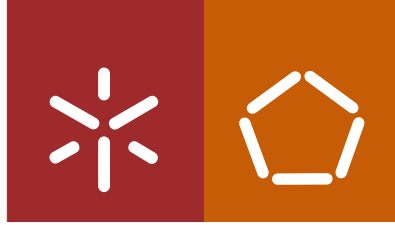




Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vitor Hugo Afonso Frias

**Clivagem e caracterização de frutalina
recombinante produzida em
*Escherichia coli***



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vitor Hugo Afonso Frias

**Clivagem e caracterização de frutalina
recombinante produzida em
*Escherichia coli***

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica
Ramo de Engenharia Clínica

Trabalho realizado sob a orientação da
Doutora Carla Oliveira
e da
Professora Doutora Lucília Domingues

outubro de 2015

DECLARAÇÃO

Nome: Vítor Hugo Afonso Frias

Título da dissertação: Clivagem e caracterização de frutalina recombinante produzida em
Escherichia coli

Orientador: Doutora Carla Oliveira e Professora Doutora Lucília Domingues

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Ramo: Engenharia Clínica

Escola: de Engenharia

Departamento: de Engenharia Biológica

DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER
PARTE DESTA DISSERTAÇÃO

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Começo por agradecer às minhas orientadoras, Doutora Carla Oliveira e Doutora Lucília Domingues, pela oportunidade que me proporcionaram, pelo apoio, pela disponibilidade, pelas opiniões e críticas e pelo saber que transmitiram.

À Joana, ao Daniel, à Goreti, à Meirielly, à Sara, ao Rui, à Tatiana e restantes elementos do LBM pela amizade, pelo tempo de que prescindiram para me ajudar, pelos momentos de entusiasmo partilhados e pela motivação diária. Quero também agradecer aos restantes elementos do grupo B. Factory, do LB e do LIBRO pela disponibilização de equipamento e pela ajuda na utilização do mesmo.

Aos amigos que me acompanharam ao longo do meu percurso académico em especial ao Pedro, ao Elmano, ao Ricardo e ao Miguel. Quero também agradecer aos colegas do 73 pelos incentivos e pela motivação diária.

À Sara pelas palavras doces, pela força e confiança que, mesmo afastada, me transmitiu em todos os momentos.

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e no meu trabalho e pelos ensinamentos da vida, sem eles nunca aqui teria chegado. A eles, dedico este trabalho.

*“Eles não sabem, nem sonham,
que o sonho comanda a vida,
que sempre que um homem sonha
o mundo pula e avança
como bola colorida
entre as mãos de uma criança.”*

António Gedeão

Resumo

A frutalina é uma lectina extraída de sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa*). É uma proteína glicosilada com peso molecular de 48-49 kDa e organizada em tetrâmeros, sendo cada um composto por uma cadeia α e uma cadeia β . É uma lectina do grupo das jacalinas com afinidade de ligação a galactose e com aplicações biomédicas como biomarcador, imunomodulador e propriedades anti-tumorais. A frutalina é, no entanto, composta por várias isoformas que a tornam uma mistura heterogênea e cuja quantidade relativa de cada uma das isoformas varia de extração para extração. A introdução de tecnologia recombinante permite obter uma solução com uma única isoforma com propriedades definidas e permite a inclusão de parceiros de fusão por forma a melhorar os rendimentos de produção e facilitar a sua purificação e reduzir as perdas associadas ao processo. Estudos anteriores demonstraram atividade citotóxica de frutalina recombinante produzida em *Pichia pastoris* mesmo não ocorrendo a excisão do linker entre as cadeias e o mesmo não aconteceu com frutalina recombinante produzida em *Escherichia coli* que não demonstrou atividade citotóxica. O presente trabalho pretende caracterizar uma versão de frutalina recombinante produzida em *E. coli* contendo como parceiro de fusão o promotor de solubilidade Trx e uma cauda de histidinas por forma a facilitar a sua purificação (TrxFTL). Esta versão de frutalina contém ainda dois locais de ação da TEV protease: um entre as cadeias e outro que separa as cadeias do parceiro de fusão. A análise SDS-PAGE indica que digestão com TEV protease removeu o parceiro de fusão, no entanto é inconclusiva quanto à separação das cadeias. O método de purificação usado, a cromatografia de afinidade ao níquel reversa demonstrou ser um método eficaz na purificação da frutalina clivada (rFTL). A frutalina recombinante não demonstrou atividade hemaglutinante em hemácias de coelho, quer antes quer após digestão. Embora a rFTL tenha demonstrado afinidade à metil- α -D-galactose em ensaios de fluorescência, não apresentou afinidade à galactomanana reticulada de *Adenanthera pavonina*. Foi ainda efetuada a desnaturação da TrxFTL e rFTL, para aumentar a acessibilidade da TEV protease, tendo resultado, no caso da TrxFTL, num aumento do comprimento de onda de intensidade de fluorescência máxima e numa diminuição de intensidade de fluorescência.

Abstract

Frutalin is a lectin extracted from breadfruit seeds (*Artocarpus incisa*). It is a glycosylated protein with a molecular weight of 48-49 kDa and organized in tetramers, each one composed of a α chain and a β chain. It belongs to the jacalin related group of lectins with binding affinity for galactose and it has biomedical applications as a biomarker, immunomodulator and anti-tumor properties. Frutalin, however, is a heterogeneous mixture of several isoforms, whose relative amount of each isoform varies with the extraction. The introduction of recombinant technology allows obtaining a solution with a single isoform, and thus more defined properties, and allows the inclusion of fusion partners to improve production yields, facilitate purification, and reduce the losses associated with the process. Previous studies have demonstrated the cytotoxic activity of the recombinant frutalin produced in *Pichia pastoris* even without the excision of the linker between the α and β chains. However, recombinant frutalin produced in *Escherichia coli* did not show cytotoxic activity. This thesis aims to characterize a recombinant version of frutalin produced in *E. coli* containing as fusion partner the solubility promoter Trx and a histidine tag to facilitate the purification (TrxFTL). This frutalin version contains also two sites of action of TEV protease: one between the chains and other for separating the chains from the fusion partner. SDS-PAGE analysis indicated that TEV protease digestion removed the fusion partner; however, it was not conclusive regarding chains separation. The purification method used, nickel affinity reverse chromatography, proved to be an effective method for the purification of cleaved frutalin (rFTL). Recombinant frutalin showed no HA on rabbit erythrocytes, both before and after digestion. Although rFTL has demonstrated affinity for methyl- α -D-galactose in fluorescence assays, it showed no affinity for crosslinked galactomannan from *Adenanthera pavonina*. It was further performed the denaturation of TrxFTL and rFTL, to increase the accessibility of the TEV protease, resulting, in the case of TrxFTL, in an increase in the wavelength of the maximum fluorescence intensity and a decrease in the fluorescence intensity.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	III
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XV
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Lectinas	3
1.1.1. Jacalinas	3
1.1.2. Frutalina	3
1.2. Produção de frutalina recombinante	5
1.3. Purificação de frutalina recombinante	6
1.4. Aplicações Biomédicas	8
1.5. Objetivos do trabalho.....	9
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
2.1. Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura.....	15
2.2. Condições de armazenamento de <i>Escherichia coli</i>	15
2.3. Condições de armazenamento de proteínas	15
2.4. Produção de frutalina recombinante	16
2.5. Purificação de frutalina recombinante	16
2.5.1 Sonicação	18
2.5.2. Purificação.....	18
2.5.3. Clivagem	19
2.5.4 Purificação reversa	19
2.6 Troca de tampão	19

2.7.	Eletroforese/SDS-PAGE	19
2.8.	Quantificação de proteína	22
2.9.	Desnaturação	23
2.10.	<i>Dynamic Light Scattering</i>	23
2.11.	Ensaio de hemaglutinação.....	23
2.12.	Fluorescência.....	24
2.13.	Ensaio de ligação a açúcares	24
CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO		25
3.1.	Produção de frutalina recombinante	27
3.2.	Purificação de frutalina recombinante	28
3.2.1.	Cromatografia de afinidade ao níquel	28
3.2.2.	Clivagem e cromatografia de afinidade ao níquel reversa.....	29
3.3.	Caracterização da rFTL.....	32
3.3.1.	Ensaio de afinidade à galactomanana de <i>Adenanthera pavonina</i>	32
3.3.2.	<i>Dynamic Light Scattering</i>	33
3.3.3.	Ensaio de hemaglutinação	34
3.3.4.	Ensaio de ligação a açúcares	35
3.4.	Desnaturação da frutalina recombinante.....	38
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS		43
CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS		47
CAPÍTULO 6: ANEXOS		53
6.1.	Sequências.....	55

Índice de figuras

Figura 1 - Composição da frutalina nativa	4
Figura 2 - Composição da proteína produzida em E. coli.	10
Figura 3 - Expressão de TrxFTL em E. coli. Análise de amostra de cultura antes e após indução em gel SDS-PAGE. Corado com Coomassie Brilliant Blue.....	28
Figura 4 - Purificação da TrxFTL por cromatografia de afinidade ao níquel. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue.....	29
Figura 5 - Troca de tampão e clivagem da TrxFTL. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue.	30
Figura 6 – Purificação reversa da rFTL por cromatografia de afinidade ao níquel. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue.	31
Figura 7 - Ensaio de ligação da frutalina nativa à goma de carol. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue.	32
Figura 8 - Ensaio de ligação da rFTL À goma de carol. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue.	32
Figura 9 - Análise DLS da rFTL e frutalina nativa.	33
Figura 10 -Ensaio de ligação açúcares. Análise por fluorescência da rFTL em presença dos açúcares melibiose, methyl- α -D-galactose, D-galactose, D-manose e D-Glucose a 4 mM e 100 mM. Relação entre o comprimento de onda e a AU	36
Figura 11 - Ensaio de ligação açúcares. Análise por fluorescência da rFTL na ausência de açúcares e na presença dos açúcares melibiose e methyl- α -D-galactose a 100 mM e 50 mM. Relação entre o comprimento de onda e a AU	37
Figura 12 - Análise comparativa da fluorescência da rFTL e frutalina nativa. Relação entre o comprimento de onda e a AU.....	39
Figura 13 - Análise por fluorescência da desnaturação de rFTL com GndHCl.	40
Figura 14 -Desnaturação de TrxFTL com GndHCl e Ureia. Análise por fluorescência das soluções resultantes.....	41

Índice de tabelas

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de SEC, HIC e IMAC como metodologias de purificação (Costa et al. 2014)(Gonçalves 2014)(Queiroz et al. 2001)(Hage et al. 2012)(Chaga 2001).	7
Tabela 2 - Composição do meio LB (pH 7,5 ajustado com NaOH 10M)	15
Tabela 3 - Composição do meio de cultura LB (pH 7,5 ajustado com NaOH 10M)	16
Tabela 4 - Composição do Tampão de equilíbrio (pH 8,0 ajustado com HCl XM)	17
Tabela 5 - Composição do Tampão de lavagem (pH 8,0 ajustado com HCl XM)	17
Tabela 6 - Composição do Tampão de eluição (pH 8,0 ajustado com HCl XM)	17
Tabela 7 - Composição do Tampão de Lise (pH=8,0).....	18
Tabela 8 - Composição dos geis de acrilamida (quantidade para 2 geis)	20
Tabela 9 - Composição do tampão de amostra 5x	20
Tabela 10 - Peso molecular das bandas do marcador	21
Tabela 11 - Composição do tampão de corrida 1x	21
Tabela 12 - Valores dos CEM e Pi relativos às proteínas usadas.....	22
Tabela 13 - Ensaios de DLS de frutalina nativa e frutalina recombinante clivada.....	33
Tabela 14 - Ensaio de hemaglutinação com frutalina recombinante clivada e por clivar.....	34
Tabela 15 - Aumento de intensidade de fluorescência / densidade óptica (%) da frutalina recombinante clivada na presença de melibiose a 331 nm e methyl- α -D-galactose a 336 nm em relação á intensidade de fluorescência / densidade óptica a 327 nm da frutalina recombinante clivada (22571 unidades arbitrias).	37

Capítulo 1: Introdução

1.1. Lectinas

Lectinas são um grupo de proteínas mediadoras de um conjunto de processos biológicos que podem ser encontradas em vários organismos, plantas, animais, microrganismos e vírus. Estas possuem pelo menos um domínio não catalítico que reconhece seletivamente e se liga reversivelmente a açúcares livres ou glicanos específicos sem alterar a estrutura dos hidratos de carbono. Nos anos 60 estas proteínas demonstraram capacidade para aglutinar células malignas o que indicou que o cancro estaria associado a uma alteração nos açúcares presentes à superfície das células (Oliveira et al. 2013)(Oliveira et al. 2011)(Sharon & Lis 2004)(Sharon 2008).

Desde então se descobriram extraordinárias propriedades anticancerígenas nas lectinas. Algumas delas têm propriedades citotóxicas nessas células por mecanismos como apoptose, necrose, autofagia ou inibição do crescimento. Após reconhecimento celular as lectinas podem ser internalizadas ou permanecer à superfície das células (Oliveira et al. 2011)(De Mejía & Prisecaru 2005)(Liu et al. 2010)(Pusztai et al. 2008)(Lei & Chang 2009).

1.1.1. Jacalinas

Esta família de lectinas deve o seu nome à jacalina, uma lectina isolada das sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*). Todas as lectinas desta família estão relacionadas com a jacalina quer a nível estrutural quer a nível evolutivo e encontram-se divididas de acordo com a sua especificidade relativamente aos hidratos de carbono, as lectinas com ligação específica à galactose e as lectinas com ligação específica à manose. A diferença entre estes dois grupos é determinada pelo tamanho do local de ligação que é maior nas lectinas com afinidade à galactose do que nas lectinas com afinidade à manose devido é separação em duas cadeias α e β através da remoção do *linker* (um péptido de 4 aminoácidos) (Oliveira et al. 2008)(Gabor et al. 2001)(BOURNE et al. 2002)(Houlès Astoul et al. 2002).

1.1.2. Frutalina

Frutalina é uma lectina presente nas sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa*), planta da qual deriva o seu nome. Esta pode ser purificada por cromatografia de afinidade pela sua afinidade à galactomanana reticulada de *Adenantha pavonina*.

Pertence à família das lectinas relacionadas com a jacalina, especificamente ao sub-grupo das lectinas com afinidade à galactose pois apresenta semelhanças ao nível da estrutura, especificidade a açúcares e identidade de sequência de aminoácidos com a jacalina. Embora com afinidade preferencial à D-galactose a sua afinidade é alargada também a açúcares como a D-manose ou a D-glucose (Oliveira et al. 2014)(Moreira et al. 1998)(Oliveira, Costa, et al. 2009)(Pineau et al. 1990).

A frutalina é caracterizada por uma atividade hemaglutinante forte com hemácias do sistema ABO humano e com hemácias de coelho, no entanto esta atividade é três vezes superior à da jacalina. Analisando o cDNA, esta é codificada, tal como a jacalina, por 471 pb que se traduzem numa proteína de 157 aminoácidos e um peso molecular de 17,1 kDa. Destes, 20 aminoácidos correspondem à cadeia β , 4 ao *linker* e 133 à cadeia α (do N-terminal para o C-terminal) como e mostrado na figura 1. O *linker* encontra-se presente apenas no subgrupo de lectinas com afinidade à galactose. A frutalina é uma mistura heterogénea de sequências de aminoácidos ligeiramente diferentes (isoformas), as quais partilham 93-97% da sua identidade. A frutalina é também parcialmente glicosilada (Oliveira et al. 2014)(Oliveira, Costa, et al. 2009)(Houlès Astoul et al. 2002)(Nobre et al. 2010)(Moreira et al. 1998).



Figura 1 - Composição da frutalina nativa. Da esquerda para a direita: cadeia β , linker, cadeia α .

Em condições desnaturantes (SDS-PAGE) a frutalina apresenta duas bandas: a banda superior de 15,5 kDa corresponde às isoformas da cadeia α altamente glicosiladas e a banda inferior de 12 kDa às isoformas levemente glicosiladas ou não glicosiladas da mesma cadeia. A cadeia β não é visível devido ao seu baixo peso molecular (2,1 kDa) (Oliveira et al. 2014)(Oliveira et al. 2008).

Na sua forma nativa a frutalina é uma proteína tetramétrica com 4 monómeros, cada um contendo uma cadeia α e uma cadeia β e um peso molecular de 48-49 kDa. É também uma proteína estável até 60 °C e bastante resistente à desnaturação química (Oliveira et al. 2014)(Oliveira et al. 2008)(Campana et al. 2002)(Moreira et al. 1998).

A frutalina apresenta propriedades biomédicas importantes, das quais se destacam a de imunomodulador (Brando-Lima et al. 2005)(Brando-Lima et al. 2006), atividade anti-tumoral

(Oliveira et al. 2011), biomarcador tumoral (Oliveira et al. 2008) e terapêutico no tratamento de úlceras gástricas (de Vasconcellos Abdon et al. 2012).

1.2. Produção de frutalina recombinante

A frutalina tal como outras lectinas é uma mistura heterogênia de várias isoformas com atividade biológica potencialmente diferente. O maior problema na sua extração das sementes de fruta-pão é uma variação de extração para extração do conteúdo de cada isoforma que pode conduzir a resultados inconstantes (Oliveira et al. 2014)(Moreira et al. 1998). Como tal a produção recombinante tem como vantagem a produção de elevadas quantidades de uma proteína com uma sequência definida e propriedades mais precisas.

O cDNA de frutalina foi usado para produção de frutalina recombinante em *Escherichia coli*. Esta bactéria tem numerosas vantagens, nomeadamente: o seu rápido crescimento, genética simples, rápida expressão, fácil cultura, elevado rendimento e baixo custo (Oliveira et al. 2013). No entanto obteve-se uma proteína predominantemente insolúvel. Mesmo assim a sua purificação foi possível por cromatografia de troca iónica seguida de exclusão molecular, tendo-se obtido um rendimento baixo (76 µg por litro de cultura). Nesta proteína não ocorreu a excisão do linker no entanto apresentou atividade hemaglutinante o que indica que a atividade hemaglutinante não está dependente da excisão do *linker*. Embora em ensaios de inibição da atividade hemaglutinante a frutalina recombinante tenha demonstrado especificidade à galactose, não foi possível a sua purificação por cromatografia de afinidade à galactomanana de *A. pavanina* (Oliveira et al. 2014)(Oliveira, Costa, et al. 2009).

Foram incorporados diversos parceiros de fusão (His6, Trx, GST, NusA, MBP, SUMO, H, e Fh8) por forma a aumentar a produção, solubilidade, o enrolamento e facilitar a purificação. A incorporação de parceiros de fusão aumentou os rendimentos de produção para a ordem das mg e facilitou a purificação (Oliveira et al. 2014)(Oliveira et al. 2013)(Costa et al. 2013).

E. coli carece, no entanto de mecanismos pós-tradução por ser um organismo procarionte, deste modo a frutalina recombinante produzida não sofre glicosilação o que pode afetar as propriedades funcionais visto a frutalina nativa ser uma proteína glicosilada (Oliveira et al. 2013). Assim sendo foi produzida num organismo eucarionte (*Pichia pastoris*) que possui esses mecanismos pós-tradução (Oliveira, Costa, et al. 2009)(Oliveira et al. 2014).

Tal como em *E. coli*, o *linker* não foi removido em *P. pastoris* sugerindo que este processo é específico de eucariontes superiores e não apresentou atividade hemaglutinante sugerindo que a glicosilação afetou a sua estrutura funcional (Oliveira, Costa, et al. 2009)(Oliveira et al. 2014). A frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* partilha no entanto apenas 93% da sua identidade genética com a produzida em *E. coli*, não sendo portanto a mesma (Oliveira et al. 2008)(Oliveira et al. 2011).

No que diz respeito à afinidade desta frutalina recombinante a açúcares esta revelou uma afinidade à metil- α -D-galactose 113 vezes inferior à frutalina nativa. Também a jacalina recombinante produzida em *E. coli* demonstrou uma afinidade à metil- α -D-galactose 100 vezes inferior à jacalina nativa. Também neste caso o *linker* não foi removido sugerindo que a remoção deste está relacionada com a afinidade específica (Oliveira et al. 2008)(Houlès Astoul et al. 2002)(Sahasrabuddhe et al. 2004).

1.3. Purificação de frutalina recombinante

A purificação é o processo mais dispendioso na produção de proteínas recombinantes. Desta forma o desenvolvimento de um processo eficaz com custos controlados é algo a ter em conta desde o início do desenvolvimento da proteína recombinante (Costa et al. 2014).

Ao desenvolver a estratégia de purificação deve ter-se em conta a finalidade da proteína a purificar. Proteínas recombinantes com aplicações terapêuticas e biomédicas requerem elevado grau de pureza e devem por isso sofrer variados processos de purificação. A tecnologia recombinante permite a introdução de parceiros com a função de facilitar este processo sem alterar a estrutura da proteína (Costa et al. 2014).

As metodologias de purificação separam as proteínas alvo das restantes proteínas em solução pelas suas diferenças de propriedades. Hoje em dia proteínas recombinantes são purificadas em colunas de cromatografia. Não sendo um processo fácil muitas vezes os métodos são combinados para se complementarem (Costa et al. 2014).

Numa purificação convencional o processo de cromatografia inicia-se com uma captura em que a proteína alvo se liga ao adsorvente da coluna e todas as restantes não. Depois são removidas proteínas com ligações fracas e por fim a proteína alvo é eluída introduzindo um agente

com maior afinidade (Costa et al. 2014). Na tabela 1 estão mencionadas vantagens e desvantagens de sistemas já usados na purificação de frutalina recombinante.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de SEC, HIC e IMAC como metodologias de purificação (Costa et al. 2014)(Gonçalves 2014)(Queiroz et al. 2001)(Hage et al. 2012)(Chaga 2001).

	Vantagens	Desvantagens
SEC	<ul style="list-style-type: none"> - Permite a determinação do peso molecular e raio hidrodinâmico - Permite a purificação em condições suaves mantendo a atividade das proteínas - Permite purificação de proteínas insolúveis 	<ul style="list-style-type: none"> - Solução resultante diluída - Requer volumes pequenos - Processo lento
HIC	<ul style="list-style-type: none"> - Eluição em condições suaves - Baixo custo - Elevada capacidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Baixa seletividade - Taxa de recuperação baixa
IMAC	<ul style="list-style-type: none"> - Purificação em condições suaves - Capacidade media-alta - Baixo custo - Taxa de recuperação elevada - Elevada seletividade 	

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) permite separar proteínas com diferentes pesos moleculares em condições suaves. Este processo resulta, no entanto, normalmente, em amostras diluídas além de requerer um baixo fluxo o que torna o processo lento. É um processo ideal para terminar uma purificação em vários passos e permite determinar o raio hidrodinâmico da proteína e o correspondente peso molecular (Costa et al. 2014). Foi usada para purificar a frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* (Oliveira et al. 2008).

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) separa proteínas de acordo com a sua hidrofobicidade superficial (quantidade de aminoácidos hidrofóbicos expostos). Permite a eluição em condições suaves e tem baixo custo, no entanto tem taxa de recuperação baixa e deve ser complementado com outro processo devido à sua baixa seletividade (Costa et al. 2014)(Chaga 2001)(Queiroz et al. 2001). Foi usada para purificar a frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* onde demonstrou menor eficiência que SEC, no entanto a frutalina recombinante purificada demonstrou maior efeito anti-proliferativo de células cancerígenas que a mesma frutalina recombinante purificada por SEC (Gonçalves 2014).

A cromatografia de afinidade separa proteínas através de uma interação reversível entre a proteína alvo e um ligando específico imobilizado na matriz cromatográfica. Oferece elevada seletividade e resolução juntamente com uma capacidade media-alta. A amostra é inicialmente ligada ao ligando e todo o material que não liga é lavado. Por fim a proteína é eluída usando um ligando que compete com esta na afinidade ao agente imobilizado na matriz cromatográfica ou alterando o pH, a força iónica ou a polaridade (Costa et al. 2014). A cromatografia de afinidade a iões metálicos imobilizados (IMAC) é um tipo de cromatografia de afinidade cujo uso tem vindo a aumentar na análise biomédica. IMAC faz uso de interações específicas entre iões metálicos imobilizados (cobre, zinco, níquel) e alvos como aminoácidos, péptidos, proteínas ou ácidos nucleicos (Hage et al. 2012). Além do seu baixo custo permite uma eluição em condições suaves (Chaga 2001). Esta técnica beneficia do uso de tecnologia recombinante pois o promotor de afinidade His⁶ (uma cauda de 6 histidinas) pode ser inserido na proteína alvo durante o processo de clonagem permitindo a purificação sob condições nativas ou desnaturantes (Gonçalves 2014). Devido a ser pequeno a sua carga raramente interfere na funcionalidade da proteína. Na purificação de frutalina recombinante produzida em *E. coli* esta revelou uma alta taxa de recuperação e elevada seletividade (Costa et al. 2014). Já na purificação de frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* esta revelou eficiência semelhante a HIC e inferior a SEC no entanto a frutalina recombinante resultante demonstrou maior efeito anti-proliferativo de células cancerígenas que a obtida por SEC (Gonçalves 2014).

1.4. Aplicações Biomédicas

A frutalina nativa tem propriedades anti-tumorais e como marcador tumoral, no entanto a sua extração de sementes de fruta-pão é um processo moroso, tem baixos rendimentos, resulta numa solução que varia de extração para extração e a sua purificação pode conter contaminantes entre os quais outras lectinas que não a desejada (Oliveira et al. 2013).

Foram realizadas comparações entre a frutalina nativa e a frutalina recombinante resultante da produção em *P. pastoris* relativamente às suas propriedades como marcador tumoral e propriedades anti-tumorais (Oliveira, Teixeira, et al. 2009)(Oliveira et al. 2011).

Em ensaios de imunohistoquímica a frutalina nativa ligou-se a qualquer tipo de células da próstata sendo essa ligação mais forte nas células malignas. Por outro lado, a frutalina produzida em *P. pastoris* apenas se ligou a células malignas, no entanto não reconheceu todos os casos

malignos estudados. Ainda assim, os resultados obtidos indicaram que a frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* tem um maior potencial como marcador tumoral que a frutalina nativa (Oliveira et al. 2014)(Oliveira, Teixeira, et al. 2009)(Oliveira et al. 2011).

Em ensaios *in vitro* a frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* demonstrou ter forte atividade citotóxica na proliferação de células tumorais HeLa, induzindo a sua morte por apoptose. A frutalina nativa obteve resultados idênticos (Oliveira et al. 2011). Como tal é sugerido que a atividade da frutalina em células tumorais não é dependente exclusivamente das suas propriedades de afinidade a açúcares. Outros fatores como as interações entre proteínas podem contribuir para a resposta celular como sugerido para o efeito de jacalina em células tumorais (Sahasrabudde et al. 2006).

A frutalina recombinante produzida em *E. coli* não contem glicosilação pois esse processo não é possível em organismos procariotas e revelou não ter atividade anti-proliferativa em células tumorais, no entanto a sua produção com parceiros de fusão mostrou elevados rendimentos e fácil purificação (Oliveira et al. 2014). Um dos caminhos a seguir é a produção em *E. coli* da isoforma clonada em *P. pastoris* para elucidar a importância da glicosilação na atividade citotóxica da frutalina. Outro caminho possível, é a clivagem do *linker* na frutalina recombinante produzida em *E. coli*, para avaliar a importância da separação cadeias que a constituem, nas suas propriedades, que é a motivação deste trabalho.

1.5. Objetivos do trabalho

A frutalina é uma lectina parcialmente glicosilada conhecida pelas suas propriedades anti-tumorais e como biomarcador, no entanto a sua extração das sementes de *A. incisa* é um processo demorado, o rendimento é baixo e resulta numa solução heterogénea devido à presença de várias isoformas (Oliveira, Costa, et al. 2009). Essas isoformas (sequências de aminoácidos com diferenças pontuais), glicosiladas ou não, podem ter diferentes atividades. A proporção entre elas pode variar de extração para extração e levar a resultados inconstantes.

A produção de frutalina por métodos recombinantes permite obter maiores quantidades de proteína com uma sequência de aminoácidos definida, logo, com propriedades mais precisas. Isoformas diferentes (93% de homologia) foram produzidas em *E. coli* e *P. pastoris*. No caso de *E. coli*, a frutalina foi produzida com diversos parceiros de fusão que aumentaram a sua estabilidade, solubilidade e facilitaram a sua purificação. No entanto, as versões resultantes, quer com parceiro

de fusão, quer após remoção do mesmo, não apresentaram atividade anti tumoral, embora apresentassem atividade hemaglutinante. Em *P. pastoris*, obteve-se uma versão de frutalina recombinante parcialmente glicosilada, sem atividade hemaglutinante, mas com propriedades de biomarcador tumoral a atividade anti tumoral, no entanto o processo de purificação precisa de ser melhorado (Oliveira et al. 2014).

Pensa-se que a ausência de atividade nas versões obtidas de *E. coli* é possivelmente devida à isoforma clonada ou à ausência de glicosilação. Por outro lado, a presença do *linker* nativo de 4 aminoácidos, unindo as cadeias α e β em todas versões de frutalina recombinante (ausente na frutalina nativa), reduziu consideravelmente a afinidade destas a açúcares, o que pode também comprometer as suas propriedades biomédicas. Nomeadamente, a versão recombinante de *P. pastoris* mostrou uma menor afinidade a tecidos malignos da próstata do que a nativa, muito provavelmente devido à sua menor afinidade a açúcares (Oliveira, Teixeira, et al. 2009). A separação dessas cadeias na versão da frutalina recombinante produzida em *E. coli* permite elucidar o impacto dessa clivagem nas suas propriedades e gerar conhecimento para clivagem de outras isoformas recombinantes de modo a melhorar as suas propriedades biomédicas.

Neste trabalho produziu-se frutalina recombinante na estirpe *E. coli* Rosetta usando o vetor de expressão pETM20 que contem o promotor T7 induzido por IPTG e o promotor de solubilidade *thioredoxin* (Trx) que revelou eficiência semelhante ao Fh8 (Costa et al. 2013). O vetor contém ainda uma cauda de histidinas (His⁶) e 1 local de ação para a TEV protease (protease do *Tobacco etch virus*), entre o His⁶ e o gene da proteína de interesse (frutalina). A frutalina foi clonada com o sítio de reconhecimento da TEV em vez do linker nativo. Assim a estirpe, previamente construída, é produtora da proteína apresentada no esquema da figura 2.



Figura 2 - Composição da proteína produzida em *E. coli*. Da esquerda para a direita: Trx, His⁶, local de ação da TEV protease, cadeia α , local de ação da TEV protease, cadeia β .

O His⁶ permite à proteína ser purificada por cromatografia de afinidade ao níquel. Os dois locais de ação da TEV protease removem o parceiro de fusão (Trx+His⁶) e separam a cadeia α da cadeia β . Na sua forma nativa a cadeia β encontra-se antes da cadeia α , no entanto aqui encontram-se pela ordem inversa por motivos de estratégia de clivagem. O local de ação de clivagem é composto por 7 aminoácidos e a TEV protease atua entre o sexto e o sétimo. Colocando a cadeia α entre a His⁶ e a cadeia β , após a clivagem a cadeia α (que é a maior) fica com 7 aminoácidos residuais

(1 da clivagem entre a cadeia α e a His⁶ e 6 da clivagem entre a cadeia α e a cadeia β) e a cadeia β com apenas 1 aminoácido residual.

Deste modo, o objetivo principal deste trabalho é a clivagem e caracterização de uma versão de frutalina recombinante produzida em *E. coli* contendo, em vez do *linker*, um local para clivagem por uma protease. Para isso ser possível é necessário:

- A produção dessa versão de frutalina recombinante em *E. coli*;
- A purificação da frutalina recombinante obtida pelo método de cromatografia de afinidade ao níquel;
- A clivagem da frutalina recombinante em condições nativas e/ou desnaturantes de modo a separar as cadeias α e β com TEV protease, e simultânea remoção do parceiro de fusão (Trx-His⁶), usado para aumentar a solubilidade e estabilidade da proteína, e sua purificação (His⁶);
- A purificação reversa da frutalina recombinante clivada pelo método de cromatografia de afinidade ao níquel. Após clivagem, a frutalina recombinante não tem afinidade ao níquel, sendo o único elemento em solução sem essa afinidade, enquanto o parceiro Trx, e a própria protease, apresentam essa afinidade por ambos conterem uma cauda de 6 histidinas (His⁶);
- Caracterizar a frutalina recombinante clivada, comparativamente à frutalina nativa, em termos moleculares, de estrutura, afinidade a açúcares e atividade hemaglutinante.

Capítulo 2: Materiais e métodos

2.1. Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura

Os materiais, soluções e meios de cultura foram esterilizados por calor húmido. Para o efeito foi usado um autoclave com os parâmetros de 121 °C, 20 minutos e 1 bar. Soluções que não suportam estes parâmetros foram esterilizados utilizando filtros estéreis ou membranas com poros de 0,2 µm.

2.2. Condições de armazenamento de *Escherichia coli*

Foi usada neste trabalho a estirpe Rosetta do organismo *Escherichia coli* com o vector pETM20/His/ frutalina recombinante transformada em trabalhos anteriores e armazenada a -80 °C.

Esta foi armazenada por períodos de 2 semanas em placas de agar invertidas com meio de crescimento LB a 4 °C preparadas anteriormente e armazenadas nas mesmas condições. A composição do meio de cultura encontra-se na tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio LB (pH 7,5 ajustado com NaOH 10M)

Quantidade	Componente
10 g/L	Triptona
5 g/L	Extrato de levedura
10 g/L	NaCl
15 g/L	Agar
0,01 g/L	Clorofenicol
0,03 g/L	Ampicilida

Os *pellets* de *E. coli* resultantes da produção foram armazenados a uma temperatura de -20 °C.

2.3. Condições de armazenamento de proteínas

As proteínas usadas neste trabalho foram a frutalina nativa (nFTL) e a frutalina recombinante na sua versão Trx / His⁶ / TEV / cadeia α / TEV / cadeia β, e a proteína clivada e purificada para remoção do parceiro de fusão (rFTL). A frutalina nativa e a última versão de frutalina recombinante

(rFTL) foram armazenadas a -20 °C por tempo indefinido e as restantes a 4 °C por períodos não superiores a 24 horas.

2.4. Produção de frutalina recombinante

A produção de foi feita em meio de cultura LB ao qual foi adicionada Ampicilina e Clorofenicol cuja composição se encontra na tabela 3.

Tabela 3 - Composição do leio de cultura LB (pH 7,5 ajustado com NaOH 10M)

Quantidade	Componente
10 g/L	Triptona
5 g/L	Extrato de levedura
10 g/L	NaCl
0,01 g/L	Clorofenicol
0,03 g/L	Ampicilida

Foi inicialmente preparada uma pre-cultura de *E. coli* da placa de Agar mais recente de 50 mL num matraz de 100 mL e deixada durante a noite a 37 °C e 180 rpm. No dia seguinte é verificada a densidade ótica a 600 nm e diluído o meio para uma densidade ótica de 0,2.

Nos meios de cultura finais é colocada a solução anteriormente diluída num rácio de 1/100 e colocados a 37 °C e 180 rpm até estes atingirem uma densidade ótica de 0,4.

Deixou-se descer a temperatura até 18 °C e foi adicionado IPTG para uma concentração final de 0,2 mM. Mantiveram-se as condições de 18 °C e 180 rpm durante a noite.

No terceiro dia o meio foi centrifugado a 4500 rpm e 4 °C por 15 minutos. Posteriormente *pellets* de resultantes de 1L de cultura foram ressuspensos em 15 mL de PBS em tubos *falcon* de 50 mL e centrifugados a 4500 rpm por 25 minutos.

2.5. Purificação de frutalina recombinante

A purificação foi feita por cromatografia de afinidade ao Níquel. Para o efeito foi usada uma bomba peristáltica e uma coluna *HisTrap* de 5 mL e tampões de equilíbrio, lavagem e eluição cujas composições se encontram nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Composição do Tampão de equilíbrio (pH 8,0 ajustado com HCl 6 M)

Quantidade	Componente
50 mM	Tris Base
150 mM	NaCl
20 mM	Imidazole

Tabela 5 – Composição do Tampão de lavagem (pH 8,0 ajustado com HCl 6 M)

Quantidade	Componente
50 mM	Tris Base
150 mM	NaCl
40 mM	Imidazole

Tabela 6 – Composição do Tampão de eluição (pH 8,0 ajustado com HCl 6 M)

Quantidade	Componente
50 mM	Tris Base
150 mM	NaCl
300 mM	Imidazole

Antes de usada a coluna é preparada e depois do processo de purificação a coluna é lavada.

A preparação da coluna foi feita lavando a coluna com mais de 10 mL de água destilada. Posteriormente foram carregados 3 mL de Níquel ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com uma seringa. Foi depois retirado o excesso de Níquel com mais 10 mL de água destilada e equilibrada a coluna com 30 mL de Tampão de equilíbrio e com caudal de 1 mL/min.

A lavagem da coluna é feita com 10 mL de EDTA 100mM seguido de 10 mL de água destilada, 10 mL de GndPBS, 10 mL de água destilada e 10 mL de etanol 20% sendo armazenada a 4 °C nesta última solução.

2.5.1 Sonicação

As células de *E. Coli* armazenadas foram descongeladas gradualmente e ressuspensas em Tampão de Lise cuja composição se encontra na tabela 7. Foram posteriormente sonicadas a uma amplitude de 30%, 25 segundos *ON*, 30 segundos *OFF* e um tempo total *ON* de 150 segundos / 2,5 minutos.

Tabela 7 – Composição do Tampão de Lise (pH=8,0)

Quantidade	Componente
50 mM	Tris Base
250 mM	NaCl
20 mM	Imidazol
4 mM	MgCl ₂
1 mM	PMSF

A solução foi depois centrifugada a 12500 rpm por 30 minutos e o sobrenadante filtrado em filtros estéreis com poros de 0,2 µm.

2.5.2. Purificação

A amostra foi carregada na coluna previamente equilibrada com um caudal de 0,5 mL/min.

Depois foram usados entre 25 a 50 mL de Tampão de lavagem com caudal de 1 mL/min para remover as proteínas sem afinidade ao Níquel usando *Bradford* 1:5 para determinar o fim do processo.

Por fim foi usado Tampão de eluição com caudal 0,5 mL/min ou inferior para eluir a frutalina recombinante na sua forma Trx α / His⁶ / TEV / cadeia α / TEV / cadeia β em frações de 2,5 mL. Foi usado *Bradford* 1:5 para determinar o início e o fim do processo.

Após isto a coluna foi lavada e armazenada.

2.5.3. Clivagem

Para separar as cadeias entre si e do composto Trx / His⁶ foi usada a TEV protease (protease do *Tobacco etch virus*) que contem uma His⁶. Após determinar a concentração de frutalina recombinante foi colocado em cada fração TEV protease num rácio de 1/20 p/p durante a noite.

2.5.4 Purificação reversa

Neste processo foi usada a mesma coluna, bomba e tampões com exceção do Tampão de Lise.

À amostra é adicionado Imidazol para uma concentração final de 20 mM. A mostra é carregada com caudal de 0,5 mL/min.

Seguidamente é feita a eluição com Tampão de lavagem com caudal de 0,5 mL/min ou inferior usando *Bradford* 1:5 para determinar o início e o fim do processo.

Por fim são carregados 10 mL de Tampão de eluição e lavada e coluna.

2.6 Troca de tampão

Para este processo foi usada uma coluna de *desalting* PD-10 sendo o processo efetuado por gravidade.

Começa por se preparar/lavar a coluna com 5 mL de PBS repetindo este passo por mais 4 vezes.

A amostra de 2,5 mL é carregada e os 2,5 mL eluídos descartado. São depois carregados 3,5 mL de PBS e recolhidos os 3,5 mL eluídos.

Este processo é repetido para todas as frações existentes.

2.7. Eletroforese/SDS-PAGE

Neste processo foram usados géis de acrilamida para separar as proteínas por peso molecular. Desta forma foi possível avaliar a pureza das soluções e confirmar a proteína presente.

Os géis usados tinham diversas concentrações de acrilamida, 12%, 15%, 17% sendo a sua composição apresentada na tabela 8 junto com a composição do gel concentrador, 4%.

Tabela 8 - Composição dos géis de acrilamida (quantidade para 2 géis)

Componente	4%	12%	15%	17%
dH ₂ O	2,9325 mL	2,825 mL	1,7 mL	1 mL
Solução de acrilamida 40%	480 µL	2,92 mL	3,6 mL	4,1 mL
Solução de Bis-acrilamida 2%	260 µL	1,6 mL	2 mL	2,27 mL
Tris – HCL 0,5M (pH = 6,8)	1,25 mL			
Tris – HCL 1,5M (pH = 8,8)		2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS (10%)	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL
APS (10%)	25 µL	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	2,5 µL	5 µL	5 µL	5 µL

A preparação dos géis é feita juntando previamente todos os componentes com exceção do TEMED. O TEMED é adicionado momentos antes de a solução ser colocada no suporte. Acima desta solução é colocada uma camada de água destilada por forma a alinhar o topo do gel e impedir o contacto deste com o ar pois prejudica o processo de gelificação.

Após gelificação é descartada a água destilada, adicionado o TEMED à solução do gel concentrador de (4%) e colocada a mesma no suporte sobre o gel anterior. É também colocado o pente que dá forma aos poços do gel.

Antes de a Eletroforese ser efetuada as amostras 20 µL são preparadas adicionando a 16 µL de amostra 4 µL de tampão de amostra 5x cuja composição se encontra na tabela 9. São então fervidas as amostras a 100 °C durante 5 minutos.

Tabela 9 - Composição do tampão de amostra 5x

Quantidade	Componente
0,313 M	Tris-HCl pH=6,8
50% (v/v)	Glicerol
10% (p/v)	SDS
10% (v/v)	β-mercaptoetanol
0,05% (p/v)	Azul de Bromofenol

Após fervidas as amostras 15 μ L destas são carregados em cada poço do gel sendo que num deles são colocados 2,5 μ L de marcador proteico 5-250 kDa cujo peso de cada banda se encontra na tabela 10.

Tabela 10 - Peso molecular das bandas do marcador

Banda	Peso molecular (kDa)
1	250
2	150
3	100
4	70
5	50
6	40
7	30
8	20
9	15
10	10
11	5

A corrida é efetuada com parâmetros de 30 mA para dois géis e 15 mA para um gel e 500 mL de tampão de corrida 1x cuja composição se encontra na tabela 11 para ambos os casos.

Tabela 11 - Composição do tampão de corrida 1x

Quantidade	Componente
25 mM	Tris
192 mM	Glicina
0,1% (p/v)	SDS

Após o fim da corrida os géis foram colorados com *Coomassie Brilliant Blue*. Inicialmente são géis são fixados adicionando 50 mL de água destilada a cada gel, aquecidos no microndas a 600 W por 30 segundos seguidos de agitação a 60 rpm por 3 minutos e a água destilada descartada. Este processo é repetido num total de três vezes.

Seguidamente os géis são colorados adicionando 50 mL de *Coomassie Brilliant Blue* a cada gel, aquecendo no microndas a 600 W por 30 segundos e agitando a 60 rpm durante 30 minutos.

Por fim é descartada a solução de *Coomassie Brilliant Blue* e adicionados 50 mL de água destilada. Os géis são então fotografados usando o *Molecular Imager ChemiDoc™ XRS + Imaging System (BioRad)* e analisados com o *software Image Lab 4.0 (BioRad)*.

A solução de *Coomassie* foi preparada dissolvendo 80 mg de *Coomassie Brilliant Blue G250* em 1 L de água destilada seguindo-se a adição de 3 mL de HCl 37%. A solução é então colocada em agitação constante por um período não inferior a 4 horas e protegida da luz.

2.8. Quantificação de proteína

A quantificação da proteína foi feita por leitura da densidade ótica a 280 nm tendo por base o coeficiente de extinção molecular. Para o efeito foi utilizado o *Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)* adicionando 2 µL do tampão onde a amostra se encontra dissolvida seguidos de 2 µL de cada amostra a analisar. Este processo foi realizado em triplicado e os valores recolhidos relativos à concentração visto o software converter com base no coeficiente de extinção molecular os valores de densidade ótica nos valores da concentração.

Os valores dos coeficientes de extinção moleculares para as proteínas em estudo e utilizadas foram obtidos através da ferramenta online *ExPASy ProtParam* com base nas sequências usadas (secção 6.1.) e encontram-se na tabela 12. Esta ferramenta indica o valor do coeficiente de extinção molecular e do ponto isoeletrico com base na sequência da proteína.

Tabela 12 - Valores dos MW e CEM relativos às proteínas usadas

Proteína		MW (Da)	CEM (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Total	TrxA + α + β	32036.33	41495
Clivada nos 2 TEVs	TrxA	14269.19	15595
	α	15716.84	20400
	β	2086.33	5500
Clivada num local (caso 1)	TrxA	14269.19	15595
	α + β	17785.16	25900
Clivada num local (caso 2)	TrxA + α	29968.01	35995
	β	2086.33	5500
TEV protease		27700	

2.9. Desnaturação

A desnaturação química foi efetuada por troca de solução tampão contendo esta solução o agente desnaturante Ureia ou GndHCl. Para realizar o processo foi usada uma coluna PD-10 sendo o processo efetuado por gravidade tal como no *desalting* (2.6). As soluções usadas foram preparadas partindo de uma solução de PBS à qual foi adicionado GndHCl para concentrações finais de 4 M e 6 M ou Ureia para uma concentração final de 8 M.

Começou por se preparar/lavar a coluna com 5 mL do tampão preparado repetindo este passo por mais 4 vezes.

A amostra de 2,5 mL é carregada e os 2,5 mL eluídos descartados. São depois carregados 3,5 mL do tampão preparado e recolhidos os 3,5 mL eluídos.

Este processo foi repetido para todas as frações de 2,5 mL.

2.10. *Dynamic Light Scattering*

A análise DLS foi efetuada utilizando o *Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)* com amostras de 1 mL das diferentes versões da frutalina recombinante em estudo em concentrações entre 0,5 mg/mL e 1 mg/mL.

O *software* foi configurado para raios hidrodinâmicos (r.nm) e para efetuar 7 leituras de cada amostra. Os valores esperados foram estimados pelo mesmo software assumindo o seu peso molecular e que a proteína é globular.

2.11. Ensaio de hemaglutinação

Para realizar os ensaios de hemaglutinação foram usadas Hemácias de coelho e tubos *eppendorf* de 1,5 mL. A preparação envolveu a lavagem de sangue de coelho com NaCl 0,15 M e centrifugação a 5000 rpm e 4 °C por períodos de 5 minutos por forma a remover o plasma e os glóbulos brancos. Seguidamente foram diluídos em PBS num rácio 1:20.

Foram preparadas diluições seriadas da frutalina recombinante em causa de 1:2 até 1:64. Foram então adicionados a 50 µL de cada diluição 50 µL da diluição de hemácias de coelho anteriormente preparada e deixou-se a incubar durante a noite. Paralelamente foi realizado um

controlo negativo e um controlo adicionando a 50 μ L da solução de hemácias de coelho 50 μ L de PBS e 50 μ L de Frutalina Nativa respetivamente.

Após incubação foram observados os resultados e registados como positivo ou negativo.

2.12. Fluorescência

As análises à fluorescência foram realizadas com o equipamento *Aqualog®* (*Horiba Scientific*) em covetes de quartzo onde foi colocado 1 mL de solução da proteína em estudo com concentrações inferiores a 0,08 mg/mL.

O software (*Aqualog®*) foi configurado para efetuar uma análise a duas dimensões com excitação a 280 nm e registo da AU dos comprimentos de onda entre 290 nm e 450 nm. O valor da AU são os valores da intensidade de fluorescência corrigidos com o valor da densidade ótica. O equipamento regista também a densidade ótica a 280 nm.

2.13. Ensaio de ligação a açúcares

Para realizar os ensaios de ligação a açúcares foram preparadas soluções de 0,5 M de melibiose, metil- α -D-galactose, D-galactose, D-manose e D-glucose em água destilada. Posteriormente, em tubos *ependorf* foram preparadas as soluções finais adicionando o volume de solução de proteína necessário para uma concentração final de 0,08 mg/mL juntamente com o volume necessário de uma das soluções dos açúcares anteriormente preparados para a concentração desejada e feito 1 mL com tampão PBS. Para cada uma das concentrações de açúcares usadas foi preparada uma solução neutra (sem açúcar) usando, em vez da solução de açúcar, água destilada.

A análise foi realizada por fluorescência como descrito na secção 2.12.

Capítulo 3: Resultados e discussão

3.1. Produção de frutalina recombinante

Neste trabalho, produziu-se frutalina recombinante em *E. coli* em fusão com a proteína Trx, e uma cauda de 6 histidinas, no N-terminal (TrxF₆TL). Este parceiro de fusão e essa cauda podem ser removidos da frutalina recombinante pela TEV protease. Contrariamente à frutalina nativa, a frutalina recombinante produzida apresenta as cadeias que a constituem posicionadas na ordem inversa, i.e. a cadeia $\alpha + \beta$, em vez de $\beta + \alpha$. Para além disso, entre elas encontra-se um local de reconhecimento para a TEV protease em vez de um *linker* nativo de 4 aminoácidos, para posterior separação das duas cadeias. Foi assim construída, com as cadeias ao contrário, devido ao local de clivagem conter 7 aminoácidos e a TEV protease atuar entre o 6º e o 7º, resultando na adição de apenas 1 aminoácido à cadeia β (que é a cadeia menor), ficando a α com os restantes aminoácidos. Uma construção $\beta + \alpha$ resultaria no inverso. Para além disso, não é expectável que a frutalina recombinante, contendo as cadeias na ordem inversa, apresente as propriedades da frutalina nativa (por exemplo, atividade hemaglutinante), portanto, a aquisição dessas propriedades serviria de controlo para uma correta clivagem e estrutura da frutalina recombinante.

Durante a produção de TrxF₆TL em *E. coli* foram recolhidas amostras da cultura antes e após indução com IPTG. Estas amostras foram analisadas por SDS-PAGE (figura 3). Uma proteína com um peso molecular próximo dos 30 kDa surge após indução (figura 3, linha 2), cujo peso molecular está de acordo com o calculado para a TrxF₆TL (secção 2.8), o que indica a produção desta proteína.

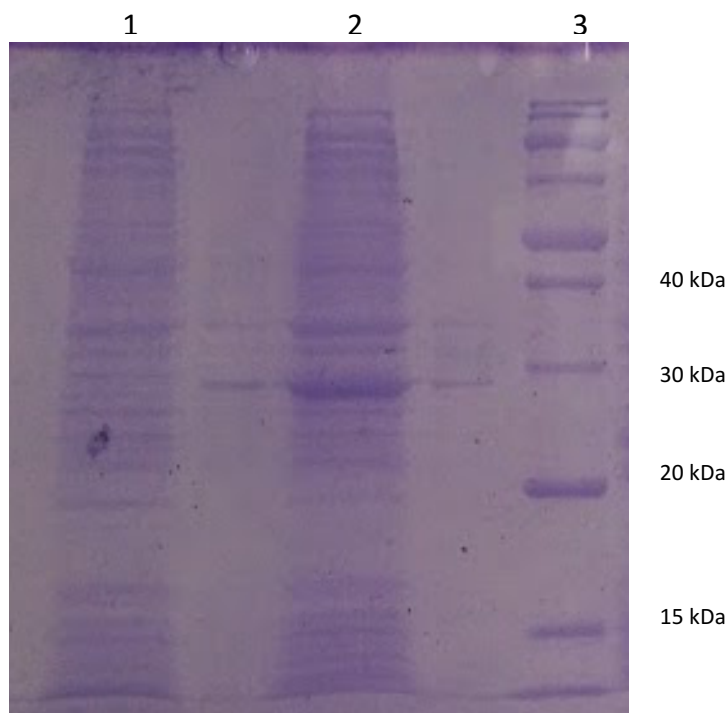


Figura 3 - Expressão de TrxFTL em *E. coli*. Análise de amostra de cultura antes e após indução em gel SDS-PAGE. Corado com Coomassie Brilliant Blue. Legenda: 1 - Amostra de cultura antes da indução; 2 - Amostra de cultura após a indução; 3 - Marcador de pesos moleculares.

3.2. Purificação de frutalina recombinante

A frutalina recombinante foi purificada em dois passos sequenciais: 1° - cromatografia de afinidade ao níquel e 2° - cromatografia de afinidade ao níquel reversa. Entre o primeiro e o segundo passo de purificação realizou-se a digestão com TEV protease, para clivagem das subunidades da frutalina recombinante e remoção do parceiro de fusão (Trx) (secção 3.2.2.). Na segunda purificação, tal como o nome indica, a frutalina recombinante é purificada reversamente, isto é, o parceiro de fusão e a protease usada (ambos contendo uma cauda de 6 histidinas) ligam à coluna, enquanto que a frutalina não liga e é recuperada aquando a passagem da amostra pela coluna.

3.2.1. Cromatografia de afinidade ao níquel

A TrxFTL foi purificada por afinidade ao níquel uma vez que esta apresenta uma cauda de histidinas. Após sonicação das células de *E. coli* produtoras de TrxFTL, analisou-se por SDS-PAGE as frações solúveis e insolúveis obtidas e verificou-se que esta proteína foi produzida de forma

solúvel (Figura 4, linha 1). Na purificação, verificou-se que a TrxFTL produzida não saiu durante as lavagens (Figure 4, linha 5), no entanto foi eluída juntamente com um elevado número de proteínas contaminantes (Figure 4, linha 7). Procedeu-se de seguida à otimização desta purificação. No entanto, quer usando diferentes tampões de lavagem (com 40 e 60 mM de imidazol), quer re-purificando os eluídos obtidos, mesmo usando uma coluna de purificação nova, não foi possível otimizar esta purificação, o que não é crítico uma vez que no próximo passo de purificação estas mesmas proteínas poderão ser eliminadas por ligação a coluna, enquanto que, tal como já referido, a frutalina é purificada reversamente.

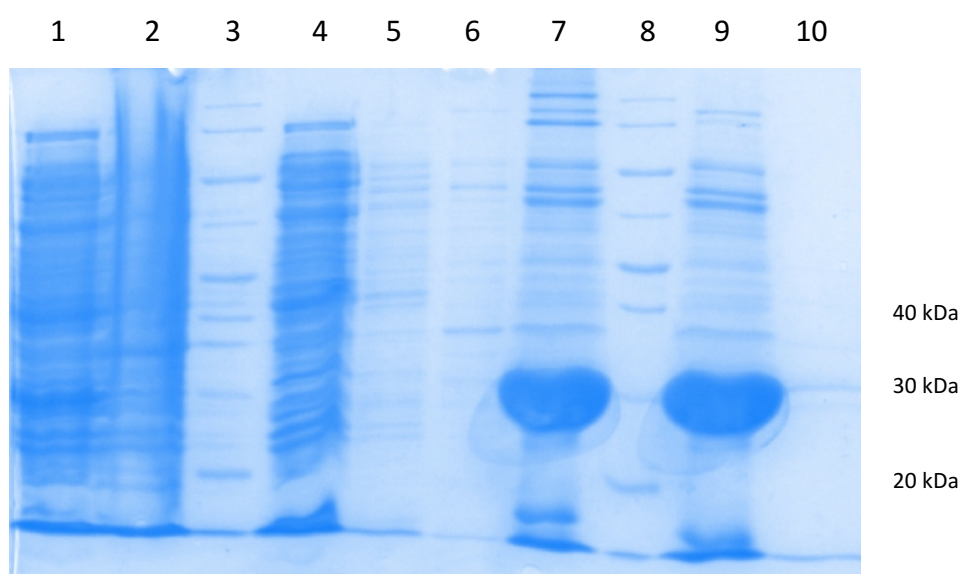


Figura 4 - Purificação da TrxFTL por cromatografia de afinidade ao níquel. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue. Legenda: 1 – Fração solúvel, 2 – Fração insolúvel, 3 e 8 – Marcador de pesos moleculares, 4 – Após passagem na coluna, 5 – Lavagem com tampão de lavagem com 40 mM de imidazol, 6 – Eluído 1 com tampão eluição com 300 mM de imidazol, 7 – Eluído 2 com tampão eluição com 300 mM de imidazol, 9 – Eluído 2 com tampão de eluição com 300 mM de imidazol após passagem na PD-10, 10 – Eluído 3 com tampão de eluição com 300 mM de imidazol.

Após eluição, foi feita a troca de tampão para PBS usando uma coluna PD-10 por forma a remover o imidazol (2.6). Verificou-se que não houve perda de frutalina recombinante durante a troca de tampão (Figura 4, linha 9).

3.2.2. Clivagem e cromatografia de afinidade ao níquel reversa

A TrxFTL obtida anteriormente foi digerida com a TEV protease durante a noite (2.5.3). Amostras foram recolhidas antes e após a clivagem e analisadas por SDS-PAGE (Figura 5).

Verificar-se que a clivagem da TrxFTL ocorreu de uma forma completa pois a proteína na sua forma completa deixou de existir na solução, i.e. uma banda correspondente ao peso molecular esperado para a TrxFTL não é observada (Figura 5, linhas 3 e 5).

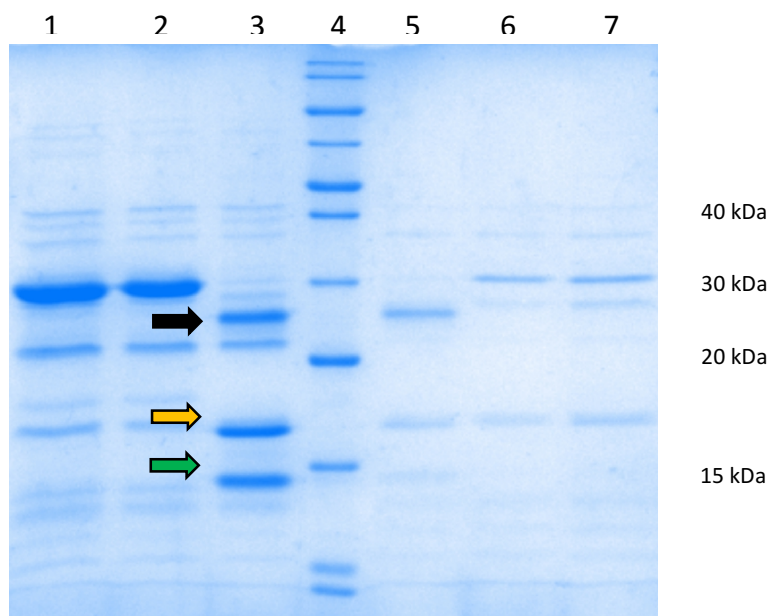


Figura 5 - Troca de tampão e clivagem da TrxFTL. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue. Legenda: 1 – TrxFTL 2 – TrxFTL após passagem na PD10, 3 – TrxFTL após clivagem, 4 – Marcador, 5 – TrxFTL após clivagem, 6 – TrxFTL após passagem na PD10, 7 – TrxFTL.

A proteína predominante de maior massa molecular (27,7 kDa; seta a preto) que aparece no gel SDS-PAGE após clivagem corresponde à TEV protease, enquanto as de inferior massa molecular (2 proteínas) correspondem ao resultado da clivagem da TrxFTL. Destas, uma pertence ao parceiro Trx+His⁶ (14,3 kDa; seta a verde) e a outra à frutalina recombinante (seta a laranja), cujo peso molecular não corresponde nem ao peso molecular da cadeia α (15,7 kDa) nem ao peso molecular das cadeias α e β juntas (17,7 kDa). O peso calculado é 16,6 kDa. A cadeia β não é visível numa análise SDS-PAGE, devido ao seu baixo peso (2 kDa). O gel não mostrou nenhuma proteína com o peso molecular esperado para a cadeia α . Um possível enrolamento da proteína pode ter impedido a protease de aceder ao local de clivagem.

O passo seguinte foi a purificação reversa da frutalina recombinante clivada (cadeia α + cadeia β ; possivelmente juntas). A análise SDS-PAGE da purificação reversa encontra-se na figura 6.

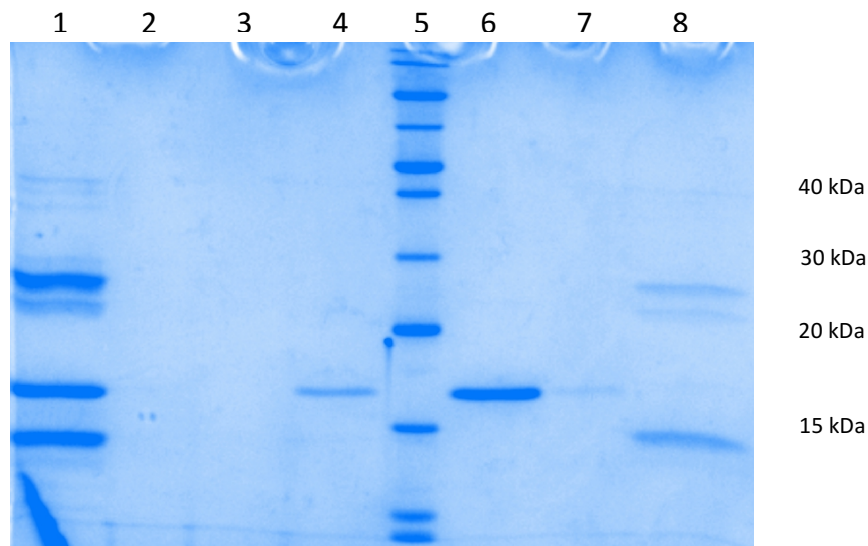


Figura 6 – Purificação reversa da rFTL por cromatografia de afinidade ao níquel. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue. Legenda: 1 – TrxFTL após digestão com TEV protease, 2 – Solução que saiu da coluna quando o carregamento da amostra, 3 – Solução que saiu da coluna quando a aplicação do tampão de lavagem antes de começar a sair rFTL – 4 – Eluído 1 de rFTL (2,5 mL) com tampão de lavagem contendo 40 mM de imidazol, 5 – Marcador, 6 – Eluído 2 de rFTL (2,5 mL) com tampão de lavagem contendo 40 mM de imidazol, 7 Eluído 3 de rFTL (2,5 mL) com tampão de lavagem contendo 40 mM de imidazol, 8 – Lavagem com EDTA.

A análise SDS-PAGE mostra uma proteína resultante aparentemente pura (Figura 6, linhas 4, 6 e 7). A parte da proteína clivada que continha a Trx e a cauda de histidinas bem como a TEV protease ligaram à coluna e só saíram na lavagem com EDTA. O mesmo aconteceu às proteínas contaminantes que a purificação anterior revelou, estas mantiveram a sua afinidade ao níquel e ligaram à coluna na passagem da amostra e saíram também nessa eluição. A rFTL é o único elemento na mistura resultante da digestão que não tem afinidade à coluna.

O rendimento máximo obtido deste conjunto de processos foi de 10,6 mg de rFTL por litro de cultura.

3.3. Caracterização da rFTL

3.3.1. Ensaio de afinidade à galactomanana de *Adenantha pavonina*

Com a rFTL obtida foi realizado o ensaio de ligação à galactomanana de *A. pavonina*, comumente designada por goma de carol, para verificar a afinidade da rFTL à galactose, comparando com a frutalina nativa. As diferentes etapas deste ensaio foram analisadas por SDS-PAGE (figuras 7 e 8).

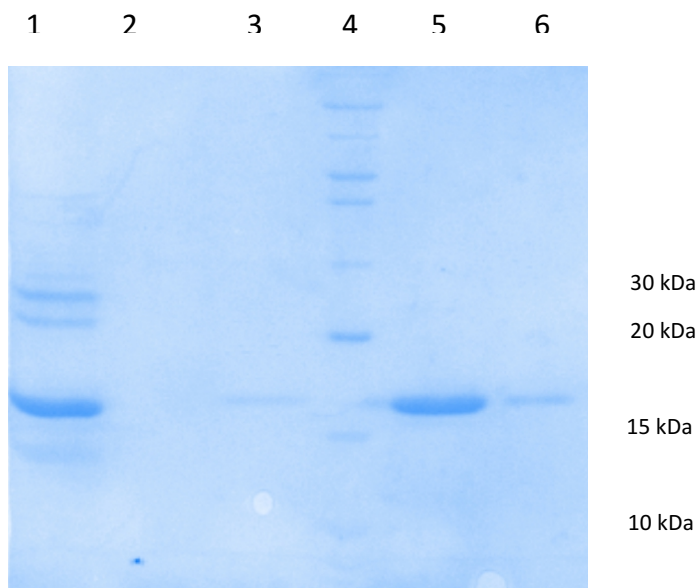


Figura 7 - Ensaio de ligação da rFTL À goma de carol. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue. Legenda: 1 – rFTL, 2 – Solução de lavagem 1 da goma após incubação, 3 – Solução de lavagem 2 da goma após incubação – 4 – Marcador, 5 – rFTL após incubação, 6 – Solução de lavagem da goma com D-Galactose (1 M).

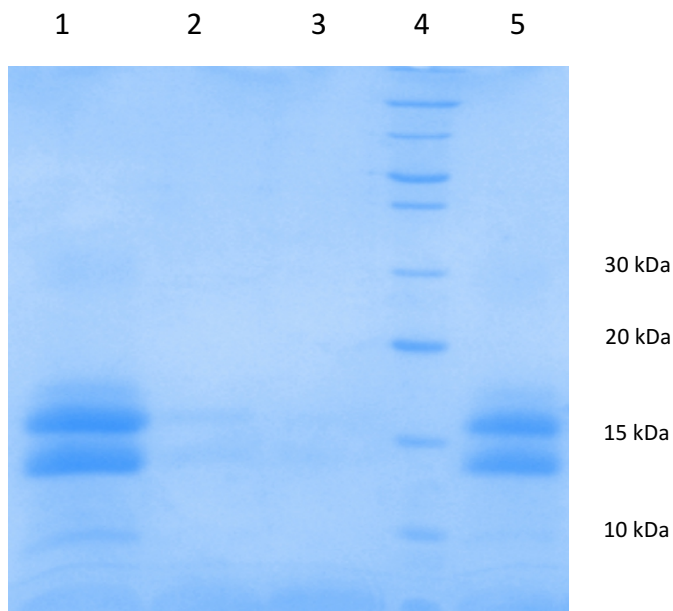


Figura 8 - Ensaio de ligação da frutalina nativa à goma de carol. Análise por SDS-PAGE a todos os passos do processo. Corado com Coomassie Brilliant Blue. Legenda: 1 – Frutalina nativa, 2 – Frutalina nativa após incubação, 3 – Solução de lavagem da goma após incubação – 4 – Marcador, 5 – Solução de lavagem da goma com D-Galactose (1 M).

Verificou-se que a rFTL não demonstrou afinidade à galactomanana (figura 7 linha 6), contrariamente à frutalina nativa, que demonstrou afinidade total (figura 8 linha 5). No entanto o aparecimento de rFTL ao longo das lavagens sugere alguma afinidade à galactose (figura 7, linhas 2, 3 e 6), a qual será muito reduzida.

3.3.2. *Dynamic Light Scattering*

Foram realizados ensaios de DLS (2.10.) para caracterizar estruturalmente a rFTL e assim estimar se esta está organizada em tetrâmeros, a conformação da frutalina nativa (Moreira et al. 1998). Os resultados obtidos para a frutalina recombinante e nativa encontram-se apresentados na figura 9. Tal como se pode observar nesta figura, existe uma população homogênea tanto para a frutalina recombinante como para a nativa, como indicado pela ocorrência de picos únicos de leitura na mesma zona de raio hidrodinâmico, embora com alguma variabilidade.

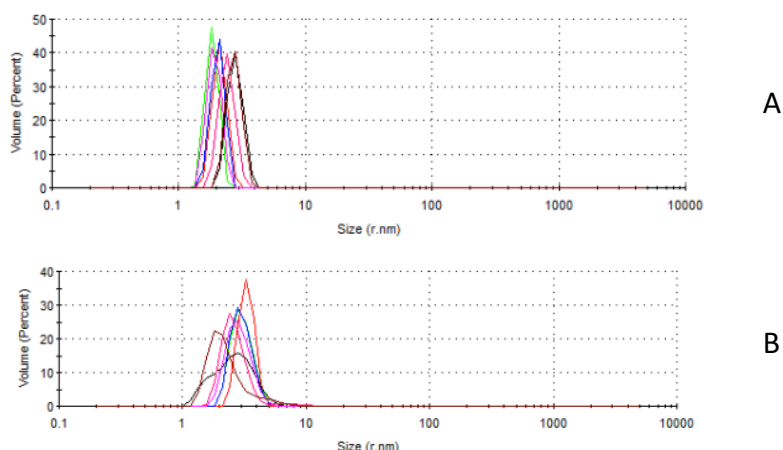


Figura 7 - Análise DLS da rFTL (A) e frutalina nativa (B). As curvas representam as leituras efetuadas

Tabela 13 - Ensaios de DLS de frutalina nativa e frutalina recombinante clivada. Os valores estimados foram calculados usando o software *Zetasizer*. Os valores correspondem à média \pm desvio padrão de 7 leituras no caso da nFTL e à média \pm desvio padrão de 3 ensaios com 7 leituras cada.

Proteína	Tampão	MW teórico (kDa)	r(nm) estimado	r(nm) obtido
nFTL	PBS	49	3,14	2,09 \pm 0,16
rFTL	PBS	70,4	3,68	3,25 \pm 0,63

Verifica-se que o raio hidrodinâmico médio obtido é maior para a frutalina recombinante (3,25 nm) do que para a frutalina nativa (2,09 nm), o que era esperado, no entanto ambos os resultados estão abaixo do estimado (tabela 13). No caso da frutalina nativa o resultado esperado seria de 3,61 r.nm, no caso da recombinante clivada, se organizada em tetrâmeros, 3,68 r.nm. O valor obtido para a frutalina nativa pode dever-se ao uso de amostras armazenadas a -20°C por alguns anos antes da leitura. Quer para a frutalina nativa quer para a rFTL o software indica os valores como não sendo estatisticamente válidos devido a precipitados ou contaminantes havendo leituras com valores bastante discordantes.

Num estudo anterior (Gonçalves 2014) o valor para o raio hidrodinâmico obtido ($2,9 \pm 0,83$ nm) foi semelhante ao obtido neste trabalho para frutalina produzida em *E. coli* após remoção do parceiro de fusão. Também nesse caso ficou abaixo do esperado (3,66 nm).

O valor obtido para a rFTL ($3,25 \pm 0,63$ nm) permite estimar um peso molecular entre 32,1 e 80,3 kDa o que indica que esta se encontra organizada em conjuntos de 2 a 4 monómeros, sendo um monómero as cadeias $\alpha+\beta$. O valor do peso molecular estimado para 3,25 nm é de 53,1 kDa o que indica uma organização em conjuntos de 3 monómeros.

3.3.3. Ensaio de hemaglutinação

Foram efetuados ensaios de hemaglutinação com eritrócitos de coelho por forma a verificar se a rFTL e a TrxFTL apresentam actividade hemaglutinante (HA), comparativamente com a frutalina nativa. Tal como descrito na literatura, a frutalina nativa demonstrou HA em eritrócitos de coelho (Campana et al. 2002)(Oliveira, Costa, et al. 2009)(Gonçalves 2014). No entanto, ao contrário da frutalina nativa, a frutalina recombinante não apresentou essa atividade (Tabela 14).

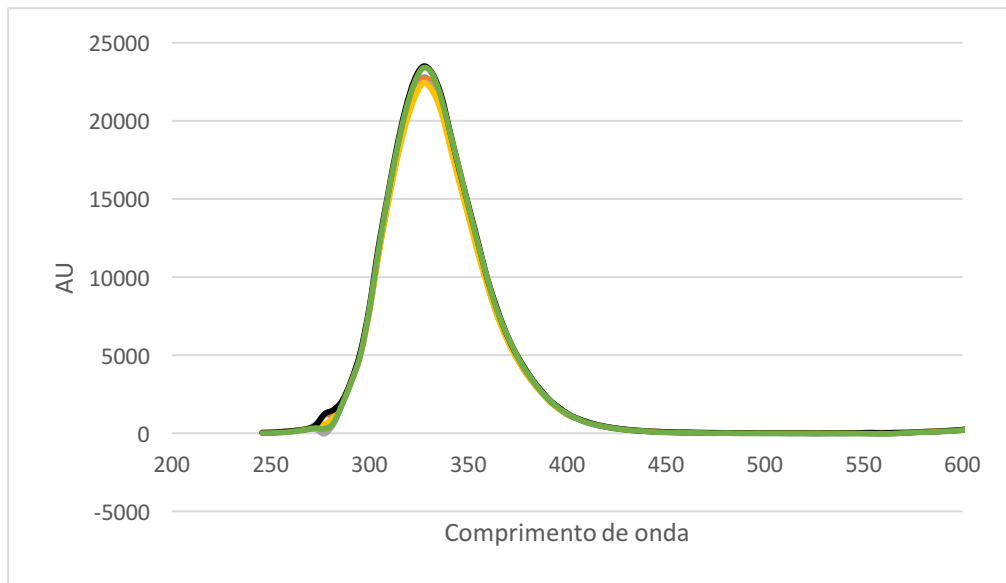
Tabela 14 - Ensaio de hemaglutinação com frutalina recombinante clivada e por clivar com concentração inicial de $1 = 0,7$ mg/mL. Usado PBS como controlo negativo e frutalina nativa como controlo positivo.

	1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
TrxFTL	-	-	-	-	-	-	-
rFTL	-	-	-	-	-	-	-

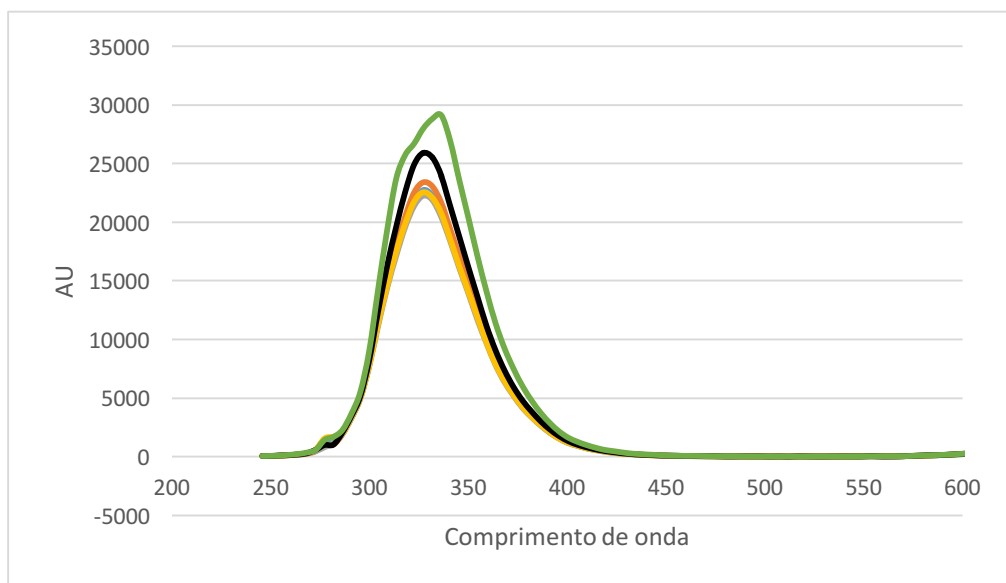
Em todos os ensaios efetuados a frutalina recombinante não demonstrou HA. Antes desta ser clivada não seria de esperar que apresentasse HA visto que a construção da mesma não é $\beta + \alpha$ como a nativa mas sim $\alpha + \beta$. Apenas após a clivagem e da organização em tetrâmeros se esperaria obter HA, tal como verificado em estudos anteriores onde a frutalina recombinante produzida em *E. coli* com a sequência $\beta + \alpha$ apresentou HA (Oliveira, Costa, et al. 2009). Tal não ocorreu o que pode ser devido à não ocorrência de clivagem entre as cadeias ou à incorreta organização das mesmas.

3.3.4. Ensaios de ligação a açúcares

Foram realizados ensaios de ligação aos açúcares melibiose, metil- α -D-galactose, D-galactose, D-manose e D-glucose por forma a verificar se a rFTL apresenta afinidade aos mesmos preparando soluções para uma concentração final de 4 mM e 100 mM dos açúcares em causa e 0,08 mg/mL de proteína. Os resultados na figura 10A revelam um aumento de intensidade de fluorescência de 3% na presença de 4 mM de melibiose e metil- α -D-galactose, o que pode advir da ligação da rFTL à melibiose e metil- α -D-galactose. Uma ligação dá aos triptofanos (um na cadeia α e um na cadeia β) uma maior exposição levando ao aumento da AU dos mesmos, como referido na literatura (Campana et al. 2002). Um aumento na concentração de melibiose e metil- α -D-galactose para 100 mM provocou aumento de AU de 14 e 28%, respetivamente. Os restantes açúcares (D-galactose, D-manose e D-glucose) não registaram nenhuma variação de AU quer a 4 mM quer a 100 mM.



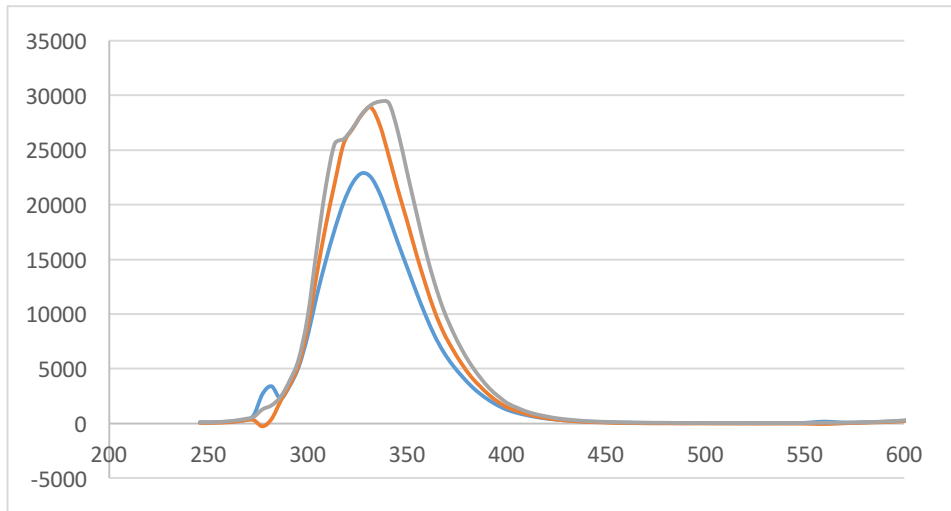
A



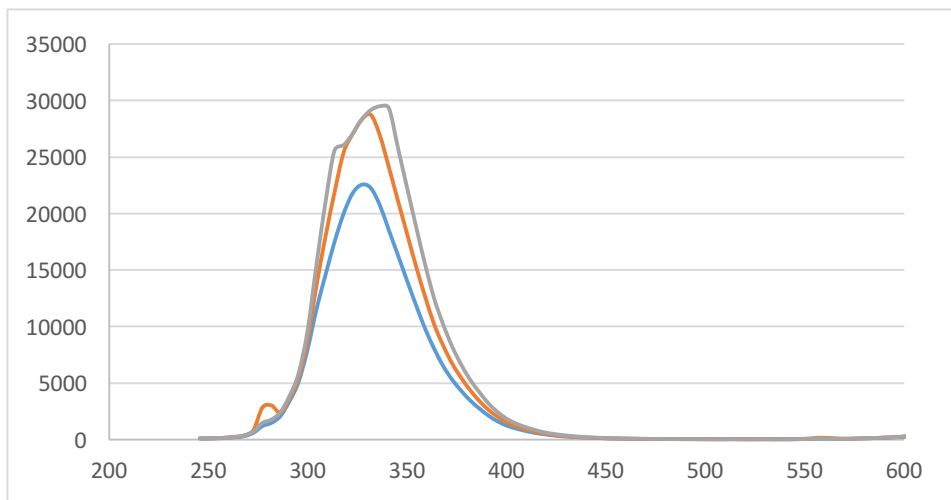
B

Figura 8 -Ensaio de ligação açúcares. Análise por fluorescência da rFTL em presença dos açúcares melibiose (preto), metil- α -D-galactose (verde), D-galactose (laranja), D-manose (amarelo) e D-Glucose (cinza) a 4 mM (A) e 100 mM (B). Relação entre o comprimento de onda (XX) e a AU (YY).

Por forma a confirmar a afinidade da rFTL à melibiose e à metil- α -D-galactose foram realizados ensaios de ligação na presença destes açúcares em concentrações de 50 mM e 100 mM (replicação) cujos resultados são mostrados na figura 11.



A



B

Figura 9 - Ensaio de ligação açúcares. Análise por fluorescência da rFTL na ausência de açúcares (azul) e na presença dos açúcares melibiose (laranja) e metil- α -D-galactose (cinza) a 100 mM (A) e 50 mM (B). Relação entre o comprimento de onda (XX) e a AU (YY).

Não existem diferenças nos valores de fluorescência da rFTL na presença de 50 e 100 mM de melibiose ou metil- α -D-galactose, para o máximo de emissão (327 nm). Como é indicado na tabela 15 os aumentos foram entre 26 e 31% confirmando a afinidade de ligação verificada anteriormente.

Tabela 15 - Aumento de intensidade de fluorescência / densidade ótica (%) da frutalina recombinante clivada na presença de melibiose a 331 nm e metil- α -D-galactose a 336 nm em relação á intensidade de fluorescência / densidade ótica a 327 nm da frutalina recombinante clivada (22571 unidades arbitrárias).

	50 mM	100 mM
MELIBIOSE	27	26
METIL- α -D-GALACTOSE	31	29

Quer a 50 mM quer a 100 mM a metil- α -D-galactose originou aumentos de AU ligeiramente superiores no entanto quer para a melibiose quer para a metil- α -D-galactose o aumento de AU foi superior nos ensaios com 50 mM do açúcar. Estes resultados sugerem que a saturação da ligação entre a frutalina recombinante e os açúcares em causa é atingida, para uma concentração de proteína de 0,08 mg/mL, com uma concentração de açúcar inferior a 50 mM.

A maior intensidade de fluorescência verificou-se aos 327 nm próxima do máximo de fluorescência da frutalina nativa, 333 nm (Campana et al. 2002). Estes resultados podem significar que, além do número de triptofanos, a estrutura também pode ser semelhante.

Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente com frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* onde 100 mM de metil- α -D-galactose provocou o aumento de 35% da intensidade de fluorescência sendo o máximo de fluorescência atingido aos 335 nm, mas não no caso da D-galactose, D-glucose e D-manose (Oliveira et al. 2008).

O aumento da exposição dos triptofanos, traduzido num aumento de intensidade de fluorescência, indica a existência de afinidade da rFTL aos açúcares melibiose e metil- α -D-galactose, mas não aos restantes açúcares aqui testados.

3.4. Desnaturação da frutalina recombinante

A rFTL purificada não revelou nenhuma das características da frutalina nativa, nomeadamente, não apresentou HA (secção 3.3.3) e afinidade à galactomanana (secção 3.3.1). Para além disso, a análise SDS-PAGE da frutalina clivada não se revelou conclusiva quanto à clivagem entre a cadeia α e β (secção 3.3.2). Uma vez que um possível enrolamento da proteína poderá ter impedido essa clivagem, foi efetuada a sua desnaturação, para originar o seu desenrolamento, e aumentar a acessibilidade da TEV protease, e logo, ocorrer a clivagem e separação das cadeias α e β . Foi testada a desnaturação química com GndHCl (4 e 6 M com pH=7,4) e ureia (8 M com pH=7,4).

Antes da desnaturação comparou-se a fluorescência da rFTL com a fluorescência da frutalina nativa (figura 12). Os resultados na figura 12 mostram semelhança ao nível da intensidade de fluorescência sendo que a maior intensidade se encontra em comprimentos de

onde maiores no caso da frutalina recombinante. A concentração usada foi a mesma (0,08 mg/mL) para ambas (a rFTL e a nFTL) embora os valores de fluorescência não sejam afetados pela mesma pois o equipamento normaliza os valores através da integração com o valor da densidade ótica. Assim, a frutalina recombinante mostrou uma emissão máxima a 340 nm e a frutalina nativa a 327 nm, próxima da referida na literatura (Campana et al. 2002).

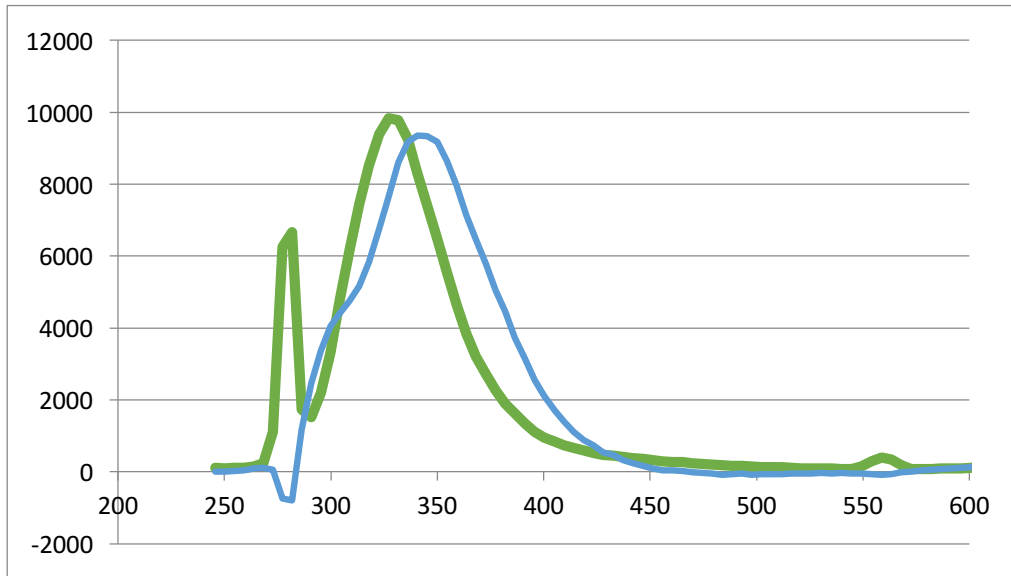


Figura 10 - Análise comparativa da fluorescência da rFTL (a azul) e frutalina nativa (a verde). Relação entre o comprimento de onda (XX) e a AU (YY).

A desnaturação química com GndHCl foi efetuada por troca de tampão PBS para NaCl/Pi com 4 ou 6 M de GndHCl a pH 7,4 (secção 2.9). Os resultados são mostrados na figura 13. A mesma concentração de rFTL (0,08 mg/mL) foi usada para as 3 condições (com 4 e 6M de GndHCl e na ausência de GndHCl).

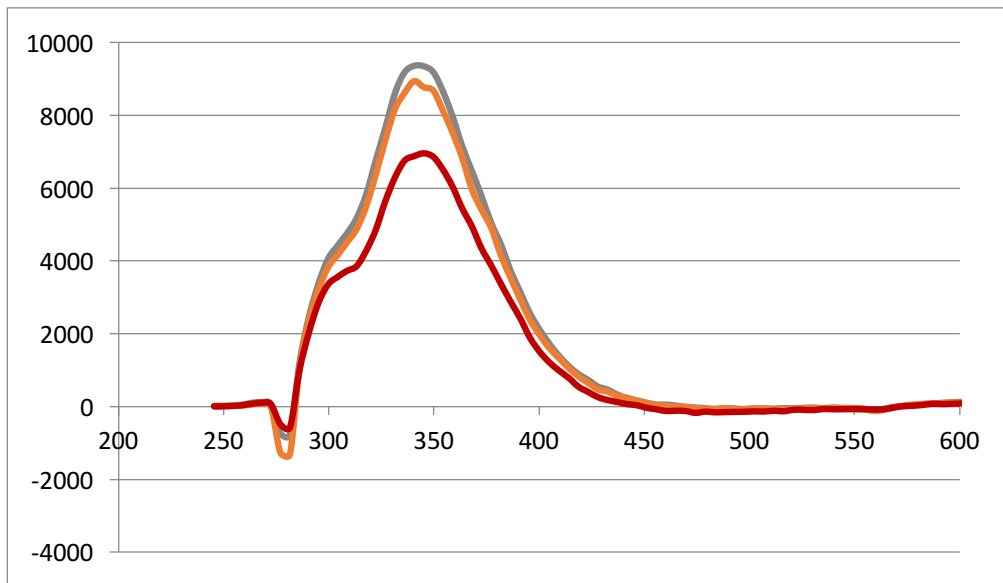


Figura 11 - Análise por fluorescência da desnaturação de rFTL com GndHCl. Legenda: rFTL (a cinza), rFTL em GndHCl 4M (a laranja), rFTL em GndHCl 6M (a vermelho). Relação entre o comprimento de onda (XX) e a AU (YY).

Num estudo anterior, a frutalina nativa revelou um aumento na intensidade de fluorescência após desnaturação nas mesmas condições aqui testadas (GndHCl 6M) e uma alteração do máximo de emissão de 333 nm para 348 nm, resultante da maior exposição dos triptofanos (Campana et al. 2002). No entanto, o máximo de emissão verificou-se nos 340 nm no caso da desnaturação com 4 M de GndHCl, e também na proteína não desnaturada, e de 345 nm no caso da desnaturação com 6 M de GndHCl. Isto pode significar que a proteína usada neste ensaio já estaria desnaturada, uma vez que no ensaio de ligação a açúcares (secção 3.3.4.), no qual um outro stock de rFTL foi usado, o máximo de emissão foi de 327 nm. Num estudo anterior uma versão de frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* obteve um máximo de emissão de 335 nm (Oliveira et al. 2008). No entanto pode dever-se ao facto de a isoforma produzida em *P. pastoris* não ser a mesma que a aqui produzida. Logo o processo de clivagem e/ou condicionamento da proteína clivada pode levar à sua desnaturação ou alteração da conformação, o que deverá ser melhor estudado

Não obtendo os resultados esperados testou-se a desnaturação da TrxFTL tendo como condições desnaturantes ureia (8 M) e GndHCl (6 M) com e sem correção do pH (4,8 e 7,4, respetivamente). De notar que esta frutalina recombinante por clivar não estava pura pois só é obtida uma solução pura após a purificação reversa. No entanto, a TrxFTL encontra-se em vasta maioria.

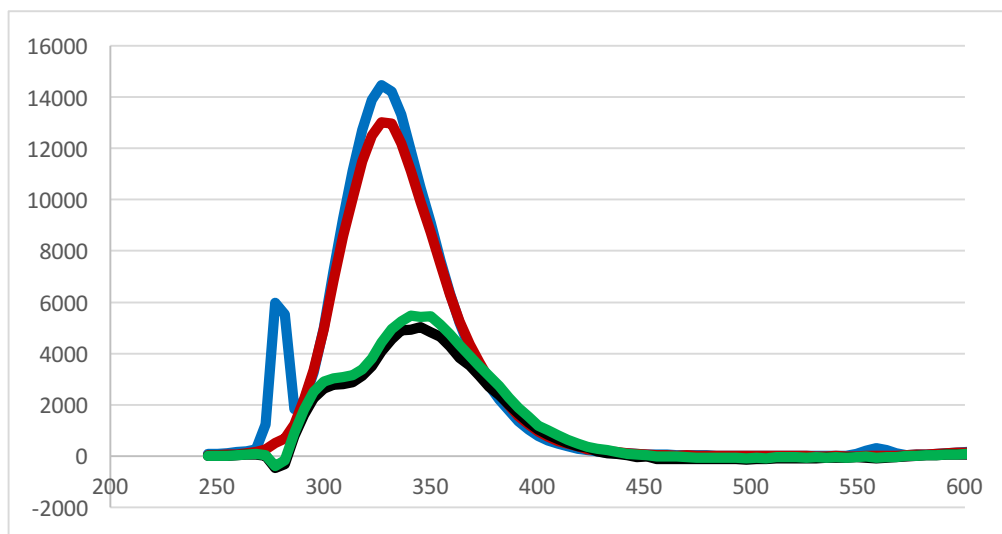


Figura 12 -Desnaturalização de TrxFTL com GndHCl e Ureia. Análise por fluorescência das soluções resultantes. Legenda: TrxFTL em PBS (a azul), TrxFTL em ureia (a vermelho), TrxFTL em GndHCl pH=7,4 (a preto), TrxFTL em GndHCl pH=4,8 (a verde). Relação entre o comprimento de onda (XX) e a AU (YY).

Tal como nas condições anteriores, estas novas condições não produziram um aumento de intensidade de fluorescência esperado em nenhum dos casos como se pode observar na figura 13. Pelo contrário, a introdução de um agente desnaturante no meio reduziu essa intensidade, mas apenas no caso do GndHCl, a ureia não surtiu qualquer efeito. O efeito observado não foi dependente do pH do desnaturante (figura 14).

Verifica-se uma alteração da emissão máxima da fluorescência de 327 nm para 340 nm. A desnaturalização de frutalina nativa além do aumento do comprimento de onda do máximo de fluorescência resultou também num aumento de 5 vezes dessa intensidade (Campana et al. 2002). No entanto a desnaturalização da lectina das sementes de *Momordica charantia* com GndHCl 6M provocou não só o aumento do comprimento de onda do máximo de fluorescência, mas também a diminuição da intensidade de fluorescência (Kavitha et al. 2010). Mais recentemente a desnaturalização de homóloga da lectina de *Leishmania donovani* com GndHCl 7M provocou também o aumento do máximo de emissão, não afetando significativamente a intensidade de fluorescência (Singh et al. 2015). De forma diferente da rFTL que teve máximo de AU variável (340 ou 327 nm), a TrxFTL teve máximo de AU constante nos 327 nm após o mesmo período de incubação quer na presença quer na ausência de GndHCl indicando uma maior estabilidade na presença do parceiro de fusão (Trx+His⁶).

Nos casos da desnaturalização com GndHCl a densidade ótica também sofreu uma queda (de 95%) no entanto o equipamento conseguiu efetuar a leitura da densidade ótica e fluorescência,

pelo que se deduz que a quantidade de proteína remanescente estava dentro dos limites de detecção do aparelho. Pode-se concluir que a desnaturação da TrxFTL com GndHCl provocou a diminuição da AU e o aumento do comprimento de onda de emissão máximo.

Capítulo 4: Conclusões e perspectivas futuras

No presente trabalho foi produzida uma versão de frutalina recombinante (TrxFTL) contendo uma cauda de histidinas e a proteína Trx como parceiro de fusão. Contem também dois locais de ação da TEV-protease por forma a separar as cadeias e liberta-las do parceiro de fusão. Esta versão permite a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel e permite também a purificação após clivagem por cromatografia de afinidade ao níquel reversa.

A produção resultou numa proteína (TrxFTL) solúvel no meio intracelular. A inclusão do Trx permitiu obter rendimentos na ordem das mg. A purificação por cromatografia de afinidade ao níquel teve elevada taxa de recuperação, embora numa primeira fase a solução resultante tenha vários contaminantes, estes são removidos num processo posterior (cromatografia de afinidade ao níquel reversa).

A digestão com TEV protease foi completa no local de ação que separa as cadeias do parceiro de fusão no entanto não foi possível concluir se ocorreu ou não clivagem entre as cadeias α e β . Um possível enrolamento pode ter deixado o local de clivagem inacessível à TEV protease.

A TrxFTL não demonstrou atividade hemaglutinante em hemácias de coelho, o mesmo foi verificado para a rFTL. Isto foi devido à construção $\alpha + \beta$ da TrxFTL (a nativa tem construção $\beta + \alpha$). No entanto, após a digestão seria esperado HA o que não se verificou. Isto pode-se dever à possível não clivagem das cadeias ou à incorreta organização das mesmas.

A rFTL não demonstrou afinidade à galactomanana de *A. pavanina*, no entanto sugeriu alguma interação com a mesma. Em ensaios de ligação da rFTL a açucares obtiveram-se aumentos de fluorescência que revelam afinidade de ligação à melibiose e metil- α -D-galactose mas não à D-galactose, D-glucose ou D-manose.

Os ensaios de DLS permitiram estimar o peso molecular da rFTL entre 32,1 e 80,3 kDa o que indica a organização desta em grupos de 2 a 4 monómeros. O valor médio indica uma organização em grupos de 3 monómeros.

Devido aos resultados não permitirem concluir se ocorreu clivagem entre as cadeias e ao facto da rFTL não possuir atividade hemaglutinante e afinidade à galactomanana, o que se pode dever à possível não clivagem entre cadeias, tentou-se a desnaturação da rFTL com GndHCl e à desnaturação de TrxFTL com GndHCl e ureia, para aumentar a acessibilidade da protease. A tentativa de desnaturação de rFTL com GndHCl não produziu uma alteração de AU ou do comprimento de onda de AU máxima, parâmetro este maior do que o esperado, quando comparado com os reportados para a frutalina nativa. Isto pode-se dever a uma desnaturação

durante o período de armazenamento indicando que a rFTL já estaria desnaturada. A desnaturação de TrxFTL apenas foi possível com GndHCl pois apenas a presença de GndHCl provocou um aumento significativo do comprimento de onda de AU máxima e uma redução de AU no entanto a queda da densidade ótica indica perdas elevadas (95%). A semelhança dos valores obtidos para o comprimento de onda de AU máxima entre a TrxFTL e a frutalina nativa indica que a presença da Trx aumenta a estabilidade da proteína.

Por forma a verificar se ocorreu ou não a clivagem das cadeias da frutalina recombinante, poder-se-ia usar um anticorpo anti cadeia β numa análise *Western blot* para determinar se a proteína de 16,6 kDa presente no gel contém a cadeia β . Uma análise estrutural da rFTL deverá ser conduzida (por exemplo, por dicroísmo circular).

Futuramente seria interessante estudar a desnaturação da TrxFTL e da TEV protease por forma a conhecer possíveis condições desnaturantes para a TrxFTL em que a TEV protease mantenha a sua atividade. Adicionalmente, estudar condições de renaturação da frutalina recombinante após desnaturação e clivagem.

Teria interesse também a produção das cadeias α e β em vetores diferentes com o mesmo parceiro de fusão (Trx+His⁶) e separados do mesmo por um local de ação da TEV protease, e posterior junção das cadeias.

Capítulo 5: Referências

- BOURNE, Y. et al., 2002. Structural basis for the unusual carbohydrate-binding specificity of jacalin towards galactose and mannose. *Biochemical Journal*, 364(1), pp.173–180.
- Brando-Lima, A.C. et al., 2005. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicology and applied pharmacology*, 208(2), pp.145–54.
- Brando-Lima, A.C. et al., 2006. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase-Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. *International immunopharmacology*, 6(3), pp.465–72.
- Campana, P.T. et al., 2002. Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric d -galactose binding lectin. *European Journal of Biochemistry*, 269(3), pp.753–758.
- Chaga, G.S., 2001. Twenty-five years of immobilized metal ion affinity chromatography: past, present and future. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1-3), pp.313–334.
- Costa, S. et al., 2014. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. *Frontiers in microbiology*, 5, p.63.
- Costa, S.J. et al., 2013. The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in Escherichia coli: a comparison with the traditional gene fusion technology. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(15), pp.6779–91.
- Gabor, F., Klausegger, U. & Wirth, M., 2001. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. *International journal of pharmaceutics*, 221(1-2), pp.35–47.
- Gonçalves, L., 2014. *Estudo de diferentes sistemas de produção e purificação de frutalina recombinante com vista à sua aplicação biomédica*, Universidade do Minho.
- Hage, D.S. et al., 2012. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 69, pp.93–105.
- Houlès Astoul, C. et al., 2002. The size, shape and specificity of the sugar-binding site of the jacalin-related lectins is profoundly affected by the proteolytic cleavage of the subunits. *The Biochemical journal*, 367(Pt 3), pp.817–24.
- Kavitha, M., Bobbili, K.B. & Swamy, M.J., 2010. Differential scanning calorimetric and spectroscopic studies on the unfolding of Momordica charantia lectin. Similar modes of thermal and chemical denaturation. *Biochimie*, 92(1), pp.58–64.
- Lei, H.-Y. & Chang, C.-P., 2009. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *Journal of biomedical science*, 16, p.10.
- Liu, B., Bian, H. & Bao, J., 2010. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer letters*, 287(1), pp.1–12.

- De Mejía, E.G. & Prisecaru, V.I., 2005. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(6), pp.425–45.
- Moreira, R.A. et al., 1998. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry*, 47(7), pp.1183–1188.
- Nobre, T.M. et al., 2010. The specificity of frutalin lectin using biomembrane models. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(8), pp.1547–55.
- Oliveira, C., Teixeira, J.A., et al., 2009. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. *BMC biotechnology*, 9(1), p.78.
- Oliveira, C., Costa, S., et al., 2009. cDNA cloning and functional expression of the alpha-D-galactose-binding lectin frutalin in *Escherichia coli*. *Molecular biotechnology*, 43(3), pp.212–20.
- Oliveira, C. et al., 2011. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.568932.
- Oliveira, C. et al., 2008. Expression of frutalin, an alpha-D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification*, 60(2), pp.188–93.
- Oliveira, C., Teixeira, J.A. & Domingues, L., 2013. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. *Critical reviews in biotechnology*, 33(1), pp.66–80.
- Oliveira, C., Teixeira, J.A. & Domingues, L., 2014. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application - the frutalin case study. *Frontiers in plant science*, 5, p.390.
- Pineau, N. et al., 1990. Structural and functional similarities of breadfruit seed lectin and jacalin. *Molecular immunology*, 27(3), pp.237–40.
- Pusztai, A., Bardocz, S. & Ewen, S.W.B., 2008. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, pp.1130–40.
- Queiroz, J.A., Tomaz, C.T. & Cabral, J.M.S., 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, 87(2), pp.143–159.
- Sahasrabudde, A.A. et al., 2004. Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 13(12), pp.3264–73.
- Sahasrabudde, A.A., Ahmed, N. & Krishnasastri, M. V, 2006. Stress-induced phosphorylation of caveolin-1 and p38, and down-regulation of EGFR and ERK by the dietary lectin jacalin in two human carcinoma cell lines. *Cell stress & chaperones*, 11(2), pp.135–47.

- Sharon, N., 2008. Lectins: past, present and future. *Biochemical Society transactions*, 36(Pt 6), pp.1457–60.
- Sharon, N. & Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), p.53R–62R.
- Singh, V. et al., 2015. Heterologous expression, purification and characterization of L-type lectin homologue from *Leishmania donovani*. *Biotechnology Reports*.
- de Vasconcellos Abdon, A.P. et al., 2012. Gastroprotective potential of frutalin, a D-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. *Fitoterapia*, 83(3), pp.604–8.

Capítulo 6: Anexos

6.1. Sequências

TrxFTL:

MSDKIIHLTDDS MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGP
CKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL FKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHM HHHHHH SSG ENLYF
Q AMGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVGS
HTSFIKGFTPVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSGYVVVRS LTFKTNKKT
YGPYGVTS GTPFNLPIENGLVVGFKGSIGYWMDYFSMYLSL ENLYFQ
G AEQSGKSQTVIVGPWGAKVS

TrxFTL após digestão nos dois locais de ação da TEV protease:

Trx+His⁶:

MSDKIIHLTDDS MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGP
CKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL FKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHM HHHHHH SSG ENLYF
Q

Cadeia α :

G AMGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVGSHT
SFIKGFTPVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSGYVVVRS LTFKTNKKT
PYGVTS GTPFNLPIENGLVVGFKGSIGYWMDYFSMYLSL ENLYFQ

Cadeia β :

G AEQSGKSQTVIVGPWGAKVS

Com clivagem em apenas um local de ação da TEV protease (*Caso 1*):

Trx+His⁶:

MSDKIIHLTDDS MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGP
CKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLL FKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHM HHHHHH SSG ENLYF
Q

Cadeia α + Cadeia β :

GAMGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVGGQSHT
SFIKGFTPVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSGYVVVRS�TFKTNKKTYG
PYGVTSGTPFNLPIENGLVVGFKGSIGYWMDYFSMYLSL ENLYFQGA
EQSGKSQTVIVGPGWAKVS

Com clivagem em apenas um local de ação da TEV protease (*Caso 2*):

Trx+His⁶ + Cadeia α :

MSDKIIHLTDDS MSDKIIHLTDDSFDTDLKADGAILVDFWAEWCGP
CKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKN
GEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGS GSGHM HHHHHHSSG ENLYF
QGAMGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVGGQS
HTSFIKGFTPVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSGYVVVRS�TFKTNKKT
YGPYGVTSGTPFNLPIENGLVVGFKGSIGYWMDYFSMYLSL ENLYFQ

Cadeia β :

GAEQSGKSQTVIVGPGWAKVS

TrxA

His⁶

TEV

Cadeia α

Cadeia β