizando-se a equação sigmóide de Boltzmann (Huynh & Partch, 2016):

$$Y = Y_{\min} + \frac{(Y_{\max} - Y_{\min})}{1 + e^{\frac{T_m - X}{dx}}} \quad (\text{eq. 17})$$

Onde Y é a fluorescência emitida a determinada temperatura; Y_{\min} é a fluorescência mínima; Y_{\max} é a fluorescência máxima; T_m é a temperatura de *melting*; X é a temperatura; dx é o fator de inclinação da curva.

A constante de dissociação foi estimada plotando-se as temperaturas de *melting* obtidas para cada concentração de ligante, em um gráfico semi-logarítmico de forma sigmoidal (Copeland, 2000). O K_d foi considerado a concentração de ligante que leva à metade da estabilização máxima da proteína. Os gráficos foram analisados por regressão não linear, aplicando-se novamente a equação sigmóide de Boltzmann, porém alterando-se os parâmetros analisados, substituindo-se fluorescência (Y) por T_m , temperatura (X) por concentração de ligante ($[L]$) e T_m por K_d :

$$T_m = T_{m(\min)} + \frac{(T_{m(\max)} - T_{m(\min)})}{1 + e^{\frac{K_d - [L]}{dx}}} \quad (\text{eq. 18})$$

4.3.3 Análise de interação por ITC

A Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foi utilizada na análise das interações entre a rPb27 e os nucleotídeos CTP e CMP, através da medida direta dos calores gerados durante a titulação da proteína com os nucleotídeos. Os ensaios de ITC foram realizados em calorímetro MicroCal VP-ITC (Malvern) no Laboratório Multiusuários de Proteômica (LMProt) do ICB-UFMG, com colaboração da Prof. Mariana Quezado, e também no Laboratório de Espectroscopia e Calorimetria (LEC) do LNBio (CNPEM, Campinas).

Anteriormente às análises, a linha de base (branco) do equipamento foi extraída pela titulação de água em água (ultrapura, Milli-Q). A célula de referência também foi preenchida com água ultrapura. As soluções filtradas foram degaseificadas por 5 a 10 minutos antes do uso, no equipamento MicroCal ThermoVac (Malvern). A célula de trabalho foi preenchida com 1,4 mL de solução de rPb27 (titulado), e a seringa com 300 µL de nucleotídeo (titulante). As titulações foram feitas a 25 °C, com agitação de 307 rpm e potência de referência de 5 µcal/s. Parâmetros experimentais, como concentração, volume e espaçamento entre injeções foram variados. Também foram feitas as titulações controle do ligante no tampão, do tampão em tampão, e do tampão em proteína (calor de diluição).

Os termogramas de titulação gerados foram analisados no programa MicroCal PEAQ-ITC Analysis (Malvern), descontando-se os resultados das titulações controle. As isotermas de ligação foram geradas pelo programa, e ajustadas de acordo com modelo para um tipo de sítio de ligação, fixando-se o valor de N (estequiometria) = 1, para a extração dos parâmetros termodinâmicos de interação K_d , ΔH , ΔG e ΔS .

4.4 Análise da detecção de anticorpos anti-Pb27

4.4.1 Análise da detecção de anticorpos anti-Pb27 por ELISA

Soros de camundongos imunizados com rPb27 foram utilizados para avaliar a detecção de anticorpos pela proteína. Os soros foram cedidos pela Dr^a. Mariana Costa, e foram inicialmente analisados por ELISA para sua posterior utilização no teste dos biossensores construídos com a proteína.

O ensaio de ELISA foi realizado utilizando-se placas de 96 poços, que foram sensibilizadas com 100 µL do antígeno rPb27 a 1 mg/mL diluído no tampão de sensibilização (carbonato/ bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6). As placas foram incubadas *overnight* a 4 °C, e em sequência foram lavadas três vezes com a solução de lavagem (tampão fosfato salina (PBS) + tween 20 0,05% pH 6,5). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 100 µL por poço de albumina de soro bovino (BSA) 1%, preparada no mesmo tampão de sensibilização, incubando-se a 37 °C por 1 h.

Após lavagem, aplicou-se 100 µL dos soros anti-Pb27 diluídos em tampão de incubação (PBS + tween 20 0,05% pH 7,4) nas diluições de 1:200 até 1:6400, em

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção e caracterização da Pb27 recombinante

Primeiramente, o plasmídeo pET28a(TEV)-Pb27 utilizado foi sequenciado para a confirmação da sequência de Pb27 introduzida (**Apêndice I**). Após a tradução da sequência nucleotídica, a sequência proteica resultante apresentou 235 aminoácidos; destes, 16 foram adicionados pelo vetor, e compreendem a cauda de histidinas e o sítio de clivagem pela protease TEV, e 219 aminoácidos correspondem à sequência da proteína Pb27, com 100% de identidade com a sequência de referência XP_010763645.1 (UniProt) (**Quadro 1**), indicando que o vetor apresentava a sequência esperada. A sequência indica uma proteína de massa molecular de 26.518 Da com a cauda de histidinas (6xHis_rPb27), e de 24.712 Da sem a cauda de histidinas (rPb27), devido à permanência de uma glicina e uma histidina do sítio de clivagem pela pTEV após a remoção da cauda

Quadro 1 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da rPb27 com a sequência de referência XP_010763645.1.

rPb27	1	MAPLSSDELKTVVSVLAQKLDLSLNIDYAIMGGAATCLLSGDPNRRRTEDVDLVIHVDHRKI	60
		MAPLSSDELKTVVSVLAQKLDLSLNIDYAIMGGAATCLLSGDPNRRRTEDVDLVIHVDHRKI	
XP 010763645.1	1	MAPLSSDELKTVVSVLAQKLDLSLNIDYAIMGGAATCLLSGDPNRRRTEDVDLVIHVDHRKI	60
rPb27	61	TADNLTQLLKSFPSDFEGVSQFGHTIPAYKLRRPGGTVQLVELEVFDYQSWPQRPOYDL	120
		TADNLTQLLKSFPSDFEGVSQFGHTIPAYKLRRPGGTVQLVELEVFDYQSWPQRPOYDL	
XP 010763645.1	61	TADNLTQLLKSFPSDFEGVSQFGHTIPAYKLRRPGGTVQLVELEVFDYQSWPQRPOYDL	120
rPb27	121	QTATRTTLNINGQKVKLFSPEWILREKILSQYQRQGSRKEGTDIRDIIISMIPLAVPGKPE	180
		QTATRTTLNINGQKVKLFSPEWILREKILSQYQRQGSRKEGTDIRDIIISMIPLAVPGKPE	
XP 010763645.1	121	QTATRTTLNINGQKVKLFSPEWILREKILSQYQRQGSRKEGTDIRDIIISMIPLAVPGKPE	180
rPb27	181	LNFNQSQELQTALANLVQKRPDLSSALKAKIKCSAVFHN	219
		LNFNQSQELQTALANLVQKRPDLSSALKAKIKCSAVFHN	
XP 010763645.1	181	LNFNQSQELQTALANLVQKRPDLSSALKAKIKCSAVFHN	219

Colônias de *E. coli* BL21(DE3) resistentes à canamicina foram obtidas com sucesso, indicando a eficiente transformação da cepa com o vetor de expressão (**Figura 14**).



Figura 14 - Colônias de *E. coli* BL21(DE3) selecionadas em ágar LB + KAN.

Após a transformação, uma colônia foi selecionada para cultivo em meio LB contendo canamicina, com a finalidade de expressar a proteína, a 37 °C. IPTG 0,5 mM foi utilizado para induzir a expressão, que foi analisada por SDS-PAGE. Pode-se observar no gel de eletroforese (**Figura 15**) que antes da indução, após o crescimento da bactéria, havia uma banda mais fraca próxima à região de 25 KDa. Após a adição de IPTG, observa-se uma banda forte nessa região, indicando que a expressão da proteína foi induzida. A quantidade de proteína aplicada em cada canaleta foi normalizada pela densidade ótica de células.

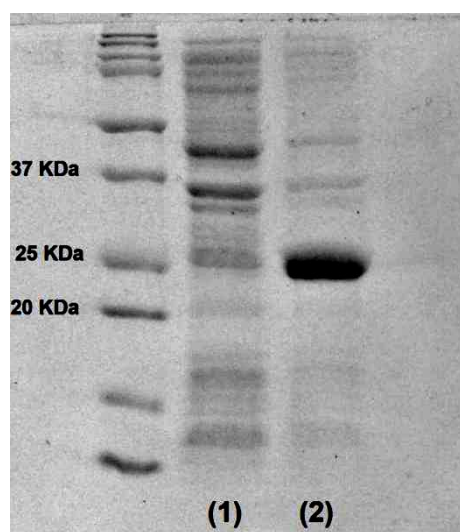


Figura 15 - Eletroforese da expressão de rPb27. A amostra (1) corresponde a cultura antes da adição de IPTG, e (2) a cultura depois da adição de IPTG.

O cultivo do clone foi repetido para a obtenção de massa de células suficientes para a purificação da rPb27 para utilização nos ensaios. Os *pellets* da bactéria foram então lisados para purificação da proteína. Observou-se a presença da rPb27 tanto na fração solúvel quanto insolúvel do lisado, porém com maior rendimento no primeiro. Assim, o extrato solúvel foi submetido a purificação por FPLC.

A seguir são apresentadas as etapas de purificação da rPb27 a partir de 5 g de células (peso úmido). A primeira etapa de purificação do extrato foi a cromatografia de afinidade ao níquel. A cauda de histidinas presente na proteína apresenta afinidade por cátions divalentes, que são adsorvidos na resina de cromatografia. A histidina possui um grupo imidazol em sua cadeia lateral, que pode formar um complexo de coordenação com o níquel (Bresolin *et al.*, 2009). Essa ligação temporária pode ser desfeita pela adição de imidazol, que atua como competidor da histidina, liberando a proteína ligada.

Pelo cromatograma de afinidade (**Figura 16**), observamos que grande parte do extrato injetado passa pela coluna, sem interagir com esta, o que corresponde aos primeiros picos de absorvância (*Flow-Through*, FT). Nessa etapa, a proteína injetada fica retida na coluna, por sua afinidade ao níquel. Após o aumento da concentração de imidazol (tampão B), observa-se a formação de um pico, que corresponde à liberação da 6xHis_rPb27. A eficácia na recuperação da proteína por cromatografia de afinidade indica que a cauda de histidinas foi introduzida com sucesso na proteína, e encontrava-se acessível ao meio externo para a realização de interações.

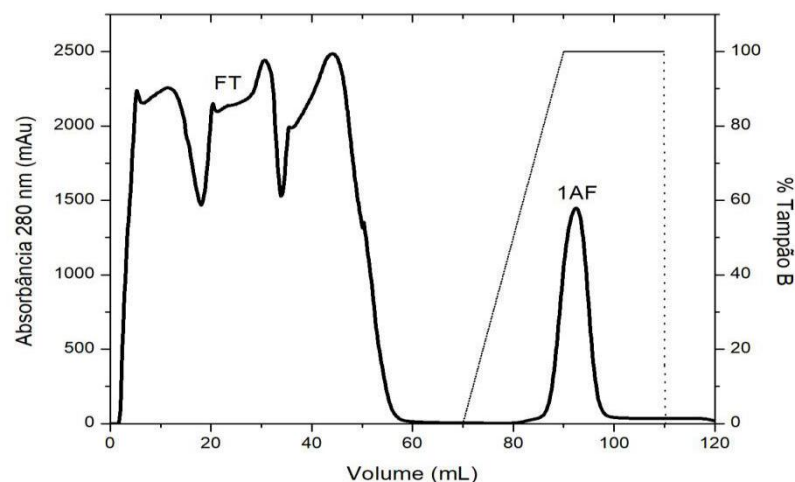


Figura 16 - Cromatograma da primeira cromatografia de afinidade ao níquel para purificação da rPb27. A cromatografia foi realizada para a purificação da fração solúvel da expressão de rPb27. O pico FT corresponde ao *flow-through*, e o pico 1AF à proteína 6xHis_rPb27.

A amostra resultante da cromatografia de afinidade apresenta elevada concentração de sais, incluindo cloreto de sódio e imidazol. A fim de preparar a amostra para a próxima etapa de purificação, a clivagem da cauda de histidinas, foi feita a troca de tampão por cromatografia de dessalinização (**Figura 17**), reduzindo a concentração de NaCl para 50 mM, e eliminando o imidazol. A amostra saiu em um pico único, e a curva de condutividade fora do pico de absorbância indica a troca eficiente do tampão.

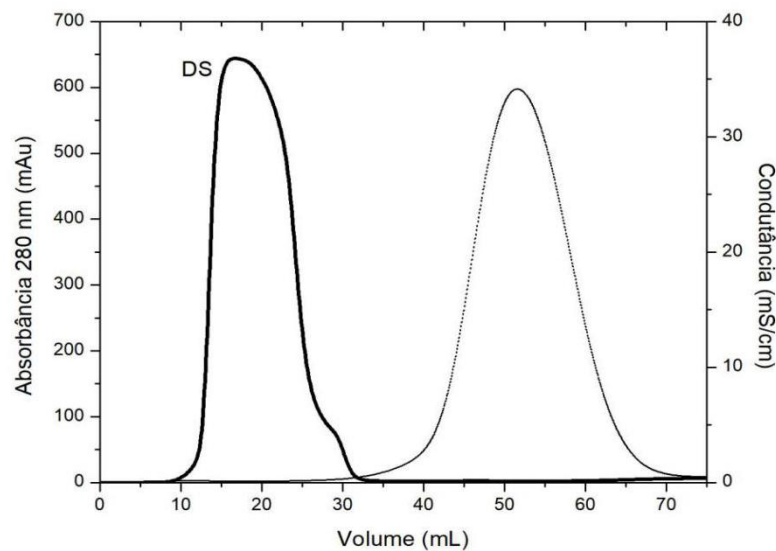


Figura 17 – Cromatografia de dessalinização para purificação da rPb27. O pico DS corresponde à proteína recuperada após etapa de dessalinização. O outro pico (condutância) corresponde aos sais removidos da amostra.

Após a etapa de dessalinização, a amostra foi submetida à clivagem pela pTEV, a 30 °C, em ambiente redutor. A proteína clivada foi recuperada por uma nova etapa de afinidade ao níquel, dessa vez sendo eluída junto ao tampão A (2AF) (**Figura 18**). Já a cauda de histidinas removida e a própria protease TEV, que têm uma cauda de histidinas não removível, foram separadas da amostra, sendo eluídas em maior concentração de imidazol (2AF B). Assim, a estratégia de introdução de uma cauda de afinidade à proteína, com sítio de clivagem pela pTEV, se mostrou adequada para a purificação da Pb27.

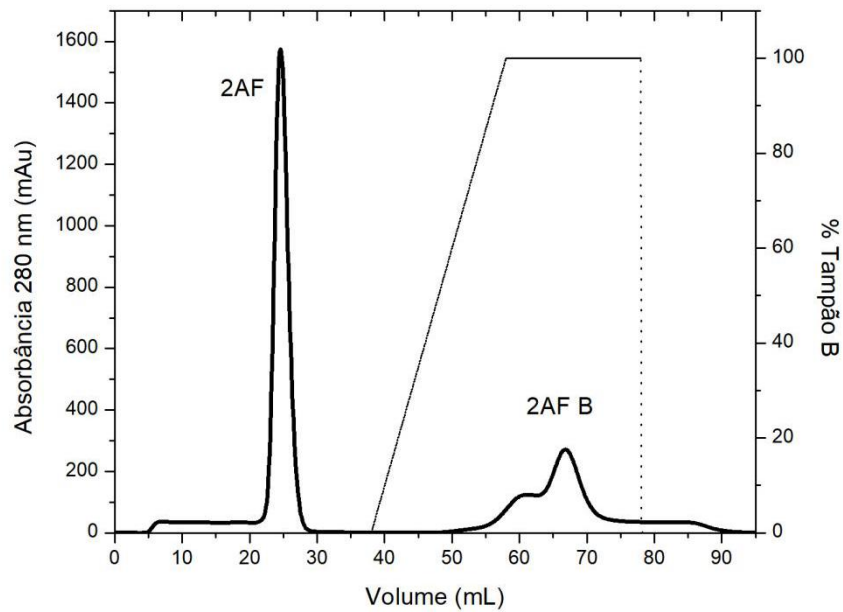


Figura 18 – Cromatograma da segunda cromatografia de afinidade ao níquel para purificação da Pb27. A proteína rPb27 (pico 2AF) foi separada de substâncias com afinidade ao níquel (pico 2AF B), como resíduos não clivados de 6xHis_rPb27, a cauda de histidinas removida na clivagem, e a protease TEV.

Por fim, a cromatografia de gel-filtração foi utilizada como passo final de troca de tampão e polimento, para separação de possíveis contaminantes com massa molecular diferente da rPb27. No cromatograma (**Figura 19**) observa-se um pico único, eluído no volume de 115 mL, que corresponde à proteína.

As etapas de purificação foram acompanhadas por SDS-PAGE (**Figura 20**). Observa-se que ao final da etapa de gel-filtração foi obtida a proteína, com massa de aproximadamente 25 KDa, e com alto grau de pureza. Amostras de rPb27 após a etapa de gel-filtração foram utilizadas nos ensaios para caracterização, análise de interação e aplicação no biossensor.

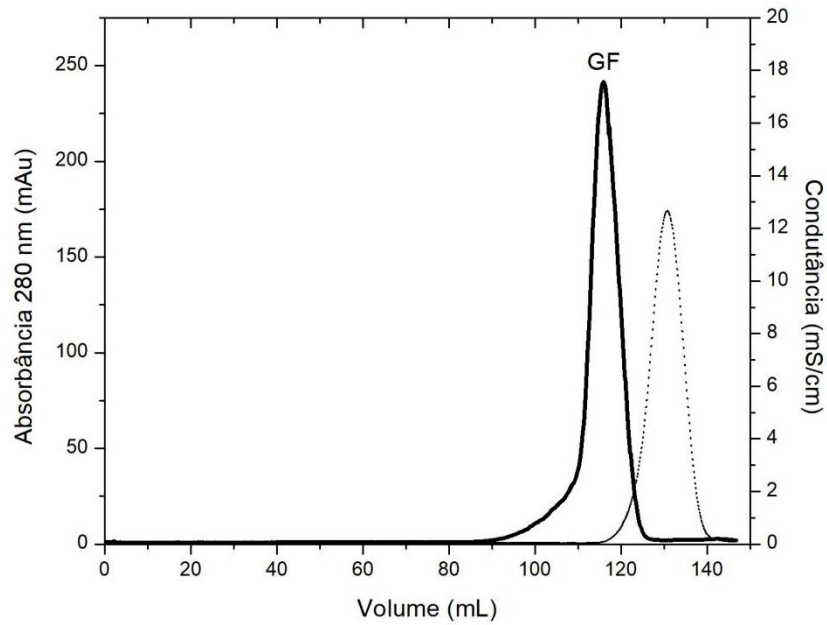


Figura 19 – Cromatografia da gel-filtração para purificação da rPb27. A etapa foi utilizada como polimento da rPb27, recuperada no pico GF.

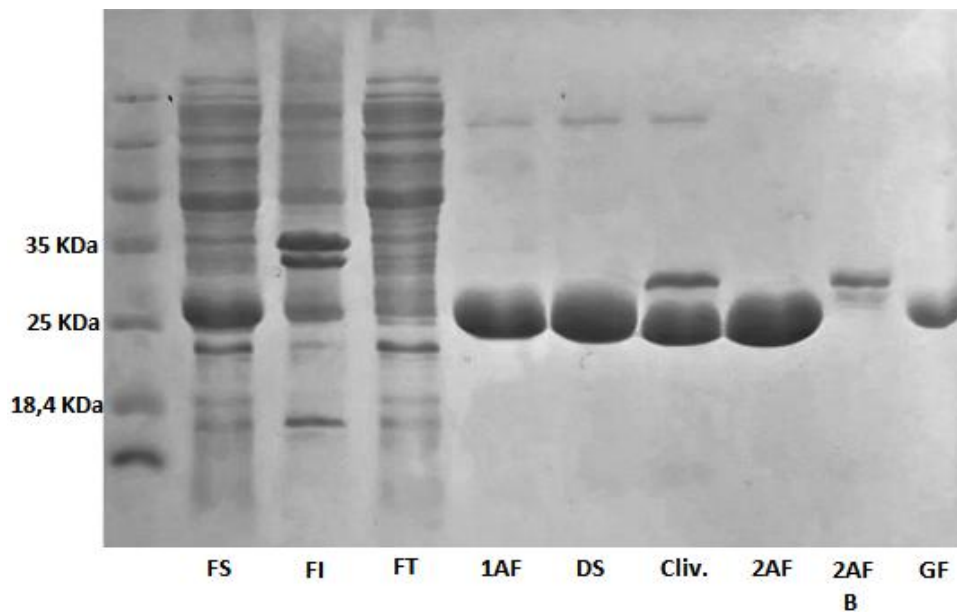


Figura 20 - Eletroforese das etapas de purificação da rPb27. A proteína rPb27 corresponde às bandas na região de 25 KDa. FS: fração solúvel do lisado; FI: fração insolúvel; FT: *flow-through* da 1ª afinidade; 1AF: pico da 1ª afinidade; DS: desalting; Cliv.: clivagem da cauda; 2AF: pico da 2ª afinidade; 2AF B: pico da 2ª afinidade (tampão B); GF: gel-filtração.

Na tabela a seguir, são apresentados os rendimentos de proteína por etapa de purificação. A quantidade de proteína foi estimada de acordo com a absorbância a 280 nm obtida pela área do cromatograma, e os coeficientes de extinção estimados para a 6xHis_rPb27 (1ª afinidade e dessalinização) e a rPb27 (2ª afinidade e gel-filtração). Observa-se que o rendimento de proteína diminuiu consideravelmente ao longo das etapas de purificação, principalmente após a etapa de clivagem, e na etapa de polimento (gel-filtração).

Tabela 1 - Quantidade de proteína obtida após as etapas de cromatografia para a purificação da rPb27.

Etapa	Amostra (pico)	Proteína (mg)	Proteína / massa de célula (mg/g)
1ª Afinidade	1AF	59,3	11,9
Dessalinização	DS	45,2	9,0
2ª Afinidade	2AF	26,2	5,2
Gel-filtração	GF	10,6	2,1

Para confirmar a massa molecular da amostra obtida, a proteína purificada foi analisada por Espectrometria de Massa. A seguir, é apresentado o espectro da amostra:

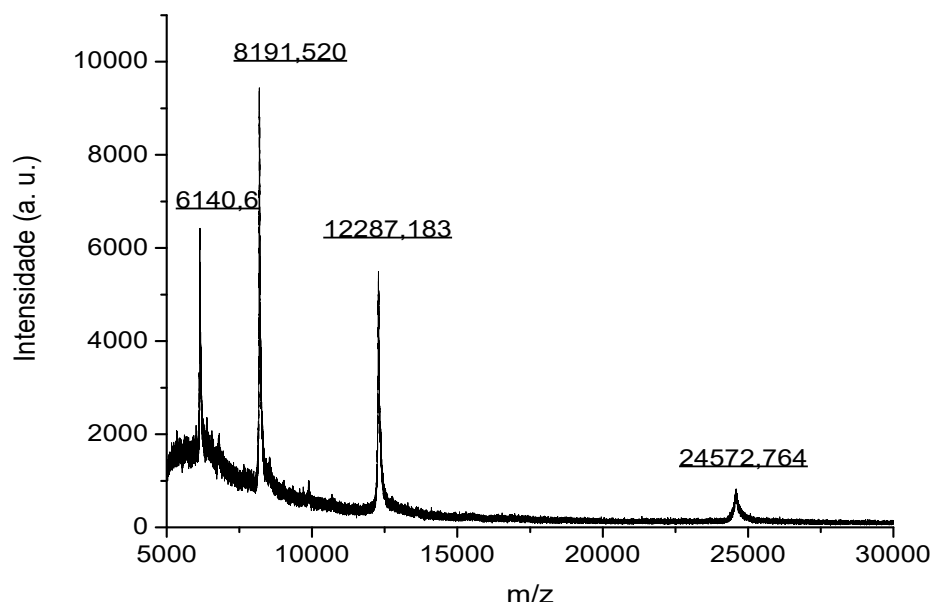


Figura 21 - Espectro de massa da proteína rPb27. Acima de cada pico é apresentado seu valor de massa por carga (m/z) correspondente.

Nesse espectro, observamos um pico de maior massa, 24.572 Da (M+H)⁺ que é próxima da massa esperada para a rPb27, 24.712 Da. Essa massa parece ser um múltiplo dos demais picos, que correspondem, da maior para a menor m/z, à dupla, tripla e quadrupla carga do primeiro pico. A média da massa de todos esses picos é de aproximadamente 24.566 Da, que é 146 Da menor que a massa esperada. Essa diferença pode ser causada pelo erro do equipamento, ou pela desprotonação de aminoácidos. A análise por espectrometria de massa corrobora a expressão da rPb27.

Além da caracterização da massa total, o estado de envelhecimento e agregação da molécula foram avaliados ao longo de dez dias após a última etapa de purificação. As análises de DLS (**Figura 22**) indicam que a proteína tem um raio hidrodinâmico de aproximadamente 2.1 nm. No gráfico de intensidade por tamanho, vemos a presença de outros picos, de raio > 50 nm, que contribuem para a intensidade de espalhamento de luz, e provavelmente correspondem a partículas de contaminantes na solução. Nota-se que, apesar dessas contaminações contribuírem na intensidade da luz espalhada, elas têm contribuição na análise de massa total insignificante, e praticamente todo volume de partículas na solução corresponde ao pico de 2,1 nm. Esse valor não variou significativamente ao longo do tempo. Além disso, a amostra se manteve monodispersa, indicando que não houve processo de agregação no período avaliado.

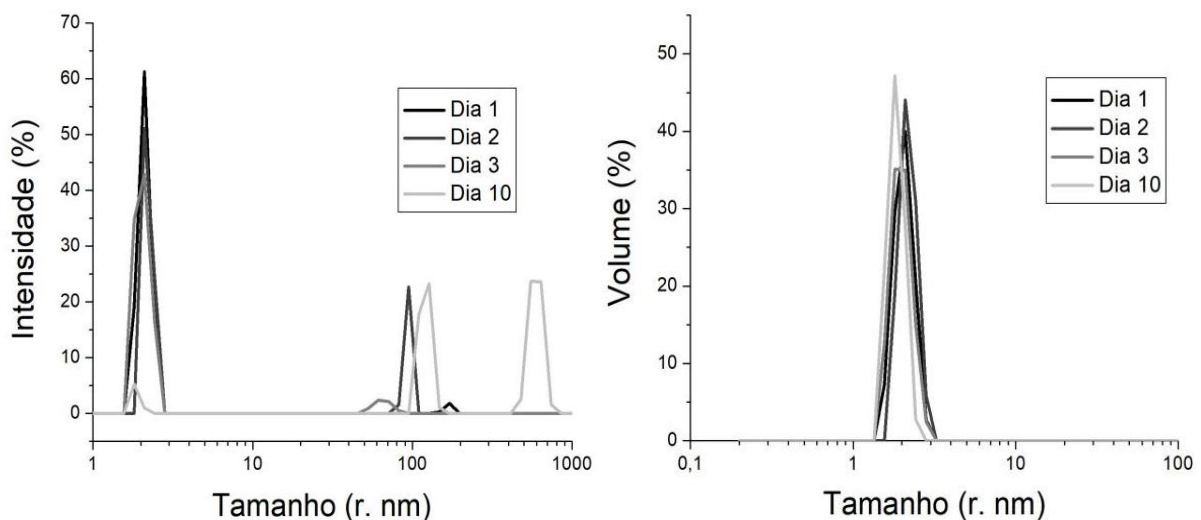


Figura 22 - Resultados da análise de DLS da rPb27. São apresentadas a distribuição de intensidade de luz espalhada e de volume das partículas em função de seus raios, nos diferentes dias de análise.

Já o estado de enovelamento da amostra foi avaliado por CD, também por 10 dias. Essa análise foi feita a duas temperaturas (25 °C e 37 °C). O espectro a 25 °C (**Figura 23**) da amostra apresenta dois vales (208 nm e 218 nm), sendo o primeiro característico de α -hélices, e o segundo poderia conter informações sobre α -hélices (222 nm) e folhas beta (215 nm); além de um pico em 192 nm, também característico de α -hélices (192 nm) (Sreerama & Woody, 2004). As curvas não variaram significativamente ao longo dos dias analisados.

Quando deconvoluiu-se o espectro, pode-se obter o conteúdo estimado de estruturas secundárias da rPb27. Observa-se que a estrutura apresenta um maior conteúdo de folhas β (25%), que é próximo à porcentagem α -hélices (22%). Tal conteúdo, assim como indicado pelo espectro, não variou significativamente ao longo do tempo. Esses dados indicam que a proteína encontra-se enovelada e apresenta estabilidade estrutural ao longo dos dias analisados. Os dados obtidos a 37 °C não foram apresentados, mas levam às mesmas conclusões.

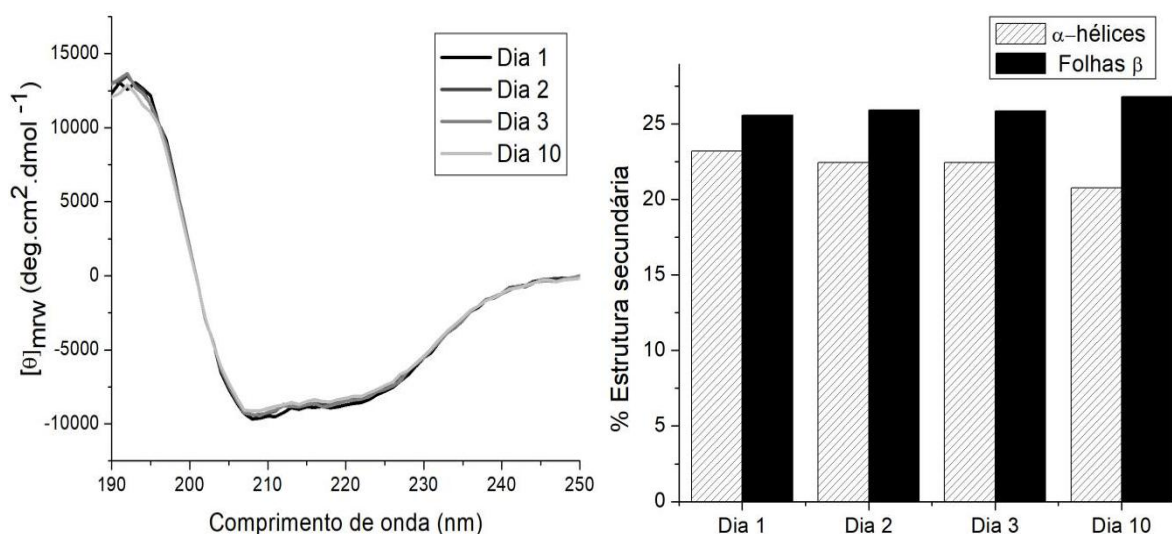


Figura 23 - Análise de dicroísmo circular da proteína rPb27 (25 °C). Na esquerda é apresentado o espectro de dicroísmo circular da proteína na região do ultravioleta, nos diferentes dias de análise. Na direita, as porcentagens de estrutura secundária obtidas após a deconvolução do espectro.

As análises de caracterização confirmam a expressão da proteína recombinante de boa qualidade, com massa adequada, e características de enovelamento, estado

de agregação e estabilidade compatíveis com as necessárias para a realização de ensaios de interação e testes para a confecção de biossensores.

5.2 Interação da rPb27 com nucleotídeos de citidina

5.2.1 Resultados da fluorimetria intrínseca de triptofano

Inicialmente, foi avaliada a emissão de fluorescência intrínseca da rPb27, utilizando comprimento de excitação seletivo para o triptofano (298 nm), na ausência e na presença de concentrações crescentes dos candidatos a ligante, CTP e CMP. A proteína apresenta dois resíduos de triptofano, ambos próximos ao seu sítio de ligação putativo, que poderiam ter suas fluorescências modificadas na presença de um ligante (**Figura 24**).

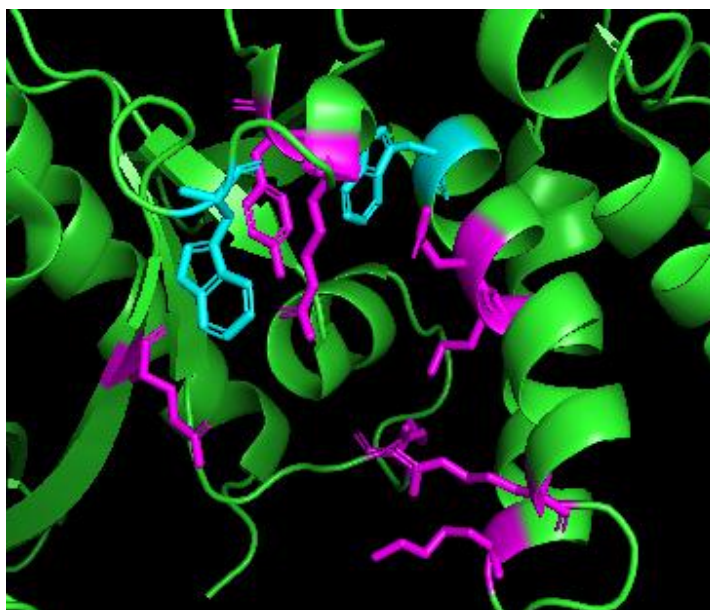


Figura 24 - Localização dos resíduos de triptofano (**ciano**) e dos resíduos do sítio de ligação putativo (**magenta**) da rPb27 (PDB: 5UVD). Nota-se a proximidade dos resíduos, de forma que a fluorescência dos triptofanos poderia ser afetada caso houvesse o acoplamento de ligantes ao sítio.

A seguir, são apresentados os gráficos de emissão da rPb27 a 25 °C, na presença dos nucleotídeos:

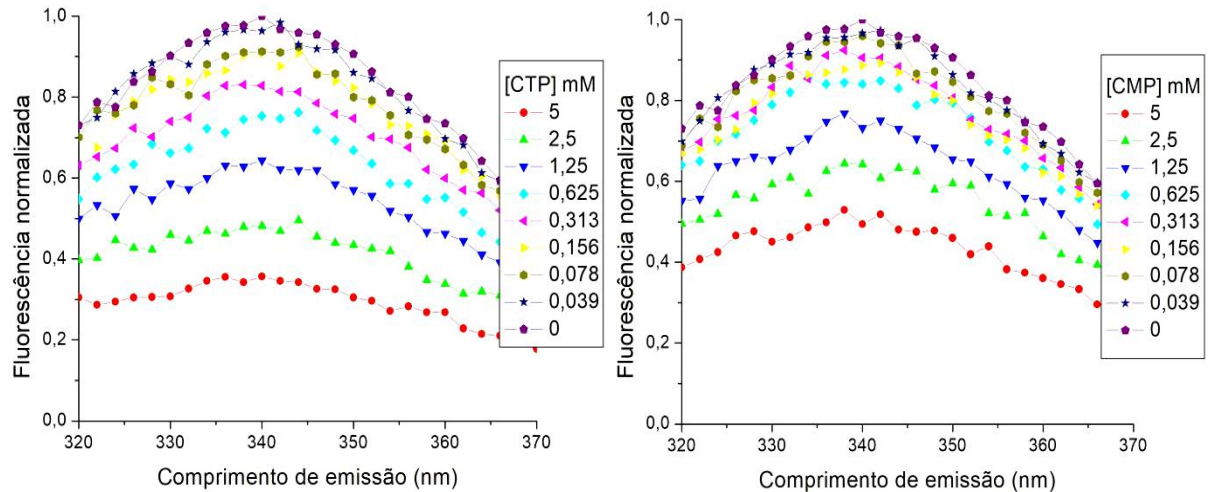


Figura 25 - Gráficos de emissão de fluorescência da rPb27 na presença de CTP e CMP. A varredura da emissão de fluorescência da proteína foi feita entre 320 e 370 nm, com comprimento de excitação de 298 nm, e com a adição de concentrações crescentes dos nucleotídeos ($n=2$).

O comprimento máximo de emissão obtido para a proteína foi de 340 nm, o que é compatível com os valores encontrados na literatura para o triptofano (Teale & Weber, 1957), indicando a excitação seletiva desse aminoácido. Observa-se que a presença de ambos os nucleotídeos induziu à diminuição na fluorescência dos resíduos de triptofano, e que essa diminuição foi proporcional ao aumento das concentrações de ligante, indicando algum tipo de interação dessas moléculas com o fluoróforo.

Os dados de fluorescência no comprimento de onda máximo foram utilizados nos demais cálculos. A Constante de Stern Volmer (K_{SV}) foi estimada por regressão linear dos dados plotados no gráfico da razão das fluorescências na ausência e na presença de ligante (F_0/F) em função da concentração de nucleotídeo adicionado (**Figura 26**):

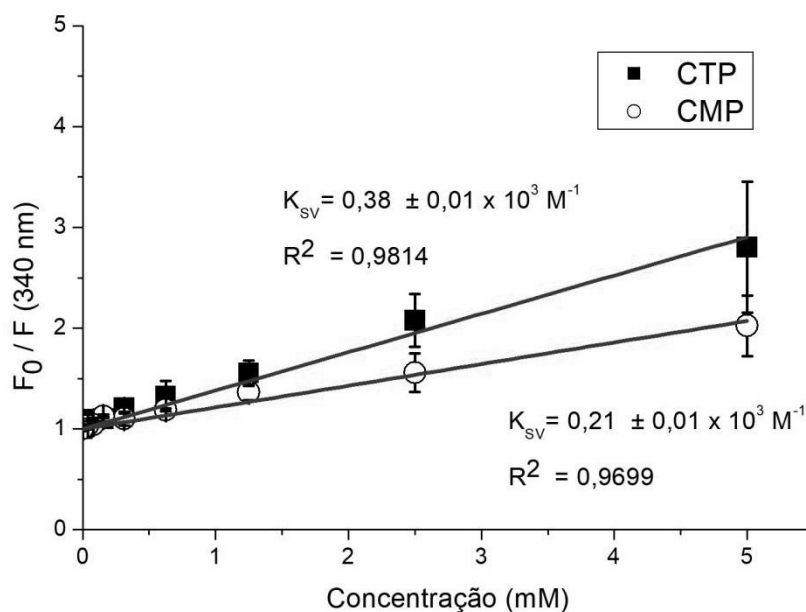


Figura 26 - Gráfico de Stern-Volmer para a interação Pb27 com os nucleotídeos CTP e CMP. A relação entre a fluorescência da proteína na ausência e na presença de ligante é apresentada em função da concentração de nucleotídeo adicionado. Observa-se aumento proporcional à concentração de ligante ($n=2$).

Gráficos de Stern-Volmer lineares indicam a presença de uma única classe de fluoróforos, igualmente acessíveis ao supressor, e que a supressão de fluorescência é provocada por um tipo de mecanismo, ou estático ou dinâmico (Lakowicz, 2006), o que é aparentemente o caso desses sistemas. A distinção entre mecanismo estático e dinâmico não é possível pelo método utilizado, sendo necessária a realização de outros experimentos, como a análise de fluorescência resolvida no tempo, o que não é o objetivo deste trabalho. A partir dos valores de K_{SV} estimados, e dos valores de tempo de vida de fluorescência do triptofano (τ_0) obtidos na literatura (Mocz & Ross, 2013), foram estimadas também as constantes de velocidade de supressão bimolecular (K_q), apresentadas na **Tabela 2**:

Tabela 2 - Valores estimados de K_{SV} e K_q para os nucleotídeos CTP e CMP.

Nucleotídeo	K_{SV} (10^3 M^{-1})	K_q (para $\tau_0 = 0,5$ a $8,7 \text{ ns}$) ($10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
CTP	$0,38 \pm 0,01$	4,4 a 76,1
CMP	$0,21 \pm 0,01$	2,5 a 42,9

A K_{SV} está relacionada à inibição da fluorescência e acessibilidade do supressor ao fluoróforo. A constante para o CTP é maior que a do CMP, indicando a maior acessibilidade do primeiro ao sítio de ligação, e uma maior supressão da fluorescência por esse nucleotídeo. Já a K_q relaciona-se à velocidade da supressão; valores de até aproximadamente $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ indicam que a velocidade é limitada pela difusão, indicando um *quenching* colisional, sem ocorrência de ligação (Lakowicz, 2006). Já valores maiores indicam uma possível ligação. Os valores de K_q estimados para o CTP foram maiores que o limite por difusão, indicando que a provável causa da diminuição da fluorescência foi a interação. Para o CMP, os valores de K_q também ficaram acima do limite por difusão, porém o valor inferior estimado ($2,5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ficou próximo desse limite.

Os dados continuaram a ser analisados, presumindo-se a ligação como causa da diminuição da fluorescência. A constante de dissociação foi estimada pelo gráfico de fluorescência relativa da proteína, que se relaciona à fração de sítios ocupados, em função da concentração de ligante (**Figura 27**). Para o CTP, a K_d foi estimada em $1,37 \pm 0,08 \text{ mM}$, indicando uma interação fraca. Para o CMP, a constante foi estimada em $1,88 \pm 0,16 \text{ mM}$, também de mesma ordem. Os valores de energia livre de Gibbs (ΔG) estimados com essas constantes são de $-16,34 \text{ KJ/mol}$ para o CTP, e $-15,56 \text{ KJ/mol}$ para o CMP.

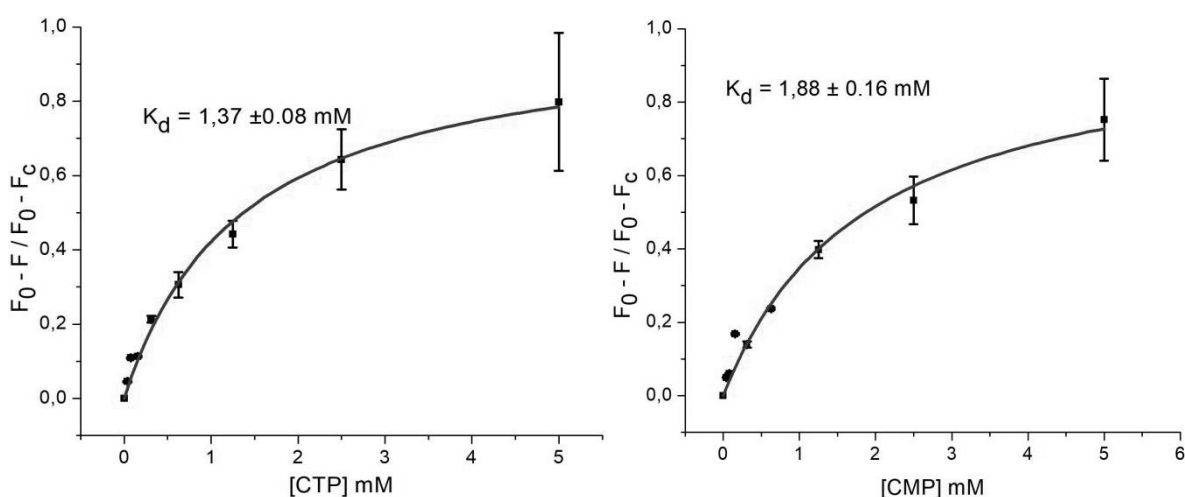


Figura 27 - Isotermas para estimativa do K_d por fluorimetria da interação rPb27:CTP e rPb27:CMP. O eixo Y apresenta a relação entre a fluorescência suprimida após interação do ligante e a fluorescência após saturação total dos sítios, em função da concentração de ligante adicionado (eixo X). Foram utilizados os dados de emissão de fluorescência a 340 nm (n=2).

5.2.2 Resultados de TSA

Curvas de desnaturação térmica da rPb27, na presença de concentrações crescentes dos nucleotídeos CTP e CMP, foram obtidas para a estimativa da constante de interação da proteína com os nucleotídeos, por um método baseado em um princípio diferente do da supressão de fluorescência do triptofano. A variação da temperatura de desnaturação térmica da proteína pode ser um indicativo da estabilização pela interação com um ligante. As curvas apresentaram perfil sigmoidal, sendo possível obter a estimativa das temperaturas de *melting* da proteína através da equação de Boltzmann. A seguir, são apresentadas as curvas da rPb27 na presença de CTP:

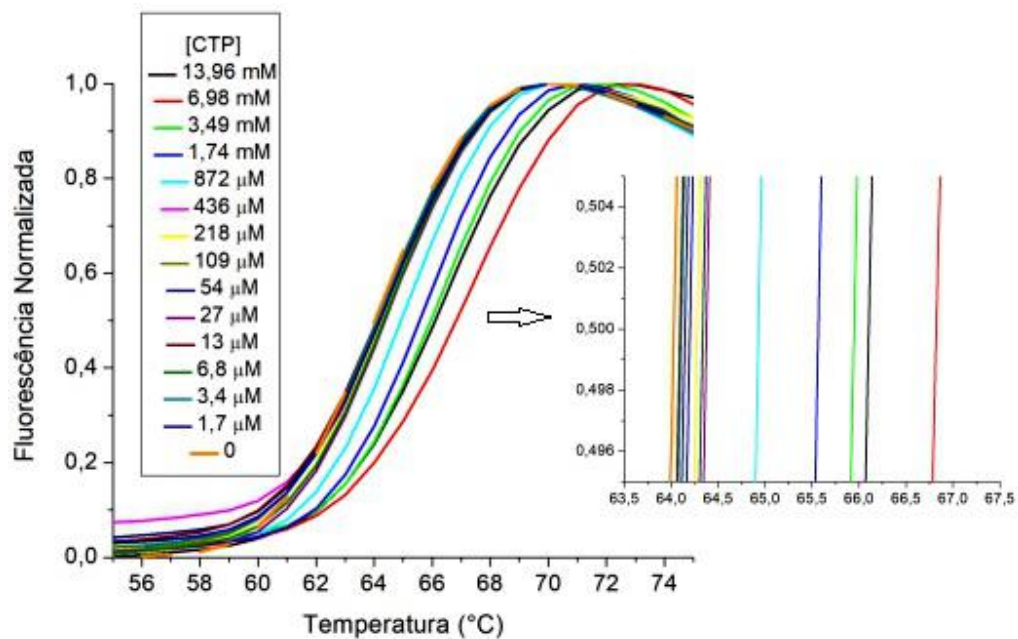


Figura 28 - Curvas de desnaturação térmica da rPb27 na presença de CTP. São apresentadas curvas de desnaturação da proteína na presença de várias concentrações do nucleotídeo, para obtenção das temperaturas de *melting* da proteína. A T_m é obtida pela temperatura do ponto médio da fluorescência, correspondendo ao valor de 0,5 no eixo Y. O controle (proteína sem ligante) é apresentado em laranja (n=3).

A proteína rPb27, sem adição de nucleotídeo, foi utilizada como controle. Observa-se que quando adicionado o nucleotídeo CTP, houve o deslocamento da curva à direita, indicando que o nucleotídeo promoveu a estabilização térmica da proteína, levando ao aumento da T_m . Essa estabilização foi mais significativa a partir

de 436 μM do ligante, aumentando até o limite de 6,98 mM, a partir do qual observa-se um deslocamento à esquerda, mas mantendo-se uma maior estabilização que a proteína *apo*.

O K_d da interação Pb27:CTP foi estimado a partir da variação T_m com a concentração de ligante adicionado (**Figura 29**). A T_m da proteína *apo* foi estimada em $64,0 \pm 0,1$ °C; o aumento da T_m ocorreu a partir da adição de 0,2 mM de CTP e houve estabilização máxima de $2,8$ °C \pm $0,2$ °C, com a adição de 6,98 mM do nucleotídeo.

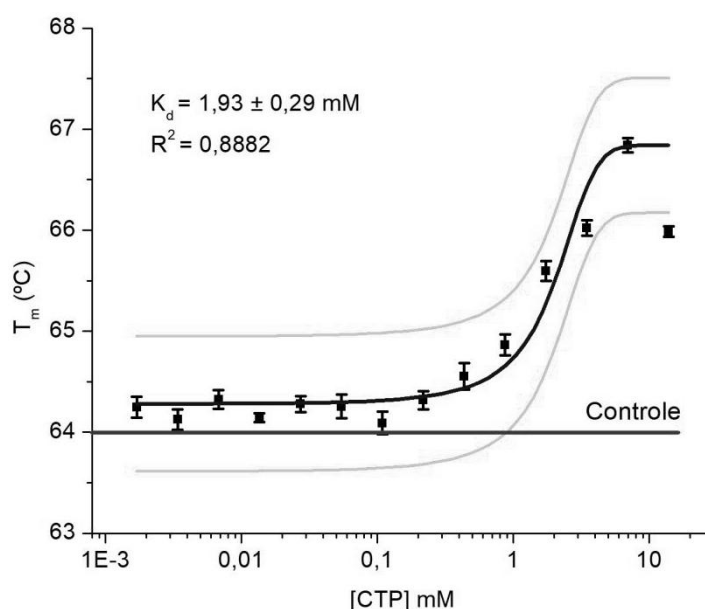


Figura 29 - Curva para determinação do K_d da interação Pb27:CTP por TSA. É apresentada a variação de T_m da rPb27 em função da concentração de CTP adicionado. A curva foi ajustada com a equação sigmóide de Boltzmann para e extração do K_d ($n=3$).

A curva obtida apresenta perfil sigmóide, e a equação de Boltzmann foi novamente utilizada para o cálculo do K_d do CTP, correspondente ao ponto médio da curva, estimado em $1,93 \pm 0,29$ mM. Este método de obtenção do K_d apresenta a desvantagem de não ter a temperatura definida, devido à necessidade de variação da temperatura para a desnaturação térmica, portanto não foi utilizado para a estimativa de outros parâmetros termodinâmicos, como ΔG . Ainda assim, por ser um método fácil e que permite a análise de um grande número de amostras em pouco

tempo, pode ser utilizado para uma estimativa inicial do K_d , ou ainda em ensaios qualitativos, para a triagem de compostos.

A **Figura 30** apresenta as curvas de desnaturação térmica da Pb27 na presença de CMP. Para esse nucleotídeo, a T_m não aumentou proporcionalmente às concentrações de nucleotídeo utilizadas. Na **Figura 31** é mostrada a curva de variação da T_m em função da concentração de CMP. Entre as concentrações de 0,13 mM e 1,52 mM, observa-se uma T_m estável, com um aumento máximo de $0,21\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,08\text{ }^\circ\text{C}$ em relação à proteína apo. Entre as concentrações de 2,28 mM e 26 mM, observa-se o deslocamento das curvas à esquerda, indicando a diminuição da T_m com a adição de concentrações crescentes do ligante, e não foi possível estimar o K_d da interação Pb27:CMP através da técnica. Essa diminuição poderia indicar uma ligação do CMP a uma conformação menos estável, não nativa, da Pb27 (Cimpmperman *et al.*, 2008), ou ainda uma desestabilização pelo excesso de ligante. A captura de moléculas de água do interior da proteína para a solvatação e solubilização do excesso de nucleotídeo adicionado também poderia ser um fator desestabilizante da proteína.

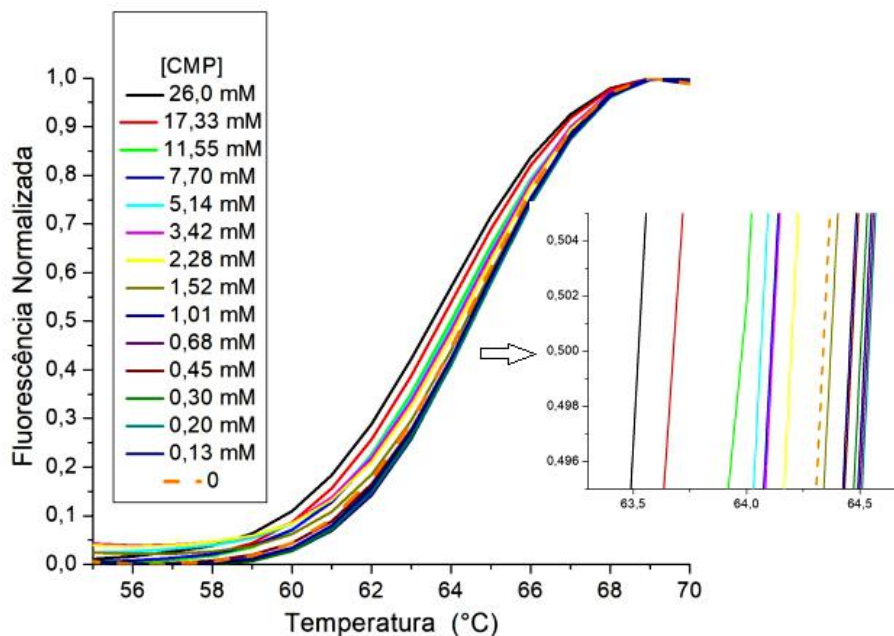


Figura 30 - Curvas de desnaturação térmica da rPb27 na presença de CMP. A T_m da proteína em cada concentração de nucleotídeo é obtida pela temperatura do ponto médio fluorescência, correspondendo ao valor de 0,5 no eixo Y. O controle (proteína sem ligante) é apresentado pela linha pontilhada em laranja ($n=3$).

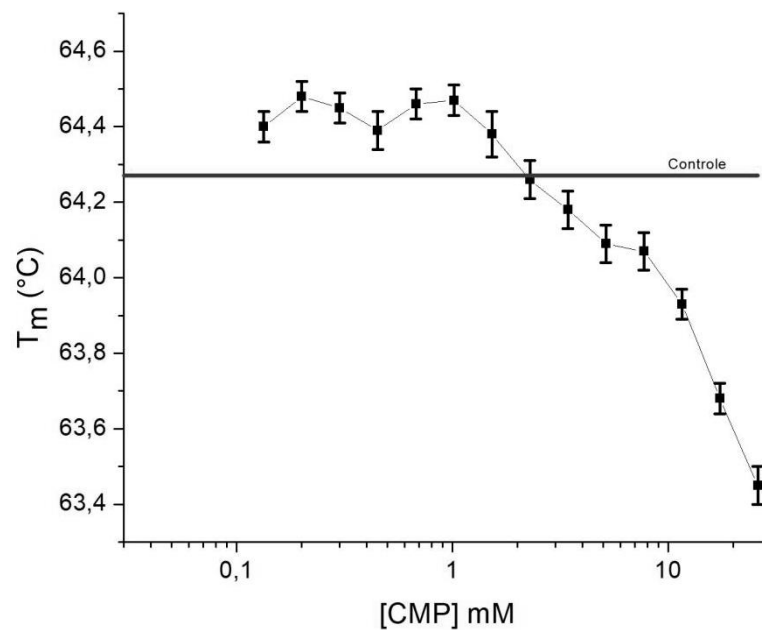


Figura 31 - Variação de T_m da rPb27 em função da concentração de CMP. A linha controle indica a T_m da proteína na ausência de ligante. Observa-se a diminuição da T_m a partir da adição de 2,28 mM do nucleotídeo (n=3).

5.2.3 Resultados de ITC

A calorimetria de titulação isotérmica foi empregada para a obtenção dos parâmetros termodinâmicos da interação da rPb27 com os nucleotídeos CTP e CMP, permitindo uma análise mais profunda do que as outras técnicas utilizadas. Ter uma estimativa prévia da constante de interação é uma etapa importante, que pode facilitar a obtenção dos melhores parâmetros de análise por ITC, já que dentre os métodos utilizados, é o que consome a maior quantidade de amostra e o de maior tempo de análise.

Um importante parâmetro da titulação é o *c-value*, que indica o formato da isoterma, e pode ser utilizado para se definir as melhores concentrações de trabalho para o sistema. Pode ser definido como a razão da concentração molar do receptor pelo K_d da interação, cujo valor ótimo está entre 10 e 500, o que permitiria a obtenção de uma curva em formato sigmoidal, com ponto de inflexão bem definido, a partir da qual seria possível obter todos os parâmetros relevantes de interação. Porém, para interações muito fortes ($K_d < 10$ nM) ou muito fracas ($K_d > 100$ μ M), a realização do ensaio direto com *c-value* ótimo não é possível. No primeiro caso, a concentração de

receptor utilizada deveria ser muito baixa, o que levaria a um sinal muito fraco. Já no segundo caso, uma concentração muito alta de macromolécula, e conseqüentemente do seu ligante, deveriam ser empregados, o que se torna impraticável por questões de gasto de amostra ou solubilidade (Turnbull & Daranas, 2003).

Esse último caso é o do sistema Pb27:CTP, que de acordo com os valores de K_d estimados pelas outras técnicas ($\sim 1,3 - 1,9$ mM), constitui um sistema de fraca interação. Para uma titulação ideal segundo o *c-value*, a concentração de rPb27 utilizada deveria estar entre ~ 20 mM e 1 M, que seriam valores impraticáveis. Porém a análise realizada apresenta *c-value* de aproximadamente 0,04. Dessa forma, não foi possível a obtenção de uma isoterma sigmoidal, com ponto de inflexão definido, e a estequiometria da interação não pode ser calculada, sendo obtida uma curva hiperbólica. Da mesma forma, a entalpia não pode ser determinada visualmente, sendo obtida pelo ajuste da curva.

A seguir, é apresentado o termograma e a isoterma da titulação da rPb27 a 86 μ M, com uma solução de CTP a 9,78 mM, a 25 °C, obtidos através da técnica. Foram feitas 30 injeções de 10 μ L de ligante, com espaçamento de 180 s e tempo de filtro de 2 s. A primeira injeção foi feita com menor volume (2 μ L), e descartada na análise, pois pode haver uma mistura entre a solução da macromolécula e do ligante, levando a resultados espúrios na primeira injeção.

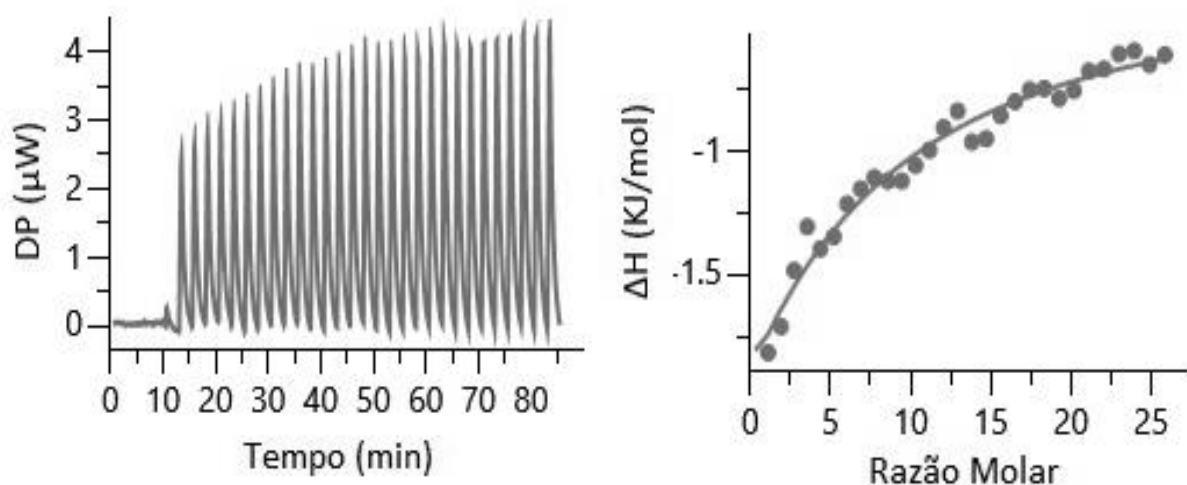


Figura 32 - Termograma e isoterma da titulação de Pb27 com CTP. A taxa de variação de energia (calor) trocado com sistema ao longo da titulação é apresentado (esquerda). A variação da entalpia obtida após a integração do calor trocado é apresentada em função da razão molar de ligante adicionado (direita).

Os parâmetros da interação Pb27:CTP foram calculados fixando-se a estequiometria de interação em 1:1, partindo-se de um modelo mais simples que permitiu o ajuste dos dados, já que o modelo estrutural indica um único sítio de ligação, e que a estequiometria não pôde ser adequadamente determinada. A análise feita pelo ajuste da isoterma através do modelo de um único sítio de ligação, indicou um K_d de $1,92 \pm 0,40$ mM, $\Delta G = -15,5$ KJ/mol, além de ΔH de $-34,3 \pm 7,74$ KJ/mol, e ΔS estimado de $-0,063$ KJ/mol K^{-1} . Já os resultados de ITC da interação Pb27:CMP não foram reprodutíveis, e em alguns casos não indicaram interação, portanto as análises foram inconclusivas através dos protocolos testados.

5.2.4 Interação entre rPb27 e CTP

O estudo da função de uma proteína pode ser realizado em muitos níveis. Nesse trabalho, buscamos informações sobre a função da proteína Pb27, avaliando sua interação molecular com possíveis ligantes, e analisando-a a partir de parâmetros termodinâmicos. Na **Tabela 3** são resumidas as informações obtidas através do estudo termodinâmico de interação da proteína rPb27 com o nucleotídeo CTP:

Tabela 3 - Parâmetros termodinâmicos de interação da rPb27 com CTP estimados por diferentes técnicas.

Método	CTP			
	K_d (mM)	ΔG (KJ/mol)	ΔH (KJ/mol)	ΔS (KJ/mol K^{-1})
Fluorimetria	$1,37 \pm 0,08$	-16,34	-	-
TSA	$1,93 \pm 0,29$	-	-	-
ITC	$1,92 \pm 0,40$	-15,5	$-34,3 \pm 7,74$	-0,063
Média	1,74	-15,92	-	-

Apesar de um valor de constante de dissociação ter sido obtido para o sistema Pb27:CMP por fluorimetria intrínseca de triptofano (1,88 mM), essa técnica apresenta a desvantagem de fornecer falsos positivos, quando a diminuição da fluorescência do

triptofano não é causada por ligação entre duas moléculas, mas por outros mecanismos, como colisão de partículas (van de Weert & Stella, 2011). Essa interação não foi caracterizada adequadamente pelas outras técnicas utilizadas.

Podemos observar que os valores de K_d para a interação Pb27:CTP nas três técnicas utilizadas (**Tabela 3**) foram de mesma ordem de 10^{-3} M, e foram muito semelhantes por TSA e ITC, portanto elas se confirmam e se complementam. Conseqüentemente, os valores de ΔG também foram semelhantes, já que foram obtidos a partir do valor de K_d encontrado. Já os valores de ΔH e ΔS só foram obtidos por ITC, que é uma técnica de avaliação direta do calor trocado durante a interação.

Os resultados indicam que a interação Pb27:CTP é fraca, exergônica (~ -16 KJ/mol), exotérmica ($-34,3$ KJ/mol), ou seja, é uma reação espontânea, que libera calor e energia livre. A força que favorece a reação é a entalpia, indicando prevalência de formação de ligações não covalentes, como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, sobre a quebra de interações entre resíduos de aminoácidos e destes com moléculas do solvente, que ocorrem durante a reorganização e interação com o ligante (Du *et al.*, 2016).

A variação da entropia negativa obtida por ITC para o complexo Pb27:CTP é desfavorável, indicando a formação de um sistema mais ordenado, o que seria impropício à reação, a menos que a variação da entalpia fosse favorável. Há maior contribuição da restrição dos graus de liberdade da proteína e/ou ligante na formação do complexo, em relação a contribuição favorável da liberação da água de solvatação no sítio de ligação e ao redor do ligante (Du *et al.*, 2016).

Tentativas de obter uma estrutura cristalográfica do complexo Pb27:CTP foram realizadas (dados não apresentados). Infelizmente, não pudemos obter a estrutura até o momento, e confirmar os resíduos de aminoácidos e os grupos químicos participantes da interação, provavelmente devido à alta tendência à dissociação do complexo. Porém, utilizando o modelo de *docking* obtido previamente (**Figura 2, p. 19**), podemos observar que a interação do CTP no sítio ativo poderia ocorrer por interações iônicas entre os grupos fosfato e resíduos de aminoácidos básicos (arg44, lis147, arg154 e arg159), ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da ribose e glutamato (glu105), e entre a citosina e resíduos de tirosina (tyr118), arginina (arg115) e glutamato (glu146), além da estabilização da carga negativa dos fosfatos por um íon magnésio encontrado no sítio ativo (Coitinho *et al.*, 2019). Resíduos de arginina e lisina, além do íon magnésio, também foram participantes da interação de uma

citidililtransferase de *E. coli* com CTP, observados na estrutura cristalográfica do complexo obtido por Richard *et al.* (2001).

Comparando a estrutura do CTP com seu análogo, CMP (**Figura 33**), a diferença reside basicamente no número de fosfatos. Assim, o CMP teria menos pontos de interação com os aminoácidos básicos do sítio de ligação, sendo menos estabilizado que o CTP.

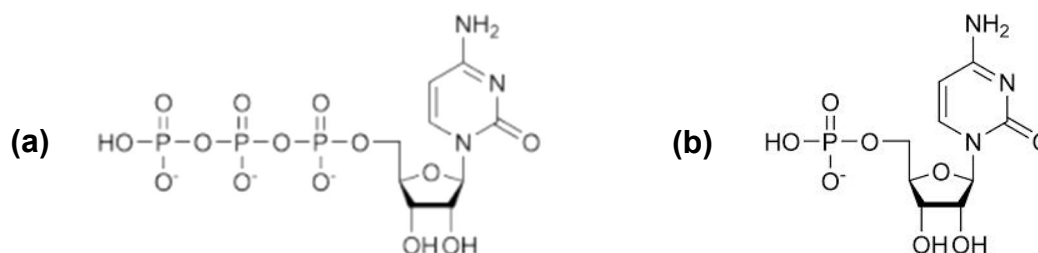


Figura 33 - Estruturas químicas dos nucleotídeos CTP (a) e CMP (b).

Concentrações intracelulares de CTP descritas na literatura variam na ordem de 10^{-4} a 10^{-3} M. A compilação feita por Traut (1994) indicou uma concentração de 0,278 mM, utilizando dados principalmente de células de mamíferos. Concentração semelhante (0,26 mM) também pode ser encontrada em estudos sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* (Koç *et al.*, 2004). Para células de *Escherichia coli* cultivadas em meio sintético, Danchin *et al.* (1984) encontraram o valor de 1,2 mM, enquanto Bennett *et al.* (2009) encontraram o valor de 2,7 mM para as bactérias em crescimento alimentadas com glicose.

O valor de K_d encontrado para a interação Pb27:CTP no presente trabalho é cerca de 0,6 a 7 vezes a concentração fisiológica do nucleotídeo. Assim, essa interação pode ter significado biológico, apesar de fraca e mantendo a proteína longe do ponto saturação. Nagy *et al.* (2013) também determinaram um valor de K_d de ordem semelhante à concentração fisiológica (0,29 mM) para a interação do CTP com uma fosfocolina citidililtransferase de *Plasmodium falciparum*, na presença do íon magnésio. Quando esse íon foi removido por EDTA, o K_d foi significativamente menor (0,06 mM), indicando que esse metal também poderia modular a força da interação, e que os resíduos carregados positivamente poderiam contribuir para a estabilização do nucleotídeo no sítio de ligação na ausência de magnésio.

O mecanismo geral de ação das nucleotidiltransferases é a transferência do nucleotídeo monofosfato a partir do trifosfato a um grupo hidroxila de um outro substrato, como uma proteína, ácido nucleico ou pequena molécula, com liberação de dois grupos fosfato (Kutcha *et al.*, 2009). Dessa forma, o CMP seria o produto da interação da proteína com o CTP, cuja formação poderia ser ativada pela ligação com um outro substrato. Assim, esperaria-se uma interação mais fraca com o CMP, a fim de liberar o produto, ou ainda a inibição da enzima pela ligação com CMP. Uma hipótese é que a presença de um segundo ligante, talvez o substrato para o qual o CMP seria transferido, estabilizaria a interação com o CTP, num complexo ternário, e aumentaria sua afinidade. De qualquer forma, a caracterização de um outro substrato natural, acceptor do nucleosídeo monofosfato, seria importante para o esclarecimento da função da proteína.

O nucleotídeo CTP apresenta conhecidos papéis biológicos, como bloco de construção na biossíntese de ácidos nucleicos (Blackburn *et al.*, 2006), cofator enzimático, substrato para a fosforilação e ativação de intermediários de vias metabólicas, além de participar das vias de síntese de lipídeos e isoprenóides, do metabolismo de carboidratos, e da regulação alostérica de enzimas (Kennedy & Weiss, 1956; Richard *et al.*, 2001; Carman & Han, 2011).

Enzimas ligadoras de CTP incluem RNA polimerases (Wang *et al.*, 2006); diferentes quinases, por exemplo a dolicoil quinase, envolvida na síntese de glicanos (Shridas & Waechter, 2006), e também as citidililtransferases (CCTs), que catalisam a transferência do CMP para a ativação de um substrato, como exemplo a CMP-Kdo sintetase, envolvida na síntese de lipopolisacarídeos (Heyes *et al.*, 2009); a fosfoetanolamina CCT e a fosfocolina CCT, que atuam na síntese de fosfolipídeos (Bakovic *et al.*, 2007; Cornell & Ridgway, 2015). Os estudos de *knockdown* do gene da Pb27 feito por Torres *et al.* (2014) indicam um papel da proteína na manutenção da morfologia e da adesão celular, e na interação com macrófagos, um possível papel de proteínas que atuam na parede celular fúngica.

Em resumo, foi possível confirmar a interação da proteína Pb27 com o nucleotídeo CTP, através das técnicas utilizadas, além de estimar a constante de interação e outros parâmetros termodinâmicos. Esses dados corroboram informações obtidas anteriormente, e reforçam a classificação da proteína como nucleotidiltransferase. Contudo, a identificação de um outro substrato natural seria

6 CONCLUSÕES

A proteína Pb27 de *Paracoccidioides brasiliensis* recombinante foi expressa adequadamente em sistema procarioto, obtendo-se a proteína purificada, em estado estável, para a utilização em ensaios de interação proteína-ligante, e para a utilização na construção de um biossensor para imunodiagnóstico. A interação da proteína com o nucleotídeo CTP foi caracterizada através de parâmetros termodinâmicos de interação, sendo uma interação fraca, mas termodinamicamente favorável. As análises preliminares de utilização da Pb27 em um biossensor impedimétrico indicaram o reconhecimento de anticorpos anti-Pb27 pela proteína, porém mais estudos ainda são necessários para a otimização e padronização do biossensor. Os resultados corroboram com a classificação da proteína como nucleotidiltransferase, e indicam-a como uma boa candidata para a construção de dispositivos para diagnóstico da paracoccidioidomicose.

7 PERSPECTIVAS

A principal perspectiva deste trabalho é a continuação do estudo com biossensores, para a padronização dos dispositivos de rPb27 para a detecção de anticorpos, incluindo a diminuição da variabilidade entre eletrodos, a determinação de limites de detecção e quantificação, e a realização de testes de estabilidade. Após a padronização, espera-se testar os sensores com amostras de pacientes infectados com paracoccidiodomicose, e também com pacientes portadores de outras doenças para controle, avaliando-se a sensibilidade e especificidade dos biossensores. Almeja-se que os dispositivos construídos possam ser utilizados para diagnóstico da paracoccidiodomicose em um futuro próximo.

Além disso, o trabalho abre a questão se um outro substrato natural da Pb27 poderia interagir e estabilizar o complexo Pb27:CTP. A identificação desse substrato seria importante para maior caracterização da função biológica e do mecanismo de ação e da enzima.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, J. A., Livingston, N. M., Egri, S. B., Guth, E., & Francklyn, C. S. (2017). Characterization of aminoacyl-tRNA synthetase stability and substrate interaction by differential scanning fluorimetry. *Methods*, 113, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.10.013>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Protein function. *Molecular Biology of the Cell*. 4th Edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26911/>
- Andrei, S. A., Sijbesma, E., Hann, M., Davis, J., O'Mahony, G., Perry, M. W. D., Karawajczyk, A., Eickhoff, J., Brunsveld, L., Doveston, R. G., Milroy, L.-G., & Ottmann, C. (2017). Stabilization of protein-protein interactions in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(9), 925–940. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1346608>
- Bakovic, M., Fullerton, M. D., & Michel, V. (2007). Metabolic and molecular aspects of ethanolamine phospholipid biosynthesis: The role of CTP:phosphoethanolamine cytidyltransferase (Pcyt2). *Biochemistry and Cell Biology*, 85(3), 283–300. <https://doi.org/10.1139/O07-006>
- Bard, A. J., & Faulkner, L. R. (2001). Techniques based on concepts of impedance. In *Electrochemical methods: Fundamentals and applications* (2 ed, p. 368–416). Wiley.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., Van Dien, S. J., & Rabinowitz, J. D. (2009). Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology*, 5(8), 593–599. <https://doi.org/10.1038/nchembio.186>
- Bertok, T., Lorencova, L., Chocholova, E., Jane, E., Vikartovska, A., Kasak, P., & Tkac, J. (2019). Electrochemical impedance spectroscopy based biosensors: Mechanistic principles, analytical examples and challenges towards commercialization for assays of protein cancer biomarkers. *ChemElectroChem*, 6(4), 989–1003. <https://doi.org/10.1002/celec.201800848>
- Bisio, L. C., Silva, S. P., Pereira, I. S., Xavier, M. A. S., Venâncio, E. J., Puccia, R., Soares, C. M. A., & Felipe, M. S. S. (2005). A new *Paracoccidioides brasiliensis* 70-kDa heat shock protein reacts with sera from paracoccidioidomycosis patients. *Medical Mycology*, 43(6), 495–503. <https://doi.org/10.1080/13693780400029478>
- Blackburn, G. M., Gait, M. J., Loakes, D., & Williams, D. M. (Orgs.). (2007). Chapter 3. Nucleosides and nucleotides. In *Nucleic Acids in Chemistry and Biology* (3o ed, p. 77–142). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781847555380-00077>
- Brayner, R., Couté, A., Livage, J., Perrette, C., & Sicard, C. (2011). Micro-algal biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(2), 581–597. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5107-z>

- Bresolin, I. T. L., Miranda, E. A., & Bueno, S. M. A. (2009). Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: Aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. *Química Nova*, 32(5), 1288–1296. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500035>
- Camargo, Z. P., Berzaghi, R., Amaral, C. C., & Silva, S. H. M. (2003). Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Medical Mycology*, 41(6), 539–542. <https://doi.org/10.1080/13693780310001615358>
- Carman, G. M., & Han, G.-S. (2011). Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 859–883. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092229>
- Carneiro, F. R. G., Silva, T. C. L., Alves, A. C., Haline-Vaz, T., Gozzo, F. C., & Zanchin, N. I. T. (2006). Spectroscopic characterization of the tumor antigen NY-REN-21 and identification of heterodimer formation with SCAND1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 343(1), 260–268. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.140>
- Carvalho, K. C., Vallejo, M. C., Camargo, Z. P., & Puccia, R. (2008a). Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(4), 622–629. <https://doi.org/10.1128/CVI.00437-07>
- Carvalho, K. C., Vallejo, M. C., Camargo, Z. P., & Puccia, R. (2008b). Use of recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(4), 622–629. <https://doi.org/10.1128/CVI.00437-07>
- Chang, Y.-J., Ho, C.-Y., Zhou, X.-M., & Yen, H.-R. (2018). Determination of degree of RBC agglutination for blood typing using a small quantity of blood sample in a microfluidic system. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.008>
- Cimpmperman, P., Baranauskienė, L., Jachimovičiūtė, S., Jachno, J., Torresan, J., Michailovienė, V., Matulienė, J., Sereikaitė, J., Bumelis, V., & Matulis, D. (2008). A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands. *Biophysical Journal*, 95(7), 3222–3231. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.134973>
- Cisalpino, P. S., Puccia, R., Yamauchi, L. M., Cano, M. I. N., da Silveira, J. F., & Travassos, L. R. (1996). Cloning, Characterization, and Epitope Expression of the Major Diagnostic Antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4553–4560.
- Clark, L. C., & Lyons, C. (2006). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102(1), 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>

Coitinho, J. B. (2013). *Cristalização, estrutura e atividade de duas proteínas com apelo biotecnológico: Pb27 de Paracoccidioides brasiliensis e salicilaldeído desidrogenase (NahF) de Pseudomonas putida* [Tese de doutorado em Bioquímica, Universidade Federal de Minas Gerais]. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/BUOS-9BNJ5X>

Coitinho, Juliana B., Costa, M. A. F., Melo, E. M., Morais, E. A., de Andrade, L. G. A., da Rocha, A. M., de Magalhães, M. T. Q., Favaro, D. C., Bleicher, L., Pedroso, E. R. P., Goes, A. M., & Nagem, R. A. P. (2019). Structural and immunological characterization of a new nucleotidyltransferase-like antigen from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Molecular Immunology*, 112, 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.04.028>

Contreras-Naranjo, J., & Aguilar, O. (2019). Suppressing non-specific binding of proteins onto electrode surfaces in the development of electrochemical immunosensors. *Biosensors*, 9(1), 15. <https://doi.org/10.3390/bios9010015>

Copeland, R. A. (2000). Protein-ligand binding equilibria. *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis* (2nd ed, p. 76–108). Wiley.

Cornell, R. B., & Ridgway, N. D. (2015). CTP:phosphocholine cytidyltransferase: Function, regulation, and structure of an amphitropic enzyme required for membrane biogenesis. *Progress in Lipid Research*, 59, 147–171. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.07.001>

Correa, M. M., Bedoya, A. M., Guerrero, M. P., Méndez, J., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (2007). Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycoses*, 50(1), 41–47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2006.01306.x>

Cunha, D. A., Zancope-Oliveira, R. M., Sueli, M., Felipe, S., Salem-Izacc, S. M., Deepe, G. S., & Soares, C. M. A. (2002). Heterologous expression, purification, and immunological reactivity of a recombinant hsp60 from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(2), 374–377. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.2.374-377.2002>

da Silva, J. de F., de Oliveira, H. C., Marcos, C. M., Assato, P. A., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: An update. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(1), 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004>

Danchin, A., Dondon, L., & Daniel, J. (1984). Metabolic alterations mediated by 2-ketobutyrate in *Escherichia coli* K12. *Molecular and General Genetics MGG*, 193(3), 473–478. <https://doi.org/10.1007/BF00382086>

de Oliveira, H. C., Assato, P. A., Marcos, C. M., Scorzoni, L., de Paula E Silva, A. C. A., Da Silva, J. D. F., Singulani, J. de L., Alarcon, K. M., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2015). *Paracoccidioides*-host interaction: An overview on

recent advances in the paracoccidioidomycosis. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01319>

Diez, S., Gomez, B. L., Restrepo, A., Hay, R. J., & Hamilton, A. J. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* 87-kilodalton antigen, a heat shock protein useful in diagnosis: Characterization, purification, and detection in biopsy material via immunohistochemistry. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 359–365. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.2.359-365.2002>

Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., & Liu, S.-Q. (2016). Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 144. <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>

Dy, R. L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G. P. C., & Fineran, P. C. (2014). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin–antitoxin mechanism. *Nucleic Acids Research*, 42(7), 4590–4605. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1419>

Entzeroth, M., Flotow, H., & Condron, P. (2009). Overview of high-throughput screening. *Current Protocols in Pharmacology*, 44(1). <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph0904s44>

Faria, A. M., & Mazon, T. (2019). Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor. *Talanta*, 203, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.080>

Faria, H. A. M., & Zucolotto, V. (2019). Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. *Biosensors and Bioelectronics*, 131, 149–155. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.02.018>

Fernandes, V.C., Coitinho, J. B., Veloso, J. M. R., Araújo, S. A., Pedroso, E. P., & Goes, A. M. (2011). Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Journal of Immunological Methods*, 367(1–2), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.006>

Fernandes, Viviane C., Martins, E. M. N., Boeloni, J. N., Coitinho, J. B., Serakides, R., & Goes, A. M. (2011). The combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* Pb40 and Pb27 recombinant proteins enhances chemotherapy effects in experimental paracoccidioidomycosis. *Microbes and Infection*, 13(12–13), 1062–1072. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.06.004>

Florea, A., Melinte, G., Simon, I., & Cristea, C. (2019). Electrochemical biosensors as potential diagnostic devices for autoimmune diseases. *Biosensors*, 9(1), 38. <https://doi.org/10.3390/bios9010038>

Fortes, M. R. P., Miot, H. A., Kurokawa, C. S., Marques, M. E. A., & Marques, S. A. (2011). Imunologia da paracoccidioidomicose. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 86(3), 516–524. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300014>

- Freire, E., Mayorga, O. L., & Straume, M. (1990). Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry*, 62(18), 950A-959A. <https://doi.org/10.1021/ac00217a002>
- Frey, A., Di Canzio, J., & Zurakowski, D. (1998). A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods*, 221(1–2), 35–41. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00170-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00170-7)
- García Blanco, S., Muñoz, J. F., Torres, I., Díez Posada, S., Gómez, B. L., McEwen, J. G., Restrepo, S., & García, A. M. (2011). Differential PbP27 expression in the yeast and mycelial forms of the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genetics and Biology*, 48(12), 1087–1095. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.09.001>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the expasy server. J. M. Walker (Org.), *The Proteomics Protocols Handbook* (p. 571–607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Gavande, N. S., VanderVere-Carozza, P., Mishra, A. K., Vernon, T. L., Pawelczak, K. S., & Turchi, J. J. (2017). Design and structure-guided development of novel inhibitors of the xeroderma pigmentosum group a (Xpa) protein–dna interaction. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(19), 8055–8070. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00780>
- Gooding, J. J., & Darwish, N. (2012). The rise of self-assembled monolayers for fabricating electrochemical biosensors-an interfacial perspective. *The Chemical Record*, 12(1), 92–105. <https://doi.org/10.1002/tcr.201100013>
- Griffiths, J., Lopes Colombo, A., & Denning, D. W. (2019). The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (Fungal) disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007195. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007195>
- Hammond, J. L., Formisano, N., Estrela, P., Carrara, S., & Tkac, J. (2016). Electrochemical biosensors and nanobiosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 69–80. <https://doi.org/10.1042/EBC20150008>
- Heyes, D. J., Levy, C., Lafite, P., Roberts, I. S., Goldrick, M., Stachulski, A. V., Rossington, S. B., Stanford, D., Rigby, S. E. J., Scrutton, N. S., & Leys, D. (2009). Structure-based mechanism of cmp-2-keto-3-deoxymanno-octulonic acid synthetase: Convergent evolution of a sugar-activating enzyme with dna/rna polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(51), 35514–35523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.056630>
- Huynh, K., & Partch, C. L. (2015). Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Current Protocols in Protein Science*, 79(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps2809s79>
- Jayanthi, V. S. P. K. S. A., Das, A. B., & Saxena, U. (2017). Recent advances in biosensor development for the detection of cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics*, 91, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.014>

- Kelly, S. M., & Price, N. C. (2000). The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein & Peptide Science*, 1(4), 349–384. <https://doi.org/10.2174/1389203003381315>
- Kennedy, E. P., & Weiss, S. B. (1956). The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipides. *The Journal of Biological Chemistry*, 222(1), 193–214.
- Koç, A., Wheeler, L. J., Mathews, C. K., & Merrill, G. F. (2004). Hydroxyurea arrests dna replication by a mechanism that preserves basal dntp pools. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 223–230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303952200>
- Koshland, D. E., Némethy, G., & Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits *. *Biochemistry*, 5(1), 365–385. <https://doi.org/10.1021/bi00865a047>
- Koshland, Daniel E. (1995). The key–lock theory and the induced fit theory. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33(2324), 2375–2378. <https://doi.org/10.1002/anie.199423751>
- Kuchta, K., Knizewski, L., Wyrwicz, L. S., Rychlewski, L., & Ginalski, K. (2009). Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: Identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Research*, 37(22), 7701–7714. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp854>
- Lakowicz, J. R. (Org.). (2006). Quenching of fluorescence. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (p. 277–330). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_8
- Legrain, P., & Rain, J.-C. (2014). Twenty years of protein interaction studies for biological function deciphering. *Journal of Proteomics*, 107, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.03.038>
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5th ed). W.H. Freeman.
- Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 40(6), 372–382. <https://doi.org/10.1002/bmb.20644>
- Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. A., & Perez-Iratxeta, C. (2012). Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 80(2), 374–381. <https://doi.org/10.1002/prot.23188>
- Maduraiveeran, G., Sasidharan, M., & Ganesan, V. (2018). Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 103, 113–129. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.12.031>

Martinez, R. (2017). New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. *Journal of Fungi*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>

Malvern Panalytical. ([s.d.]). Isothermal titration calorimetry. Biomolecular interactions analysis. Recuperado 15 de janeiro de 2020, de <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/microcalorimetry/isothermal-titration-calorimetry>

Matute, D. R., Quesada-Ocampo, L. M., Rauscher, J. T., & McEwen, J. G. (2008). Evidence for positive selection in putative virulence factors within the *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(9), e296. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000296>

McEwen, J. G., Ortiz, B. L., García, A. M., Florez, A. M., Botero, S., & Restrepo, A. (1996). Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kda antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genetics and Biology*, 20(2), 125–131. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1996.0027>

Mehennaoui, S., Poorahong, S., Jimenez, G. C., & Siaj, M. (2019). Selection of high affinity aptamer-ligand for dexamethasone and its electrochemical biosensor. *Scientific Reports*, 9(1), 6600. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42671-3>

Mendes, R. P., Cavalcante, R. de S., Marques, S. A., Marques, M. E. A., Venturini, J., Sylvestre, T. F., Paniago, A. M. M., Pereira, A. C., da Silva, J. de F., Fabro, A. T., Bosco, S. de M. G., Bagagli, E., Hahn, R. C., & Levorato, A. D. (2017). Paracoccidioidomycosis: Current perspectives from Brazil. *The Open Microbiology Journal*, 11(1), 224–282. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224>

Mocz, G., & Ross, J. A. (2013). Fluorescence techniques in analysis of protein–ligand interactions. In M. A. Williams & T. Daviter (Orgs.), *Protein-Ligand Interactions* (Vol. 1008, p. 169–210). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_7

Mollarasouli, Kurbanoglu, & Ozkan. (2019). The role of electrochemical immunosensors in clinical analysis. *Biosensors*, 9(3), 86. <https://doi.org/10.3390/bios9030086>

Morais, E. A., de Carvalho Oliveira, J. A., Melo, E. M., Costa, M. A. F., Nagem, R. A. P., Russo, R. C., Gomes, D. A., & Goes, A. M. (2018). Efficacy of Chitosan as Vaccine Adjuvant Against Paracoccidioidomycosis in Mice. *Journal of Immunology and Infectious Diseases*, 5(1), 1–16.

Morais, E. A., Martins, E. M. N., Fernandes, V. C., dos Santos, I. G. D., Silva, G. A. B., Gomes, D. A., & Goes, A. M. (2013). Immunization with rPb27 Protects Mice from the Disruption of VEGF Signaling in *Paracoccidioides brasiliensis* Infection. *Journal of Life Sciences*, 7(9), 913–927.

Morais, Elis Araujo, Martins, E. M. do N., Boelone, J. N., Gomes, D. A., & Goes, A. M. (2015). Immunization with recombinant pb27 protein reduces the levels of pulmonary fibrosis caused by the inflammatory response against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 179(1–2), 31–43. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9815-8>

Nagem, R. A. P., Costa, M. A. F., Rodrigues, F. T. G., & Coitinho, J. B. (2018). Crystal structure of an antigenic nucleotidyltransferase-like protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. PDB: 5UVD. doi:10.2210/pdb5UVD/pdb

Nagy, G. N., Marton, L., Krámos, B., Oláh, J., Révész, Á., Vékey, K., Delsuc, F., Hunyadi-Gulyás, É., Medzihradzky, K. F., Lavigne, M., Vial, H., Cerdan, R., & Vértessy, B. G. (2013). Evolutionary and mechanistic insights into substrate and product accommodation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase from *Plasmodium falciparum*. *FEBS Journal*, 280(13), 3132–3148. <https://doi.org/10.1111/febs.12282>

Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2008). *Lehninger principles of biochemistry* (5. ed., 5. print). Freeman.

Nelson, D. L., Cox, M. M., & Lehninger, A. L. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (Seventh edition). W.H. Freeman and Company; Macmillan Higher Education.

Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2(9), 2212–2221. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.321>

Ohno, R., Ohnuki, H., Wang, H., Yokoyama, T., Endo, H., Tsuya, D., & Izumi, M. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 40(1), 422–426. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.07.052>

Ortiz, B. L., Díez, S., Urán, M. E., Rivas, J. M., Romero, M., Caicedo, V., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (1998). Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(6), 826–830. <https://doi.org/10.1128/CDLI.5.6.826-830.1998>

Ortiz, B. L., Garcia, A. M., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (1996). Immunological characterization of a recombinant 27-kilodalton antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 3(2), 239–241. <https://doi.org/10.1128/CDLI.3.2.239-241.1996>

Pain, R. H. (2004). Determining the fluorescence spectrum of a protein. *Current Protocols in Protein Science*, 38(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0707s38>

Pereira, A. L., Amorim, F. G., & Martins Júnior, R. B. (2012). Sorologia da Paracoccidioidomicose. *Revista Eletrônica de Farmácia*, IX(3), 29–44.

Pimenta-Martins, M. G. R., Furtado, R. F., Heneine, L. G. D., Dias, R. S., Borges, M. de F., & Alves, C. R. (2012). Development of an amperometric immunosensor for detection of staphylococcal enterotoxin type A in cheese. *Journal of Microbiological Methods*, 91(1), 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.016>

Poschenrieder, A., Thaler, M., Junker, R., & Luppa, P. B. (2019). Recent advances in immunodiagnosics based on biosensor technologies—From central laboratory to the point of care. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(29), 7607–7621. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01915-x>

Reis, B. S., Fernandes, V. C., Martins, E. M. N., Serakides, R., & Goes, A. M. (2008). Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Vaccine*, 26(43), 5461–5469. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.097>

Renaud, J.-P., & Delsuc, M.-A. (2009). Biophysical techniques for ligand screening and drug design. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.008>

Richard, S. B., Bowman, M. E., Kwiatkowski, W., Kang, I., Chow, C., Lillo, A. M., Cane, D. E., & Noel, J. P. (2001). Structure of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylerythritol synthetase involved in mevalonate-independent isoprenoid biosynthesis. *Nature Structural Biology*, 8(7), 641–648. <https://doi.org/10.1038/89691>

Rocha-Silva, F., Maria de Figueiredo, S., Rutren La Santrer, E. F., Machado, A. S., Fernandes, B., Assunção, C. B., Góes, A. M., & Caligiorne, R. B. (2018). Paracoccidioidomycosis: Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* genome in biological samples by quantitative chain reaction polymerase (Qpcr). *Microbial Pathogenesis*, 121, 359–362. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.05.039>

Santos, G. S., Caldas, R. G. S. C., Melo, F. L., Bruscky, I. S., Silva, M. A. L., Wanderley, L. B., Andrade, C. A. S., & Oliveira, M. D. L. (2019). Label-free nanostructured biosensor for *Schistosoma mansoni* detection in complex biological fluids. *Talanta*, 204, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.111>

Santos, L. da S., Fernandes, V. C., Cruz, S. G. da, Siqueira, W. C., Goes, A. M., & Pedroso, Ê. R. P. (2012). Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: Treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(1), 1–10. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000100001>

Serdyuk, I. N., Zaccai, N. R., & Zaccai, G. (2007). Isothermal Titration Calorimetry. In *Methods in molecular biophysics: Structure, dynamics, function* (p. 221–233). Cambridge University Press.

Shikanai-Yasuda, M. A., Mendes, R. P., Colombo, A. L., Queiroz-Telles, F. de, Kono, A. S. G., Paniago, A. M. M., Nathan, A., Valle, A. C. F. do, Bagagli, E., Benard, G., Ferreira, M. S., Teixeira, M. de M., Silva-Vergara, M. L., Pereira, R. M., Cavalcante, R. de S., Hahn, R., Durlacher, R. R., Khoury, Z., Camargo, Z. P. de, ... Martinez, R. (2017). Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(5), 715–740. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>

Shridas, P., & Waechter, C. J. (2006). Human dolichol kinase, a polytopic endoplasmic reticulum membrane protein with a cytoplasmically oriented ctp-binding

site. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31696–31704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604087200>

Sreerama, N., & Woody, R. W. (2004). Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. In *Methods in Enzymology* (Vol. 383, p. 318–351). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(04\)83013-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)83013-1)

Stevenson, H., Bacon, A., Joseph, K. M., Gwandaru, W. R. W., Bhide, A., Sankhala, D., Dhamu, V. N., & Prasad, S. (2019). A rapid response electrochemical biosensor for detecting thc in saliva. *Scientific Reports*, 9(1), 12701. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49185-y>

Taborda, C. P., Buccheri, R., Benard, G., Duarte-Neto, A. N., Nosanchuk, J. D., & Travassos, L. R. (2018). *Paracoccidioides spp.* and *Histoplasma capsulatum*: Current and new perspectives for diagnosis and treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1333–1348. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002112231>

Teale, F. W. J., & Weber, G. (1957). Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal*, 65(3), 476–482. <https://doi.org/10.1042/bj0650476>

Thevenot, D. R., Tóth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (1999). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 71(12), 2333–2348. <https://doi.org/10.1351/pac199971122333>

Torres, I., Hernandez, O., Tamayo, D., Muñoz, J. F., García, A. M., Gómez, B. L., Restrepo, A., & McEwen, J. G. (2014). *Paracoccidioides brasiliensis* pbp27 gene: Knockdown procedures and functional characterization. *FEMS Yeast Research*, 14(2), 270–280. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12099>

Traut, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(1), 1–22. <https://doi.org/10.1007/BF00928361>

Turnbull, W. B., & Daranas, A. H. (2003). On the value of c: Can low affinity systems be studied by isothermal titration calorimetry? *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14859–14866. <https://doi.org/10.1021/ja036166s>

van de Weert, M., & Stella, L. (2011). Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *Journal of Molecular Structure*, 998(1–3), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2011.05.023>

Verli, H., & Barreiro, E. J. (2005). Um paradigma da química medicinal: A flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, 28(1), 95–102. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100018>

Vivoli, M., Novak, H. R., Littlechild, J. A., & Harmer, N. J. (2014). Determination of protein-ligand interactions using differential scanning fluorimetry. *Journal of Visualized Experiments*, 91, 51809. <https://doi.org/10.3791/51809>

Wang, D., Bushnell, D. A., Westover, K. D., Kaplan, C. D., & Kornberg, R. D. (2006). Structural basis of transcription: Role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell*, 127(5), 941–954. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.023>

Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Chemical Reviews*, 108(2), 814–825. <https://doi.org/10.1021/cr068123a>

Wolynec, S. (2003). *Técnicas eletroquímicas em corrosão*. EDUSP.

APÊNDICES

Apêndice I - Resultado do sequenciamento da região de rPb27 do plasmídeo pET28a(TEV)-Pb27

5'...GGATACATTTCCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCCATC
 ATCATCATCATCACGAAAACCTGTATTTTCAGGGCCATATGGCGCCGCTCAGTTCCGACGAGCTG
 AAAACTGTTGTTTCCGTCCTTGACAGAACTCGATTCCTTAAATATCGACTATGCCATCATGGGG
 GGCGCTGCGACTTGTCTGCTGAGTGGAGACCCAAATCGAAGGACCGAAGACGTGACCTCGTGA
 TCCATGTTGACCACCGCAAGATTACCGCAGACAACCTTACAACCTCAGCTTCTCAAATCCTTCCCGT
 CCGACTTTGAAGGAGTCAGCCAATTTGGGCACACCATTCCCGCATACAACTGCGCCGACCAGG
 AGGTACCGTTCAGTTGGTGGAACTGGAAGTATTTGACTACCAAAGCTGGCCGCAACGTCCCCAAT
 ACGATCTTCAGACTGCTACACGGACGACGTTGAATATCAACGGTCAGAAGGTCAAACCTTTCAGC
 CCTGAATGGATCCTGCGTGAAAAGATCCTGTCCCAGTATCAGCGCCAAGGTAGTCGCAAAGAAG
 GAACCGATATTCGTGATATCATTAGTATGATCCCTTTGGCTGTGCCGGGCAAACCAGAGCTCAAC
 TTCAACCAAAGCCAAGAGTTGCAAACCTGCATTGGCAAATCTTGTGCAAAGAGGCCAGATTTGAG
 TTCAGCTTTGAAGGCCAAGATCAAATGCAGCGCTGTCTTCCACAAC**TAGACTCGAG**CACCACCAC
 CACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGG...3'

Legenda:

Cauda de histidinas

Sítio de clivagem pela pTEV

Sítio de restrição da NdeI

Sequência da rPb27

Stop Códon

Sítio de restrição da XhoI

ANEXOS

Anexo I - Parâmetros da rPb27 estimados pelo ProtParam.

User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
GHMAPLSSDE LKTVVSVLAQ KLDSLNIIDYA IMGGAATCLL SGDPNRRTED VDLVIHVDHR

      70      80      90     100     110     120
KITADNLTTQ LLKSFPSDFE GVSQFGHTIP AYKLRPPGGT VQLVELEVFD YQSWPQRPQY

     130     140     150     160     170     180
DLQTATRTTL NINGQKVKLF SPEWILREKI LSQYQRQGSR KEGTDIRDII SMIPLAVPGK

     190     200     210     220
PELNFNQSQE LQTALANLVQ KRPDLSALK AKIKCSAVFH N

```

Number of amino acids: 221

Molecular weight: 24712.23

Theoretical pI: 8.52

Amino acid composition:

Ala (A)	14	6.3%
Arg (R)	12	5.4%
Asn (N)	9	4.1%
Asp (D)	14	6.3%
Cys (C)	2	0.9%
Gln (Q)	16	7.2%
Glu (E)	10	4.5%
Gly (G)	12	5.4%
His (H)	5	2.3%
Ile (I)	13	5.9%
Leu (L)	26	11.8%
Lys (K)	14	6.3%
Met (M)	3	1.4%
Phe (F)	7	3.2%
Pro (P)	12	5.4%
Ser (S)	17	7.7%
Thr (T)	14	6.3%
Trp (W)	2	0.9%
Tyr (Y)	5	2.3%
Val (V)	14	6.3%
Py1 (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%

(B) 0 0.0%

(Z) 0 0.0%
 (X) 0 0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 24
 Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 26

Atomic composition:

Carbon	C	1096
Hydrogen	H	1764
Nitrogen	N	308
Oxygen	O	331
Sulfur	S	5

Formula: $C_{1096}H_{1764}N_{308}O_{331}S_5$ Total number of atoms: 3504

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 18575
 Abs 0.1% (=1 g/l) 0.752, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 18450
 Abs 0.1% (=1 g/l) 0.747, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is G (Gly).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 46.73
 This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 93.53

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.363

Anexo II - Parâmetros da 6xHis_rPb27 estimados pelo ProtParam.

User-provided sequence:

```

      10      20      30      40      50      60
MGHHHHHHEN LYFQGHMAPL SSDELKTVVS VLAQKLDLNL IDYAIMGGAA TCLLSGDPNR

      70      80      90     100     110     120
RTEDVDLVIH VDHRKITADN LTTQLLKSFP SDFEGVSQFG HTIPAYKLRR PGGTVQLVEL

     130     140     150     160     170     180
EVFDYQSWPQ RPQYDLQTAT RTTLNINGQK VKLFSPEWIL REKILSQYQR QGSRKEGTDI

     190     200     210     220     230
RDIISMIPLA VPGKPELNFN QSQELQTALA NLVQKRPDLS SALKAKIKCS AVFHN

```

Number of amino acids: 235

Molecular weight: 26518.18

Theoretical pI: 7.85

Amino acid composition:

Ala (A)	14	6.0%
Arg (R)	12	5.1%
Asn (N)	10	4.3%
Asp (D)	14	6.0%
Cys (C)	2	0.9%
Gln (Q)	17	7.2%
Glu (E)	11	4.7%
Gly (G)	13	5.5%
His (H)	11	4.7%
Ile (I)	13	5.5%
Leu (L)	27	11.5%
Lys (K)	14	6.0%
Met (M)	4	1.7%
Phe (F)	8	3.4%
Pro (P)	12	5.1%
Ser (S)	17	7.2%
Thr (T)	14	6.0%
Trp (W)	2	0.9%
Tyr (Y)	6	2.6%
Val (V)	14	6.0%
Py1 (O)	0	0.0%
Sec (U)	0	0.0%
(B)	0	0.0%
(Z)	0	0.0%
(X)	0	0.0%

Total number of negatively charged residues (Asp + Glu): 25
 Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 26

Atomic composition:

Carbon	C	1177
Hydrogen	H	1868
Nitrogen	N	336
Oxygen	O	350
Sulfur	S	6

Formula: $C_{1177}H_{1868}N_{336}O_{350}S_6$ Total number of atoms: 3737

Extinction coefficients:

Extinction coefficients are in units of $M^{-1} cm^{-1}$, at 280 nm measured in water.

Ext. coefficient 20065
 Abs 0.1% (=1 g/l) 0.757, assuming all pairs of Cys residues form cystines

Ext. coefficient 19940
 Abs 0.1% (=1 g/l) 0.752, assuming all Cys residues are reduced

Estimated half-life:

The N-terminal of the sequence considered is M (Met).

The estimated half-life is: 30 hours (mammalian reticulocytes, in vitro).
 >20 hours (yeast, in vivo).
 >10 hours (Escherichia coli, in vivo).

Instability index:

The instability index (II) is computed to be 44.55
 This classifies the protein as unstable.

Aliphatic index: 89.62

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.439