

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Armando Hugo Soares Marques

**Desenvolvimento na produção de proteínas recombinantes e respectivos anticorpos com interesse de diagnóstico e/ou terapêutico através de um novo sistema de fusão em *Escherichia coli***



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Armando Hugo Soares Marques

**Desenvolvimento na produção de proteínas recombinantes e respectivos anticorpos com interesse de diagnóstico e/ou terapêutico através de um novo sistema de fusão em *Escherichia coli***

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

Trabalho realizado sob a orientação da  
**Professora Doutora Lucília Domingues**  
e co-orientação do  
**Doutor André Almeida**

Outubro de 2011

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

# Agradecimentos

Foi um longo caminho para realizar esta dissertação. E muita gente foi contribuindo para que esta tese fosse uma realidade.

Agradeço à Prof. Doutora Lucília Domingues e ao Doutor André Almeida por todo o apoio dado ao longo deste trabalho. Agradeço também à Sofia Costa, por todo o interesse que demonstrou durante toda a execução do trabalho, pelos ensinamentos, pelos conhecimentos que me transmitiu, e paciência que teve comigo. Agradeço também à Doutora Carla Oliveira e ao Doutor António Castro. Por todas as ideias, pelos recursos que me disponibilizaram e por toda a atenção e paciência que me deram, o meu muito obrigado! Sem eles, seria impossível completar este trabalho. Agradeço também a todos os investigadores do Laboratório de Ecologia e Microbiologia Molecular (LEMM), sob a alçada da prof. Lucília, e ao centro de Imunologia e Biologia Parasitária do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Agradeço ainda à Lara e ao Eduardo por toda a ajuda prestada. Obrigado pelo bom ambiente e pela ajuda que me forneceram quando mais necessitei.

E claro que não me podia esquecer das pessoas mais importantes na minha vida! A toda a minha família pelo infundável apoio e paciência ao longo deste ano mais “estafante”. Aos meus pais que sempre me incitaram e incitam a ser mais e melhor, às minhas irmãs, aos meus sobrinhos que me tiraram algumas horas de trabalho! Também a todos os meus amigos.

E a todos que me possa ter esquecido, o meu muito obrigado!

## Resumo

A Pal é uma lipoproteína que existe em maior abundância na parede celular da *Legionella pneumophila*. A localização e abundância da Pal tornam-na um antígeno importante no controlo de infecções causadas por este microrganismo. A obtenção desta proteína na sua estrutura nativa é, assim, importante para a produção de anticorpos que possam ser utilizados em testes de diagnóstico rápidos e na produção de vacinas. Tendo em conta o potencial de diagnóstico da Pal bem como a necessidade de uma produção proteica rápida e eficaz, estudou-se neste trabalho um novo sistema de produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* e respectivos anticorpos: o tag de fusão H.

Para isso procedeu-se ao estudo das condições ótimas de solubilidade da HPal em condições nativas, na *E. coli* e posteriormente passou-se ao aumento de escala e à purificação desta proteína através da cromatografia de afinidade. Posteriormente, procedeu-se à imunização dos animais com a HPal purificada ao longo de 15 dias e 25 dias. Findo esse tempo, recolheu-se o soro dos animais e procedeu-se à detecção dos anticorpos presentes no soro.

A elaboração deste trabalho permitiu expressar de forma solúvel a HPal, usando 4 horas de indução, 1mM IPTG, a 37°C. Além disso, foi possível equilibrar, lavar e eluir a proteína com 20 mM, 20 mM e 70 mM de imidazole, respectivamente. Apesar de apresentar alguns contaminantes, ficou também provado que o antígeno recombinante HPal induziu uma forte produção de anticorpos anti-Pal. O trabalho foi desenvolvido em estreita colaboração com a empresa Hitag Biotechnology, Lda.

**Palavras-chave:** proteínas recombinantes, tag de fusão, Pal, *Doença do Legionário*, *Legionella Pneumophila*, cromatografia de afinidade, diálise, anticorpos, ELISA, Blotting.

## Abstract

The Pal is a lipoprotein that exists in greater abundance in the cell wall of *Legionella Pneumophila*. The location and abundance of Pal make it an important antigen in the control of infections caused by this microorganism. The achievement of this protein in its native structure is thus important for the production of antibodies that can be used in rapid diagnostic tests and vaccine production. Having regard to the diagnostic potential of Pal and the need for a rapid and efficient protein production, we studied in this work a new system for producing recombinant proteins in *Escherichia coli* and their antibodies: the fusion tag H.

For this we proceeded to the study of optimal conditions for solubility of HPal in native conditions in *E. coli* and subsequently went to the scaling up and purification of this protein by affinity chromatography. Afterwards, if the immunization of animals with purified HPal over 15 days and 25 days. After this time, withdrew the serum of animals and proceeded to the detection of antibodies in serum.

The preparation of this work allowed us to express the soluble form HPal, using four hours of induction, 1 mM IPTG at 37°C. Moreover, it was possible to balance, wash and elute the protein with 20 mM, 20 mM and 70 mM imidazole, respectively. Despite showing some contaminants, it also proved that the HPal recombinant antigen induced strong production of anti-Pal. The work was developed in close collaboration with the company Hitag Biotechnology, Inc.

**Keywords:** recombinant proteins, fusion tag, Pal, *Legionnaire's disease*, *Legionella pneumophila*, affinity chromatography, dialysis, antibodies, ELISA, Blotting.

**Dedico esta tese**

**A minha mãe**

# Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	IV
Abstract.....	V
Índice de figuras.....	XII
Índice de tabelas.....	XIII
Lista de siglas e abreviações.....	XIV
<b>1</b> <b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b> <b>Enquadramento e objectivos do trabalho.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b> <b>A bactéria <i>Escherichia coli</i> como hospedeira para produzir proteínas.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3</b> <b>Sistemas de fusão .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4</b> <b>Sistema H e Pal.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.1</b> <b>O novo sistema de fusão H.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2</b> <b>Lipoproteínas .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.3</b> <b>Lipoproteína associada ao peptidoglicano .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.3.1</b> <b>Estrutura da Pal e complexo Tol-Pal.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.3.2</b> <b>Doença do Legionário.....</b>	<b>13</b>

1.5	Expressão da Pal recombinante.....	14
2	Materiais e métodos .....	16
2.1	Esterilização do material, soluções e meios de cultura.....	16
2.2	Vectores e estirpe usados.....	16
2.3	Expressão da HPal recombinante .....	18
2.3.1	Estudo das condições óptimas de produção da HPal recombinante solúvel .....	18
2.3.1.1	Culturas para o estudo das condições óptimas da produção da HPal recombinante solúvel.....	19
2.3.2	Expressão da HPal recombinante solúvel.....	21
2.3.2.1	Cultura 50 mL.....	21
2.3.2.2	Cultura de 500 mL.....	22
2.3.2.3	Cultura de 1L.....	22
2.4	Purificação da HPal recombinante .....	23
2.4.1	Separação por afinidade da coluna de níquel.....	23
2.4.2	Diálise.....	26
2.5	Electroforese – SDS-PAGE .....	27
2.5.1	Método de coloração <i>Coomassie Blue</i> .....	28

2.6	Quantificação proteica .....	29
2.7	Imunização .....	29
2.7.1	Preparação de soros policlonais.....	29
2.7.2	ELISA.....	30
2.7.3	<i>Western blot</i> .....	31
2.7.3.1	Tris-Tricine-PAGE e transfer.....	31
2.7.3.2	<i>Immunoblotting</i> .....	33
3	Resultados e discussão .....	34
3.1	Expressão da HPal recombinante em <i>E. coli</i> .....	34
3.1.1	Estudo da solubilidade da HPal.....	34
3.1.2	Expressão da HPal recombinante solúvel.....	39
3.2	Purificação da HPal recombinante solúvel.....	40
3.2.1	Análise dos testes de cromatografia de afinidade dos extractos de <i>E. coli</i> com HPal recombinante por géis SDS-PAGE.....	41
3.2.2	Quantificação da HPal recombinante obtida.....	46
3.3	Detecção de anticorpos por ELISA e <i>Immunoblotting</i> .....	46
4	Conclusão e perspectivas futuras.. ..	50

<b>5</b>	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>51</b>
	<b>Anexos.....</b>	<b>54</b>
	<b>Anexo I - Expressão da HPal recombinante solúvel.....</b>	<b>54</b>
	<b>A.I.1. Análise pela ferramenta <i>ProtParam</i> do <i>ExPASy</i> proteomic     Tools.....</b>	<b>54</b>
	<b>Anexo II - Purificação da HPal recombinante.....</b>	<b>58</b>
	<b>A.II.1 Características da coluna His-trap.....</b>	<b>58</b>
	<b>Anexo III - Curva de calibração usada no método de Bradford.....</b>	<b>58</b>
	<b>Anexo IV - Cálculos.....</b>	<b>59</b>

# Índice de figuras

**Figura 1.** *Folding* de proteínas e secreção em *E. coli*.

**Figura 2.** Representação esquemática da via de expressão da proteína para a purificação usando tags de solubilidade.

**Figura 3.** Sinalização em cascata em células apresentadoras de antígenos induzida por estimulação de receptores TLR2.

**Figura 4.** Localização e interações das proteínas Tol-Pal na membrana celular das bactérias Gram-negativas.

**Figura 5.** *Legionella pneumophila*.

**Figura 6.** Representação do mapa circular dos sistemas de vetores pQE: pQE30, pQE31 e pQE32. Mapa e sequência de clonagem/expressão do vector pQE30.

**Figura 7.** Matraz de capacidade 1 L com 200 mL de cultura LB.

**Figura 8.** Purificação de proteínas His-tag usando o sistema QIAexpress.

**Figura 9.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 20°C.

**Figura 10.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 25°C.

**Figura 11.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 30°C.

**Figura 12.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 37°C.

**Figura 13.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 37°C, 1mM IPTG.

**Figura 14.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 500 mL da HPal recombinante em *E. coli*.

**Figura 15.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com fracções celulares da cultura de 1 L da HPal recombinante em *E. coli*.

**Figura 16.** Géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna His-trap 5mL. Condições: 40mM imidazole no tampão ligação, 40 mM imidazole no tampão de lavagem e 300 mM no tampão de eluição.

**Figura 17.** Géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna His-trap 5mL. Condições: 40mM imidazole no tampão ligação, 100 mM imidazole no tampão de lavagem e 300mM no tampão de eluição.

**Figura 18.** Géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna com 1mL Níquel por gravidade. Condições: 20 mM imidazole no tampão de ligação, com diferentes concentrações (20 mM, 40 mM, 70 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM) de imidazole nos tampões de lavagem.

**Figura 19.** Resultados da ELISA realizadas com soros de ratinhos CD1 (média + desvio padrão) injectados com HPal contra a proteína recombinante HPal.

**Figura 20.** Membrana de nitrocelulose da análise por *Western blot* da HPal.

**Figura A.1.1.** Sequência nucleotídica e sequência proteica da HPAL clonada, usada na análise pelo

*ExPASy proteomic tools*.

**Figura A.1.2.** Sequência nucleotídica e sequência proteica do H clonado, usada na análise pelo

*ExPASy proteomic tools*.

# Índice de tabela

**Tabela 1.** Características do sistema de expressão *E.coli*.

**Tabela 2.** Estratégias para melhorar a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* (adaptado).

**Tabela 3.** Esquema do estudo das condições ótimas de expressão da HPal.

**Tabela 4.** Constituição dos geis SDS-PAGE 15% -4%.

**Tabela 5.** Constituição do PBS.

**Tabela 6.** Constituição do gel Tris-Tricina-PAGE 4% -20%

**Tabela 7.** Constituição do tampão de amostra Tris-Tricina 1X.

**Tabela 8.** Tampão de transferência de proteínas.

**Tabela A3.** Especificações da coluna His-trap.

## Lista de siglas e abreviações

Amp – ampicilina (antibiótico);

APS – persulfato de amônio (*Ammonium Persulfate*);

BSA – albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*);

DL - *Doença do legionário*;

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*;

H (fragmento) - sequência de 11 aminoácidos pertencentes ao antígeno recombinante *Fh8*;

His-tag - tag de histidinas;

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio;

IMAC - cromatografia de afinidade com metal imobilizado;

IPTG – isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo;

IP – intraperitonealmente;

[IPTG] – concentração de IPTG;

Kan – kanamicina (antibiótico);

LP - *Legionella Pneumophila*;

LB – *Luria Broth*;

MW - peso molecular

MWCO - peso molecular de corte;

Ni-NTA - Níquel-ácido nitrilotriacético;

OPD - *Ortho Phenyl Diamine*;

o/n – over night (toda a noite);

Pal – lipoproteína associada ao peptidoglicano;

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos;

PBS – tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*);

PBST – tampão fosfato salino-Tween;

PI – ponto isoelétrico;

p/v - relação peso/volume;

pb - pares de base;

SDS - *Sodium Dodecyl Sulfate*;

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*;

rpm - rotações por minuto;

t – tempo;

Tamb – temperatura ambiente;

Temp – temperatura;

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina;

TLR - receptor *Toll-like*.

# 1 Introdução

## 1.1 Enquadramento e objectivos do trabalho

O presente trabalho tem como objectivo a produção e expressão da lipoproteína associada ao peptidoglicano, Pal presente na parede celular da *Legionella pneumophila*, em *Escherichia coli*, para posterior produção de anticorpos anti-Pal que serão utilizados em testes de diagnóstico rápido.

Esta proteína já foi anteriormente produzida na sua forma desnaturante. Tendo em vista a aplicação da Pal como ferramenta de diagnóstico e terapêutica, torna-se fundamental obter esta proteína em maiores quantidades e na forma nativa.

Neste trabalho, o sistema de expressão escolhido para a produção da Pal recombinante foi o sistema de *E. coli* em conjunto com o tag de fusão H, pretendendo-se alcançar os seguintes objectivos:

- Produzir a proteína na forma nativa e solúvel usando o tag de fusão H;
  - Optimizar as condições de expressão de Pal recombinante em *E.coli*;
  - Optimizar as condições de purificação de Pal a partir de extractos celulares de *E. coli*, através de cromatografia de afinidade;
- Produzir anticorpos anti-Pal a partir do antigénio recombinante HPal.

## 1.2 A bactéria *Escherichia coli* como hospedeira para produzir proteínas

A *E. coli* é a bactéria Gram negativa mais antiga e utilizada para a produção de proteínas heterólogas. [Terpe, 2006] *E. coli* é a bactéria melhor caracterizada na produção de proteínas recombinantes. Os sistemas de expressão em *E. coli* implicam uma geração rápida da biomassa (produção e crescimento em massa), facilidade em

obter as condições de cultura a baixo custo, e são bastante versáteis, devido à disponibilidade de um número crescente de vectores de clonagem e estirpes do hospedeiro. [Gholipour et al, 2010] Este é um sistema excelente para expressão funcional de proteínas não glicosiladas. As vantagens e desvantagens deste hospedeiro estão demonstradas na tabela 1.

**Tabela 1.** Características do sistema de expressão *E. coli*.

<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Rápida expressão (produção em massa) e rendimentos elevados	Proteínas com pontes dissulfídicas dificultam a expressão
Facilidade em cultivar em alta densidade celular	Ausência de modificações pós-traducionais/ Produz proteínas não glicosiladas
Não é caro/baixo custo	Formação de acetato resultando na toxicidade celular
Direcionamento da proteína para compartimentos específicos: citoplasma, periplasma, meio extra-celular	Proteínas produzidas como corpos de inclusão
Facilidade de modificar o seu genoma	

Contudo o sistema de *E. coli* também acarreta algumas limitações, que têm que ser ultrapassadas para expressar as proteínas de uma forma eficiente. A elevada densidade celular resulta na toxicidade celular devido à formação de acetato, no entanto pode ser contornado pelo controlo dos níveis de oxigenação. [Demain e Vaishnav, 2009] Outros problemas com a expressão de proteínas em *E. coli* podem incluir a instabilidade da proteína, o processamento indevido ou modificação de pós-tradução, e tradução ineficiente. [Qiagen, 2011]

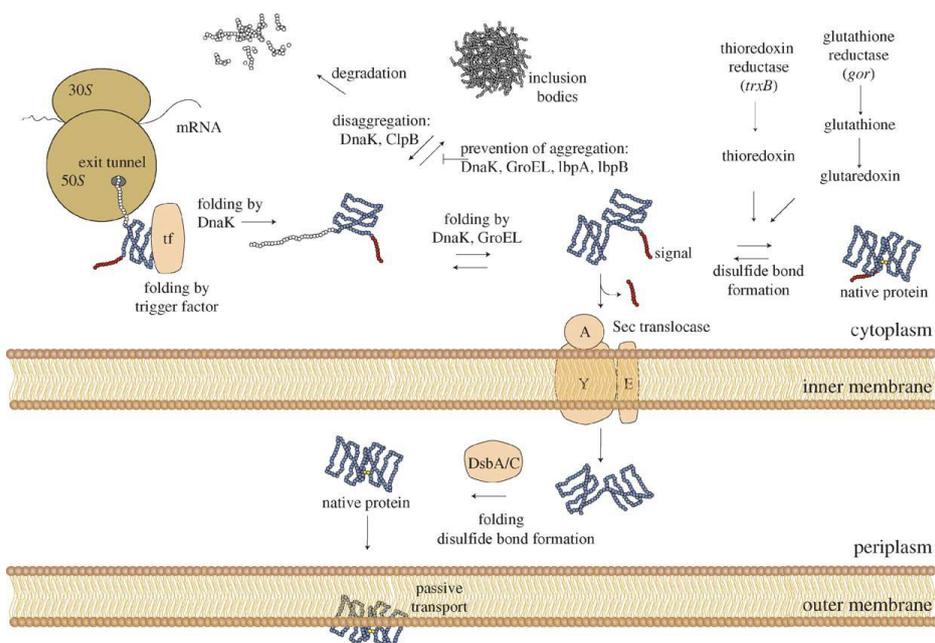
Uma desvantagem da utilização de proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* para fins terapêuticos é acumulação de lipopolisacaridos, LPS, referido geralmente

como endotoxinas que são pirogênicas em humanos e outros mamíferos. [Terpe, 2006] Além disso, existe o problema de não produzir proteínas com muitas pontes dissulfureto e o *refolding* dessas proteínas é extremamente difícil. [Demain e Vaishnav, 2009]

Outra desvantagem da sobreexpressão é que a maioria das proteínas recombinantes aplicadas na terapia e diagnóstico formam corpos de inclusão no citoplasma da *E. coli*. [Terpe, 2006; Gholipour, et al, 2010] A formação de corpos de inclusão em sistemas de expressão de proteínas recombinantes é o resultado de um equilíbrio instável entre a agregação de proteínas *in vivo* e a solubilização. [Sørensen e Mortensen, 2005] As proteínas que são produzidas sobre a forma de corpos de inclusão são frequentemente inactivas, insolúveis e requerem *refolding*. [Demain e Vaishnav, 2009] Os corpos de inclusão formados durante a expressão citoplasmática de proteínas recombinantes são agregados de proteína insolúvel, resultado da resposta ao stress (como o choque térmico, prejudicam o *fold*ing e as proteínas tendem a associar-se em grânulos proteicos amorfos chamados corpos de inclusão) quando a proteína recombinante é expressa em taxas elevadas, que exigem isolamento, solubilização e adequada renaturação. [Gholipour, et al, 2010; Sørensen e Mortensen, 2005] Pouco é conhecido acerca da estrutura dos corpos de inclusão e o seu mecanismo de formação.

Normalmente as proteínas recombinantes insolúveis contribuem entre 50 a 95% dos corpos de inclusão da matéria proteionica. Os corpos de inclusão são facilmente preparados e a sua degradação está limitada pelas proteases. As proteases estão directamente envolvidas na degradação *in situ* do desdobramento dos corpos de inclusão associados a polipeptídeos por interacção com as zonas hidrofóbicas expostas. Os agregados podem ser solubilizados usando detergentes como a ureia e guanidina hidroclicídica. [Sørensen e Mortensen, 2005]

A actividade da proteína exige flexibilidade na estrutura tridimensional (3D). A figura 1 mostra o *fold*ing de proteínas e secreção em *E. coli*.



**Figura 1.** Folding de proteínas e secreção em *E. coli*. Vias importantes para a secreção da expressão recombinante e formação de pontes dissulfureto.

Com vista a ultrapassar estas limitações, existem várias estratégias para melhorar a produção em *E. coli*, mostradas na tabela 2.

**Tabela 2.** Estratégias para melhorar a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* [adaptado de Demain e Vaishnav, 2009; Handbook 18-1142-75. Edition AA]

---

## Estratégias para melhorar a produção em *E. coli*

---

Usar diferentes promotores para regular a expressão

---

Diminuição da temperatura de crescimento para melhorar a solubilidade

---

Secreção de proteínas no espaço periplasmático ou no meio de cultura

---

Reduzir a taxa de síntese proteica

---

---

Mudar o meio de cultura

---

Adicionar um tag de fusão

---

Expressar um fragmento da proteína

---

Desnaturar *in vitro* e *refolding* da proteína

---

Usar diferentes estirpes

---

Co-expressão de chaperones e/ou foldases

---

Diminuir a concentração de IPTG para alterar o nível de indução

---

Alterar o tempo de indução: Induzir por curto período de tempo

---

Induzir a uma alta densidade celular para diminuir o período de tempo

---

Aumentar a oxigenação: O elevado transporte de oxigénio pode ajudar a prevenir a formação de corpos de inclusão

---

Teoricamente, a modificação das condições de cultura, isto é, a diminuição da temperatura ou alterações na composição do meio podem ser suficientes para atenuar alguns dos problemas de expressão. [Terpe, 2006]

Existem inúmeros estudos de casos mostrando o aumento da solubilidade de proteínas recombinantes a baixas temperaturas de cultivo. Nem sempre esse efeito é observado num conjunto de proteínas entre a gama de temperaturas 20 a 37 ° C. É razoável esperar que as proteínas maiores são mais propensas a ter mecanismos complexos dobráveis, que as tornam mais vulneráveis à agregação associada com a

transcrição de altas taxas de crescimento em temperaturas mais elevadas. Por outro lado, o comprometimento da solubilidade de proteínas menores pode ser um efeito de factores menos dependente da temperatura, tais como falta de co-factores, modificações pós-translacionais, ou partners de *folding*. [HAMMARSTRÖM et al, 2001]

A redução da concentração do indutor também pode ser uma solução, mas na maioria dos casos sem sucesso. [Terpe, 2006]

As chaperones servem para proteger a proteína recombinante produzida na *E. coli*. Se a proteína estiver sozinha ela é facilmente atacada e destruída. Ao passo que acompanhada com chaperone, uma proteína que oferece protecção à proteína de interesse, evitando dessa forma a sua inutilização. [Sørensen e Mortensen, 2005]

### 1.3 Sistemas de fusão

A produção de proteínas requer o sucesso de três etapas individuais: expressão, solubilidade e purificação. A produção de proteínas solúveis para purificação continua a ser o maior problema nesta área. A razão pela qual é difícil expressar proteínas solúveis é desconhecida, mas dois dos possíveis factores que podem explicar são a taxa de tradução e a taxa de *folding* proteico.

Os principais desafios a serem ultrapassados na produção de proteínas recombinantes em *E. coli* são a degradação por proteólise das proteínas alvo, melhorar o *folding* das proteínas, a baixa solubilidade, e a necessidade de melhorar as metodologias da purificação. A tecnologia dos tags de fusão tem sido capaz de melhorar a expressão heteróloga contornando muitos destes problemas. [Esposito e Chatterjee, 2006] As proteínas de fusão normalmente incluem um partner ou tag, que podem ser diferentes proteínas, domínios, ou péptidos associados à proteína alvo [Sørensen e Mortensen, 2005; Terpe, 2003] e, no melhor caso, auxiliam o *folding* proteico correcto levando à

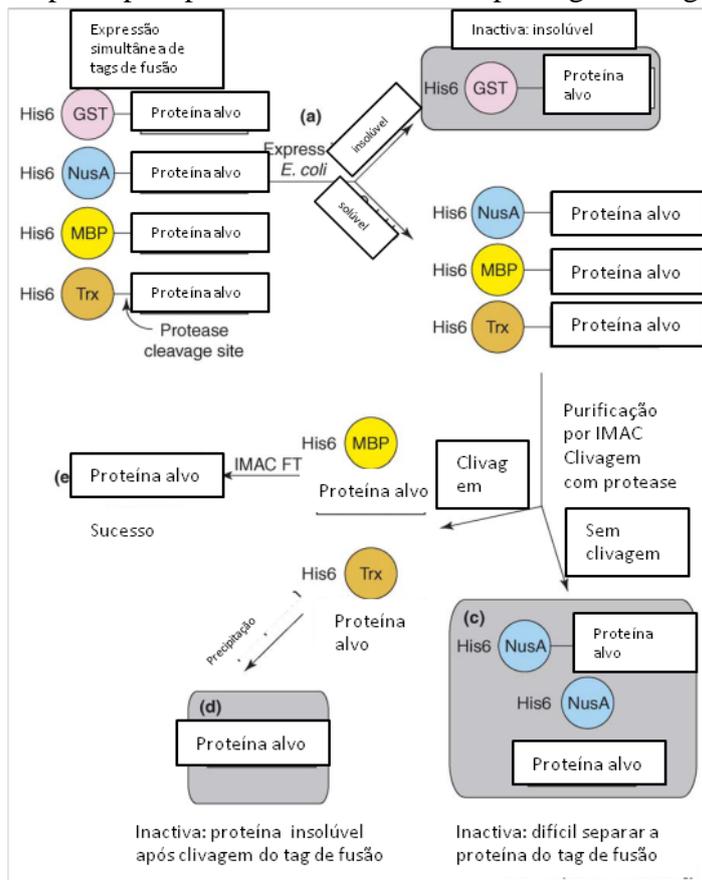
melhoria da solubilidade da proteína alvo. [Esposito e Chatterjee, 2006; Sørensen e Mortensen, 2005]

As funções do tag de fusão são:

- ✓ Melhorar o rendimento das proteínas recombinantes - A vantagem do N-terminal no tag é melhorar o rendimento da proteína recombinante ao promover o início eficiente da tradução. Diversos N-terminais no tag podem aumentar o rendimento, requerendo apenas que os ribossomos iniciem eficientemente a tradução no resíduo metionina no N-terminal do tag. [Waugh, 2005]
- ✓ Melhorar a solubilidade das proteínas recombinantes - O método mais comum para melhorar a solubilidade das proteínas recombinantes em *E. coli* é reduzir a temperatura até que a proteína alvo seja produzida. [Terpe, 2003; Waugh, 2005]
- ✓ Facilitar a purificação das proteínas recombinantes [Waugh, 2005]

No entanto, os tags de afinidade têm o potencial para interferir com a sua estrutura e função, e devem ser removidos. [Waugh, 2005] O efeito na estrutura terciária e actividade biológica das proteínas de fusão com pequenos tags depende da localização e da composição dos aminoácidos nos tags. [Terpe, 2003] Um dos problemas em utilizar os tags é a sua remoção. [Esposito e Chatterjee, 2006] A clivagem de proteínas de fusão para gerar proteínas livres é a maior desvantagem para a tecnologia da proteína de fusão. Tem sido desenvolvido uma variedade de metodologias químicas e enzimáticas para clivar as fusões. Estes métodos incluem o uso de locais estratégicos para clivagem, que são reconhecidos por proteases e estão posicionados entre o tag de fusão e a proteína alvo. As proteases têm sido utilizadas para clivar tag de fusão. [Butt, et al, 2005] A figura 2 representa esquematicamente a via de expressão da proteína para a purificação usando tags de solubilidade.

As principais proteínas de fusão são: poliarginina-tag Arg-tag; tag de polihistidina His-



tag; Flag-tag; strep-tag; c-myc-tag; S-tag; peptideo ligado à calmodulina; domínio de ligação à celulose; SBP-tag; domínio ligação à quitina; GST, MBP; NusA, TrxA e DsbA. [Terpe, 2003] Os tags de afinidade normalmente são o polihistidina tag, que é compatível com a cromatografia de afinidade ao metal imobilizado, IMAC e o tag GST utilizado na purificação à base de resinas glutationa. [Sørensen e Mortensen, 2005]

**Figura 2.** Representação esquemática da via de expressão da proteína para a purificação usando tags de solubilidade. [Esposito e Chatterjee, 2006]

No geral, é difícil seleccionar o melhor sistema de fusão para uma proteína alvo específica. Isto depende da própria proteína, isto é, da sua estabilidade, hidrofobicidade, do sistema de expressão, e da aplicação da proteína purificada. Em muitos casos, é utilizado um segundo tag de afinidade para melhorar a purificação após uma segunda etapa de cromatografia de afinidade. [Terpe, 2003] Em muitos casos, estes tags têm uma dupla função que é facilitar a solubilidade e aumentar a eficiência na purificação. Noutros casos, esta solubilidade está combinada com um simples tag hexahistidina, permitindo à proteína de fusão manter a solubilidade e também a afinidade pelo tag. Por último, os tags usados na afinidade que são combinados com os tags de solubilidade

permitem melhorar a solubilidade e têm sucesso para produzir proteínas purificadas. [Esposito e Chatterjee, 2006]

## 1.4 Sistema H e Pal

### 1.4.1 O novo sistema de fusão H

Um novo sistema de fusão comercializado pela Hitag foi descoberto recentemente e inclui dois tags: Fh8, caracterizado por melhorar o rendimento da produção da proteína em *E. coli*, e um tag H. O tag H é uma sequência de 11 aminoácidos, proveniente do N-terminal do antígeno recombinante Fh8 da *Fasciola hepatica*. A adição do tag H na sequência das proteínas aumenta o rendimento da produção de proteína. Além disso, o tag H desencadeia a imunogenicidade na proteína alvo, aumentando a resposta imune e, conseqüentemente, o desenvolvimento de anticorpos contra a proteína alvo. Esta solução tecnológica permite superar um problema muito frequente na investigação, que é obter um anticorpo reactivo contra um antígeno difícil de expressar e não-imunogénico.

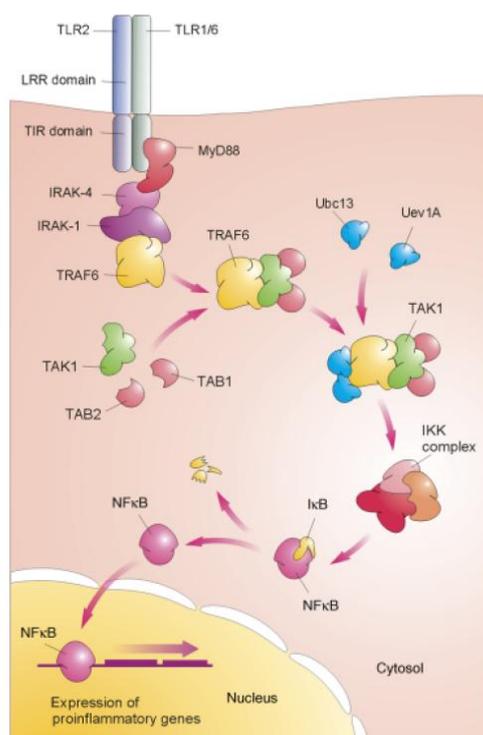
A produção de biomoléculas, como as proteínas recombinantes, anticorpos e vectores de expressão, tem uma aplicação directa em biologia molecular e na biotecnologia, o desenvolvimento de uma alta variedade de kits de diagnóstico e kits de pesquisa, num ponto de vista industrial.

Este sistema foi aplicado para a produção da Pal. Neste trabalho, clonou-se o gene que codifica para o tag H (cujo peso molecular é 1,2 KDa, que se encontra no Anexo I) juntamente com o gene que codifica para a Pal no vector pQE30.

## 1.4.2 Lipoproteínas

As lipoproteínas bacterianas pertencem aos chamados padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs modulando a resposta imune do hospedeiro. Estes são reconhecidos por receptores *Toll-like*, TLRs, localizados principalmente na superfície das células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, macrófagos e células

Gram-negative Pal protein



dendríticas. Isso leva à ativação de uma cascata de transdução de sinal (Figura 3), o que resulta na transcrição de gene das citocinas pró-inflamatórias. As lipoproteínas são reconhecidas por classes de receptores TLR2 de maneira dependente TLR6 ou TLR1, que participam na indução de imunidade às moléculas *diacylated* ou *triacylated*, respectivamente. Para certas lipoproteínas, as cascatas de sinalização são estimuladas independentemente do TLR1 e TLR6. [Godlewska, et al, 2009]

**Figura 3.** Sinalização em cascata em células apresentadoras de antígenos induzida por estimulação de receptores TLR2.

## 1.4.3 Lipoproteína associada ao peptidoglicano

### 1.4.3.1 Estrutura da Pal e o complexo Tol-Pal

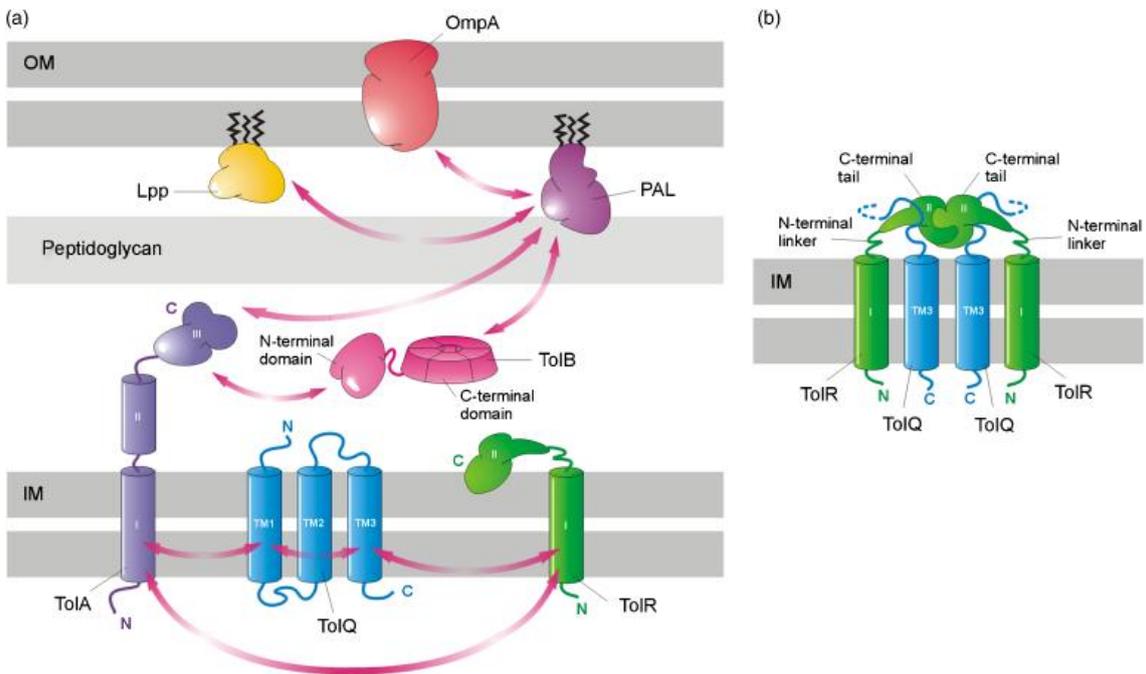
A membrana celular das bactérias Gram-negativas está dividida em 3 partes: uma membrana proteína lipídica interior (IM, voltada para o citoplasma), uma membrana externa (OM), composta principalmente de lipopolissacarídeos e proteínas, e

uma camada rígida de peptidoglicano (cadeias de polímeros de ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina ligados por pequenos péptidos), localizada no espaço periplasmático. O peptidoglicano tem a capacidade de interagir com muitas proteínas da membrana celular, condicionando a sua estabilidade. Uma delas é a lipoproteína associada ao peptidoglicano, Pal que constitui parte do complexo das proteínas Tol-Pal. Na maioria das bactérias Gram-negativas, o complexo Tol-Pal é composto por cinco proteínas essenciais: TolQ, TolR, TolA, TolB e Pal. O complexo Tol-Pal forma um complexo membranar multiproteico que mede e exhibe semelhanças estruturais e funcionais para as proteínas MotAB (flagelar motor) e sistema de Tonb (Tonb, ExbB e EXBD). Os complexos Tonb e Tol-Pal participam da penetração de partículas fago na célula e na translocação de colicinas através da parede celular.

O primeiro aminoácido da proteína Pal é um resíduo de cisteína que é modificado com lípidios. O final da lipoproteína é o N-terminal hidrofóbico e é responsável pela fixação da proteína na membrana. O segundo aminoácido da proteína é a serina que determina a localização da Pal na OM. A translocação adequada da Pal através da membrana citoplasmática e sua localização correcta são dependentes do sistema proteína Tol. A região N-terminal da Pal é a que provavelmente forma uma cauda flexível, que liga a proteína para o folheto interno da OM via lípidios *moieties* ligados à cisteína. A região C-terminal da Pal interage com a parede celular do peptidoglicano. Assim, a Pal forma uma ligação cruzada entre a OM e peptidoglicano.

A TolB, que está localizada no periplasma, contém uma região N-terminal composta por *five-stranded mixed  $\beta$ -sheet* estrutura composta por dois grandes sanduíches  $\alpha$ -hélices e uma região C-terminal com seis lâminas de domínio  $\beta$ -hélice. Este domínio compete com o peptidoglicano para se ligar à Pal. A TolB é considerada uma proteína adaptadora que coordena a associação de OM/Pal com o peptidoglicano e a IM.

As proteínas Tol-Pal formam dois complexos (Figura 4). O primeiro é um complexo de TolQ, TolR e TolA com uma estequiometria 4-6:2:1, ancorado na membrana citoplasmática. A TolAI interage com o primeiro domínio transmembranar TolQ e com o domínio transmembranar TolRI. O segundo complexo é composto pelo TolB e Pal ligados à OM. A Pal está ancorada na OM e interage com o domínio C-terminal da TolB periplasmática, que possui uma estrutura  $\beta$ -hélice. Além disso, a Pal interage com a TolA e proteínas de outras células, tais como as proteínas do envelope OmpA e Lpp. Todas essas interações são independentes umas das outras.



**Figura 4.** (a) Localização e interações das proteínas Tol-Pal na membrana celular das bactérias Gram-negativas. As várias interações são indicadas por setas. (b) modelo hipotético da interação TolR e TolQ com a membrana. Apenas foi mostrado um domínio transmembranar TolQ (TM3) para esclarecer o esquema.

Através da identificação de mutantes supressores caracterizou-se as regiões responsáveis pela interação entre TolB e Pal. A região entre os resíduos de aminoácidos 94-121 da Pal é responsável por suas interações com peptidoglicano e TolB, mas a Pal não se pode ligar a ambas as moléculas, simultaneamente. [Godlewska, et al, 2009]

### 1.4.3.2 Doença do Legionário

A *Legionella pneumophila*, LP (Figura 5) o agente etiológico da *Doença do Legionário*, LD, é uma importante causa de infecção de pneumonia adquirida tanto na comunidade como na forma nosocomial. As LP fazem parte da comunidade microbiana



dos ecossistemas aquáticos, o que explica que a LD ocorra em todo o mundo. [Kim, et al, 2003; Gholipour, et al, 2010] A LD ainda ocorre, tanto nas formas esporádicas e epidémicas, envolvendo às vezes centenas de mortos e pode causar elevada morbidade e mortalidade se tratada inadequadamente. [Gholipour, et al, 2010]

**Figura 5.** *Legionella Pneumophila* [URL: <http://s99.middlebury.edu/BI330A/projects/cocchiaro/>]

No entanto, o diagnóstico de LP pode ser difícil porque as manifestações clínicas e os dados radiológicos são inespecíficos. Os testes laboratoriais convencionais, incluindo o cultivo do organismo, coloração da bactéria por imunofluorescência directa, e detecção de anticorpos do soro têm sensibilidades sub-óptimas, com resultados que não estão rapidamente disponíveis. Além disso, a LD pode ser grave e é potencialmente fatal em idosos e pacientes imunodeprimidos, e portanto, é necessário diagnóstico rápido, que possibilite o tratamento precoce com antibióticos e assegurar a prevenção primária da pneumonia. [Kim, et al, 2003; Gholipour, et al, 2010]

A detecção de antígenos solúveis na urina de pacientes com LP foi descrita pela primeira vez em 1979. Nos anos seguintes, foram estudados métodos para detecção de antígenos de LP na urina utilizando as técnicas de ensaio imunoenzimático (EIA) e radioimunoensaio (RIA). A especificidade para estes testes foi relatada ser 100%, e a sensibilidade foi mostrada variar entre 70 e 100%. As vantagens destes métodos incluem a facilidade da recolha de urina, a capacidade de detectar o antígeno após o início da terapia antibiótica, e a capacidade de obter resultados rapidamente. Dois kits

comerciais EIA, Binax EIA (Binax, Portland, Maine) e Biotest EIA (Biotest AG, Dreieich, Alemanha), têm sido amplamente utilizados desde que foi comercializado em 1996 e 1997, respectivamente, e foi introduzido recentemente um novo EIA Bartels. Estes EIAs são sensíveis e específicos, em muitos estudos clínicos. Os testes comerciais de EIA são ensaios sanduíche directa que utilizam anticorpos policlonais de coelho específicos para LP sorogrupo 1 ou reactiva a extractos solúveis de sorogrupos LP e outras espécies como a ligação e detecção de anticorpos. [Kim, et al, 2003; Gholipour, et al, 2010]

A parede celular de LP (bactéria Gram negativa rodeada de LPS) tem vários antígenos, incluindo a proteína Pal de 19 kDa. [Kim, et al, 2003; Gholipour, et al, 2010] A Pal utilizada neste trabalho é uma proteína imunodominante de antígenos da LP e está altamente conservada entre os antígenos das espécies da mesma. Isso apoia a ideia de que poderia ser usado como um potencial antígeno para o diagnóstico urinário da DL e também como foco de projectos para vacinas contra infecções por LP em seres humanos, pois são potentes células B mitógenos, imunoadjuvantes e podem ser indutores de células T. [Gholipour, et al, 2010]

Embora a LP sorogrupo 1 seja a causa predominante da DL na maioria das áreas geográficas, outros sorogrupos e espécies da LP estão sendo reconhecidas com crescente frequência. [Kim, et al, 2003; Gholipour, et al, 2010]

A Pal da LP, como um componente de antígenos da LP, foi detectada de forma eficiente pelos anticorpos da Pal sendo considerado um diagnóstico útil ao antígeno causador da infecção LP. [Gholipour, et al, 2010]

## 1.5 Expressão da Pal recombinante

A Pal foi anteriormente produzida na forma recombinante em *E.coli*, no espaço periplasmático. O estudo procedeu à avaliação da expressão fazendo variar a

concentração de indutor (IPTG), a densidade óptica da cultura e o tempo de indução. A expressão da proteína Pal foi induzida pela adição de várias concentrações (0,1 - 1 mM) de isopropil- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG, numa densidade óptica a 600nm de (0,4-1). Para determinar o curso do tempo da expressão da proteína Pal, foram retiradas alíquotas das diferentes culturas apenas antes da indução de IPTG e em diferentes tempos após a indução (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 15 horas), a 37°C, e a proteína submetida a análise. Os resultados obtidos destas condições de optimização mostraram uma elevada expressão da proteína Pal, quando induzida em *E. coli BL 21* no vector pET26b-pal, por adição de 1mM IPTG e usando 15 horas de indução. [Gholipour, et al, 2010]

A produção da Pal com o tag de fusão GST permitiu expressar a proteína GST-Pal de um modo eficiente com uma indução de 0,3 mM IPTG, em *E. coli BL21*. [YOON, et al, 2002]

## 2 Materiais e métodos

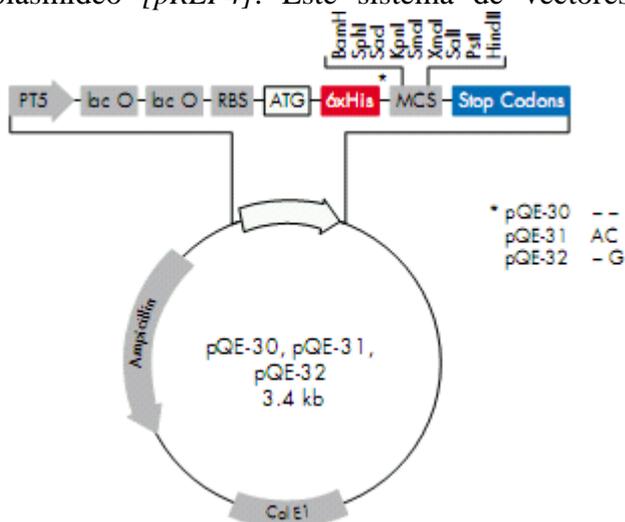
### 2.1 Esterilização do material, soluções e meios de cultura

Os materiais, soluções e meios de cultura resistentes à temperatura foram esterilizados por autoclavagem durante 20 minutos, a 121°C e 1 atmosfera. As soluções e meios de culturas termolábeis foram esterilizados por filtração com filtros estéreis de 0,2 µm.

### 2.2 Vectores e estirpes usados

Microrganismos como a enterobactéria *Escherichia coli* são excelentes produtores de proteínas recombinantes. Um sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* normalmente envolve uma combinação de um plasmídeo e de uma estirpe de *E. coli*. [Sørensen e Mortensen, 2005]

Para a expressão da HPal recombinante usou-se o sistema de vectores pQE com a estirpe *E. coli* M15 baseado no plasmídeo [pREP4]. Este sistema de vectores bacterianos possibilita a expressão rápida e controlada de grandes quantidades de proteínas recombinantes. De entre os vários vectores do sistema, escolheu-se o vector pQE30, ilustrado na Figura 6.



**Figura 6.** Representação do mapa circular dos sistemas de vectores pQE: pQE30, pQE31 e pQE32 [QIAGEN, 2003].

A estirpe *E. coli* M15 permite altos níveis de expressão e contém várias cópias do plasmídeo pREP4. Este plasmídeo possui o gene lacI que codifica o repressor lac e, no interior das células, a produção de elevados níveis do repressor lac regula a expressão proteica. A expressão através dos vectores pQE é rapidamente induzida pela adição de IPTG, o qual se liga ao repressor lac, inactivando-o, libertando o promotor.

O sistema de vectores pQE oferece uma elevada expressão de proteínas de fusão com uma cauda de 6 histidinas no seu N-terminal e contém ainda as seguintes características: Um promotor/operador optimizado, constituído pelo promotor do fago T5 e duas sequências do operador lac; Um local sintético de ligação ribossomal, RBSII; Uma sequência de afinidade com 6 histidinas, tanto a 5' ou 3' da região de clonagem; Um MCS e codões STOP em todas as *reading frames*; Dois terminadores de transcrição: t0 do fago lambda e T1 do operão rrnB de *E. coli*; Região codificante para a  $\beta$ -lactamase e região de replicação ColE1. [Qiagen, 2003]

## 2.3 Expressão da HPal recombinante

A expressão da HPal recombinante foi optimizada através do estudo das condições óptimas de produção da HPal recombinante solúvel. Após se ter encontrado as condições óptimas, produziu-se posteriormente a HPal recombinante nessas mesmas condições.

### 2.3.1 Estudo das condições óptimas de produção da HPal recombinante solúvel

Estudou-se a temperatura de indução, a concentração do indutor, bem como o tempo de indução. A tabela 3 mostra o estudo das condições óptimas de expressão da HPal.

**Tabela 3.** Esquema do estudo das condições óptimas de expressão da HPal

	Temperatura da indução (°C)	Concentração de indutor (mM)	Tempo de indução (Horas)
HPal	20	0,1	5
			Toda a noite
		0,55	5
			Toda a noite
		1,0	5
			Toda a noite
	25°C	0,1	5
			Toda a noite
		0,55	5
			Toda a noite
		1,0	5
			Toda a noite
	30°C	0,1	5
			Toda a noite
		0,55	5
			Toda a noite
		1,0	5
			Toda a noite
	37°C	0,1	5
			Toda a noite
		0,55	5
			Toda a noite
		1,0	5
			Toda a noite
1,0		0	
		1	
		2	
		3	
	4		
5			

### 2.3.1.1 Culturas para o estudo das condições óptimas da produção da HPal recombinante solúvel

A partir de uma placa de LB-agar nova com ampicilina e kanamicina, da estirpe *E. coli* M15/pQE30 + HPal, inoculou-se 10 mL de meio LB/amp/kan num *falcon* de 50 mL (procedeu-se desta forma para todas as restantes experiências).

Deixou-se crescer a pré-cultura celular de 10 mL a 37 °C, 150 rpm, durante a noite e, no dia seguinte, inoculou-se 50 mL de meio LB/amp/kan com 1/50 dessa pré-cultura.

**Ampicilina** - A concentração stock foi de 100 mg/mL e nos meios de cultura utilizou-se 100 µg/mL. Dissolver em H<sub>2</sub>O destilada.

**Kanamicina** – A concentração stock usada foi de 50 mg/mL e nos meios de cultura utilizou-se 50 µg/mL. Dissolver em H<sub>2</sub>O destilada.

Esta cultura foi deixada a crescer a 37 °C e 220 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,5.

Realizou-se o estudo da solubilidade da HPal recombinante, como descrito anteriormente. Por exemplo, para 20°C fez-se variar a concentração do IPTG, e o tempo de indução. Procedeu-se de igual forma para 25, 30 e 37°C.

Após os tempos de indução, as culturas foram recolhidas por centrifugação durante 15 minutos a 4000 g e 4 °C, e os *pellets* celulares resultantes foram guardados a -20 °C para serem utilizados posteriormente.

### **LB/amp/Kan**

Meio LB: NaCl 5g; extracto levedura 2,5 g; triptona 5g; NaOH 87,5 µl num volume de 500mL.

### **LB-agar/ampicilina/kanamicina**

Meio LB + agar para as placas. 1 g de agar por cada 50 mL de meio LB.

Com o intuito de avaliar a expressão da HPal recombinante solúvel, os *pellets* celulares foram ressuspensos em 1/5 do volume inicial da cultura com tampão de nativo

QIAGEN, pH a 7,4 e lisados por sonicação (Branson sonifier - 5 ciclos, na posição 2, *Duty cycle 50 % e Output control 5*).

### **Tampão nativo Qiagen:**

- 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;
- 0,3 M NaCl.

Ajustar o pH a 7,4. [Steinert, et al, 1997]

A fracção solúvel resultante da lise celular foi separada da respectiva fracção insolúvel por centrifugação durante 30 minutos a 10000 g e 4 °C, tendo-se ressuspendido o *pellet* obtido (fracção insolúvel) em 1/10 do volume inicial (10 mL, portanto 1 mL), com o mesmo tampão de lise usado anteriormente.

As fracções solúveis e insolúveis de todas as culturas estudadas foram posteriormente analisadas por electroforese - SDS-PAGE.

### **2.3.2 Expressão da HPal recombinante solúvel**

Após se ter determinado as condições que maximizam a produção da HPal recombinante, a sua expressão passou por: uma cultura de 50 mL, para analisar a sua produção em *E. coli* perante as condições determinadas nas condições óptimas, bem como o comportamento sem indução e ao longo de 1, 2, 3, 4 horas de indução.

No final desta etapa procedeu-se a um pequeno aumento de escala das fermentações (500 mL), para verificar a capacidade de produção em *E. coli*. E, por fim, duas cultura de 1 L, para produzir maior quantidade de proteína recombinante.

### 2.3.2.1 Cultura de 50 mL

Preparou-se uma pré-cultura, inoculando 5 mL de LB/amp/kan a partir de uma placa fresca com a estirpe *E. coli* M15/pQE30 HPal e deixou-se crescer durante a noite a 37 °C, 150 rpm.

No dia seguinte, inoculou-se 50 mL de LB/amp/kan com 1/50 da cultura anterior e incubou-se a 37 °C, 220 rpm, até atingir uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0.5 (cerca de 3 horas e 30 minutos de incubação). Adicionou-se IPTG para uma concentração final de 1 mM e incubou-se durante 4 horas a 37 °C e 150 rpm. Findo o tempo de indução, as células foram recolhidas por centrifugação durante 15 minutos, a 10000 g e 4 °C. Os *pellets* celulares foram guardados a -20 °C ou directamente colocados em gelo, sendo que no primeiro caso, após congelação dos *pellets*, procedeu-se à sua descongelação, contribuindo assim para a lise celular. Os *pellets* celulares foram depois ressuspensos em tampão nativo QIAGEN e lisados pelo método mecânico da sonicação (*Branson sonifier* - 5 ciclos, na posição 2, *Duty cycle* 50 % e *Output control* 5), sempre em gelo. Centrifugou-se a 10000g, 4 °C durante 30 minutos, tendo-se separado a fracção solúvel resultante (sobrenadante) da fracção insolúvel (*pellet*).

Todas as fracções obtidas foram analisadas em géis SDS-PAGE.

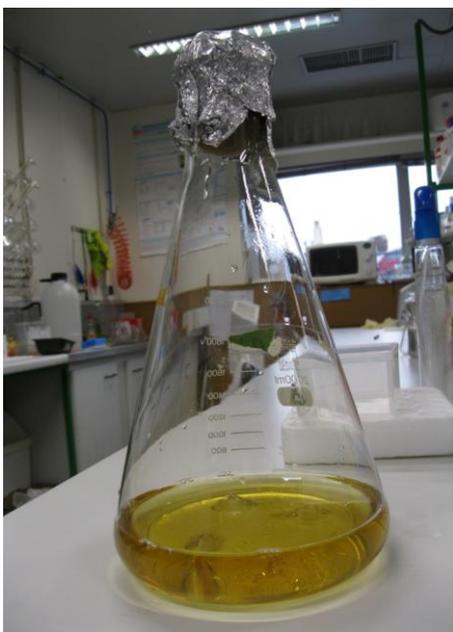
### 2.3.2.2 Cultura de 500 mL

A cultura de 500 mL foi obtida a partir de 2 fermentações, uma de 100 mL e outra de 400 mL.

O volume da pré-cultura passou a ser de 10 mL (2mL e 8 mL, respectivamente, fazendo uma diluição da pré-cultura de 1/50 no meio de cultura) e após o tempo de indução, os *pellets* celulares recolhidos por centrifugação foram ressuspensos em tampão nativo QIAGEN num total de 1/10 do volume inicial, aumentando desta forma o factor de concentração de 5 para 10.

Todas as fracções obtidas foram também analisadas em géis SDS-PAGE, tendo-se armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  as fracções solúveis para posterior análise.

### 2.3.2.3 Cultura de 1 L



A cultura de 1 L resultou de 3 fermentações: duas de 400 mL e uma de 200 mL (Figura 7), tendo-se procedido como na secção anterior.

O volume de pré-cultura passou a ser de 20 mL. Da mesma forma que nas secções anteriores, todas as fracções obtidas foram também analisadas em géis SDS-PAGE e as fracções solúveis foram armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

**Figura 7.** Matraz de capacidade 1 L com 200 mL de cultura LB.

## 2.4 Purificação da HPal recombinante

A coluna de cromatografia é um dos métodos mais comuns de purificação de proteínas. Esta técnica consiste na passagem da proteína através de uma coluna que é desenhada para reter ou diminuir a velocidade da passagem da fase móvel onde estão as proteínas. A solução a analisar deve conter a proteína concentrada e o método deve ser rápido para evitar a degradação da mesma.

### 2.4.1 Separação por afinidade da coluna de níquel

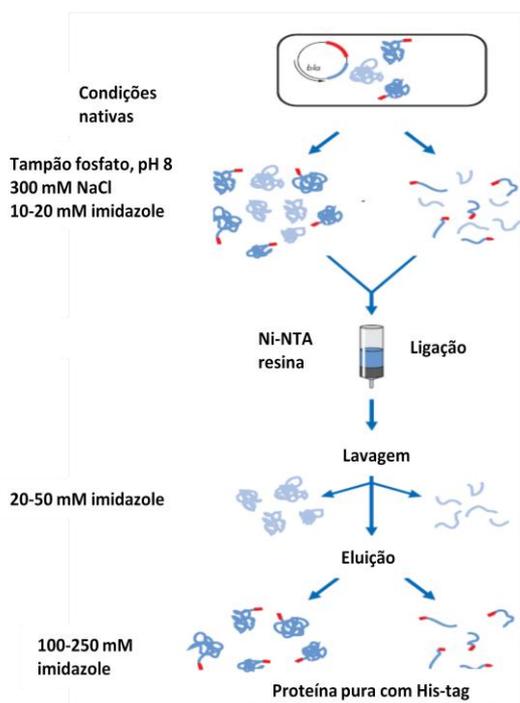
A cromatografia de afinidade é uma técnica de purificação, que geralmente oferece uma pureza superior a 95% numa única etapa. [GEHealthcare (2011)] Para a purificação em condições nativas, o tampão de ligação ou equilíbrio, lavagem, e eluição foram preparados pela adição de concentrações variáveis de imidazole para um tampão contendo 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 300 mM NaCl. A ligação ocorre com a adição de imidazole ao tampão contendo as proteínas com His-tag lisadas, que se ligam à resina a 4°C com agitação suave. [Steinert, et al, 1997] A escolha do tampão de ligação também depende das propriedades do íon metálico e das propriedades de ligação das moléculas da amostra. Recomenda-se um pH de ligação neutro a ligeiramente alcalino (pH 7-8). O tampão fosfato de sódio é frequentemente usado. [GE Healthcare, 71-5027-69 Edition AA]

A HPal recombinante foi purificada recorrendo a uma coluna His-Trap de capacidade 5 ml. A coluna HisTrap HP é uma coluna pré-empacotada usando íões Níquel, Ni<sup>2+</sup> (Sephacrose de elevado desempenho), pronta para uso na purificação de proteínas recombinantes com His-tag por cromatografia de afinidade com metal imobilizado, IMAC. O desenho especial da coluna, juntamente com o elevado desempenho da matriz, fornece acesso rápido, simples e separação fácil num formato conveniente. A coluna His-Trap HP foi operada com uma bomba peristáltica, contribuindo a pressão para o aumento do fluxo. [GE Healthcare, 71-5027-69 Edition AA]

A IMAC é uma técnica que se baseia na interação entre o metal de transição, o Ni<sup>2+</sup> imobilizado na matriz e os aminoácidos específicos da cadeia. A técnica envolve a imobilização de íões Ni<sup>2+</sup> numa matriz de suporte sólido cuja superfície foi modificada pela adição de um ligante adequado – a resina. [Hearn e Acosta, 2001] O Ni<sup>2+</sup> é o íon metal de eleição para a purificação de proteínas recombinantes His-tag, pois retêm as proteínas selectivamente formando um complexo com os resíduos de aminoácidos (histidina) exposta na superfície da proteína. A histidina é o aminoácido que exhibe a

interacção mais forte com o metal imobilizado na matriz. [Terpe, 2003; GE Healthcare, 71-5027-69 Edition AA]

O tag de fusão polihistidina é um método largamente utilizado em IMAC para purificar proteínas recombinantes. [Terpe, 2003] Os peptídeos contendo sequências de resíduos consecutivos de histidina são eficientemente retidos na coluna IMAC. As lavagens seguintes ao material da matriz, contendo sequências peptídicas com polihistidina podem ser facilmente eluídas pela adição de imidazole. [Terpe, 2003] A figura 8 mostra o processo de purificação de proteínas His-tag usando o sistema QIAexpress.



**Figura 8.** Purificação de proteínas His-tag usando o sistema QIAexpress.

Lise celular

O His-tag aumenta a afinidade ao  $\text{Ni}^{2+}$  e faz com que geralmente as proteínas com His-tag se liguem mais fortemente em relação às outras proteínas, num extracto de *E. coli*. Deste modo, a ligação das proteínas sem o His-tag das células do hospedeiro é menor com imidazole, mas uma concentração muito alta de imidazole também impede a ligação das

proteínas com His-tag. A concentração de imidazole que dá resultados ideais na purificação, em termos de pureza e de rendimento depende da proteína. Contudo, existe um equilíbrio entre a concentração necessária para evitar a ligação não específica de contaminantes e a concentração de imidazole necessária para eluir a proteína com His-tag. [GE Healthcare, 71-5027-69 Edition AA]

Todas as purificações realizadas no trabalho resultaram de um volume de fermentação de 500 mL de meio LB. Este foi depois concentrado num volume de

extracto celular de 50 mL e é centrifugado antes de passar na coluna de purificação a 10000 g, 4°C, durante 10 minutos para separar o *pellet* do sobrenadante. Este último contém a proteína ressuspensa em tampão fosfato de sódio, enquanto o *pellet* retém possíveis contaminantes.

Durante a purificação fez-se variar a concentração de imidazole no tampão de ligação. Fez-se também variar a concentração de imidazole no tampão de lavagem da coluna, e conseqüentemente, no tampão de eluição.

Todas as soluções foram filtradas antes de passar para a coluna. Esta coluna não continha bolhas de ar e foi lavada, passando 20-30 ml de água filtrada. A coluna foi carregada com 10 ml de níquel até a mesma ficar completamente verde/azul. De seguida, foi novamente lavada com 25-30 ml de água filtrada. Após a lavagem da coluna com água destilada filtrada, a coluna foi equilibrada com 50 ml do tampão de ligação. Antes de passar o extracto de *E. coli* na coluna, adicionou-se imidazole ao mesmo para ficar com a mesma concentração de imidazole usada no tampão de ligação. O pH desse tampão foi acertado a 7,4. A solução tampão que continha as proteínas foi carregada na coluna e foi recolhido o flow fraction, ou seja, as proteínas que não aderem à coluna. A coluna foi lavada com 100 ml do tampão de lavagem. Foram recolhidos os 10 ml iniciais e os 2 ml finais. A proteína é eluída com diferentes concentrações de imidazole. Foram recolhidos os primeiros 2ml, continuando a recolher várias fracções de eluição de 5 ml, e verificando simultaneamente se estava a sair proteína com teste de Bradford numa placa de poços. No final, a coluna foi lavada com solução de limpeza apropriada como EDTA que remove todo o níquel. Esta fracção também deverá ser tida em conta na análise dos géis em SDS-PAGE. A coluna foi novamente lavada com 100 ml de água filtrada e armazenada com etanol a 20%. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15-4%. [Steinert, et al, 1997]

## 2.4.2 Diálise

A diálise é um processo de separação membranar que tem como objectivo a separação segundo o gradiente de concentrações. É utilizado para remover compostos de médio e baixo peso moleculares (imidazole), uma vez que os poros da membrana são bastante reduzidos, mantendo espécies de maior tamanho (HPal). A diálise pode ser efetivamente usada como um processo de separação com base na rejeição de tamanho. Os solutos deslocam-se da região de concentração mais elevada para a de menor concentração, de modo a atingir o equilíbrio. Os solutos de maior tamanho molecular atravessam mais lentamente a membrana do que os solutos de menor peso molecular. A difusão dos solutos para o exterior da membrana depende do gradiente de concentrações, da permeabilidade da membrana ao soluto e da área de contacto da membrana. No entanto, a permeabilidade de um soluto também depende da forma molecular, grau de hidratação, carga iónica e da polaridade. É recomendado seleccionar um MWCO, peso molecular de corte com metade do tamanho do MW, peso molecular das espécies que devem ser conservadas e o dobro do tamanho do MW das espécies destinadas a atravessar. [Uniscience, 2011]

A membrana de diálise consiste de uma matriz de polímeros reticulados esponjosos. A classificação dos poros referida como MWCO, é uma medida indirecta do desempenho de retenção. O MWCO é determinado como o tamanho de soluto que é retido em pelo menos 90%. [Spectrumlabs (2011); Uniscience (2011)]

A manga de diálise utilizada foi a SPECTRUM: SPECTRA/POR®, MWCO: 3,500. Esta foi cortada e hidratada com água destilada. [Uniscience, 2011] O antígeno recombinante HPal isolado em condições nativas foi dialisado extensivamente contra tampão fosfato (50 mM fosfato de sódio, pH 7,2) preparado com água apirogénica durante 24 horas a 4°C com 3 mudanças de tampão.

## 2.5 Electroforese - SDS-PAGE

Os extractos proteicos obtidos na secção 3.1 e as fracções recolhidas da coluna de cromatografia His-trap na secção 3.2 foram analisados por electroforese-SDS-PAGE. Os géis de SDS-PAGE utilizados neste sistema são descontínuos, sendo constituídos por um gel de empacotamento sobreposto num gel resolvente, com pH distintos. As proteínas são desnaturadas com beta-mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), que destrói as pontes de dissulfureto, e com SDS, que confere carga negativa às proteínas, tornando a sua migração no gel unicamente dependente do seu peso molecular.

O tamanho dos poros do gel é variável, podendo ser ajustado através das concentrações de acrilamida e do reagente reticulador, bis-acrilamida, para melhorar a resolução da proteína que se deseja analisar. A reacção de polimerização é regulada pelos reagentes persulfato de amónio (APS) e N, N, N, N' – Tetrametilenediamina (TEMED).

A tabela 4 apresenta a constituição dos géis com diferentes percentagens (p/v).

**Tabela 4.** Constituição dos géis SDS-PAGE 15% -4%.

Reagentes	Gel resolvente 15%	Gel empacotamento 4%
40% Acrilamida	3,6 mL	480 $\mu$ L
2% Bis-acrilamida	2,0 mL	260 $\mu$ L
0,5M Tris-HCl, pH 6,8	-	1,25 mL
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 mL	-
Agua destilada	1,7 mL	2,9325 mL
TEMED	7 $\mu$ L	5 $\mu$ L
APS 10%	50 $\mu$ L	25 $\mu$ L
SDS 10%	100 $\mu$ L	50 $\mu$ L
Volume final	10 mL	5 mL

Antes de se aplicar as amostras proteicas no gel de SDS-PAGE, procedeu-se ao seu tratamento, adicionando tampão de amostra 5X e fervendo por 5 minutos. Depois, guardaram-se as amostras em gelo ou a -20 °C até serem carregadas no gel. As electroforeses decorreram em tinas verticais, utilizando-se um tampão de corrida, com uma corrente constante de 15-20 mA por cada gel. Finda a corrida, revelou-se os géis de SDS-PAGE pelo método de coloração de *Coomassie Blue*.

### **Tampão de corrida 10x:**

- Tri-base 7,575 g
- Glicina 36 g
- SDS 2,5 g

Solução para um Volume final 250 ml.

Diluir 50 ml desta solução 10X em 450 ml de água destilada para cada corrida de electroforese.

### **2.5.1 Método de coloração de *Coomassie Blue***

Após a corrida de electroforese em condições desnaturantes, os géis ficaram na solução corante de *Coomassie Blue* durante 30 minutos, tendo-se posteriormente descorado os géis com solução descorante até se visualizarem as bandas proteicas.

### **Solução corante de *Coomassie Blue***

- 50 % metanol (25 ml)
- 10 % ácido acético glacial (5ml)
- 0,05 % (p/v) azul brilhante coomossie R (0,025g)
- 40 % água destilada

### **Solução descorante**

- 30 % Metanol
- 10% Ácido acético glacial

- 60 % água destilada

## 2.6 Quantificação proteica

O antigénio recombinante foi filtrado através de um filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . A quantificação proteica foi efectuada de acordo segundo o protocolo fornecido pelo fabricante (BioRad). A curva de calibração foi obtida através da leitura da densidade óptica, a 595 nm, de soluções de concentração conhecida da albumina sérica bovina (BSA) com o reagente *Coomassie Plus Protein Assay*.

## 2.7 Imunização

Cada imunização foi preparada com o volume de antigénio correspondente a 20  $\mu\text{g}$  (200  $\mu\text{l}$  de HPal).

### 2.7.1 Preparação de soros policlonais

A obtenção de soro policlonal específico para a HPal efectuou-se em ratinhos CD1 (Harlan, Espanha) com 8 meses de idade. Os CD1 foram mantidos com comida e bebida *ad libitum*. A manutenção e tratamento dos animais foram efectuados segundo as directivas existentes. Grupos de 3 CD1 foram (grupo HPal) ou não (Grupo negativo) injectados com 20  $\mu\text{g}$  da proteína recombinante (inóculo com 200  $\mu\text{l}$ ) intraperitonealmente - IP). O grupo HPal recebeu 3 injeções com intervalos de 5 dias. No dia 0 (dia da primeira injeção IP), ao dia 15 pós 1ª IP (dia em que foi efectuada a 4ªIP) procedeu-se á recolha de sangue nas veias da cauda dos CD1. No dia 25 pós-1ª IP procedeu-se ao sacrifício, e recolha de sangue de 2 CD1 do grupo HPal e á recolha de sangue (através das veias da cauda) dos CD1 do grupo negativo. A recolha do soro foi

realizada após centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos. O soro foi guardado a -20°C até ser usado.

### 2.7.2 ELISA

As microplacas de poliestireno (96 poços) foram revestidas com 100 µL de tampão *coating* (carbonato/bicarbonato 0,1M pH 4,5) contendo antigénio recombinante numa concentração de 5 µg/mL, ficando a 4 °C durante a noite. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-Tween 0.3% (PBST) e saturados com 200 µL de PBS-BSA 3% (cada poço), ficando a 37 °C durante um tempo mínimo de 30 minutos. Após a saturação, os poços foram novamente lavados com PBST, procedendo à adição dos soros diluídos em PBS-T a 1/400, colocando-se 100 µL em cada poço. Colocou-se a incubar durante 1 hora e 30 minutos, a 37 °C. Após os períodos de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBST e adicionou-se a cada poço 100 µL do conjugado anti-IgG de ratinho (Sigma) marcado com peroxidase diluído em PBS-T a 1/2000. As placas ficaram a incubar durante 1 hora e 30 minutos, a 37 °C. Lavaram-se os poços 3 vezes com PBST. A revelação deu-se por reacção de substrato que continha 1 mg de OPD por mL de solução fosfato 0.2 M, pH 5.6. Por cada mL desta solução adicionou-se ainda 1 µL de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em cada poço, colocou-se 100 µL da solução de substrato e parou-se a reacção com 100 µL de 3M HCl. A densidade óptica foi lida a 490 nm no *Microplate reader* (BioRad). A tabela 5 mostra a constituição do PBS.

**Tabela 5.** Constituição do PBS 1x, pH 7.2 – 7.4.

Reagentes	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,72g
NaCl	8g
Volume final	1L

### 2.7.3 *Western blot*

#### 2.7.3.1 **Tris-Tricine-PAGE e transfer**

Os géis Tris-Tricina usados para analisar as fracções recolhidas basearam-se nos sistemas Tris-Tricina de Schagger, H. e Jagow, G. (1987) e SDS-PAGE de Laemmli (1970). Desta forma, o sistema adoptado era constituído de acordo com a tabela 6, que apresenta a constituição dos géis com diferentes percentagens (p/v).

**Tabela 6.** Constituição dos géis Tris-Tricina-PAGE 4% -20%.

<b>Reagentes</b>	<b>Gel resolvente 20%</b>	<b>Gel empacotamento 4%</b>
Acrilamida 30%	2200 µL	350 µL
Tampão Gel	1470 µL	625 µL
Glicerol	470 µL	-
Água destilada 30%	245 µL	1500 µL
APS 10%	88 µL	100 µL
TEMED	2,2 µL	2,5 µL
Volume final	4,475 mL	2,578 mL

O sistema de electroforese usado era constituído por dois reservatórios, superior (junto dos géis) e inferior, nos quais foi colocado tampão de cátodo e tampão do ânodo, respectivamente. Aplicou-se uma diferença de potencial, ddp de 100 V para o gel de empacotamento e uma ddp de 150 V para o gel resolvente. As amostras (em condições desnaturantes), antes de serem aplicadas no gel, foram tratadas com tampão de amostra

Tris-Tricina 1X, mostrado na tabela 7. Os géis foram corados com *Coomassie Blue* e descorados com uma solução descorante.

**Tabela 7.** Constituição do tampão de amostra Tris-Tricina 1X, pH 8,45.

Reagentes
0,1 M Tris
0,1 % SDS

Para efectuar o tranfer mergulhou-se em tampão de transferência 4 papéis de filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel SDS-PAGE Tris-Tricina e as esponjas para a montagem do sandwich. Após estarem bem embebidos no tampão, procedeu-se à montagem do sandwich, assegurando que a transferência ocorreria no sentido do pólo negativo para o positivo. A transferência realizou-se em tampão de transferência, durante 1 hora, com uma diferença de potencial de 80 V. As membranas foram colocadas a -20°C para posterior utilização. A tabela 8 mostra a constituição do tampão de transferência de proteínas.

**Tabela 8.** Tampão de transferência de proteínas.

Reagentes
25 mM Tris
0,2 M Glicina
Metanol 100 mL

### 2.7.3.2 *Immunoblotting*

Após a transferência, procedeu-se à saturação da membrana de nitrocelulose com PBS-Leite 5%, durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana 3 vezes com PBS-Tween 0,3% (PBST) e incubou-se com os soros diluídos, que contem

os anticorpos anti-Pal produzidos, em PBS-leite (1/500), durante a noite, a 4 °C. Lavou-se a membrana 3 vezes com PBST e adicionou-se o conjugado anti-IgG de ratinho marcado com peroxidase (Sigma) diluído a 1/1000 e Proteína G marcada com peroxidase a 1/1000, em PBS-leite (5%). Incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana 3 vezes com PBST e revelou-se com 4-Cloro- 1-naftol (30 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvido em 10 mL de metanol frio, 40 mL de PBS frio e 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). [Qiagen, 2011]

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Expressão da HPal recombinante em *E.Coli*

Neste trabalho recorreu-se ao programa *ExpASy proteomic tools* [Expasy, 2011] para determinar o peso molecular dos aminoácidos das cadeias pertencentes à sequência da HPal clonada, tendo-se obtido um total de 201 aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 21,8 kDa.

A HPal foi anteriormente produzida, em condições desnaturantes, a 37°C, 1mM IPTG, com 5 horas de indução. Primeiramente estas proteínas foram resuspensas num tampão com 8M ureia. A ureia promove a lise celular, ao mesmo tempo que desnatura a proteína, incluindo os corpos de inclusão.

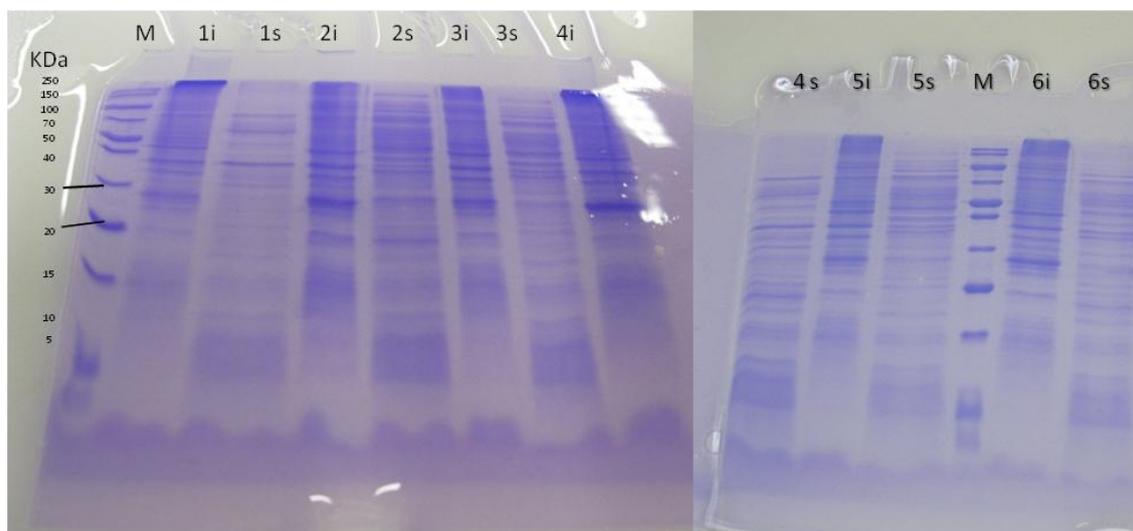
A escolha entre purificar proteínas contendo His-tag em condições nativas ou em condições desnaturantes depende da localização das proteínas, da solubilidade, da acessibilidade do His-tag, da posterior aplicação, e se deve ser mantida a actividade biológica. [Qiagen, 2011] Tendo em conta o objectivo do trabalho, procedeu-se à produção da proteína recombinante HPal em condições não desnaturantes de modo a potenciar posteriormente a produção de anticorpos anti-Pal capazes de reconhecer a estrutura nativa do antígeno HPal.

A expressão da HPal recombinante em *E. coli* foi otimizada com recurso ao estudo das condições óptimas. Através deste estudo foi possível estimar as condições que possibilitavam uma maior expressão da proteína recombinante. Definidas as condições óptimas, procedeu-se à produção da HPal recombinante numa escala maior, de modo a obter quantidade suficiente de HPal para posteriores aplicações.

#### 3.1.1 Estudo da solubilidade da HPal

No estudo analisaram-se três variáveis experimentais – temperatura de indução, concentração de IPTG, e tempo de indução – perante a resposta em termos de

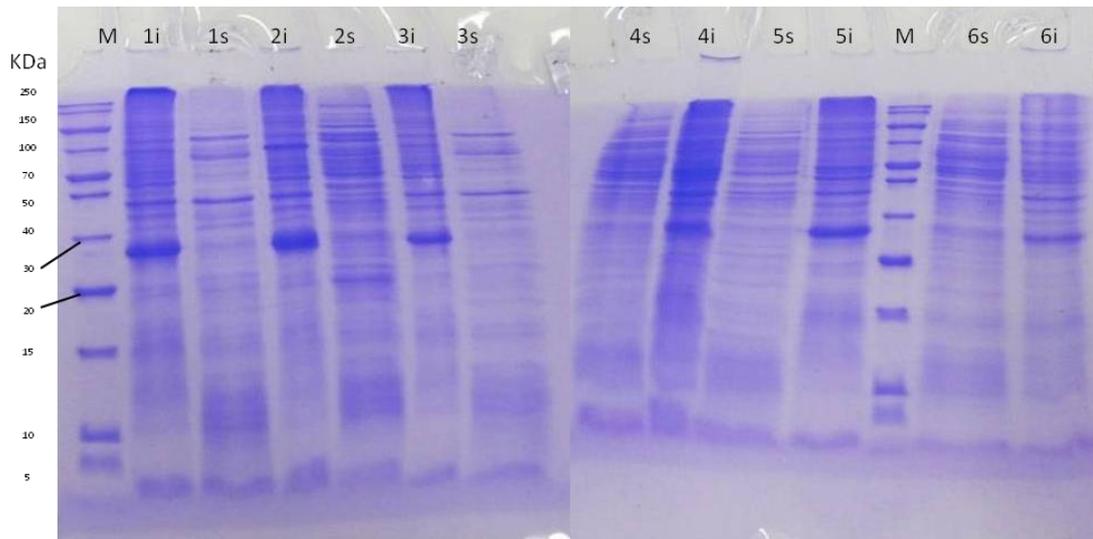
concentração da HPal recombinante solúvel obtida. A Figura 9 mostra o conteúdo proteico dos extractos celulares contendo HPal recombinante obtidos de uma indução a 20°C.



**Figura 9.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com fracções celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 20°C. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; 1i – 0,1 mM 5H insolúvel; 1s - 0,1 mM 5H solúvel; 2i – 0,1 mM o/n insolúvel; 2s – 0,1 mM o/n solúvel; 3i - 0,55 mM 5H insolúvel; 3s - 0,55 mM 5H solúvel; 4i - 0,55 mM o/n insolúvel; 4s – 0,55 mM o/n solúvel; 5i - 1,0 mM 5H insolúvel; 5s – 1,0 mM 5H solúvel; 6i - 1,0 mM o/n insolúvel; 6s – 1,0 mM o/n solúvel.

A expressão da proteína HPal na forma insolúvel é favorecida quando induzida a 20°C. Não se visualiza a produção de proteína na forma solúvel.

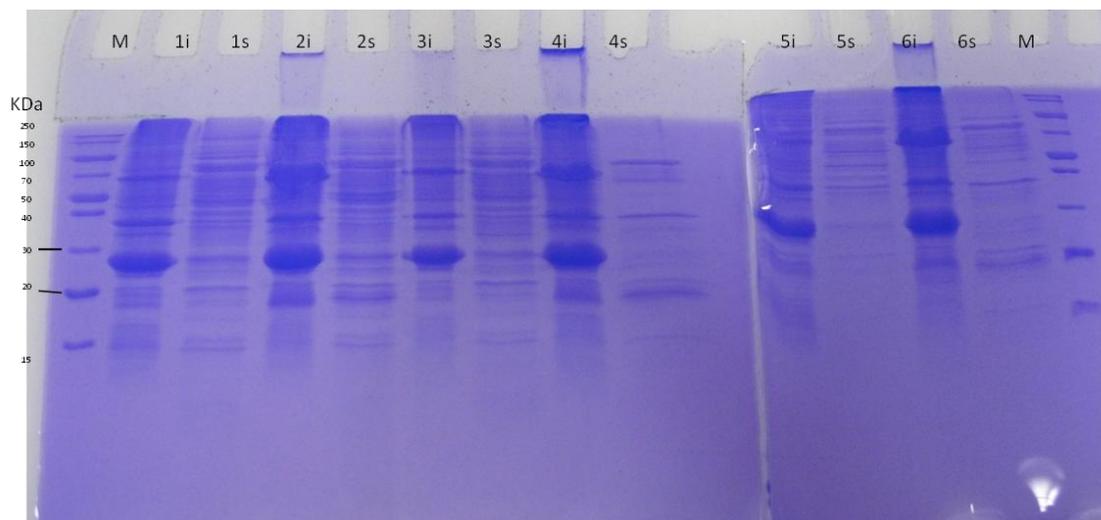
A Figura 10 mostra o conteúdo proteico dos extractos celulares contendo HPal recombinante obtidos de uma indução a 25°C.



**Figura 10.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com fracções celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 25°C. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; 1i - 0,1 mM 5 H insolúvel; 1s - 0,1 mM 5 H solúvel; 2i - 0,1 mM o/n insolúvel; 2s - 0,1 mM o/n solúvel; 3i - 0,55 mM 5 H insolúvel; 3s - 0,55 mM 5 H solúvel; 4s - 1mM o/n solúvel; 4i - 1mM o/n insolúvel; 5s - 1mM 5 H solúvel; 5i - 1mM 5 H insolúvel; 6s - 0,55 mM o/n solúvel; 6i - 0,55 mM o/n insolúvel.

A expressão da proteína HPal na forma solúvel não é favorecida a 25°C, independentemente da concentração do indutor e do tempo de indução.

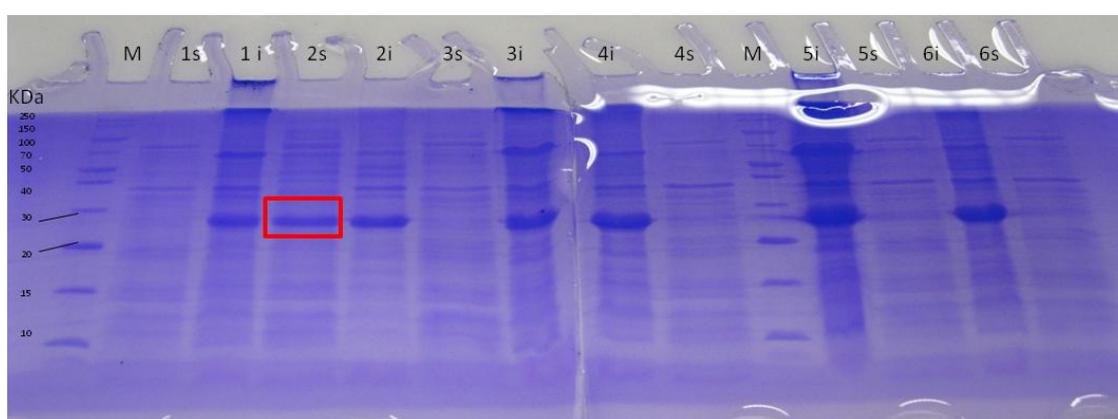
A Figura 11 mostra o conteúdo proteico dos extractos celulares contendo HPal recombinante obtidos de uma indução a 30°C.



**Figura 11.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com fracções celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 30°C. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; 1i – 0,1 mM IPTG 5H insolúvel; 1s – 0,1 mM IPTG 5 H solúvel; 2i - 0,1 mM IPTG o/n insolúvel; 2s – 0,1 mM IPTG o/n solúvel; 3i- 0,55 mM IPTG 5 Horas insolúvel; 3s – 0,55 mM IPTG 5 H solúvel; 4i - 0,55 mM IPTG o/n insolúvel; 4s – 0,55 mM IPTG o/n solúvel; 5i- 1,0 mM IPTG 5 Horas insolúvel; 5s – 1,0 mM IPTG 5H solúvel; 6i – 1,0 mM IPTG o/n insolúvel; 6s – 1,0 mM IPTG o/n solúvel.

A 30°C observou-se uma melhoria da expressão da proteína HPal, em particular com 0,1 mM IPTG e 0,55 mM IPTG com 5 horas de indução. Ainda assim em pouca quantidade relativamente à fracção insolúvel.

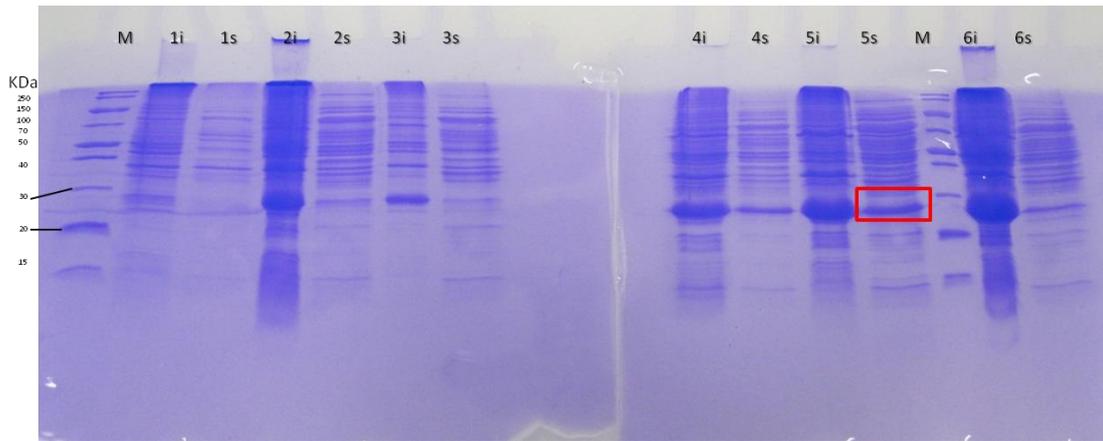
A Figura 12 mostra o conteúdo proteico dos extractos celulares contendo HPal recombinante obtidos de uma indução a 37°C.



**Figura 12.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com fracções celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 37°C. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; 1s – 1,0 mM o/n solúvel; 1i – 1,0 mM o/n insolúvel; 2s – 1 mM 5H solúvel; 2i – 1 mM 5H insolúvel; 3s – 0,55 mM o/n solúvel; 3i - 0,55 mM o/n insolúvel; 4i – 0,1 mM 5H insolúvel; 4s – 0,1 mM 5H solúvel; 5i – 0,1 mM o/n insolúvel; 5s – 0,1 mM o/n solúvel; 6i – 0,55 mM 5H insolúvel; 6s - 0,55 mM 5H solúvel.

A máxima produção solúvel da proteína HPal é obtida a 37°C, 1 mM IPTG e 5 horas de indução.

A Figura 13 mostra o conteúdo proteico dos extractos celulares contendo HPal recombinante obtidos de uma indução a 37°C, 1 mM IPTG e diferentes tempos de indução, bem como o controlo sem indução.



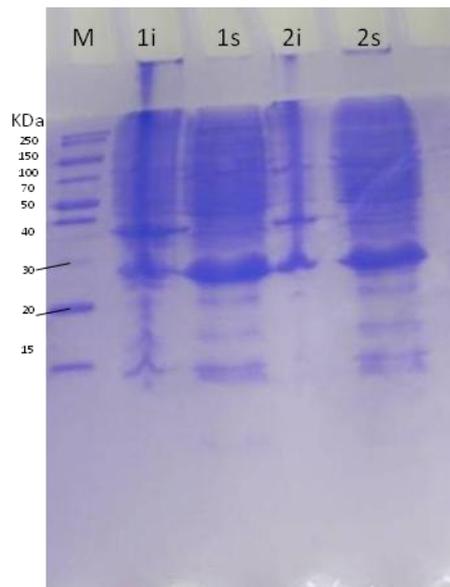
**Figura 13.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com fracções celulares da cultura de 50 mL de HPal recombinante em *E. coli*, temperatura de indução 37°C, 1mM IPTG. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; 1i – controlo sem indução insolúvel; 1s – controlo sem indução solúvel; 2i – 1 hora de indução insolúvel; 2s – 1 hora de indução solúvel; 3i – 2 horas de indução insolúvel; 3s – 2 horas de indução solúvel; 4i – 3 horas de indução insolúvel; 4s – 3 horas de indução solúvel; 5i – 4 horas de indução insolúvel; 5s – 4 horas de indução solúvel; 6i – 5 horas de indução insolúvel; 6s – 5 horas de indução solúvel.

Tendo em conta os resultados dos géis SDS-PAGE, a máxima produção solúvel da proteína HPal é obtida a 37 °C, com 1,0 mM de IPTG e 4 horas de indução.

A Figura 13 mostra ainda o conteúdo proteico dos extractos celulares da HPal recombinante em *E. coli* e respectivo controlo sem indução. Na fracção solúvel ao fim de 4 horas de indução, a HPal recombinante distingue-se do controlo negativo pela presença de uma banda proteica com um peso molecular de, aproximadamente, 21,8 kDa. Esta banda encontra-se rodeada de outras bandas proteicas, características dos extractos de *E. coli*. Este resultado foi também observado nos restantes géis de SDS-PAGE contendo as fracções celulares das culturas de 500 mL e de 1 L.

Uma vez que se pretendia determinar quais as condições que optimizavam a expressão da HPal recombinante solúvel, a abordagem realizada foi suficiente para alcançar esse objectivo.

### 3.1.2 Expressão da HPal recombinante solúvel

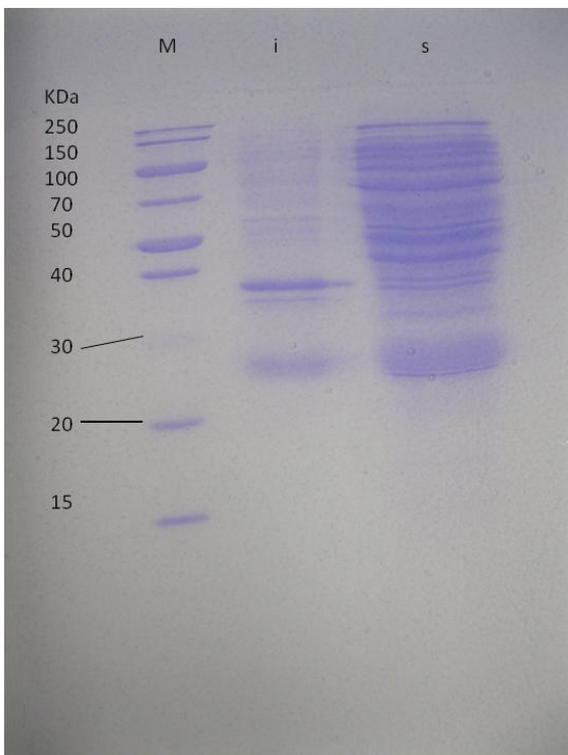


**Figura 14.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 500 mL da HPal recombinante em *E. coli*. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; 1i – Volume 100 mL de meio LB Insolúvel\*; 1s – Volume 100 mL de meio LB solúvel; 2i – Volume 400 mL de meio LB insolúvel\*; 2s – Volume 400 mL de meio LB solúvel. (\*) - Não deu para carregar no gel, pois as amostras encontravam-se demasiado viscosas.

Após se ter determinado as condições de cultura que maximizam a expressão da HPal recombinante solúvel em *E. coli*, procedeu-se à realização de fermentações de 500 mL (Figura 14), e posteriormente, 1 L (Figura 15), de modo a obter a maior quantidade de HPal recombinante solúvel possível.

Todas as culturas foram analisadas por electroforese-SDS-PAGE.

No poço 1s mostra que a proteína HPal resultante da cultura de 100 ml de meio LB foi expressa na forma solúvel. O mesmo aconteceu com a cultura de 400 ml, no poço 2s.



**Figura 15.** Gel de SDS-PAGE 15% - 4% com frações celulares da cultura de 1 L da HPal recombinante em *E. coli*. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; i – fracção insolúvel; s – fracção solúvel.

No poço s mostra que a proteína HPal resultante da cultura de 1 L de meio LB foi expressa na forma solúvel. Ainda assim, foi possível observar alguma expressão na forma insolúvel.

Em ambas as culturas na fracção insolúvel, é possível observar uma banda proteica ligeiramente menos intensa. Esta banda proteica apresenta um peso molecular igual e corresponde à HPal recombinante na sua forma insolúvel, possivelmente agregada em corpos de inclusão.

Os corpos de inclusão são agregados insolúveis que resultam de uma falha do sistema de controlo celular para reparar/remover proteínas com um *folding* incompleto (apresentando uma estrutura *misfolded* ou *unfolded*) [Sørensen e Mortensen, 2005].

Teoricamente, a temperaturas baixas provocam um *stress* menor durante o *folding* proteico e oferecem taxas lentas de síntese proteica, diminuindo assim a tendência para a agregação [Sørensen e Mortensen, 2005]. No entanto, isso não ocorreu com a proteína HPal, porque a temperatura de indução depende da proteína em questão, do vector e da estirpe. Além disso, uma proteína da bactéria favorece sempre o crescimento a 37°C. [Godlewska, et al, 2009]

Os resultados obtidos na análise da HPal recombinante nos extractos de *E. coli* por SDS-PAGE encontram-se de acordo com o peso molecular calculado a partir do *ExpASy* e mostram a existência de apenas uma única banda proteica na fracção solúvel de HPal recombinante, com peso molecular compreendido entre 20 e 30 kDa.

### 3.2 Purificação da HPal recombinante

Os géis de SDS-PAGE mostraram que a HPal recombinante produzida nos extractos de *E. coli* se encontrava acompanhada de inúmeras proteínas, que são características da expressão na própria bactéria. Tendo em conta que o objectivo principal da produção desta proteína recombinante é a sua aplicação como antigénio para produção de anticorpos, foi necessário purificá-la.

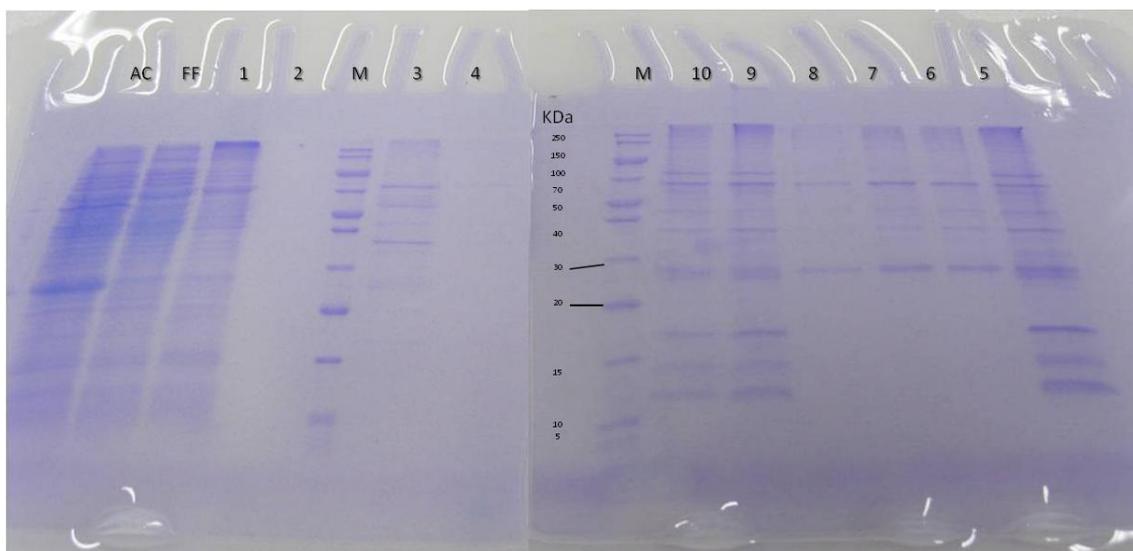
O processo de purificação foi constituído por cromatografia de afinidade à coluna de Níquel, de forma a obter a maior quantidade de HPal recombinante solúvel purificada.

### **3.2.1 Análise dos testes de cromatografia de afinidade dos extractos de *E. coli* com HPal recombinante por géis SDS-PAGE**

As fracções recolhidas da coluna His-Trap foram analisadas em géis de SDS-PAGE, de modo a avaliar o grau de purificação obtido através desta técnica cromatográfica. De seguida, procedeu-se à coloração dos géis com *Coomassie Blue*.

A cromatografia de afinidade baseia-se na especificidade biológica da proteína que se liga à coluna. O tipo mais comum envolve um ligando (pequena biomolécula específica - Histidina), que é imobilizado e ligado a uma matriz da coluna, como Ni-NTA. A proteína a analisar passa através da coluna e liga-se à mesma pelo seu ligando, enquanto as outras proteínas como impurezas são libertadas sem se ligar. As proteínas que se ligam são concentradas na coluna, enquanto aquelas que não possuem tanta afinidade passam pela coluna, acompanhando o fluxo de tampão.

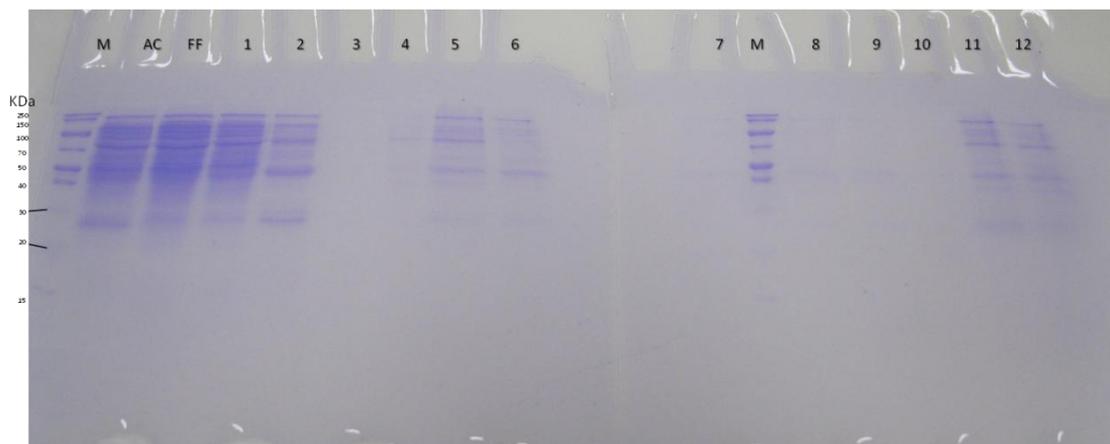
A Figura 16 apresenta os géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna His-trap 5 mL, com 40 mM imidazole no tampão ligação, 40 mM imidazole na lavagem e 300 mM imidazole no tampão de eluição. Estas fracções foram usadas na imunização dos 3 ratos CD1.



**Figura 16.** Géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna His-trap 5mL. Legenda: AC – Antes da coluna; FF – Flow fraction; 1 – 10 ml iniciais da lavagem; 2 – 2 ml finais da lavagem; M – Marcador de pesos moleculares; 3 – F1; 4 – F2; 5 – F3; 6 – F4; 7 – F5; 8 – Final com níquel; 9– F2+F3+F4; 10– Após diálise.

Na Figura 16, em FF, observou-se que as fracções recolhidas da coluna His-trap aquando da passagem de um extracto celular de 50 mL não apresentavam a banda proteica correspondente à HPal, ocorrendo dessa forma uma ligação da proteína à coluna. Além disso, o poço 1 mostra também que alguma proteína já começa a ser eluída durante a etapa de lavagem. Ainda na figura 16, poço 5, observou-se que as fracções recolhidas da coluna His-trap aquando da passagem de um extracto celular de 50 mL apresentavam várias bandas proteicas, para além da banda de HPal recombinante.

De modo a tentar remover os contaminantes, decidiu-se aumentar a concentração de imidazole no tampão de lavagem. A Figura 17 apresenta os géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna His-trap 5mL, com 40 mM imidazole no tampão de ligação, 100 mM imidazole no tampão de lavagem e 300 mM imidazole no tampão de eluição.



**Figura 17.** Géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de HPal nativa na coluna His-trap 5mL. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; AC – Antes da coluna; FF – Flow Fraction; 1 – Depois do flow fraction; 2 – 10 ml da lavagem; 3 – 2ml da lavagem; 4 – 5ml fim da lavagem; 5 – F1; 6 – F2; 7 – F3; 8 – F4; 9 – F5; 10 – Final com Niquel; 11 – F1; 12 – HPal após diálise.

Na Figura 17, poço FF, observou-se que as fracções recolhidas da coluna His-trap aquando da passagem de um extracto celular de 50 mL não apresentavam a banda proteica correspondente à HPal, ocorrendo dessa forma uma ligação da proteína à coluna. Além disso, o poço 3 mostra também que quase toda HPal é eluída durante a etapa de lavagem com 100 mM imidazol.

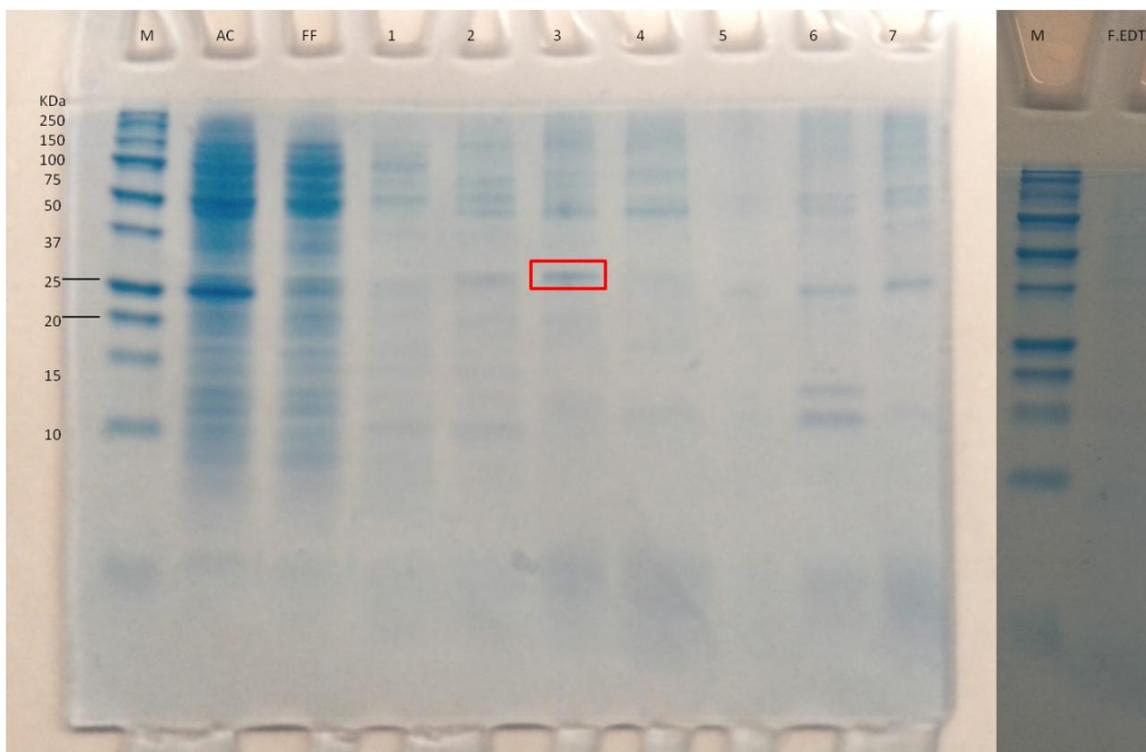
As figuras 16 e 17 mostraram que a cromatografia de afinidade originou fracções que possuíam contaminantes proteicos, sendo estes maioritariamente de peso molecular superior.

Possivelmente a capacidade da coluna 5 mL é demasiado grande e pode ocorrer a ligação de contaminantes, como proteínas indesejadas. Uma possível sugestão é reduzir a quantidade total de Ni-NTA à quantidade de proteína com His-tag a ser purificada (por exemplo 1ml). [GE Healthcare, 71-5027-69 Edition AA] As proteínas sem His-tag, bem como proteínas endógenas com locais de ligação a metais, normalmente ligam-se com menor afinidade à matriz de Ni-NTA relativamente às proteínas com His-tag. Consequentemente muito poucas proteínas indesejadas serão retidas na resina, se quase todos os locais disponíveis para ligação estão ocupados pelas proteínas com His-tag. Caso a capacidade de ligação da quantidade da coluna utilizada

exceder muito o quantidade de proteína com His-tag a ser purificada, estas proteínas podem ligar-se à matriz de Ni-NTA consideravelmente numa maior extensão, e serão posteriormente recuperadas na fase de eluição. [Qiagen, 2011]

Após ligação das proteínas alvo à coluna, esta pode ser eluída por um gradiente crescente de imidazole. [Terpe, 2003] (Figura 18) A adição de baixas concentrações de imidazole nos tampões de ligação e de lavagem é muito eficaz na prevenção da contaminação de proteínas de ligação à matriz de Ni-NTA. A lavagem com uma baixa concentração de imidazole reduz a ligação de proteínas inespecíficas do hospedeiro. [Terpe, 2003]

A Figura 18 apresenta os géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de Hpal nativa na coluna de capacidade máxima 10 mL e carregada com 1 mL de níquel, com 20 mM imidazole no tampão de ligação, com diferentes concentrações de imidazole nos tampões de lavagens 20 mM, 40 mM, 70 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM e 300 mM.



**Figura 18.** Géis SDS-PAGE das fracções recolhidas da passagem de Hpal nativa na coluna com 1mL

Níquel por gravidade. Legenda: M – Marcador de pesos moleculares; AC – Antes da coluna; FF- Flow fraction; 1 – Lavagem com 20 mM; 2 – Lavagem com 40 mM; 3 – Lavagem com 70 mM; 4 – Lavagem com 100 mM; 5 – Lavagem com 150 mM; 6 – Lavagem com 200 mM; 7 – Lavagem com 300 mM, F.EDTA – Final com EDTA.

Na Figura 18, poço FF, observou-se que as fracções recolhidas da coluna com 1 mL níquel por gravidade aquando da passagem de um extracto celular de 50 mL apresentavam uma banda proteica pouco intensa correspondente à HPal. O poço 3 mostra que quase toda HPal é eluída durante a etapa de lavagem com 70 mM imidazol. O poço 3 mostra também que a cromatografia de afinidade continuou a originar fracções que possuíam contaminantes proteicos, sendo estes maioritariamente de peso molecular superior.

Alternativamente, a adição de 20 mM  $\beta$ -mercaptoetanol ao tampão de lise poderá reduzir as pontes dissulfureto que podem ter se formado entre proteínas contaminantes e as proteínas com His-tag. [Qiagen, 2011] Caso existam contaminações na proteína com His-tag, poder-se-á aumentar as concentrações de sal e/ou detergente, ou adicionar etanol/glicerol ao tampão de lavagem para interromper as interacções inespecíficas.

Assim, quando é necessária a pureza ideal, testa-se uma eluição da proteína por etapas com tampões contendo uma concentração constante de tampão fosfato e um gradiente de concentrações crescentes de imidazole. A eluição em etapas, de acordo com o protocolo de optimização é uma técnica simples. Contudo, quando o alto rendimento é mais importante que melhorar a pureza, pode ser usado directamente o protocolo base da purificação, sem uma prévia optimização. [GE Healthcare, 71-5027-69 Edition AA]

### 3.2.2 Quantificação da HPal recombinante obtida

As fracções recolhidas da coluna His-trap, apresentadas na Figura 16 foram quantificadas pelo método de Bradford, tendo-se utilizado a curva de calibração apresentada no Anexo A.III.

A quantificação por Bradford resultou num total de 20 µg de proteína HPal por cada 200 µl de proteína purificada. Estas fracções derivaram da purificação de uma fermentação de 500 mL. Como tal, estimou-se a quantidade total de proteína, tendo-se obtido 2,2 mg de proteína HPal recombinante por litro de cultura de *E. coli*. Apesar destas fracções não se apresentaram totalmente puras no gel de SDS-PAGE, esta foi a quantificação mais próxima do valor real.

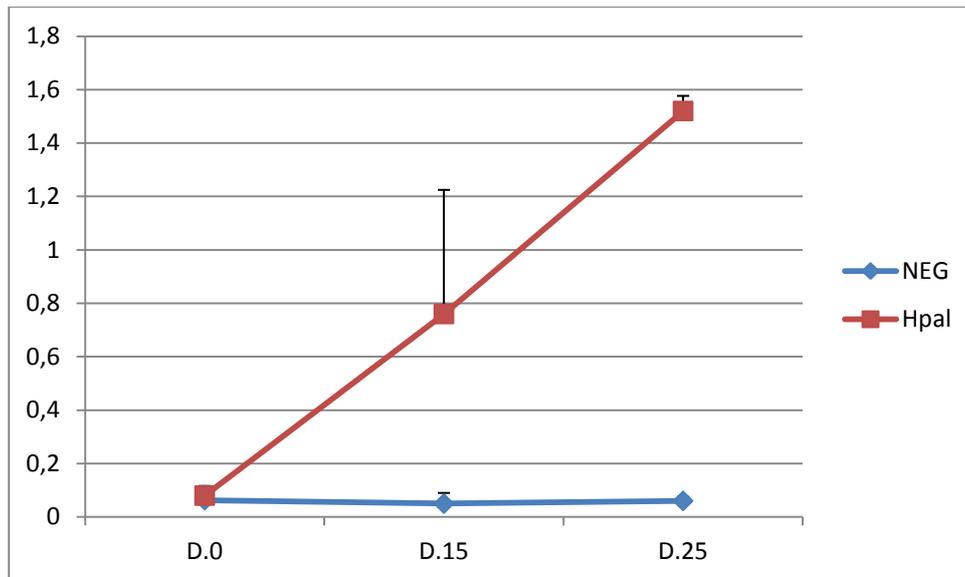
### 3.3 Detecção de anticorpos por ELISA e *Immunoblotting*

Após imunização dos ratos com HPal recombinante purificada, foi detectada a indução de produção de anticorpos anti-Pal através de dois métodos imunológicos: ELISA e western blotting.

O soro é um material de diagnóstico alternativo à urina. Porém, quando é difícil ou impossível obter urina, deve ser usado o soro como fonte de material para o diagnóstico. [TANG e TOMA, 1989]

Os ensaios de detecção dos anticorpos anti-Pal obtidos foram realizados de acordo como descrito na secção 2.7.3 e 2.7.4 para a ELISA e o *Immunoblotting*, respectivamente.

A figura 22 apresenta os resultados obtidos pela ELISA realizados com soros de ratinhos CD1 (média + desvio padrão) injectados com HPal recombinante.



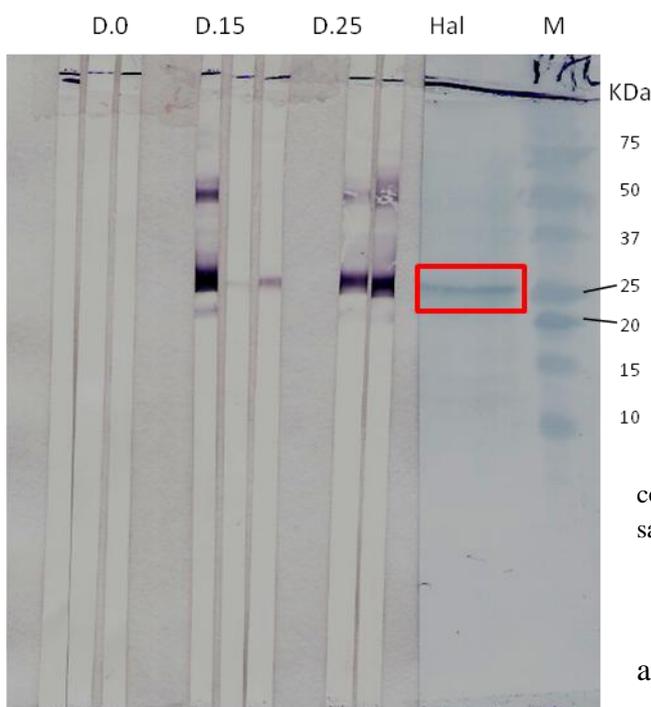
**Figura 19.** Resultados da ELISA realizadas com soros de 3 ratinhos CD1 (média +/- desvio padrão) injectados com HPal contra a proteína recombinante HPal. A azul está o controlo negativo (média de 3 CD1), a vermelho o grupo de ratinhos imunizados.

O desempenho dos anticorpos anti-Pal pela ELISA foi avaliado num grupo de três animais infectados e num grupo de três animais não infectados (controlo). Os ratos foram imunizados IP com 20 µg (200 µl de HPal), e foi obtido soro para ELISA.

Como mostrado na figura 22, após 15 dias verificou-se um aumento nos níveis de IgGs, traduzindo-se assim no aumento da produção de anticorpos. As amostras do soro de animais injectados com antigénio HPal tornam-se positivos após 15 dias e 25 dias. Os níveis de anticorpos aumentaram de 0,08 (0 dias) para 0,76 (15 dias) e para 1,52 (25 dias) em animais imunizados com HPal. Enquanto os níveis de anticorpos IgG diminuíram de 0,063 (0 dias) para 0,05 (15 dias) e aumentaram para 0,06 (25 dias) em animais não imunizados com HPal. Em D.15 e D.25, o grupo de animais infectados reagiram fortemente com anticorpos, comparando com o controlo negativo.

Os resultados indicam que no tempo 0 não existe anticorpos anti-Pal em ambos os grupos. O teste ELISA é sensível e capaz de detectar poucas quantidades de proteína presente numa proteína lipopolisacarideo purificada que é o maior constituinte da LP.

Para a análise do *western blot*, o gel SDS-PAGE carregado com o antígeno HPal recombinante foi transferido para a membrana de nitrocelulose e esta foi posteriormente incubada com o soro recolhido dos ratinhos injectados com HPal. A figura 20 mostra a membrana de nitrocelulose da análise por *Western blot*.



**Figura 20.** Membrana de nitrocelulose da análise por *Western blot*. *Immunoblottings* de soros de CD1 do grupo HPal usando uma nitrocelulose com a proteína recombinante HPal obtida em condições nativas. D.0 – *Immunoblottings* realizados com os soros de CD1 do grupo HPal recolhidos no dia 0; D.15 - *Immunoblottings* realizados com os soros de CD1 do grupo HPal recolhidos no dia 15 pós-1ª IP; D.25 - *Immunoblottings* realizados com os soros de CD1 do grupo HPal sacrificados no dia 25 pós-1ª IP.

A figura 20 mostra que a análise *immunoblotting* da proteína prominente de 21,8 kDa reage fortemente com os anticorpos anti-Pal produzidos, permitindo considerar a Pal como um potencial diagnóstico urinário de antígenos. O antígeno HPal está disponível como uma proteína recombinante que actua como um forte indutor de anticorpos.

A imunização com a lipoproteína HPal gerou uma resposta imunitária com elevados níveis de anticorpos, suportando a ideia que a lipoproteína bacteriana Pal pode ter a sua função imunoestimulatória. Além disso, as lipoproteínas são os maiores antígenos de outras membranas num conjunto de patógenos bacterianos. [YOON, et al, 2002]

Os resultados obtidos na análise dos anticorpos anti-Pal presentes no soro dos animais por *Western blot* encontram-se de acordo com o peso molecular calculado a

partir do *ExPASy* e mostram a existência de apenas uma única banda proteica na fracção solúvel de HPal recombinante, com peso molecular compreendido entre 20 e 25 kDa.

## 4 Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho realizado teve como objectivos a optimização da produção, a purificação da HPal recombinante em *E. coli*, e a produção e detecção de anticorpos.

Neste trabalho, verificou-se que o estudo da solubilidade optimizou a produção da HPal recombinante. As condições experimentais que aumentaram a sua expressão solúvel, isto é, condição óptima para expressar a HPal são: 37°C; 1,0 mM IPTG; e 4 horas de indução.

A cromatografia de afinidade não foi suficiente para isolar totalmente a HPal recombinante, no entanto, as fracções das lipoproteínas obtidas, mesmo com alguns contaminantes, apresentaram actividade imunogénica. A purificação da HPal foi realizada com 20 mM imidazole no tampão de ligação e lavagem, e pode ser eluída com 70mM imidazole. Não optimizada, mas foi possível produzir HPal suficiente para a produção de anticorpos anti-Pal.

De modo a continuar este trabalho, poder-se-á obter a Pal recombinante a partir de outros dois sistemas tag (Pal sem H e com o tag Fh8Pal), pelo que será fundamental comparar a proteína recombinante obtida nas três condições quanto à sua aplicação na produção de anticorpos anti-Pal, escolhendo também o melhor sistema tag para a sua produção.

Futuramente deverá ser avaliado a actividade dos anticorpos no reconhecimento da Pal de *Legionellas pneumophilas*, bem como a sua utilização para produção de KITS de diagnóstico e produção de vacinas. Testar a funcionalidade dos anticorpos produzidos (avaliar se identificam a Pal existentes nas *Legionellas pneumophilas*).

## 5 Referências bibliográficas

- Amersham pharmacia. The Recombinant Protein: Protein Amplification and Simple Purification. Handbook 18-1142-75. Edition AA.
- Amersham Biosciences, GE Healthcare, HisTrap HP Kit for purification of histidine-tagged proteins, HiTrap, 71-5027-69 Edition AA.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., e Mattern, M. R. (2005) SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins; ELSEVIER, Protein Expression and Purification, 43, 1-9.
- Demain, A. L., e Vaishnav, P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. ELSEVIER, Biotechnology Advances, 297-306.
- Esposito, D., e Chatterjee, D. K. (2006) Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, ELSEVIER, Protein technologies, 17, 353-358.
- Expasy (2011). URL: <http://expasy.org>. Agosto de 2011
- Gholipour, A., Moosavian, M., Galehdari, H., Makvandi, M., Memari, H. R., e Alvandi, A. (2010) Cloning and periplasmic expression of peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) protein of *Legionella pneumophila* in *Escherichia coli*; Jundishapur Journal of Microbiology, 1-9.
- Godlewska, R., Wisniewska, K., Pietras, Z. e Jagusztyn-Krynicka, E. K.. (2009) Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis; FEMS Microbiol, 1-11.

- GEHealthcare (2011). URL: [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein\\_purification~affinity~immobilized\\_lectin](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/protein_purification~affinity~immobilized_lectin), Abril de 2011.
- HAMMARSTRÖM, M., HELLGREN, N., BERG, S. V. D., BERGLUND, H., e HÄRD, T. (2001) Rapid screening for improved solubility of small human proteins produced as fusion proteins in *Escherichia coli*; Protein Science, 11, 313-321.
- Hearn, M. T W, e Acosta, D. (2001) Applications of novel affinity cassette methods: use of peptide fusion handles for the purification of recombinant proteins; JOURNAL OF MOLECULAR RECOGNITION, 14, 323-369.
- Kim, M. J. Jang, Sohn, W., Park D. W., Park, S. C., e Chun, B. C. (2003) Characterization of a Lipoprotein Common to *Legionella* Species as a Urinary Broad-Spectrum Antigen for Diagnosis of Legionnaires' Disease; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2974-2979.
- Sørensen, H. P., e Mortensen, K. K.. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. ELSEVIER, Journal of Biotechnology, 115, 113-128.
- Spectrumlabs (2011) URL: [www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html](http://www.spectrumlabs.com/dialysis/Fund.html), Abril de 2011.
- Steinert, K., Wulbeck, M. e Ribbe, J. Ni-NTA resins — your key to efficient purification of 6xHis-tagged proteins; QIAGEN GmbH, Hilden, Germany.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems; Appl Microbiol Biotechnol, Appl Microbiol Biotechnol 60:523–533.
- Terpe, K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Appl Microbiol Biotechnol 72:211–222.

- TANG, P. W., TOMA, S., e RAJKUMAR, W. D. (1989) Detection of Urinary Antigens of *Legionella pneumophila* Serogroup 12 by Broad-Spectrum Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 783-784.
- Uniscience (2011) URL: [www.uniscience.com/dialise](http://www.uniscience.com/dialise), Abril de 2011.
- Waugh, D. S. (2005) Making the most of affinity tags. *ELSEVIER, TRIENDS in Biotechnology*, 23.
- YOON, W. S., PARK, S. H., PARK, Y. K., PARK, S. C., SIN, J. I., e KIM, M. J. (2002). Comparison of Responses Elicited by Immunization with a *Legionella* Species Common Lipoprotein Delivered as Naked DNA or Recombinant Protein. *DNA AND CELL BIOLOGY* Volume 21, Number 2, 99-107.
- QIAexpress®, Ni-NTA Fast Start; Handbook For purification and detection of recombinant 6xHis-tagged proteins; July 2011.
- The QIAexpressionist™; A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins; June 2003, Fifth Edition.

# Anexos

## Anexo I – Expressão da HPal recombinante solúvel

### A.I.1. Análise pela ferramenta *ProtParam* do *ExPASy proteomic*

#### *Tools*

A sequência de nucleótidos da HPal clonada bem como a respectiva sequência proteica, usadas na determinação de alguns parâmetros pelo *ExPASy proteomic tools*, encontram-se apresentadas na Figura A1.

```
ATGAGAGGATCGcatcaccatcaccatcacGGATCCATGCCTAGTGTTCAAGAGGTTG
AAAACTCCTTGAGCTCatgaaagccggatcggtttataaactgggactgctgtagcaagcgtgtattggtg
cagcctgttctaaaacccaggcagtcgggatggtgggctgcggtaggtgatggtgatgctactgcccaagtttgggca
aatgactcactttgctggacaagagcctggtgagtcctatacaacgcaggcaccgcataatcaattgtattgtttgcgatgatg
acagcactttggcatcaaaatatttaccttcagttaacgcgcaggcagaatatttaaaacccaccagggtctcgagtgatgat
agctggacatactgatgaacgtgtagtcgtgaatataacgttctcttgggtaacgccgtgctgatactgtagctgaaattctgc
gtatggcaggtgtagcagacaacaaattcgagtagttagctacggcaaaagagcggccgctaattatggccatgatgaagcg
tcgcatgcgcagaatcgacgcgtagagtttatttatgaggcaacaagatga

MRGSHHHHHHGSMPSVQEVEKLELMKAGSFYKLGLLVASAVLVAACSKTPG
SADGGAAVGDGDATAQQLGQMTHFAGQEPGESYTTQAPHNQLYLFAYDDSTL
ASKYLPSVNAQAEYLKTHPGARVMIAGHTDERGSREYNVALGERRADTVAEIL
RMAGVSRQQIRVVSYGKERPANYGHDEASHAQNRRVEFIYEATR-
```

**Figura A 1.1** Sequência nucleotídica e sequência proteica da HPAL clonada, usada na análise pelo

*ExPASy proteomic tools*. A metionina, o pQE30, 6 histidinas, enzimas de restrição, SacI, tag H, Pal e o STOP.

Análise obtida pelo ProtParam

Number of amino acids: 201

Molecular weight: 21806.2

Theoretical pI: 6.63

Amino acid composition:

Ala (A)	26	12.9%
Arg (R)	13	6.5%
Asn (N)	5	2.5%
Asp (D)	8	4.0%
Cys (C)	1	0.5%
Gln (Q)	10	5.0%
Glu (E)	14	7.0%
Gly (G)	20	10.0%
His (H)	12	6.0%
Ile (I)	4	2.0%
Leu (L)	15	7.5%
Lys (K)	7	3.5%
Met (M)	6	3.0%
Phe (F)	4	2.0%
Pro (P)	7	3.5%
Ser (S)	15	7.5%
Thr (T)	10	5.0%
Trp (W)	0	0.0%
Tyr (Y)	10	5.0%
Val (V)	14	7.0%
Pyl (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): 22

Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 20

Atomic composition:

Carbon	C	945
Hydrogen	H	1478
Nitrogen	N	286
Oxygen	O	296
Sulfur	S	7

Formula:  $C_{945}H_{1478}N_{286}O_{296}S_7$   
Total number of atoms: 3012

Extinction coefficients:

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

Ext. coefficient 14900

Abs 0.1% (=1 g/l) 0.683, assuming all pairs of Cys residues form cystines

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 31.87

This classifies the protein as stable.

Aliphatic index: 70.00

Grand average of hydropathicity (GRAVY): -0.494

As seqüências de nucleótidos do H clonado, usadas na determinação de alguns parâmetros pelo ExPASy proteomic tools, encontram-se apresentadas na Figura A.1.2

ATGCCTAGTGTTCAAGAGGTTGAAAACTCCTT

MPSVQEVEKL L

**Figura A 1.2** Sequência nucleotídica e sequência proteica da H clonada, usada na análise pelo

*ExPASy proteomic tools.*

Number of amino acids: 11

**Molecular weight:** 1272,5

**Theoretical pI:** 4,53

**Amino acid composition:**

CSV format

Ala (A) 0 0,0%

Arg (R) 0 0,0%

Asn (N) 0 0,0%

Asp (D) 0 0,0%

Cys (C) 0 0,0%

Gln (Q) 1 9,1%

Glu (E) 2 18,2%

Gly (G) 0 0,0%

His (H) 0 0,0%

Ile (I) 0 0,0%

Leu (L) 2 18,2%

Lys (K) 1 9,1%

Met (M) 1 9,1%

Phe (F) 0 0,0%

Pro (P) 1 9,1%

Ser (S) 1 9,1%

Thr (T) 0 0,0%

Trp (W) 0 0,0%

Tyr (Y) 0 0,0%

Val (V) 2 18,2%

Pyl (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): 2**

**Total number of positively charged residues (Arg + Lys): 1**

**Atomic composition:**

Carbon C 56

Hydrogen H 97

Nitrogen N 13

Oxygen O 18

Sulfur S 1

**Formula:** C<sub>56</sub>H<sub>97</sub>N<sub>13</sub>O<sub>18</sub>S<sub>1</sub>

**Total number of atoms:** 185

**Extinction coefficients:**

Como não existiem Trp, Tyr ou Cys na região considerada, sua proteína não deve ser visível por espectrofotometria de UV.

**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 76,34

This classifies the protein as **unstable**

**Aliphatic index:** 123,64

**Grand average of hydropathicity (GRAVY):** 0,100

## **Anexo II – Purificação da HPAAL recombinante**

### **A.II.1. – Características da coluna His-trap**

**Tabela A2.** Especificações da coluna His-trap

Matrix	Highly cross-linked spherical agarose, 6%
Mean particle size	34 µm
Metal ion capacity	~15 µmol Ni <sup>2+</sup> /ml medium
Dynamic binding capacity*	At least 40 mg (His) <sub>6</sub> -tagged protein/ml medium
Column volumes	1 ml or 5 ml
Column dimensions	i.d. × h: 0.7 × 2.5 cm (1 ml) 1.6 × 2.5 cm (5 ml)
Recommended flow rate	1 and 5 ml/min for 1 and 5 ml column respectively
Max. flow rates	4 and 20 ml/min for 1 and 5 ml column respectively
Max back pressure**	0.3 MPa, 3 bar
Compatibility during use	Stable in all commonly used buffers, reducing agents, denaturants and detergents. See Table 2 for details.
Chemical stability (Ni <sup>2+</sup> -stripped medium)	0.01 M HCl, 0.1 M NaOH, 6 M Gua-HCl, 8 M urea, sodium acetate, pH 4.0. Tested for 1 week at 40 °C. 1 M NaOH, 70% HAc. Tested for 12 hours. 2% SDS. Tested for 1 hour. 30% 2-propanol. Tested for 30 min.
Avoid (during purification) pH stability	Chelating agents, e.g. EDTA, EGTA, citrate short term (≤ 2 hours): 2-14 long term (≤ 1 week): 3-12
Storage buffer	20% ethanol
Storage temperature	+4 to +8 °C
* Dynamic binding capacity conditions:	
Sample:	1 mg/ml (His) <sub>6</sub> -tagged pure protein (M <sub>r</sub> 28 000 or 43 000) in binding buffer (QB <sub>10%</sub> determination) or (His) <sub>6</sub> -tagged protein bound from <i>E. coli</i> extract
Column volume:	0.25 ml or 1 ml
Flow rate:	0.25 ml/min or 1 ml/min
Binding buffer:	20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4
Elution buffer:	20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4
<b>Note:</b> Dynamic binding capacity is protein dependent.	
** H <sub>2</sub> O at room temperature	

## Anexo III – Curva de calibração usada no método de Bradford

A curva de calibração usada para a quantificação proteica pelo método de Bradford foi construída com base em cinco concentrações padrão da proteína albumina sérica bovina (BSA), como se encontra descrito na secção. Efectuou-se a leitura da absorvância a 595 nm para cada concentração de BSA, tendo-se obtido a curva de calibração apresentada na Equação 6.

$$ABS_{595nm} = 0,014 Conc + 0,065, R^2=0,99$$

## Anexos IV – Cálculos

**Indutor IPTG:** [IPTG]<sub>I</sub> = 1M ; [IPTG]<sub>f</sub> = 0,1mM

- 0,1 mM:  $C_i V_i = C_f V_f$  ( $\Rightarrow$ )  $V_i = 5 \mu\text{l}$
- 0,55 mM:  $V_i = C_f V_f / C_i$  ( $\Rightarrow$ )  $V_i = (0,55 \times 0,05) / 1 = 27,5 \mu\text{l}$
- 1,0 mM:  $V_i = 50 \mu\text{l}$

**Preparação de HCl 6 M:**

[HCl] = 6M; 6M = 6 moles/1 L x 36,46g/mol = 218 g/L;  $C_i V_i = C_f V_f$ . Nota: 37 % = 37 g/100 ml = 370 g/L

$370 \text{g/L} \times V_i = 218,76 \times 30 \text{mL}$  ( $\Rightarrow$ )  $V_i = 17,73 \text{ mL} + 12,26 \text{ mL d H}_2\text{O}$ .

**Preparação 1,5 M Tris-HCl pH=8,8:**

Pesar 9,0855g de Tris e dissolver em 50 mL de água destilada. Acertar o pH a 8,8 com HCl.

**Preparação de APS 10%:**

Pesar 100 mg de persulfato de amônio e dissolver em 1 mL de água destilada.

**Tampão desnaturante:**

- 0,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) = 119,98 g/mol
- 0,01 M Tris-HCl, M (Tris-HCl) = 121,14 g/mol
- 8 M Ureia, M (Ureia) = 60,06 g/mol

Observação: Adicionar 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  e completar o restante até prefazer um volume de 50 mL.