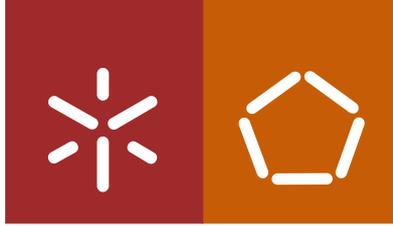


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Liliana Patrícia Sousa Gonçalves

**Estudo de diferentes sistemas de produção
e purificação de frutalina recombinante com
vista à sua aplicação biomédica**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Liliana Patrícia Sousa Gonçalves

**Estudo de diferentes sistemas de produção
e purificação de frutalina recombinante com
vista à sua aplicação biomédica**

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

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Lucília Domingues
e da
Professora Doutora Lucília Saraiva

outubro de 2014

DECLARAÇÃO

Nome: Liliana Patrícia Sousa Gonçalves

Título dissertação: Estudo de diferentes sistemas de produção e purificação de frutalina recombinante com vista à sua aplicação biomédica

Orientador: Professora Doutora Lucília Domingues e Professora Doutora Lucília Saraiva

Ano de conclusão: 2014

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica

Ramo: Engenharia Clínica

Escola: de Engenharia

Departamento: de Engenharia Biológica

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

Universidade do Minho, ____/____/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer às minhas orientadoras, Doutora Lucília Domingues e Doutora Lucília Saraiva, pelo apoio, ajuda, incentivo e por todo o conhecimento que comigo partilharam. Um muito obrigado pela oportunidade e pela experiência que me proporcionaram.

A todos os meus colegas do grupo LD, em especial à Carla pela enorme dedicação, paciência e ajuda que me deu em toda a realização deste trabalho e à Sofia Costa pelo que me ensinou no início deste trabalho. Quero ainda agradecer à Goreti, à Joana, ao Bruno, ao Rui e ao Fred pelo companheirismo, pela preciosa ajuda em inúmeras situações, mas acima de tudo, pela amizade criada.

Agradeço às minhas colegas do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, em especial à Joana e à Liliana que sempre se mostraram disponíveis a ajudar e que sem elas a conclusão deste trabalho não seria possível.

Aos amigos que me acompanham há 17 anos por toda a amizade ao longo destes anos e por me apoiarem mesmo quando estive ausente. À enorme família que criei em Vila Real, muito obrigado pelos melhores anos da minha vida, pela amizade que nos une e pelo constante incentivo perante todos os obstáculos. À Raquel, à Ju e à Carina por estarem sempre presentes e me ouvirem nas horas em que nada parecia correr bem.

Ao Sérgio, o meu maior pilar, pela paciência, dedicação, ajuda e apoio incondicional, mas acima de tudo por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidava que era capaz.

Por último, e o meu maior agradecimento, à minha família, em especial ao meu pai, por tornar tudo isto possível, por tudo que fez por mim, sem ti nunca teria chegado até aqui, nem me teria tornado na pessoa que sou hoje, devo-te tudo, obrigado.

Dedico esta tese

À minha Mãe!

Resumo

A frutalina é a principal lectina de sementes da fruta-pão (*Artocarpus incisa*). Esta lectina é uma glicoproteína tetramérica, parcialmente glicosilada e pertencente à sub-família das lectinas relacionadas com a jacalina com afinidade de ligação a resíduos de D-galactose. Em estudos anteriores a frutalina recombinante produzida em *Pichia pastoris* e purificada por cromatografia de exclusão molecular (SEC) mostrou ter um potente efeito citotóxico em células do cancro do cólon do útero (HeLa) e do adenocarcinoma do cólon (HCT 116), sendo este efeito devido à indução de morte celular por apoptose por uma via dependente das caspases e independente da p53. No entanto a purificação por SEC limita a aplicação da frutalina recombinante uma vez que é um processo demorado e resulta em amostras muito diluídas, pelo que metodologias alternativas à sua purificação são necessárias. Por outro lado, a *Escherichia coli*, como sistema de expressão, permite um processo de produção e purificação mais eficiente contudo as versões resultantes não têm efeito citotóxico. Assim, com o presente trabalho pretendeu-se avaliar o efeito citotóxico de versões de frutalina recombinante produzidas em *E. coli*, bem como de versões produzidas em *P. pastoris* e purificadas por diferentes metodologias, nomeadamente cromatografia de exclusão molecular (SEC), cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e cromatografia de afinidade ao níquel (IMAC-Ni). Para atingir este objetivo foram testadas duas versões de frutalina produzidas em *E. coli*, uma delas contendo o *tag* His₆ (EcrHis₆FTL) e outra resultante da clivagem do Fh8 da versão EcrFh8FTL (EcrCFTL), em linhas tumorais humanas com (HCT 116 p53^{+/+}) e sem a forma nativa da p53 (HCT 116 p53^{-/-}), e nenhuma destas versões mostrou ter efeito anti-proliferativo em ambas as linhas tumorais. O que sugere que a glicosilação assume um papel importante na atividade da frutalina e a ausência desta resulta na inexistência de atividade anti-proliferativa. Por outro lado, foram produzidas versões de frutalina em *P. pastoris*, versões glicosiladas, e usadas 3 metodologias de purificação distintas, SEC, HIC e IMAC-Ni. A purificação por HIC e IMAC-Ni não se revelou eficiente contrariamente à purificação por SEC. A frutalina purificada por SEC é estável estruturalmente e mantém a sua atividade anti-proliferativa na linha HCT 116 p53^{+/+} mesmo após 6 meses de armazenamento a -20°C, contudo de entre todas as versões testadas esta foi a que mostrou ter um menor efeito citotóxico. A metodologia HIC resultou em 2 amostras diferentes, uma delas enriquecida na fração glicosilada e outra desfavorecida nesta fração, sendo que a primeira possui cerca do dobro da potência da segunda, contudo estas diferenças não são estatisticamente significativas. Em relação à PprFTLHis₆ produzida em *P. pastoris* e purificada por IMAC-Ni, clonada pela primeira vez neste trabalho de modo a facilitar o processo de purificação, verificou-se que o *tag* His₆ não influencia negativamente a atividade anti-proliferativa da frutalina e esta possui um potente efeito anti-proliferativo na linha HCT 116 p53^{+/+}. Curiosamente, as amostras resultantes da metodologia de purificação mais eficiente (SEC) mostraram ter menor efeito anti-proliferativo comparativamente com as amostras resultantes das metodologias menos eficientes (HIC e IMAC-Ni) onde foram obtidas amostras de frutalina recombinante com um potente efeito anti-proliferativo em linhas tumorais humanas HCT 116 p53^{+/+}.

Abstract

Frutalin is the major lectin of breadfruit seeds (*Artocarpus incisa*). It is a tetrameric glycoprotein, partially glycosylated, which belongs to the lectins sub-family related to jacalin, with affinity to bind to D-galactose residues. In previous studies, frutalin produced in *Pichia pastoris* and purified by size exclusion chromatography (SEC) was found to have a potent cytotoxic effect in cervical cancer cells (HeLa) and colon adenocarcinoma (HCT 116). This effect results of apoptotic cell death by caspase-dependent and p53 independent pathways. However, the purification by SEC restricts the application of recombinant frutalin, since it is a lengthy process and results in very dilute samples, leading to an increasing necessity for alternative methods. By contrast, the use of *Escherichia coli* as an expression system allows a more efficient production and purification process. However, the resulting versions had no cytotoxic effect. Thus, the present work aims to evaluate the cytotoxic effects of recombinant versions of frutalin produced in *E. coli*, as well as the versions produced in *P. pastoris* and purified by different methods, namely by size exclusion chromatography (SEC), hydrophobic interaction chromatography (HIC) and nickel affinity chromatography (IMAC-Ni). To achieve this goal, two versions of frutalin produced by *E. coli*, one containing the His₆ tag (EcrHis₆FTL) and the other resulting from the cleavage of the Fh8 from the EcrFh8FTL version (EcrCFTL), were tested in human tumor lines with the wild-type p53 form (HCT 116 p53^{+/+}) and without p53 (HCT 116 p53^{-/-}). The results obtained showed that none of the versions had an anti-proliferative effect in both tumor lines, suggesting that glycosylation may play an important role in frutalin activity and that its absence does not result in an anti-proliferative activity. Moreover, frutalin versions were produced in *P. pastoris*, glycosylated versions, and three distinct purification methodologies were used, namely SEC, HIC and IMAC-Ni. Purification by HIC and IMAC-Ni was not efficient, oppositely to purification by SEC. The frutalin purified by SEC is structurally stable and retains its anti-proliferative activity in line HCT 116 p53^{+/+} even after 6 months of storage at -20°C. However, among the tested versions, the latter showed to have the lower cytotoxic effect. The HIC methodology resulted in two different samples, one enriched in the glycosylated fraction and the other weakened in this fraction. Specifically, the first sample had nearly double the power of the second one, despite these differences not being statistically significant. Regarding the PprFTLHis₆ produced in *P. pastoris* and purified by IMAC-Ni, cloned for the first time in this study to facilitate the purification process, it was found that the His₆ tag did not inhibit the anti-proliferative activity of this frutalin and that it had a potent anti-proliferative effect on HCT 116 p53^{+/+} cell line. Interestingly, samples resulting from the most efficient purification method (SEC) exhibited less anti-proliferative effect when compared with the samples resulting from less efficient methodologies (HIC and IMAC-Ni), which resulted in recombinant versions of frutalin with a potent anti-proliferative effect on HCT 116 p53^{+/+} cell line.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo	vii
Abstract	xv
Lista de Figuras	xxi
Lista de Tabelas	xxiii
Abreviaturas	xxv
Capítulo 1 Introdução.....	1
1.1. Lectinas.....	3
1.1.1. Lectinas relacionadas com a jacalina	4
1.1.2. Frutalina.....	4
1.1.3. Aplicações biomédicas relacionadas com o cancro.....	5
1.1.4. Mecanismo de indução de apoptose	6
1.2. Produção de lectinas em sistemas de expressão recombinantes	9
1.3. Produção e aplicação de frutalina recombinante	12
1.3.1. Produção em <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i>	12
1.3.2. Purificação de frutalina recombinante	14
1.3.3. Aplicações biomédicas.....	16
1.4. Objetivos deste trabalho	17
Capítulo 2 Materiais e Métodos	19
2.1. Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura.....	21
2.2. Estirpes e vetores.....	21
2.3. Proteínas.....	21
2.4. Condições de armazenamento de bactérias e leveduras.....	22

2.5.	Condições de armazenamento de DNA	23
2.6.	Construção da estirpe <i>P. pastoris</i> KM71H/pPICZ α A/frutalina recombinante+His ₆	23
2.6.1.	Extração de DNA plasmídico	23
2.6.2.	Amplificação de fragmentos de DNA por PCR.....	24
2.6.3.	Quantificação de DNA.....	25
2.6.4.	Eletroforese de DNA.....	25
2.6.5.	Purificação de DNA em gel	26
2.6.6.	Modificação enzimática de DNA	27
2.6.7.	Transformação de células de <i>E. coli</i> pelo método de choque térmico.....	27
2.6.8.	Transformação de células de <i>P. pastoris</i> por electroporação.....	28
2.7.	Produção de diferentes versões de frutalina recombinante em <i>P. pastoris</i>	29
2.8.	Concentração dos sobrenadantes	30
2.9.	Purificação de diferentes versões de frutalina recombinante expressa em <i>P. pastoris</i>	31
2.9.1.	Cromatografia de exclusão molecular.....	31
2.9.2.	Cromatografia de interação hidrofóbica	32
2.9.3.	Cromatografia de afinidade ao níquel	33
2.10.	Eletroforese de proteína – SDS-PAGE.....	34
2.10.1.	Gel SDS-PAGE	34
2.10.2.	Marcador de pesos moleculares – Proteína.....	35
2.10.3.	Coloração com <i>Coomassie Blue</i>	36
2.10.4.	Coloração com nitrato de prata	36
2.11.	Quantificação de proteína	37
2.12.	<i>Dynamic Light Scattering</i>	37
2.13.	Ensaio de hemaglutinação	38
2.14.	Ensaio em linhas tumorais humanas.....	38

2.14.1.	Condições de crescimento das linhas tumorais humanas	38
2.14.2.	Efeito anti-proliferativo de diferentes versões de frutalina recombinante em linhas tumorais humanas.....	39
2.15.	Análise estatística.....	40
Capítulo 3 Resultados e Discussão		Erro! Marcador não definido.
3.1.	Produção e purificação de frutalina recombinante em <i>P. pastoris</i>	43
3.2.	Construção da estirpe <i>P. pastoris</i> KM71H/pPICZ α A/frutalina recombinante+His ₆	49
3.3.	Produção e purificação de FTLHis ₆ em <i>P. pastoris</i>	51
3.4.	Caraterização da estabilidade de diferentes versões de frutalina recombinante	53
3.4.1.	<i>Dynamic Light Scattering</i>	53
3.4.2.	Ensaio de hemaglutinação.....	55
3.5.	Efeito anti-proliferativo das diferentes versões de frutalina recombinante em linhas tumorais humanas.....	56
Capítulo 4 Conclusões e Perspetivas futuras		61
4.1.	Conclusões	63
4.2.	Perspetivas futuras.....	65
Capítulo 5 Referências		67
Capítulo 6 Anexos		75
6.1.	Sequências	77

Lista de Figuras

Figura 1.1. Linha temporal de eventos-chave na investigação de lectinas tendo em vista a sua aplicação biomédica. (Adaptado de [5]).....	3
Figura 1.2. Indução de apoptose pela via extrínseca e intrínseca. Influência da proteína p53 na regulação de ambas as vias. A vermelho encontram-se os genes cuja expressão transcricional é regulada pela proteína p53. (Retirado de [2])	8
Figura 3.1. Expressão da frutalina recombinante em <i>P. pastoris</i> . Análise dos sobrenadantes das culturas em gel SDS-PAGE 4%-15% corado com <i>Coomassie blue</i>	42
Figura 3.2. Purificação da frutalina recombinante por HIC (estratégia 1). Análise dos passos de purificação em gel SDS-PAGE 4%-12% corado com nitrato de prata	43
Figura 3.3. Purificação de frutalina recombinante por HIC (estratégia 2). Análise dos passos de purificação em gel SDS-PAGE 4%-12% corado com nitrato de prata.....	44
Figura 3.4. Amostras resultantes das purificações por HIC. Análise em gel SDS-PAGE 4%-12%, corado com nitrato de prata, das amostras finais das versões de frutalina recombinante após as diferentes estratégias de HIC	46
Figura 3.5. Cromatogramas obtidos por SEC.....	47
Figura 3.6. Amplificação do gene da FTL e do vector pPICZ α A	48
Figura 3.7. Confirmação da inserção de gFTLHis ₆ no pPICZ α A por PCR de colónia.....	49
Figura 3.8. Confirmação da inserção de gFTLHis ₆ no genoma de <i>P. pastoris</i> por PCR de colónia.	49
Figura 3.9. Expressão da PprFTLHis ₆ em <i>P. pastoris</i> . Análise dos sobrenadantes das culturas em gel SDS-PAGE 4%-15% corado com <i>Coomassie blue</i>	50
Figura 3.10. Purificação da PprFTLHis ₆ por IMAC-Ni. Análise dos passos de purificação em gel SDS-PAGE 4%-15% corado com <i>Coomassie blue</i>	50

Figura 3.11. Ensaios de DLS das diferentes versões de frutalina recombinante. Distribuição "Tamanho vs Volume"	52
Figura 3.12. Análise estatística dos valores de GI ₅₀ em células HCT 116 p53 ^{+/+} de diferentes versões de frutalina recombinante de <i>P. pastoris</i> obtidas por diferentes metodologias de purificação	55

Lista de Tabelas

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens de <i>E. coli</i> e <i>P. pastoris</i> como sistemas de expressão [5, 37, 39].....	11
Tabela 2.1. Características da frutalina nativa e de diferentes versões de frutalina recombinante	22
Tabela 2.2. <i>Primers</i> utilizados	24
Tabela 2.3. Pesos moleculares das bandas do marcador <i>NZYDNA Ladder III</i>	26
Tabela 2.4. Estratégia de purificação por SEC	31
Tabela 2.5. Estratégias de purificação por HIC	32
Tabela 2.6. Estratégia de purificação por IMAC-Ni	33
Tabela 2.7. Composição dos géis SDS-PAGE	34
Tabela 2.8. Pesos moleculares das bandas do marcador <i>PageRuller Unstained Broad Range</i> ..	35
Tabela 2.9. Concentração da 1 ^a diluição de diferentes versões de frutalina recombinante testada nas linhas tumorais humanas	39
Tabela 3.1. Ensaio de DLS de diferentes versões de frutalina recombinante. Os valores para “r obtido” correspondem à média ± desvio-padrão de 10 leituras	52
Tabela 3.2. Atividade hemaglutinante da frutalina nativa e de diferentes versões de frutalina recombinante (concentração inicial ≈ 0,1 g/L)	53

Abreviaturas

AAL	<i>Agrocybe aegerita lectin</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMG	<i>Buffered minimal glycerol medium</i>
BMM	<i>Buffered minimal metanol medium</i>
cFLIP	<i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
ConA	<i>Concavalin A</i>
CV	Volume de coluna
dH ₂ O	Água destilada
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte
DO	Densidade ótica
EB	Tampão de eluição
EcrFTL	Frutalina recombinante produzida em <i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with death domain</i>
FasL	<i>Fas ligand</i>
FBS	Soro fetal bovino
Fh8	<i>Fasciola hepatica 8-kDa protein</i>
FTL	Frutalina
FW	<i>Forward</i>
GNA	<i>Galanthus nivalis agglutinin</i>
GSA	<i>Adenylyl cyclase-stimulatory G</i>
gJRLs	Lectinas relacionadas com a jacalina com afinidade de ligação à galactose
gFTL	galactose
HA	Gene da frutalina
HeLa	Atividade hemaglutinante
HIC	<i>Human cervical cancer cells</i>
His ₆	Cromatografia de interação hidrofóbica
HPA	Cauda de 6 histidinas
IAPs	<i>Helix pomatia agglutinin</i>
IMAC-Ni	Proteínas inibidoras da apoptose
JRLs	Cromatografia de afinidade ao níquel
kDa	Lectinas relacionadas com a Jacalina
LB	Kilodalton
miRNAs	<i>Luria-Bertani broth medium</i>
mJRLs	Micro-ácidos ribonucleicos

ML	Lectinas relacionadas com a jacalina com afinidade de ligação à manose
MVL	<i>Mistletoe lectin</i>
MW	<i>Microcystis viridis lectina</i>
Pb	Peso molecular
PBS	Pares de base
PCL	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polygonatum cyrtoneuma lectin</i>
pl	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHA	Ponto isoeléctrico
POL	<i>Phytohemagglutinin</i>
PprFTL	<i>Polygonatum odoratum lectin</i>
ROS	Frutalina recombinante produzida em <i>Pichia pastoris</i>
RV	Espécies de oxigénio reativas
SDS-PAGE	<i>Reverse</i>
SEC	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SOC	Cromatografia de exclusão molecular
SRB	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
TAE	Sulfarrodamina B
TCA	<i>Tris-acetate EDTA</i>
TEV	Ácido tricloroacético
TNF	<i>Tobacco etch virus</i>
TRADD	Fator de necrose tumoral
YE	<i>TNFR1 associated death domain protein</i>
YNB	<i>Extrato de levedura</i>
YPD	<i>Yeast nitrogen base medium</i>
WGA	<i>Yeast extract peptone dextrose medium</i>
uH ₂ O	<i>Wheat germ agglutinin</i> Água ultrapura

Capítulo 1

Introdução

1.1. Lectinas

As lectinas são um grupo heterogéneo de proteínas ou glicoproteínas com pelo menos um domínio não catalítico que reconhece seletivamente, e liga-se reversivelmente a diferentes resíduos de açúcares livres ou glicanos específicos, presentes em glicoproteínas e glicolípídios sem alterar a estrutura dos hidratos de carbono e, assim, desencadear vários processos celulares importantes [1, 3-6]. Além disso, a maioria das lectinas são capazes de aglutinar células, sendo assim frequentemente designadas como aglutininas [5, 7]. Inicialmente foram descobertas em plantas no final do século XIX e acreditava-se que estavam confinadas a esse reino. Posteriormente foram encontradas em diferentes organismos, que vão desde vírus a seres humanos, contudo são mais abundantes em plantas e, por conseguinte, são as lectinas mais estudadas [3, 5].

A classificação de lectinas em famílias está a evoluir e ainda não se chegou a um consenso devido à sua diversidade. Inicialmente foram classificadas com base nas estruturas das subunidades, como merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas [1, 5]. Posteriormente, foram classificadas tendo por base a estrutura tridimensional e a sequência de aminoácidos do domínio de ligação a hidratos de carbono, sendo as lectinas de plantas divididas em 12 famílias. Dessas 12 famílias, 3 têm sido amplamente estudadas pela relação que têm a vários processos patológicos, sendo elas, as lectinas relacionadas com a GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*), as lectinas relacionadas com a jacalina e as lectinas da família das *Ricin-B* [1, 5, 6].

Na figura 1 é apresentada uma perspetiva histórica dos eventos-chave na investigação de lectinas tendo em vista a sua aplicação biomédica (Fig. 1) [6].

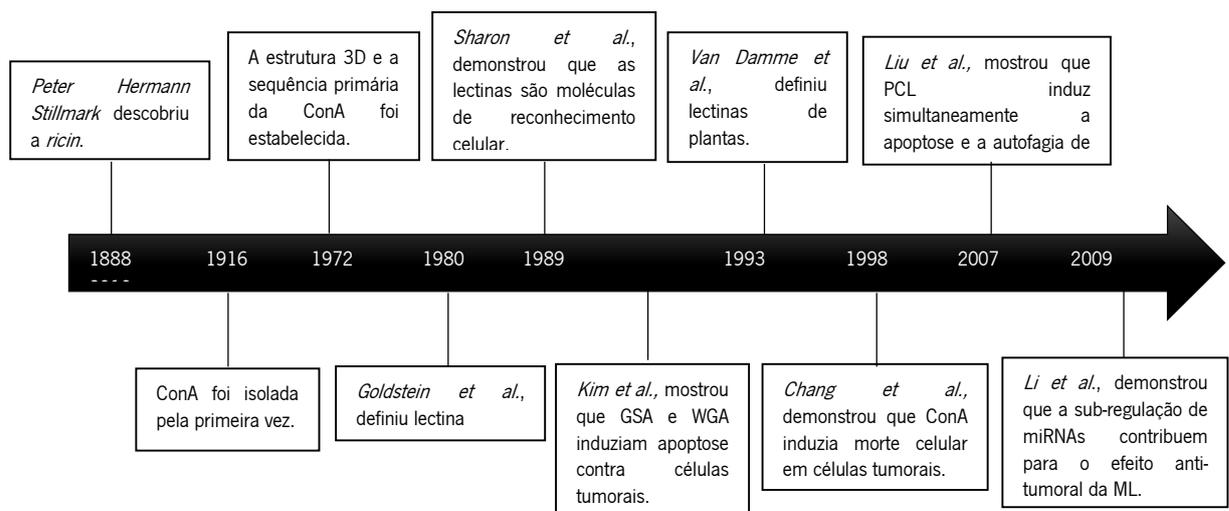


Figura. 1.1. Linha temporal de eventos-chave na investigação de lectinas tendo em vista a sua aplicação biomédica. (Adaptado de [5]).

1.1.1. Lectinas relacionadas com a jacalina

A família de lectinas relacionadas com a jacalina (JRLs) é uma pequena família que inclui todas as lectinas com similaridades estruturais e sequenciais à lectina jacalina (extraída das sementes de *Artocarpus integrifolia*, planta conhecida por jaca) [8]. Esta família divide-se em 2 sub-famílias de acordo com a sua especificidade para hidratos de carbono, as lectinas com afinidade de ligação à galactose (gJRLs) e as lectinas com afinidade de ligação à manose (mJRLs) [7–9]. As principais diferenças entre as 2 sub-famílias, além da especificidade, reside na estrutura, no processamento e na sua localização intracelular [7, 8].

Todas as gJRLs possuem uma estrutura e um processamento semelhante ao da jacalina [7, 8]. A jacalina é uma lectina tetramérica sintetizada como um precursor composto por uma sequência sinal de 21 aminoácidos, um pro-peptídeo de 39 aminoácidos, uma cadeia β de 20 aminoácidos, um *linker* tetrapeptídico (T-S-S-N) e uma cadeia α com 133 aminoácidos. Após o processamento pós-tradução, a sequência sinal (21 aminoácidos) e o pró-peptídeo (39 aminoácidos) são clivados, ocorre a excisão do *linker* tetrapeptídico originando 2 cadeias proteicas independentes (\square e \square) localizadas no vacúolo [7–9], e simultaneamente ocorre a geração de um aminoácido de glicina livre localizado no N-terminal da cadeia α . Este aminoácido parece ser essencial para a formação do domínio de ligação à galactose [9].

1.1.2. Frutalina

A frutalina (FTL) é a principal lectina de sementes de *Artocarpus incisa* (ou *Artocarpus altilis*), uma planta normalmente conhecida como fruta-pão [10, 11]. Esta lectina é parcialmente N-glicosilada e pertencente à família JRLs (encontradas na família Moraceae), por apresentar alta similaridade estrutural e sequencial com a jacalina. Mais precisamente, a frutalina pertence à sub-família gJRLs, por reconhecer especificamente resíduos de D-galactose [10–12]. Adicionalmente, esta lectina apresenta uma ampla gama de afinidades a outros açúcares como, D-manose e D-glucose [13].

Na sua forma nativa, a frutalina é uma glicoproteína tetramérica, constituída por 4 monómeros ligados por ligações não-covalentes onde cada monómero contém uma cadeia β e

uma cadeia α , formando 4 locais de ligação a açúcares com uma conformação predominantemente de folhas β e um peso molecular de 48-49 kDa [12, 14].

A frutalina é também caracterizada por uma atividade hemaglutinante (HA) forte e idêntica com eritrócitos humanos do sistema ABO e com eritrócitos de coelho, contudo esta atividade é 3 vezes superior à da jacalina [15]. Tal como a jacalina, a frutalina pode ser codificada por uma família de genes, cada um deles contendo 471 pb, correspondente a uma proteína de 157 aminoácidos, com um peso molecular calculado de 17,1 kDa, onde 20 aminoácidos correspondem à cadeia β , 4 aminoácidos ao *linker* e 133 aminoácidos à cadeia α (do N- para o C-terminal) [10]. Além disso, a análise do seu cDNA revelou a existência de isoformas com e sem possíveis locais de N-glicosilação [13].

Sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), a frutalina apresenta 2 bandas, em que a superior (15,5 kDa) corresponde às isoformas altamente glicosiladas da cadeia α , ao passo que a banda inferior (12 kDa) corresponde às isoformas ligeiramente glicosiladas ou não-glicosiladas da mesma cadeia. A cadeia β não é visível devido ao seu baixo peso molecular (2,1 kDa) [16].

A frutalina possui importantes propriedades biomédicas, entre elas destacam-se a de biomarcador tumoral [17], imunomodulador [18, 19], atividade anti-tumoral [20] e efeito protetor contra lesões gástricas [21].

1.1.3. Aplicações biomédicas relacionadas com o cancro

As lectinas apresentam uma diversidade de aplicações, sendo de especial interesse os diagnósticos biomédicos e a terapia contra o cancro [5]. Algumas lectinas têm sido utilizadas como biomarcadores tumorais para o diagnóstico e prognóstico de diferentes cancros, onde é observada uma glicosilação aberrante [5, 6, 22]. Dois exemplos disso são a frutalina e a HPA [3]. A frutalina foi capaz de reconhecer células malignas de tecidos da próstata e a lectina HPA (*Helix pomatia agglutinin*) recombinante (produzida em *Escherichia coli*) foi capaz de reconhecer as células tumorais no tecido de cancro da mama [17, 23].

Além de serem utilizadas como biomarcadores tumorais, as lectinas também possuem a capacidade de direcionar as células para a morte celular programada, apoptose e/ou autofagia, o que constitui uma possível aplicação biomédica [6].

Existem vários exemplos de lectinas com propriedades anti-tumorais. A lectina recombinante *Aviscume* expressa em *E. coli* foi usada em estudos pré-clínicos e clínicos e foram obtidos resultados positivos [24]. A lectina AAL (*Agrocybe aegerita lectin*) nativa e recombinante, expressa em *E. coli*, é conhecida por ter propriedades anti-tumorais [25]. Outra lectina com propriedades semelhantes é a jacalina recombinante expressa também em *E. coli*, que apresentou uma magnitude de citotoxicidade similar à jacalina nativa em 2 linhas tumorais humanas, A431 (carcinoma epidermóide) e HT29 (adenocarcinoma do cólon) [26]. A frutalina nativa e recombinante expressa em *Pichia pastoris*, mostrou também ter efeito citotóxico em células HeLa [20]. A lectina MVL (*Microcystis viridis lectin*) expressa em *E. coli* exibiu uma atividade anti-tumoral *in vitro* em 4 linhas tumorais HT29, SK-OV-3 (adenocarcinoma), SCG-7901 (adenocarcinoma do estômago) e HepG2 (carcinoma do fígado) [27].

1.1.4. Mecanismo de indução de apoptose

A apoptose é um mecanismo celular intrínseco para eliminar células prejudiciais e para a manutenção da homeostasia que ocorre em várias situações fisiológicas e patológicas, sendo caracterizada por fragmentação do DNA nuclear, condensação da cromatina e formação de vesículas na membrana [6, 28, 29].

As caspases são uma família de proteases envolvidas em ambas as vias do processo apoptótico (via extrínseca e via intrínseca) [29–31]. Inicialmente são produzidas como uma forma inativa, as pro-caspases monoméricas que requerem dimerização e clivagem para ativação e dividem-se em 2 grandes grupos, as caspases pro-apoptóticas (caspase-3, -6, -7, -8, -9), e as caspases pro-inflamatórias (caspase-1, -4, -5, -12). As caspases pro-apoptóticas foram subclassificadas tendo em conta o seu mecanismo de ação dando origem a 2 subgrupos, as caspases iniciadoras (caspase -8 e -9) e as caspases executoras (caspase -3, -6, e -7). As caspases iniciadoras ativam as caspases executoras que, posteriormente coordenam as suas atividades no sentido de degradar ou ativar proteínas estruturais chave. Uma vez ativada, uma caspase executora pode clivar e ativar outras caspases executoras, levando a uma acelerada ativação da cascata de morte [31].

Como referido anteriormente, a apoptose ocorre por 2 vias diferentes. A via extrínseca é desencadeada por sinais extracelulares sob a forma de ligandos que se ligam a recetores de morte, membros do fator de necrose tumoral (TNF) [29–31]. A ligação do ligando ao recetor de morte, com a ajuda das proteínas adaptadoras (FADD, TRADD), leva à associação à pro-caspase-8 através da dimerização do domínio efetor de morte. Neste ponto, forma-se um complexo de sinalização de indução de morte (DISC) que resulta na ativação autocatalítica da pro-caspase-8, e subsequentemente da caspase-8, iniciando o processo apoptótico por consequente ativação das caspases executoras [30, 31]. Contudo, o recetor de morte que medeia a apoptose pode ser inibido por uma proteína denominada c-FLIP que irá ligar-se à proteína adaptadora FADD e à caspase-8, tornando-as ineficazes [29, 32].

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada em resposta a sinais extracelulares e intracelulares, tais como danos no DNA, privação do fator de crescimento, perturbações no citoesqueleto, entre outros. Nesta via, a ativação das caspases está intimamente ligada à permeabilização da membrana mitocondrial externa [29, 32]. Na presença de um estímulo externo, as proteínas da família Bcl-2, os principais reguladores desta via, induzem a libertação do citocromo *c* da mitocôndria, que forma um complexo com a Apaf-1, o apoptossoma, que cliva a pro-caspase 9 e conduz à apoptose [29, 31, 33].

No final, ambas as vias convergem na ativação das caspases executoras-3, -6 e -7 que podem ser inibidas pelas IAPs (proteínas inibidoras da apoptose). Contudo a mitocôndria liberta a proteína Smac/DIABLO que inibe as IAPs, permitindo assim a correta ativação das caspases executoras e consequentemente a apoptose [29, 32, 33].

Além das caspases, também a proteína supressora tumoral p53 possui um papel muito importante na apoptose, podendo intervir em ambas as vias apoptóticas, ativando-as [34]. Na via extrínseca, a p53 ativa a indução de genes que codificam para os recetores de morte e os seus ligandos, induzindo assim apoptose [2]. Na via intrínseca, aumenta a expressão das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax, Noxas, Puma, Bid), que subsequentemente aumentam a permeabilização da membrana da mitocôndria libertando o citocromo *c* [35].

A proteína Bid distingue-se das outras proteínas da família Bcl-2 pela sua capacidade de ligar a ativação dos recetores de morte (via extrínseca) à ativação dos processos mitocondriais (via

intrínseca). Esta proteína é ativada pela caspase-8, insere-se na membrana da mitocôndria e ativa a proteína Bax, iniciando os eventos mitocondriais que conduzem à formação do apoptossoma. A p53 não só intervém em cada uma das vias apoptóticas, como parece promover a convergência de ambas através da proteína Bid [2]. Além destes genes alvo, a p53 também induz diretamente a expressão da caspase-6 em resposta ao DNA danificado [2].

A inativação da via das caspases e/ou p53 está envolvida no desenvolvimento de tumores e na resistência à terapia [28, 31]. A figura 1.2 representa o processo apoptótico pela via extrínseca e intrínseca, assim como o envolvimento da p53 em ambas as vias.

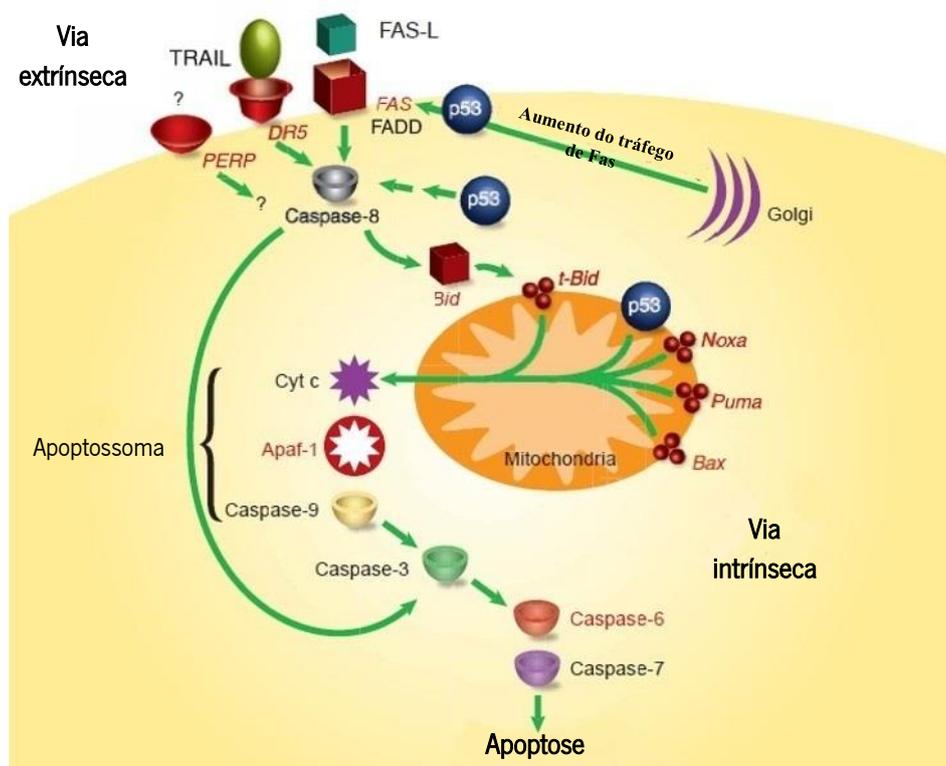


Figura 1.2. Indução de apoptose pela via extrínseca e intrínseca. Influência da proteína p53 na regulação de ambas as vias. A vermelho encontram-se os genes cuja expressão transcricional é regulada pela proteína p53. (Adaptado de [2]).

Algumas lectinas pertencentes a diferentes famílias têm a capacidade de induzir a apoptose em diferentes células tumorais e por diferentes vias. Como exemplos são as lectinas, PCL (*Polygonatum cyrtonema lectin*) e POL (*Polygonatum odoratum lectin*) pertencentes à família de lectinas relacionadas com a GNA, ML-I (*Mistletoe lectin I*) e Ricin, pertencentes à família da Ricin-B e ConA (*Concavalina A*) pertencente ao grupo das lectinas com domínio das leguminosas [6].

A lectina PCL induz apoptose através da regulação das proteínas da família da Bcl-2, que alteram o potencial da membrana mitocondrial, provocando a libertação do citocromo *c*, subsequente ativação das caspases e acumulação de espécies reativas de oxigénio (ROS), ativando as proteínas p38 e p53 [1, 6]. A lectina ML-I induz a apoptose de forma semelhante, contudo neste mecanismo de indução de apoptose não há ativação da p53 [1, 6].

A lectina POL induz apoptose pelas vias intrínseca e extrínseca, dependente das caspases. Pela via extrínseca, atua aumentando os níveis Fas ligando (FasL), levando à subsequente ativação da caspase-8. Pela via intrínseca, altera o potencial da membrana mitocondrial, libertando o citocromo *c* e subsequente ativação das caspases executoras, tal como a lectina ConA [1, 6]. A lectina *Ricin* induz a apoptose através da regulação da caspase-8, sendo assim uma lectina indutora de apoptose pela via extrínseca [1, 6].

1.2. Produção de lectinas em sistemas de expressão recombinantes

A extração de lectinas das suas fontes naturais tem vários inconvenientes; é um processo demorado, exige uma grande quantidade de biomassa e os rendimentos são baixos. Além disso, existe o problema de muitas lectinas serem um mistura de isoformas que podem possuir diferentes afinidades e/ou especificidades de ligação, resultando em atividades biológicas distintas e originar uma variabilidade de resultados indesejável quando usadas como ferramentas biomédicas [5].

Assim, a produção heteróloga de lectinas, usando a tecnologia de DNA recombinante em diferentes sistemas de expressão microbianos e não-microbianos, podem amenizar esses potenciais problemas. Esta estratégia permite a produção de lectinas com níveis mais elevados de pureza e uma sequência de aminoácidos definida, permitindo assim um maior controlo das propriedades finais [5].

O sistema de expressão microbiano de primeira escolha para expressar lectinas recombinantes de diversos organismos e, especialmente de plantas, é a bactéria *E. coli*, seguida da levedura *P. pastoris* [5, 36]. *E. coli* possui inúmeras vantagens, como simplicidade do processo, contudo o seu uso está limitado devido aos problemas associados à falta de modificações pós-tradução [5, 36, 37]. A levedura *P. pastoris* é um eucariota simples, e, portanto, capaz de

modificações pós-tradução, embora em muitos casos tenha um padrão de glicosilação não otimizado [36].

A bactéria *E. coli* como sistema de expressão apresenta inúmeras vantagens como taxa de crescimento rápido, genética simples que permite uma modificação rápida e precisa do seu genoma, rápida expressão, facilidade de cultivo, elevada produção e baixo custo [5, 37]. Neste sistema, a expressão no citoplasma é o método mais simples e com rendimentos mais altos e, portanto, o mais frequentemente usado. No entanto, a sobre-expressão de proteínas heterólogas pode ter um efeito citotóxico levando à formação de corpos de inclusão (ocorrendo em 90% dos casos de expressão de lectinas) [5], sendo estes frequentemente inativos e insolúveis [36, 37].

Contudo, o uso de *E. coli* como sistema de expressão está limitado devido aos problemas associados ao correto enrolamento da proteína e à falta de modificações pós-tradução como a glicosilação ou a formação de pontes dissulfureto, não deixando de ser um excelente sistema de expressão para produção de lectinas recombinantes não-glicosiladas [5, 36, 37]. São exemplos de lectinas produzidas neste sistema de expressão, jacalina, PCL, *Aviscumine* e AAL [5].

As leveduras são mais adequadas do que as bactérias para a expressão de lectinas a partir de eucariotas, sendo escolhidas por superarem os baixos rendimentos de lectinas solúveis expressas em bactérias, ou devido à facilidade de modificações pós-tradução, tais como a glicosilação ou o correto enrolamento das proteínas. As leveduras utilizadas para a expressão e produção de lectinas recombinantes incluem *Saccharomyces cerevisiae* e *P. pastoris*, sendo a última a mais amplamente utilizada por oferecer uma maior capacidade de produção e, especialmente, de secreção [5, 36, 37]. Este sistema de expressão tem-se tornado atrativo por combinar as vantagens dos sistemas de expressão procariotas e eucariotas [5], além de as células crescerem rapidamente a altas densidades celulares, o nível de expressão do produto pode ser regulado por simples manipulação do meio [36, 37].

P. pastoris é uma levedura metilotrófica, ou seja, tem a capacidade de utilizar o metanol como a única fonte de carbono e energia [36, 37] e é de simples manipulação tal como as bactérias [5]. Outra vantagem reside no facto de as proteínas poderem ser expressas a níveis elevados e segregadas para o meio de crescimento, o que facilita a purificação, devido às baixas quantidades de proteínas secretadas pelo hospedeiro [5, 37]. A secreção para o meio de

crescimento requer a presença de uma sequência de sinal na proteína expressa para destiná-la para as vias secretoras, sendo a mais usada o α -factor de *S. cerevisiae* [5].

O sistema baseado no promotor *AOX1* é o mais usado para expressão de proteínas em *P. pastoris*. Neste sistema é geralmente usado o glicerol para aumentar a biomassa, a que segue uma cultura de indução com metanol, onde o promotor *AOX1* regula a expressão de proteínas recombinantes a altos níveis [5, 37].

Outra característica importante desta levedura é a sua capacidade de realizar modificações pós-tradução, como a formação de pontes de dissulfureto, o processamento proteolítico e a glicosilação, especialmente relevante na produção de produtos farmacêuticos, a fim de serem biologicamente ativos. No entanto, o padrão de glicosilação consiste em vários resíduos de manose que diferem significativamente da glicosilação dos eucariotas superiores, e o alto conteúdo em manose pode alterar (reduzir) a atividade e até a estabilidade da proteína [36, 38]. São exemplos de lectinas produzidas em *P. pastoris*, a frutalina, a PHA (*Phytohemagglutinin*), a AAL, entre outras [5].

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens de *E. coli* e *P. pastoris* como sistemas de expressão [5, 37, 39].

Sistema de expressão	Vantagens	Desvantagens
<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rápida expressão e de baixo custo - Rendimentos elevados - Facilidade de cultura e de modificações no genoma - Indicado para a produção de lectinas que não necessitam de modificações pós-tradução 	<ul style="list-style-type: none"> - Proteínas com pontes dissulfureto difíceis de expressar - Produção de proteínas não glicosiladas - Proteínas produzidas com endotoxinas - Proteínas produzidas como corpos de inclusão
<i>P. pastoris</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Rendimentos moderados - Estirpes de produção estável - Crescimento de alta densidade - Alta produtividade - Rápido crescimento em meios quimicamente definidos - Processamento do produto semelhante a células de mamíferos - Pode auxiliar o re-enrolamento de proteínas - Pode glicosilar proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil produção de proteínas de membrana - Modificações pós-tradução baixas - Condições de cultura podem requerer otimização - Re-enrolamento pode ser necessário - Glicosilação com elevado teor em manose

1.3. Produção e aplicação de frutalina recombinante

Considerando as potenciais aplicações biomédicas da frutalina, é muito importante desenvolver uma estratégia para melhorar a sua produção [10]. Para isso, a frutalina foi produzida quer em *E. coli* quer em *P. pastoris*, para produção de frutalina não-glicosilada e glicosilada, respetivamente [10, 16].

1.3.1. Produção em *E. coli* e *P. pastoris*

Diferentes estratégias foram levadas a cabo para a produção de frutalina recombinante em *E. coli* sem parceiro de fusão, no entanto estas resultaram na produção de frutalina predominantemente sob a forma de proteína insolúvel. Ainda assim, foi possível purificar e caracterizar a frutalina recombinante a partir da fração solúvel dos extratos de *E. coli*. Esta proteína migrou em géis SDS-PAGE como uma única banda com 17 kDa, indicando que não ocorreu a excisão do *linker*. Além disso, apresentou atividade hemaglutinante (HA) em eritrócitos de coelho, apesar de ser necessário mais tempo para esta atividade ocorrer em relação à frutalina nativa. Ou seja, a HA não é estritamente dependente da clivagem do *linker* [13]. Em ensaios de inibição de HA a frutalina produzida demonstrou especificidade por galactose [10].

Tendo em conta os baixos rendimentos de produção, foi de seguida usada a tecnologia de proteínas de fusão, de modo a aumentar o rendimento, a solubilidade, o enrolamento e a facilitar a purificação. Esta tecnologia permitiu aumentar os rendimentos da gama dos µg para mg de proteína ativa por litro de cultura de *E. coli*, ao mesmo tempo que simplificou o processo de produção e purificação [40].

Relativamente à posição dos *tags* de fusão o N-terminal parece ser uma boa opção para a expressão da frutalina, uma vez que vai permitir que o parceiro de fusão seja traduzido em primeiro lugar, proporcionando o enrolamento correto [41].

A introdução do *tag* de fusão Fh8 (uma pequena proteína de 8 kDa de *Fasciola hepatica*), permite aumentar a solubilidade, e o seu baixo peso molecular dá-lhe uma vantagem sobre *tags* maiores, oferecendo uma avaliação mais confiável da solubilidade da frutalina quando expressa como uma proteína de fusão [41]. Contudo, o *tag* poderá ter influência nas propriedades funcionais

da frutalina, sendo necessária a sua remoção, geralmente feita em locais de clivagem específicos incluídos entre o *tag* de fusão e a proteína-alvo. No caso da inserção do *tag* Fh8 na frutalina, este pode ser retirado com sucesso através da clivagem com a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*), dando origem à frutalina clivada da EcrFh8FTL, a EcrCFTL [41]. Neste caso, verificou-se que o Fh8 aumentou a estabilidade e não interferiu com a HA nem com a estrutura de ambas as versões de frutalina (EcrFh8FTL e EcrCFTL) [42].

De modo a facilitar a purificação o *tag* His₆, um péptido de 6 histidinas, pode ser geneticamente fundido à frutalina, tanto no N-terminal como no C-terminal, permitindo a sua purificação por cromatografia de afinidade ao níquel (IMAC-Ni) [40, 41]. Este *tag* é um dos *tags* de purificação mais usados e apresenta várias vantagens, entre elas, é pequeno e a sua carga raramente interfere com a função e a estrutura da proteína, pode ser usado sob condições nativas ou desnaturantes e as proteínas alvo podem ser eluídas sob condições suaves, por competição com imidazole ou decréscimo no pH [40].

Porém, a frutalina produzida em *E. coli* é não glicosilada e a ausência de glicanos podem afetar as propriedades funcionais da frutalina, uma vez que a frutalina nativa é uma proteína parcialmente glicosilada. Para contornar esta questão a frutalina foi produzida num organismo capaz de conferir glicosilação, nomeadamente a levedura *P. pastoris*. O gene da frutalina foi otimizado e integrado no genoma de *P. pastoris* em fusão com o C-terminal do α -factor, para produção de frutalina extracelular, e sob o controlo do promotor indutível por metanol *AOX1* [16].

Como observado em *E. coli*, o *linker* também não foi clivado em *P. pastoris*, o que sugere que este processamento é específico de eucariotas superiores, além disso a sequência do α -factor não foi totalmente removida resultando numa repetição Glu-Ala na extremidade N-terminal, provocando um decréscimo de pI de 8 para 5 [16].

Como esperado a frutalina expressa em *P. pastoris* foi glicosilada, uma vez que a sua sequência de aminoácidos tem um potencial local de glicosilação (α -Asn74), e por essa mesma razão o seu peso molecular tem mais 2,8 kDa que a frutalina expressa em *E. coli* [20]. Ao contrário da frutalina nativa, a frutalina glicosilada não aglutina eritrócitos de coelho, apesar de também possuir estrutura tetramérica [16], o que sugere que o padrão de glicosilação da frutalina expressa

em *P. pastoris* inibe a HA [3]. Contudo é necessário ter em atenção que a isoforma clonada em *E. coli* não é a mesma que a clonada em *P. pastoris*, apesar de terem 93% de identidade [13].

Relativamente à afinidade de ligação a hidratos de carbono, a frutalina recombinante glicosilada mostrou especificidade por Me- α -galactose e uma afinidade menor por este açúcar do que a frutalina nativa [13].

1.3.2. Purificação de frutalina recombinante

O processo de purificação é um passo crítico no desenvolvimento comercial de produtos biotecnológicos, sendo esta a etapa mais dispendiosa da estratégia de produção de uma proteína recombinante [43]. Ao projetar uma estratégia de purificação, deve-se considerar o objetivo final da proteína-alvo a ser purificada. No caso de proteínas recombinantes, mais concretamente lectinas, para aplicações biomédicas é requerido um grau de pureza de nível elevado podendo desse modo, ser necessário vários passos de purificação subsequentes [40].

As metodologias de purificação permitem separar de acordo com as diferenças entre as propriedades da proteína a ser purificada (a proteína-alvo - frutalina), e as propriedades de outras substâncias presentes na amostra [40, 44]. Algumas dessas propriedades são o tamanho, a hidrofobicidade e a ligação a iões metálicos, sendo as metodologias usadas, a cromatografia de exclusão molecular (SEC), a cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) e a cromatografia de afinidade a ião metálico (IMAC), respetivamente [40, 44].

A cromatografia de exclusão molecular (SEC) permite separar proteínas com diferentes tamanhos moleculares sob condições suaves. Contudo esta metodologia resulta geralmente numa diluição da amostra. De modo a aumentar o rendimento, a amostra poderá ser previamente concentrada, porém o volume carregado na coluna deverá ser mantido pequeno (0,5% a 2% do volume total da coluna), tal como o fluxo deverá ser mantido baixo para obter uma máxima resolução. A eluição é feita num tampão único e sem gradiente, este tampão é selecionado de acordo com o tipo de amostra, de modo a manter a atividade da proteína-alvo, que no caso da frutalina deverá ser PBS com pH 7,4, contudo existem versões de frutalina em que o pH tem de ser alterado [40, 44]. Adicionalmente esta metodologia permite a determinação do peso molecular

correspondente [44], tendo sido já usada em trabalhos anteriores para a purificação de frutalina recombinante [10, 16, 45].

A cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) separa as proteínas de acordo com as diferenças na sua hidrofobicidade de superfície, utilizando uma interação reversível entre as regiões não polares na superfície destas proteínas e os ligandos hidrofóbicos imobilizados no meio de cromatografia. As proteínas são separadas de acordo com as diferenças na quantidade de aminoácidos hidrofóbicos expostos. Inicialmente é usada uma elevada concentração de sal de modo a alterar a conformação das proteínas e a expor os resíduos hidrofóbicos e, assim, ligar-se ao meio. Para realizar a eluição são feitas alterações no tampão com um decréscimo contínuo ou gradual na concentração de sal, de modo a que as proteínas ligadas sejam eluídas de forma diferenciada [40, 44].

A interação entre as proteínas hidrofóbicas e o meio de HIC é significativamente influenciado por vários parâmetros tais como; o tipo e concentração de sal, uma concentração elevada de sal melhora a interação, enquanto uma diminuição da concentração de sal enfraquece a interação; o pH, um aumento do pH enfraquece a interação hidrofóbica e uma diminuição do pH pode resultar num aumento das interações hidrofóbicas; a temperatura, o aumento da temperatura melhora a retenção de proteína; entre outros [40]. Esta metodologia de purificação foi também usada em proteínas contendo o *tag* de solubilidade Fh8, inclusive para uma versão de frutalina recombinante contendo este *tag* [46].

Além da purificação de proteínas, a metodologia HIC oferece várias potencialidades, sendo descrita como uma das estratégias mais utilizadas para a remoção de endotoxinas e para o reenrolamento de proteínas [40].

Outra metodologia de cromatografia usada para a purificação de frutalina recombinante é a cromatografia de afinidade, este método de purificação separa as proteínas por meio de uma interação reversível entre a proteína-alvo (frutalina) e um ligando específico ligado a uma matriz cromatográfica. A interação pode ser realizada por meio de um anticorpo (interação bioespecífica), ou por meio de um íon metálico imobilizado (interação não-bioespecífica) ou substância corante. Um exemplo de cromatografia de afinidade não-bioespecífica é IMAC, baseado na interação de proteínas com resíduos de histidina (ou triptofano e Cys) na sua superfície com íões de metálicos

bivalentes (por exemplo, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺) [40, 44]. Esta metodologia de purificação foi também usada para a purificação de outras lectinas como PCL, HPA e AAL, bem como para a purificação de frutalina recombinante expressa em *E. coli* contendo o *tag*His₆ [23, 25, 41, 47].

Esta metodologia geralmente oferece alta seletividade e resolução. A amostra é primeiro ligada ao ligando usando as condições favoráveis à ligação. Em seguida, o material não ligado é retirado por lavagem da coluna e a eluição da proteína pura é conseguida usando um ligando competitivo (imidazole no caso de IMAC-Ni) ou por alteração do pH, força iônica ou polaridade. Esta estratégia de purificação pode beneficiar da utilização da tecnologia de DNA recombinante, para fundir o marcador de afinidade com a proteína de interesse, durante a clonagem [40]. Geralmente as proteínas marcadas com histidina têm uma grande afinidade devido à quantidade de resíduos que possuem, 6 a 10 [40].

1.3.3. Aplicações biomédicas

A frutalina recombinante desempenha um papel importante em aplicações biomédicas, e por essa razão foram realizados estudos com a frutalina recombinante expressa em *P. pastoris*, de modo a avaliar a sua atividade como biomarcador tumoral e como uma lectina capaz de induzir a apoptose, por comparação com a frutalina nativa [17, 20].

De modo a verificar a sua potencialidade como biomarcador tumoral, foram realizados ensaios de imunohistoquímica em tecidos humanos da próstata, e foi possível verificar que a frutalina nativa se liga a todas as células apesar da sua ligação ser mais forte a células neoplásicas do que a células hiperplásicas. Por outro lado, a frutalina recombinante foi mais específica pois apenas se ligou a células neoplásicas, apesar de não reconhecer todos os casos de neoplasia estudados [17]. Esta diferença no reconhecimento de células talvez seja devido à diferença existente na afinidade de ligação a açúcares entre a frutalina nativa e a frutalina recombinante [16]. Ou seja, este estudo permitiu concluir que a frutalina recombinante tem um maior potencial como biomarcador tumoral do que a frutalina nativa [17].

Em ensaios *in vitro*, a frutalina recombinante de *P. pastoris* mostrou ter uma forte atividade citotóxica na proliferação de células HeLa, induzindo a morte celular por apoptose [20]. Este efeito foi irreversível e dependente do tempo e da dose (GI₅₀ ≈ 100 µg/mL ≈ 5,85 µM). Resultados

idênticos foram obtidos com a frutalina nativa no mesmo estudo. Isto significa que a ação da frutalina em células tumorais não é exclusivamente dependente das propriedades de ligação a hidratos de carbono. Neste estudo foi também possível concluir que a frutalina nativa e a recombinante mostraram ter atividade de migração nuclear em células HeLa [20].

Mais recentemente foi realizado um estudo com a frutalina recombinante produzida em *P. pastoris*, de modo a elucidar qual o mecanismo de indução de apoptose. Para isso foram realizados ensaios em levedura com as principais proteínas envolvidas no mecanismo de apoptose, as caspases executoras e a família da p53, bem como ensaios em linhas celulares do adenocarcinoma do cólon, HCT 116, uma delas contendo a forma nativa da p53, HCT 116 p53^{+/+}, e a sua derivada isogénica em que o gene p53 foi silenciado, HCT 116 p53^{-/-}. Os resultados obtidos sugerem que a frutalina induz apoptose numa via dependente de caspases e independente da p53 [46].

1.4. Objetivos deste trabalho

Em estudos anteriores a frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* e purificada por SEC mostrou ter um potente efeito citotóxico em células do cancro do cólon do útero (HeLa) e na linha celular do adenocarcinoma do colón, HCT 116, sendo este efeito devido à indução de morte celular por apoptose por uma via dependente das caspases e independente da p53 [20, 46]. No entanto a purificação por SEC limita a aplicação da frutalina recombinante uma vez que é um processo demorado e resulta em amostras muito diluídas, pelo que metodologias alternativas à sua purificação são necessárias.

A frutalina foi também produzida em *E. coli* recorrendo à tecnologia de proteínas de fusão, nomeadamente ao *tag* de solubilidade Fh8, numa tentativa de otimizar o processo de produção e purificação de frutalina recombinante, porém esta não inibiu a proliferação da linha celular HCT 116 [46]. Este resultado pode ser atribuído à presença do parceiro de fusão (Fh8) ou à ausência da glicosilação uma vez que a frutalina recombinante de *P. pastoris* é glicosilada.

Para elucidar a importância da glicosilação, foi avaliada a atividade citotóxica de duas amostras de frutalina recombinante contendo diferentes graus de glicosilação, produzidas em *P. pastoris* e purificadas por HIC. Ambas as amostras foram obtidas por casualidade numa tentativa

de otimização do processo de purificação. A amostra enriquecida na fração glicosilada mostrou ter efeito na inibição da proliferação celular, apesar de ter sido menor do que o da frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* e purificada por SEC, enquanto a amostra desfavorecida na fração glicosilada não teve efeito anti-proliferativo na linha celular HCT 116 [46]. Estes resultados sugeriram que a glicosilação possa ser essencial para a atividade citotóxica da frutalina mas necessitam de ser confirmados uma vez que um único ensaio foi realizado.

De modo a elucidar os resultados obtidos anteriormente, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico de outras versões de frutalina recombinante produzidas em *E. coli* e de versões produzidas em *P. pastoris* e purificadas por diferentes metodologias. Os objetivos específicos incluíram:

(1) Clonagem e produção de frutalina em *P. pastoris* contendo o *tag*His₆ no C-terminal e estudo do seu efeito na proliferação de linhas tumorais humanas (HCT 116);

(2) Estudo de novas metodologias de purificação de frutalina recombinante produzida em *P. pastoris* (HIC e IMAC);

(3) Estudo do efeito de diferentes versões de frutalina recombinante produzida em *E. coli* (EcrHis₆FTL e EcrCFTL) na proliferação de linhas tumorais humanas;

(4) Caracterização da estabilidade de diferentes versões de frutalina recombinante no que respeita à sua estrutura e atividade hemaglutinante.

Capítulo 2

Materiais e Métodos

2.1. Esterilização de materiais, soluções e meios de cultura

Os materiais, soluções e meios de cultura termorresistentes foram esterilizados por calor húmido em autoclave a 121°C durante 20 min e a pressão de 1 bar. Para soluções termolábeis o método de esterilização usado foi a filtração com filtros estéreis de 0,2 µm e para materiais termolábeis o método usado foi a exposição a radiação ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm durante 20 min.

2.2. Estirpes e vetores

Neste trabalho foi usada a estirpe *Escherichia coli* NZ5α (NZYTech) e 3 estirpes de *Pichia Pastoris*: *P. pastoris* KM71H; *P. pastoris* KM71H/pPICZαA/frutalina recombinante [16], e *P. pastoris* KM71H/pPICZαA/frutalina recombinante+His₆ (construída neste trabalho).

Foi também utilizado o vetor pPICZαA (*Invitrogen*), para construir uma das estirpes usadas, a *P. pastoris* KM71H/pPICZαA/frutalina recombinante+His₆.

2.3. Proteínas

Neste trabalho foi usada a frutalina nativa e 7 versões de frutalina recombinante, 3 dessas versões foram produzidas em *E. coli*, EcrHis₆FTL, EcrFh8FTL e EcrCFTL, e as restantes 4 versões foram produzidas em *P. pastoris*, PprFTL-SEC A; PprFTL-SEC B; PprFTL-HIC A; PprFTL-HIC B e PprFTLHis₆. As versões de frutalina produzidas em *E. coli* e a versão PprFTL-SEC A foram produzidas e purificadas em trabalhos anteriores [42]. A PprFTL-SEC A e a PprFTL-SEC B diferem uma da outra no tempo de armazenamento e no investigador que a produziu, a A esteve armazenada a -20°C durante 6 meses e foi produzida num trabalho anterior, a B apenas esteve armazenada 1 mês e foi produzida neste trabalho. Relativamente à PprFTL-HIC A e PprFTL-HIC B a diferença reside na glicosilação, a A é enriquecida na fração glicosilada e a B desfavorecida nesta fração.

Na tabela 2.1 encontram-se algumas das características das versões usadas. Estas características foram calculadas tendo por base as sequências de aminoácidos de cada versão de frutalina recombinante (anexo 1) recorrendo à ferramenta *ProtParam* do *software online ExPASy*.

Tabela 2.1. Características da frutalina nativa e de diferentes versões de frutalina recombinante

Nomenclatura das frutalinas	Sistema de expressão	Metodologia de purificação	Nº aminoácidos	Peso molecular (kDa)	pI teórico	Coefficiente de extinção	Abs 0,1% (=1g/L)
FTL nativa	Fruta-pão	Galatomanana reticulada de <i>A. pavanina</i>	153	16,7	8,75	24410	1,46
EcrHis₆FTL*		IMAC-Ni	186	20,5	7,10	27390	1,34
EcrFh8FTL**	<i>E. coli</i>	IMAC-Ni	247	27,2	7,16	25900	0,95
EcrCFTL***		IMAC-Ni	162	17,5	8,75	24410	1,40
PprFTL-SEC		SEC	163	17,8	5,35	27390	1,54
PprFTL-HIC	<i>P. pastoris</i>	HIC	163	17,8	5,35	27390	1,54
PprFTLHis₆*		IMAC-Ni	165	18,2	7,30	27390	1,51

*His₆- Tag de purificação de 6 histidinas

**Fh8- Tag de solubilidade (*Fasciola hepatica* com 8kDa)

***C- clivagem com a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*) de Fh8FTL

2.4. Condições de armazenamento de bactérias e leveduras

As culturas de bactérias e leveduras foram armazenadas por um período máximo de 2 semanas a 4°C em placas de agar invertidas com os meios de crescimento LB ou YPD e seladas com parafilme. Para as bactérias foi usado o meio LB e para as leveduras o meio YPD. Além disso, para armazenar a nova estirpe construída foram feitos *stocks* permanentes com o meio de crescimento, LB ou YPD dependendo da estirpe em causa, suplementado com 30% de glicerol e armazenados a -80°C por tempo indeterminado.

LB

1% (p/v) Triptona

1% (p/v) NaCl

0,5% (p/v) YE

2% (p/v) Agar

pH 7,5 ajustado com NaOH 10N

YPD	2% (p/v) Glucose
	2% (p/v) Peptona
	1% (p/v) YE
	2% (p/v) Agar

2.5. Condições de armazenamento de DNA

As soluções de DNA foram armazenadas a -20°C em tampão EB ou em água ultrapura (uH₂O) estéril.

EB	10 mM Tris
	pH 8,5 ajustado com HCl

2.6. Construção da estirpe *P. pastoris* KM71H/pPICZαA/frutalina recombinante+His₆

2.6.1. Extração de DNA plasmídico

2.6.1.1. Preparação das células

A estirpe de *E. coli* com o vector pPICZαA foi colocada a crescer em 10 mL de LB *low salt* com 25 µg/mL de Zeocina™ (*Invitrogen*) a 37°C e 200 rpm durante a noite para posterior isolamento do DNA plasmídico.

LB <i>low salt</i>	1% (p/v) Triptona
	0,5% (p/v) NaCl
	0,5% (p/v) YE
	pH 7,5 ajustado com NaOH 10N

2.6.1.2. Método de extração

De modo a obter grandes quantidades de DNA plasmídico com elevada pureza foi usado o kit *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma)*. O protocolo foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, à exceção do passo de eluição onde foi diminuída a quantidade de tampão EB de 100 µL para 50 µL, de modo a obter uma concentração mais elevada de DNA.

2.6.2. Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

A amplificação de DNA por PCR foi realizada com 2 enzimas diferentes. A amplificação dos fragmentos de sub-clonagem foi realizada com a *Vent_r DNA polymerase (NEB)*, enquanto a técnica de PCR de colônia foi realizada com a *NZYTaq DNA polymerase (NZYTech)*.

2.6.2.1. Amplificação de gFTL

O gFTL foi amplificado por PCR com a *Vent_r DNA polymerase* e com os *primers* da tabela 2.2 a partir do DNA molde de *P. pastoris* KM71H/pPICZαA/ frutalina recombinante [16]. Com a finalidade de colocar o *tag* His₆ e assim obter gFTLHis₆. A mistura de reação foi feita com 6 µL de vetor KM71H/pPICZαA/frutalina recombinante (DNA molde), 1 µL de cada *primer* a 25 µM, 1,5 µL de dNTPs (*NZYTech*) a 10 mM, 1 µL de MgSO₄ (*NEB*) a 100 mM, 5 µL de tampão 10x (*NEB*) e 34 µL de uH₂O de modo a perfazer o volume final de 50 µL. A amplificação do gene foi realizada, com um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 45 s de desnaturação a 95°C, 45 s de emparelhamento a 55°C e 1 min de extensão a 72°C, e com uma extensão final de 10 min a 72°C.

Tabela 2.2. *Primers* utilizados

<i>Primers</i>	Sequência	T _m (°C)
α_Histag_Kpnl_RV	5'- GGGGTACCTCAATGATGATGATGATGATGCAAAGACAAGTACATGGAG -3'	65,7
β_FW	5'- CTCGAATTC AATCAACAATCTGG -3'	52,2

2.6.2.2. PCR de colônia

A técnica de PCR de colônia foi usada para verificar a correta inserção e orientação do fragmento de interesse no plasmídeo e no genoma de *P. pastoris*. Nesta técnica foi usada a ponta de um palito estéril para adicionar à parte inferior de um tubo de PCR uma pequena quantidade de cada colônia de células. De seguida, os tubos foram levados ao micro-ondas em 2 ciclos de 45 s a 900 W e imediatamente colocados em gelo. A mistura de reação foi preparada, por colônia, com 2 µL de tampão 10x, 0,6 µL de dNTPs (*NZYTech*) a 10 mM, 0,8 µL de MgCl₂ (*NZYTech*) a 150 mM, 0,4 µL de cada *primer* a 25 µM (tabela 2.2), 0,4 µL de *NZYTaq DNA polymerase* e 15,4

μL de uH_2O de modo a perfazer o volume final de $20 \mu\text{L}$. Além disso, foi incluído um controlo negativo apenas com a mistura de reação, e um controlo positivo com o DNA molde e a mistura de reação. A amplificação foi realizada de igual modo ao usado na amplificação com a *Vent_rDNA polymerase*.

2.6.3. Quantificação de DNA

A quantificação de DNA foi realizada usando o *Nanodrop 1000* que mede a absorvância a 260 nm e converte-a automaticamente em valores de concentração em $\text{ng}/\mu\text{L}$. Além da concentração, o *Nanodrop* também permite determinar a pureza da amostra. Esta é dada pela razão entre a absorvância a 260 nm e a 280 nm . Um valor de $1,8$ é geralmente aceite como indicativo de uma amostra pura, valores mais baixos podem indicar a presença de proteína, fenol ou outros contaminantes. Uma segunda medida da pureza, é a razão entre a absorvância a 260 e 230 nm , a qual deve estar no intervalo de $1,8-2,2$. Uma proporção significativamente menor pode indicar a presença de contaminantes, como proteínas e fenol.

2.6.4. Eletroforese de DNA

A análise dos fragmentos de DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

2.6.4.1. Gel de agarose

Aos géis foi adicionado *Green Safe Premium (NZYTech)* para marcar o DNA e a cada amostra foi adicionado o corante *Loading Dye 1x* que permitiu a monitorização da corrida e aumentar a densidade das amostras, tornando-as mais densas do que o tampão de corrida e permitindo-lhes assim, penetrar no poço. A corrida eletroforética foi realizada entre 70 e 100 V em tampão TAE $1x$, até que o corante migrasse $2/3$ do comprimento total do gel. No final, os géis foram visualizados e fotografados no aparelho *Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+Imaging System (Bio-Rad)* e analisados no *software Image Lab 4.0*.

Gel de agarose

1% (p/v) agarose dissolvida em Tampão TAE $1X$

$0,006\%$ (v/v) *Green Safe Premium*

Tampão TAE 50x	2M Tris
	50 mM EDTA
	pH 8,0 ajustado com ácido acético
Loading dye 5x	25% (v/v) Glicerol
	20 mM EDTA
	0,25% (p/v) Azul de bromofenol

2.6.4.2. Marcador de pesos moleculares - DNA

O marcador de peso molecular usado nos géis de agarose foi o *NZYDNA Ladder III* (*NZYTech*). O peso molecular de cada banda está apresentado na tabela 2.3.

Tabela 2.3. Pesos moleculares das bandas do marcador *NZYDNA Ladder III*

Banda	Peso molecular (pb)
1	10000
2	7500
3	6000
4	5000
5	4000
6	3000
7	2500
8	2000
9	1400
10	1000
11	800
12	600
13	400
14	200

2.6.5. Purificação de DNA em gel

A purificação de DNA do plasmídeo pPICZ α A e de DNA do produto de PCR foi feita em gel de agarose usando o kit *QIAquick® Gel Extration Kit* (*QIAGEN*). O protocolo foi realizado de acordo

com as instruções do fabricante, à exceção do passo de eluição onde foi diminuída a quantidade de tampão EB de 50-100 μL para 30 μL , de modo a obter uma concentração mais elevada de DNA.

2.6.6. Modificação enzimática de DNA

2.6.6.1. Digestão com endonucleases de restrição

As reações de digestão com endonucleases de restrição do DNA de pPICZ α A e do gFTLHis₆ foram realizadas com as enzimas *EcoRI* HF (*NEB*) e *KpnI* HF (*NEB*) durante a noite a 37°C para que ambos possuíssem extremidades compatíveis. Para estas reações foi usada 1 unidade de enzima por cada μg de DNA. O tampão usado foi o tampão 4 10x (*NEB*) e o volume de reação foi ajustado com uH₂O para um volume final de 20 μL .

2.6.6.2. Desfosforilação do DNA

A desfosforilação do DNA foi feita por adição da enzima SAP (*Fermentas*), onde foi usada uma unidade por pmol de plasmídeo *termini*, de modo a impedir a recirculação do pPICZ α A digerido. Esta enzima foi adicionada à mistura de reação aquando da digestão com endonucleases de restrição do DNA plasmídico.

2.6.6.3. Reações de ligação

A ligação de gFTLHis₆ ao pPICZ α A linearizado foi realizada com a *T4 DNA Ligase* (*Invitrogen*) durante a noite a 4°C. A quantidade de gFTLHis₆ a adicionar foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$ng \text{ do insert} = \frac{ng \text{ do vetor} \times Kb \text{ do insert}}{Kb \text{ do vetor}} \times \text{razão molar insert:vetor} \quad (1)$$

A razão molar *insert:vetor* foi de 3:1 e a quantidade de vetor usada foi de 100 ng. Na mistura de reação adicionou-se ainda 2 μL de tampão de ligação 10x (*Invitrogen*), 1 unidade *T4 DNA Ligase* e uH₂O para um volume final de 20 μL .

2.6.7. Transformação de células de *E. coli* pelo método de choque térmico

Para a transformação das células de *E. coli* pelo método de choque térmico foram usadas as células competentes *E. coli* NZY5 α (*NZYTech*). O DNA resultante da reação de ligação foi cuidadosamente misturado com 100 μL de células competentes e incubado no gelo durante 30

min. De seguida, as células foram submetidas a um choque térmico durante 40 s num banho de água a 42°C e incubadas no gelo durante 2 min. Depois disso, foram adicionados 900 µL de meio SOC às células e incubadas a 37°C e 225 rpm durante 1 h. No final, a suspensão foi dividida por placas de agar LB *low salt* com 25 µg/mL de Zeocina™ fazendo-se diferentes diluições e incubou-se durante a noite a 37°C. Posteriormente, foram selecionados alguns clones e realizado um PCR de colónia (como descrito na secção 2.6.2.2) de modo a saber quais os clones que efetivamente continham o *insert* gFTLHis₆ clonado no vetor pPICZαA.

SOC	2% (p/v) Triptona
	0,5% (p/v) YE
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgSO ₄ .7H ₂ O
	10 Mm MgCl ₂ .6H ₂ O
	20 mM Glucose

2.6.8. Transformação de células de *P. pastoris* por electroporação

A transformação das células de *P. pastoris* KM71H foi realizada segundo o protocolo existente no Manual *EasySelect™ Pichia Expression Kit* efetuando-se pequenas alterações [48].

2.6.8.1. Preparação do DNA

Para a transformação de células de *P. pastoris* KM71H, 12 µg do vetor pPICZαA/FTLHis₆, foram digeridos com *SacI* (*NEB*) para linearizar o produto de ligação, e assim aumentar a eficiência de transformação. À mistura de reação foram adicionados 5 µL de tampão 10x e o volume ajustado para 50 µL com uH₂O. De seguida, incubou-se durante a noite a 37°C e a enzima foi inativada por aquecimento durante 20 min a 65°C. Por fim, foi necessário limpar o DNA digerido com o kit *QIAquick® Gel Extration Kit* (*QIAGEN*).

2.6.8.2. Preparação de células electrocompetentes

Inicialmente, uma colónia de *P. pastoris* KM71H foi inoculada em 50 mL de YPD e colocada a crescer durante a noite a 37°C. No dia seguinte e a partir desta cultura, 0,5 mL foram

transferidos para 200 mL de meio YPD fresco e colocados a crescer até atingir uma densidade ótica (DO) entre 1,3 e 1,5. Neste ponto, as células foram lavadas com $\mu\text{H}_2\text{O}$ gelada e esterilizada 2 vezes por centrifugação a 4000 g durante 5 min a 4°C e o *pellet* ressuspensionado também em $\mu\text{H}_2\text{O}$ gelada e esterilizada. No final, o *pellet* resultante foi ressuspensionado em sorbitol 1 M gelado até um volume final de 1 mL e imediatamente usado para transformação por electroporação.

2.6.8.3. Electroporação

Para a transformação por electroporação foram adicionados 10 μg do DNA previamente linearizado a 80 μL de células electrocompetentes. Esta suspensão foi transferida para uma cuvette de electroporação de 0,2 cm (*Bio-Rad*) gelada que foi posteriormente incubada no gelo durante 5 min e submetida a um pulso com os seguintes parâmetros, voltagem de 1500 V, capacidade elétrica de 2 μF e resistência de 200 Ω . Imediatamente após o pulso, 1 mL de meio SOC foi adicionado à suspensão e esta transferida para um tubo esterilizado de 15 mL, incubando-se durante 2h a 30°C sem agitação. Em seguida, a suspensão foi espalhada em placas de YPD com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ZeocinaTM e 1M de sorbitol fazendo-se diferentes diluições e incubadas a 30°C durante um período de 5 dias.

YPD com 1 M sorbitol	2% (p/v) Glucose
	2% (p/v) Peptona
	1% (p/v) YE
	2% (p/v) Agar BD
	1M Sorbitol

2.6.8.4. Seleção de transformantes

De modo a seleccionar os melhores transformantes, com maior número de cópias integradas, as colónias obtidas anteriormente foram repicadas em placas de agar de YPD com concentrações crescentes de ZeocinaTM (100; 200; 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 30°C durante 2 dias.

2.7. Produção de diferentes versões de frutalina recombinante em *P. pastoris*

O modo como as estirpes de *P. pastoris* foram colocadas a crescer é o mesmo. Cada uma delas foi inoculada em 100 mL de BMG a 30°C, com agitação contínua de 200 rpm durante toda

a noite. No dia seguinte, as células foram recolhidas por centrifugação a 4000 g durante 10 min à temperatura ambiente e ressuspendidas em 50 mL de BMM, para começar o período de indução. As culturas foram colocadas em *Erlenmeyers* com anteparos usando 2 camadas de gaze estéril para os tapar, e incubados a 15°C com agitação contínua (200 rpm) e adição diária de metanol para uma concentração final de 0,5% (v/v) durante 4 dias. Após o período de indução as células foram separadas do sobrenadante por centrifugação a 4000 g durante 10 min a 4°C. De modo a fazer precipitar os sais existentes no sobrenadante, o pH foi ajustado para 7,5 por adição de 10 N NaOH e retirados por centrifugação 3 vezes a 4000 g durante 10 min e a 4°C.

BMG	100 mM Fosfato de potássio pH 6,0
	1% (v/v) Glicerol
	1,34% (p/v) YNB
	4X10 ⁻⁵ (p/v) Biotina
BMM	100 mM Fosfato de potássio pH 6,0
	0,5% (v/v) Metanol
	1,34% (p/v) YNB
	4X10 ⁻⁵ (p/v) Biotina

2.8. Concentração dos sobrenadantes

A concentração dos sobrenadantes das culturas foi feita por ultrafiltração em tubos *Amicon* com cut-off de 10 kDa (*Millipore*). Estes filtros foram previamente lavados com água destilada filtrada e PBS pH 7,4 filtrado, por centrifugação a 4000 g durante 5 min e a 4°C. Simultaneamente os sobrenadantes foram filtrados em acrodiscos de 0,2 µm. De seguida, os sobrenadantes foram colocados nos tubos *Amicon* e centrifugados nas mesmas condições até um volume final de 1-2 mL. Depois de concentrados, os sobrenadantes foram lavados 3 vezes com PBS pH 7,4 filtrado, da mesma forma. De modo a confirmar a presença da proteína-alvo, os sobrenadantes foram analisados por SDS-PAGE (secção 2.10). Foi também quantificada a proteína total contida nos sobrenadantes (secção 2.11).

PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	2 mM KH ₂ PO ₄
	100 mM Na ₂ HPO ₄
	pH 7,4 ajustado com HCl

2.9. Purificação de diferentes versões de frutalina recombinante expressa em *P. pastoris*

Depois de concentradas, as amostras foram purificadas por diferentes metodologias cromatográficas, cromatografia de exclusão molecular (SEC), de interação hidrofóbica (HIC) ou de afinidade ao níquel (IMAC-Ni). Todas as soluções usadas nas diferentes metodologias, bem como todas as amostras carregadas nas colunas foram previamente filtradas com acrodiscos de 0,2 µm e mantidas em gelo. No final as amostras de proteína foram analisadas por SDS-PAGE (secção 2.10) para avaliar a pureza, quantificadas (secção 2.11) e guardadas a -20°C.

2.9.1. Cromatografia de exclusão molecular

A purificação por cromatografia de exclusão molecular (SEC) foi levada a cabo usando uma coluna *HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare)* no sistema FPLC (*Pharmacia Biotechnology*) para obter a versão de frutalina recombinante PprFTL-SEC B. A estratégia de purificação usada encontra-se indicada na tabela 2.4. O pico correspondente à saída da frutalina recombinante foi recolhido e concentrado em tubos *Amicon* com cut-off de 10 kDa. Para aquisição do cromatograma foi usado o *software Workstation toolbar*.

Tabela 2.4. Estratégia de purificação por SEC

	Estratégia
Preparar coluna (0,5 mL/min)	0,5 CV dH ₂ O
Equilibrar coluna (1 mL/min)	2 CV PBS pH 7,4
Carregar amostra (1 mL/min)	5 mL de amostra
Eluição (1 mL/min)	1 CV PBS pH 7,4
Lavagem da coluna (1mL/min)	0,5 CV NaOH 0,2 M 2 CV dH ₂ O 2 CV Etanol 20% m (Panreac)

* CV- Volume de coluna de 120 ml

2.9.2. Cromatografia de interação hidrofóbica

Para a purificação por cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) foi usada uma coluna *HiTrap HP 5 mL (GE Healthcare)* e uma bomba peristáltica (*Pharmacia LKB*), de modo a obter 2 das versões de frutalina recombinante, PprFTL-HIC A e a PprFTL-HIC B. As estratégias de purificação usadas encontram-se indicadas na tabela 2.5. Na estratégia 1 foram usados vários tampões com concentrações crescentes de NaCl. Numa tentativa de otimização do processo foram omitidos alguns tampões que faziam parte da etapa de eluição dando origem à estratégia 2.

Ao longo da purificação foram retiradas frações de cada etapa para posterior análise SDS-PAGE (secção 2.10). Após essa análise, as amostras que continham a proteína-alvo pura foram concentradas e lavadas com PBS pH 7,4 em tubos *Amicon* com cut-off de 10 kDa, a 4000 g e a 4°C para trocar o tampão.

Tabela 2.5. Estratégias de purificação por HIC

	Estratégia 1	Estratégia 2
Equilíbrio da coluna (1 mL/min)	8 CV PBS com 2,5 M NaCl pH 7,4	8 CV PBS com 2,5 M NaCl pH 7,4
Carregamento da amostra (0,5 mL/min)	Diluída 1:2 em PBS com 5 M NaCl pH 7,4	Diluída 1:2 em PBS com 5 M NaCl pH 7,4
Lavagem (1 mL/min)	8 CV PBS com 2,5 M NaCl pH 7,4	8 CV PBS com 2,5 M NaCl pH 7,4
Eluição (0,5 mL/min)	4 CV PBS com 2 M NaCl pH 7,4 4 CV PBS com 1,5 M NaCl pH 7,4 4 CV PBS com 1 M NaCl pH 7,4 4 CV PBS com 0,5 M NaCl pH 7,4 4 CV PBS com 0,25 M NaCl pH 7,4 4 CV PBS com 0,125 M NaCl pH 7,4 4 CV PBS pH 7,4 4 CV Tris 50 mM pH 10	5 CV PBS com 1 M NaCl pH 7,4 5 CV PBS pH 7,4 5 CV Tris 50 mM pH 10
Lavagem da coluna (1 mL/min)	2 CV NaOH 1 M 2 CV Etanol 70% 4 CV dH ₂ O 2 CV Etanol 20%	2 CV NaOH 1 M 2 CV Etanol 70% 4 CV dH ₂ O 2 CV Etanol 20%

* CV- Volume de coluna de 5 ml

2.9.3. Cromatografia de afinidade ao níquel

Para a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel (IMAC-Ni) foi usada uma coluna *HisTrap HP 5 mL (GE Healthcare)* e uma bomba peristáltica (*Pharmacia LKB*), para obter a versão de frutalina recombinante, PprFTLHis₆-IMAC. A estratégia de purificação usada está indicada na tabela 2.6.

Ao longo do processo foram retiradas frações de cada etapa para posterior análise SDS-PAGE (secção 2.10). Durante a fase de eluição foi usado o método de quantificação por *Bradford* com o reagente *Protein Assay Dye (Bio-Rad)* para que fosse conhecido o momento em que a proteína-alvo foi totalmente eluída, e assim terminar a fase de eluição. Este método foi realizado em placa de 96 poços com 100 µL de reagente diluído 1:5 e 5 µL de amostra. O resultado obtido apenas é avaliado visualmente pela intensidade do azul produzido pela reação da proteína com o reagente, uma vez que esta é proporcional à concentração de proteína presente. Após a análise SDS-PAGE, tal como na purificação por HIC, as amostras com proteína-alvo pura foram concentradas e lavadas com PBS pH 7,4 em tubos *Amicon* com cut-off de 10 kDa, a 4000 g e a 4°C para trocar o tampão.

Tabela 2.6. Estratégia de purificação por IMAC-Ni

	Estratégia
Preparação da coluna (1 mL/min)	2 CV dH ₂ O 1 CV NiSO ₄ ·6H ₂ O 0,1 M 2 CV dH ₂ O
Equilíbrio da coluna (1 mL/min)	4 CV Tampão de ligação pH 8,0
Carregamento da amostra (0,5 mL/min)	Amostra com concentração final de imidazole de 20 mM
Lavagem (1 mL/min)	6 CV Tampão de ligação pH 8,0 4 CV Tampão de lavagem pH 8,0
Eluição (0,5 mL/min)	> 6 CV Tampão de eluição pH 8,0
Lavagem da coluna (1 mL/min)	2 CV EDTA 2 CV dH ₂ O 2 CV Guanidina 6 M 2 CV dH ₂ O 2 CV Etanol 20%

* CV- Volume de coluna de 5 ml

Tampão de ligação	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	20 mM Imidazole
Tampão de lavagem	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	40 mM Imidazole
Tampão de eluição	50 mM Tris
	150 mM NaCl
	300 mM Imidazole

2.10. Eletroforese de proteína – SDS-PAGE

A análise de proteína foi feita por eletroforese sob condições desnaturantes, SDS-PAGE, usando o método de *Laemmli* (1970). Este método usa géis com diferentes concentrações de acrilamida permitindo separar as proteínas pelo seu peso molecular e assim avaliar a pureza e estimar o peso molecular da proteína(s) alvo [49].

2.10.1. Gel SDS-PAGE

Neste trabalho foram usados géis separadores com concentrações diferentes, 12% e 15%, sendo que o último permite uma melhor separação de proteínas com um peso molecular mais baixo. A composição dos géis está apresentada na tabela 2.7.

Tabela 2.7. Composição dos géis SDS-PAGE

	Gel separador 15%	Gel separador 12%	Gel concentrador 4%
40% Acrilamida	3,6 mL	2,9 mL	480 µL
2% Bis-acrilamida	2 mL	1,6 mL	260 µL
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	1,25 mL
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	-
dH ₂ O	1,7 mL	2,8 mL	2,93 mL
SDS 10%	100 µL	100 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	2,5 µL
APS 10%	50 µL	50 µL	25 µL

As amostras de SDS-PAGE foram preparadas misturando-se 16 μL da amostra a analisar com 4 μL de tampão de amostra 5x, com posterior aquecimento a 100°C durante 5 min. De seguida, carregou-se cada poço do gel com 15 μL de amostra e num dos poços 5 μL de marcador de pesos moleculares (secção 2.10.2). A corrida simultânea de dois géis foi efetuada a 30 mA e usando 500 mL de tampão de corrida 1x.

Tampão de amostra 5x	0,313 M Tris-HCl pH 6,8
	50% (v/v) Glicerol
	10% (p/v) SDS
	10% (v/v) β -mercaptoetanol
	0,05% (p/v) Azul de bromofenol
Tampão de corrida 1x	25 mM Tris
	192 mM Glicina
	0,1% (p/v) SDS

2.10.2. Marcador de pesos moleculares – Proteína

O marcador de peso molecular usado nos géis SDS-PAGE foi o *PageRuller Unstained Broad Range* (5-250 kDa; *Thermo Scientific*). O peso molecular de cada banda está apresentado na tabela 2.8.

Tabela 2.8. Pesos moleculares das bandas do marcador *PageRuller Unstained Broad Range*

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

2.10.3. Coloração com *Coomassie Blue*

Após a eletroforese os géis SDS-PAGE foram corados pelo método de coloração com *Coomassie Blue*. Os géis foram colocados em água destilada e aquecidos no micro-ondas durante 30 s, de seguida foram colocados em agitação constante durante 3 min. Este passo foi repetido 2 vezes efetuando-se a troca da água destilada em cada uma das vezes. Posteriormente, os géis foram colocados numa solução de *Coomassie Blue* e aquecidos no micro-ondas durante 30 s, e colocados em agitação constante durante 3 min. Para finalizar, foi retirada a solução corante, adicionada água destilada e os géis foram fotografados no aparelho *Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+Imaging System (Bio-Rad)* e quando necessário analisados no *software Image Lab 4.0*.

A solução *Coomassie Blue* foi preparada dissolvendo-se 60-80 mg de *Coomassie Brilliant Blue G250* num 1 L de água destilada, colocando-se em agitação com um magneto durante 2 a 4 h. Depois disso, foram adicionados 3 mL de HCl 37% e a solução guardada à temperatura ambiente e protegida da luz.

2.10.4. Coloração com nitrato de prata

Quando a concentração de proteína é baixa o método de coloração com nitrato de prata é o mais adequado, dado que este é um método mais sensível permitindo detetar baixas concentrações de proteína, sendo a quantidade mínima de 1-4 ng de proteína por banda [50].

Neste método os géis foram lavados em etanol 20% (v/v) durante 10 min seguidos de 10 min em água destilada. Depois de lavados, os géis foram imersos na solução de sensibilização durante 2 a 5 min e lavados 2 vezes com água destilada em ciclos de 20 s. De seguida, os géis foram colocados durante 30 min na solução de coloração e lavados 5 vezes com água destilada em ciclos de 10 s. Após a coloração, os géis foram colocados na solução de revelação até as bandas aparecerem. Esta reação foi parada com a solução de paragem durante 1 min e por fim os géis foram lavados com água destilada e fotografados no aparelho *Molecular Imager ChemiDoc™ XRS+Imaging System (Bio-Rad)* e quando necessário analisados no *software Image Lab 4.0*.

Solução de sensibilização	0,2 g/L Tiosulfato de sódio
Solução de coloração	2 g/L Nitrato de prata
Solução de revelação	0,7 mL/L Formaldeído 37% 10 mg/L Tiosulfato de sódio 30 g/l K ₂ CO ₃
Solução de paragem	50 g/L Tris 2,5% (v/v) Ácido acético

2.11. Quantificação de proteína

A quantificação de proteína presente nas amostras foi efetuada por absorvância a 280 nm usando o *Nanodrop 1000* (*Thermo Scientific*) e tendo por base o coeficiente de extinção molar das diferentes versões de frutalina recombinante em estudo (tabela 2.1). Para isso, foram aplicados 2 µL de cada amostra no aparelho e lido o valor de absorvância, que posteriormente foi convertido em valores de concentração.

2.12. *Dynamic Light Scattering*

Os ensaios de *Dynamic Light Scattering* (DLS) foram realizados no equipamento *Zetasizer Nano ZS* (*Malvern Instruments*) e com amostras de diferentes versões de frutalina recombinante de 1 mL contendo uma concentração proteica entre 0,5 e 1 g/L. As amostras foram previamente centrifugadas e filtradas sendo realizadas 10 leituras para cada amostra. O *software* foi configurado para raios hidrodinâmicos (r.nm) e para interpretação dos resultados obtidos foi usada uma ferramenta do *software Zetasizer* denominada de *MW & Shape Estimates*, que pressupõe que a proteína é globular, combinada com a ferramenta *ProtParam* do *software online ExPASy*.

2.13. Ensaios de hemaglutinação

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados com eritrócitos de coelho e em tubos de 1,5 mL. As amostras de diferentes versões de frutalina recombinante foram preparadas fazendo-se diluições seriadas de 1:2 até à diluição 1:64 contendo uma concentração inicial de 0,1 g/L. Os eritrócitos de coelho foram previamente preparados, para isso foi necessário lavar o sangue fresco de coelho com NaCl 0,15 M e realizar centrifugações sucessivas a 5000 rpm durante 5 min e a 4°C de modo a remover o plasma e os glóbulos brancos. Seguidamente os eritrócitos foram diluídos 1:20 no tampão em que se encontram as diferentes versões de frutalina recombinante (PBS pH 7,4 ou PBS pH 6,0) e incubados (50 µL) com as amostras de frutalina (50 µL) durante toda a noite à temperatura ambiente. Simultaneamente foi realizado um controlo negativo com 50 µL de tampão e 50 µL de eritrócitos. Como controlo positivo foi usada a frutalina nativa isolada da fruta-pão.

O grau de hemaglutinação foi monitorizado visualmente depois do período de incubação. As amostras que não apresentaram atividade hemaglutinante visível após esse período foram consideradas negativas.

2.14. Ensaios em linhas tumorais humanas

A análise do efeito anti-proliferativo de diferentes versões de frutalina recombinante (tabela 2.9) foi feita em ensaios com linhas tumorais humanas.

2.14.1. Condições de crescimento das linhas tumorais humanas

Nos ensaios com linhas tumorais humanas foram usadas 2 linhas celulares do adenocarcinoma do cólon, HCT 116, uma delas contendo a forma nativa da p53, HCT 116 p53^{+/+}, e a sua derivada isogénica em que o gene p53 foi silenciado, HCT 116 p53^{-/-} (cedida pelo Dr. B. Vogelstein, The Johns Hopkins Kimmel Cancer Center, Baltimore, MD, EUA).

Ambas as linhas celulares foram incubadas em meio RPMI-1640 com ultraglutamina (Lonza), suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e mantidas numa incubadora húmida a 37°C com 5% de CO₂. Quando as células atingiram a confluência de 80%, foram lavadas com

PBS e tripsina, e colhidas por centrifugação a 1500 rpm durante 5 min. Após isto, as células foram ressuspendidas em 5 mL de RPMI-1640 com ultraglutamina suplementado com 5% de FBS.

2.14.2. Efeito anti-proliferativo de diferentes versões de frutalina recombinante em linhas tumorais humanas

O efeito anti-proliferativo de diferentes versões de frutalina recombinante foi avaliado nas linhas tumorais HCT 116 p53^{+/+} e HCT 116 p53^{-/-}. Para isso, foi usado um corante de ligação às proteínas, a sulfarrodamina B (SRB) que permite a determinação da densidade celular tendo por base a medição do teor de proteína celular [51].

Neste ensaio, as células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 células/poço em RPMI-1640 com ultraglutamina suplementado com 5% de FBS, e incubadas durante 24 h numa incubadora humidificada a 37°C com 5% de CO₂. Após 24 h, tempo requerido para a adesão celular, as células foram incubadas com 5 diluições seriadas (na razão 1:2) de frutalina recombinante durante 48 h. As concentrações da 1ª diluição de cada versão de frutalina recombinante testada estão indicadas na tabela 2.9. Simultaneamente foi também testado o tampão em que se encontra diluída a frutalina recombinante (PBS pH 7,4 ou PBS pH 6,0), no mesmo volume da concentração máxima testada de frutalina (controlo negativo). Após esse período, as células aderidas foram fixadas com a adição de ácido tricloroacético (TCA) a 25% (v/v) e incubadas a 4°C durante 1 h. Posteriormente, as placas foram repetidamente lavadas com água destilada e, quando secas, foram coradas com uma solução de SRB (0,4% (v/v) sulfarrodamina B em ácido acético a 1% (v/v)) e novamente incubadas durante 30 min. A fração de corante não ligado foi lavado com ácido acético a 1% (v/v) e o corante ligado foi solubilizado com uma solução de Tris a 10 mM. No final, a densidade ótica foi medida a 510 nm usando um leitor de microplacas *Synergy HT (Biotek)*.

Os valores de GI₅₀ (concentração correspondente a 50% de inibição do crescimento celular) foram determinados para cada versão de frutalina recombinante testada.

Na tabela 2.9 encontram-se os valores de concentração em µM de diferentes versões de frutalina recombinante testada nas linhas tumorais humanas.

Tabela 2.9. Concentração da 1ª diluição de diferentes versões de frutalina recombinante testada nas linhas tumorais humanas.

Frutalina	Concentração (µM)
EcrHis ₆ FTL	4,39
EcrFh8FTL*	8,38
EcrCFTL	18,6
PprFTL-SEC A	10,4
PprFTL-SEC B	8,55
PprFTL-HIC A	14,6
PprFTL-HIC B	6,37
PprFTLHis ₆	2,57

*Frutalina testada num trabalho anterior [46]

2.15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism 6®*, onde foi usado o *one-way ANOVA* para analisar os dados de GI₅₀ e as comparações foram realizadas pelo teste de *Tukey*. As diferenças foram consideradas no nível de significância de $p < 0,05$ e os resultados expressos em média ± desvio padrão.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1. Produção e purificação de frutalina recombinante em *P. pastoris*

De modo a confirmar a produção de frutalina recombinante em *P. pastoris*, os concentrados dos sobrenadantes das culturas foram analisados por SDS-PAGE (figura 3.1). A frutalina recombinante aparece como uma banda dupla, em que a banda inferior apresenta um peso molecular de aproximadamente 17,1 kDa, confirmando que a expressão da frutalina ocorre sem a excisão do *linker* tetrapeptídico [16]. A banda superior corresponde à fração de frutalina recombinante glicosilada e a banda inferior à fração não-glicosilada [16].

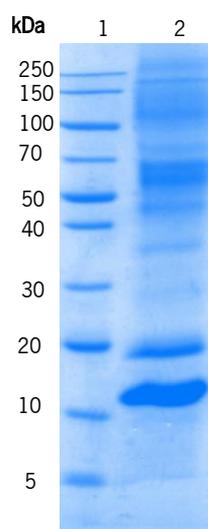


Figura 3.1. Expressão da frutalina recombinante em *P. pastoris*. Análise dos sobrenadantes das culturas em gel SDS-PAGE 4%-15% corado com *Coomassie blue*. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- Concentrado 40x resultante de 4 produções de frutalina recombinante.

Após se verificar a produção da frutalina recombinante, as amostras foram purificadas por metodologias de cromatografia diferentes, interação hidrofóbica (HIC) e exclusão molecular (SEC).

Inicialmente foi feita a purificação por interação hidrofóbica (figura 3.2) numa tentativa de mimetizar um resultado obtido anteriormente, a separação da fração glicosilada da fração não-glicosilada [46], além de minimizar os custos e simplificar o processo de purificação comparativamente com a cromatografia por exclusão molecular. O ensaio foi realizado usando uma quantidade inicial de proteína de 8,05 mg (resultante de 6 produções) e usando vários tampões de eluição.

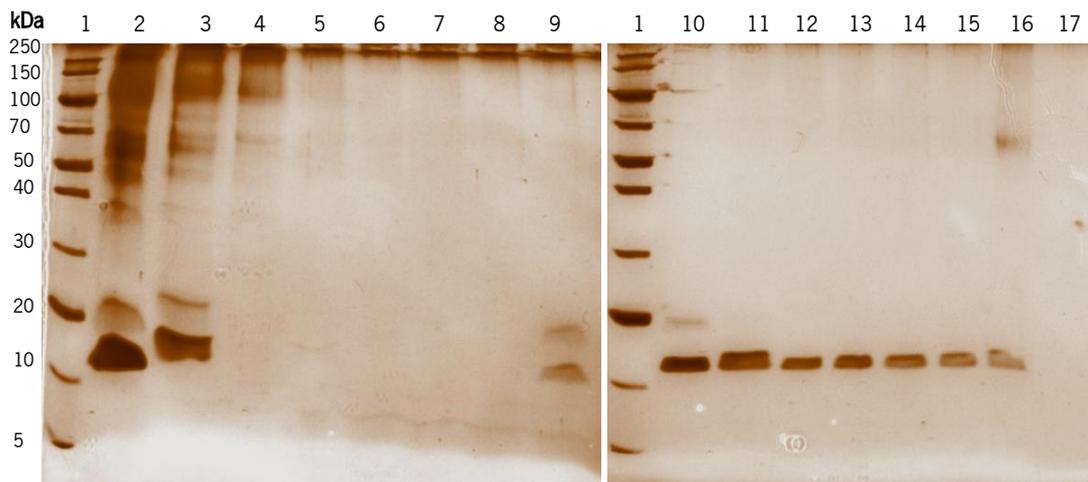


Figura 3.2. Purificação da frutalina recombinante por HIC (estratégia 1). Análise dos passos de purificação em gel SDS-PAGE 4%-12% corado com nitrato de prata. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- Amostra inicial de FTL antes da purificação; 3- Amostra diluída 1:2 em PBS com 5 M NaCl pH 7,4 antes de carregada na coluna; 4- *Flow-through*; 5- Lavagem com PBS com 2,5 M NaCl pH 7,4; 6- Eluído com PBS com 2 M NaCl pH 7,4; 7- Eluído com PBS com 1,5 M NaCl pH 7,4; 8- Eluído com PBS com 1 M NaCl pH 7,4; 9- Eluído com PBS com 0,5 M NaCl pH 7,4; 10- Eluído com PBS com 0,25 M NaCl pH 7,4; 11- Eluído com PBS com 0,125 M NaCl pH 7,4; 12 a 15- Eluído com PBS pH 7,4; 16- Eluído com Tris 50 mM pH 10; 17- Lavagem da coluna com NaOH 1M.

Neste ensaio, não é possível observar perdas de frutalina no *flow-through* (amostra que não ligou à coluna) e na lavagem da coluna (poços 4 e 5). Relativamente à eluição da frutalina enriquecida na fração glicosilada, esta é feita de forma gradual e só começa a acontecer com tampão de eluição PBS com 0,5 M NaCl pH 7,4 e mantém-se com o tampão PBS com 0,25 M NaCl pH 7,4 (poços 9 e 10). A frutalina desfavorecida na fração glicosilada, começou a eluir com o tampão PBS com 0,125 M NaCl pH 7,4 até ao final da eluição (poços 11 a 16), contudo no poço 16 são eluídos também alguns contaminantes que ainda se encontravam ligados à coluna.

Para os ensaios em linhas tumorais juntaram-se as amostras correspondentes aos poços 9 e 10 resultantes de 4 CV de PBS 0,5 M NaCl pH 7,4 e 4 CV de PBS 0,25 M NaCl pH 7,4, respetivamente. Posteriormente foram sujeitas ao processo de ultrafiltração para concentração e troca de tampão para PBS pH 7,4 de modo a obter a versão enriquecida na fração glicosilada, PprFTL-HIC A. As amostras correspondentes ao poço 11 resultante de 4 CV de PBS 0,125 M NaCl pH 7,4 e aos poços 12 a 15 resultantes de 4 CV de PBS pH 7,4, foram sujeitas ao mesmo processo para se obter a versão desfavorecida na fração glicosilada, PprFTL-HIC B. Obtiveram-se assim 2,08 mg da versão enriquecida na fração glicosilada (resultante de um volume total de 8 CV) e 0,912 mg da versão desfavorecida nesta fração (resultante de um volume total de 8 CV). Este processo

apresenta um rendimento de aproximadamente 62%, estimando que a quantidade de frutalina presente na amostra inicial é cerca de 60% da quantidade de proteína total, esta estimativa foi feita por análise da amostra inicial em gel SDS-PAGE (figura 3.4; poço 2). No final da purificação e do processo de ultrafiltração foi possível obter 9-10 mg de frutalina recombinante pura por cada litro de cultura.

De modo a otimizar o processo, recuperando uma maior quantidade de proteína, foi realizado um novo ensaio (figura 3.3) com 5,34 mg de proteína (resultante de 4 produções) e onde foram eliminados alguns passos de eluição da estratégia 1, nomeadamente os passos 1, 2, 4, 5 e 6 da tabela 2.5.

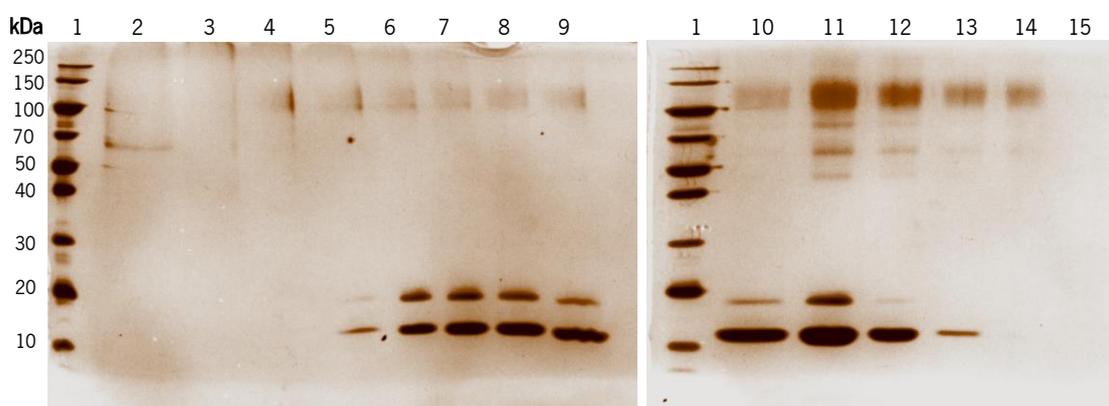


Figura 3.3. Purificação de frutalina recombinante por HIC (estratégia 2). Análise dos passos de purificação em gel SDS-PAGE 4%-12% corado com nitrato de prata. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- *Flow-through*; 3- Lavagem com PBS com 2,5 M NaCl pH 7,4; 4- Eluído com PBS com 1 M NaCl pH 7,4; 5 a 9- Eluído com PBS pH 7,4; 10 a 14- Eluído com Tris 50 mM pH 10; 15- Lavagem da coluna com NaOH 1M.

Neste ensaio verificou-se o mesmo que no primeiro relativamente ao *flow-through* e ao passo de lavagem. Quanto à eluição, quando foi feita com PBS pH 7,4 a versão enriquecida na fração glicosilada começou a ser eluída até ao primeiro volume de coluna do tampão Tris 50 mM (poços 5 a 11). A versão desfavorecida na fração glicosilada foi eluída no segundo e terceiro volume de coluna de Tris 50 mM (poços 12 e 13). Contudo neste ensaio verifica-se uma maior quantidade de contaminantes nos poços 11, 12 e 13.

Tal como no ensaio anterior, juntaram-se as amostras com o intuito de testar em linhas tumorais. As amostras correspondentes aos poços 5 a 9, resultantes de 5 CV de PBS pH 7,4 e 10 e 11, resultantes de 2 CV de Tris 50 mM pH 10 foram juntas e sujeitas ao processo de ultrafiltração

anteriormente referido, de modo a obter a versão de frutalina enriquecida na fração glicosilada. As amostras dos poços 12 e 13, resultantes de 2 CV de Tris 50 mM pH 10 foram sujeitas ao mesmo processo para obter a versão de frutalina desfavorecida na fração glicosilada. No final foi possível obter 1,92 mg da versão enriquecida na fração glicosilada (resultante de um volume total de 7 CV) e 0,762 mg da versão desfavorecida nesta fração (resultante de um volume total de 2 CV). Como o processo de produção é o mesmo que o usado na estratégia de purificação 1 supõe-se que, tal como no ensaio anterior, a quantidade de frutalina presente na amostra inicial seja cerca de 60% da quantidade total de proteína, desse modo o rendimento deste processo é de aproximadamente 84%. No final desta estratégia de HIC e do processo de ultrafiltração foi possível obter 13-14 mg de frutalina recombinante por cada litro de cultura.

Relativamente aos contaminantes o que se verifica é que em ambas as estratégias estes também se ligam à coluna. Na estratégia 1 como existem vários passos de eluição, a frutalina foi eluída de forma gradual e quando foi usado o tampão Tris 50 mM pH 10, que faz com que tudo se desprenda da coluna devido à diminuição da concentração de sais e ao aumento de pH, a restante frutalina foi eluída juntamente com os contaminantes. Na estratégia 2, como foram omitidos vários tampões de eluição, a frutalina que despreendeu da coluna até ao uso do tampão Tris 50 mM tinha sido pouca, estando ainda grande parte dela ligada à coluna. Assim, quando este tampão foi usado toda a frutalina ainda ligada despreendeu tal como os contaminantes, dando origem a amostras de frutalina altamente contaminadas. Além disso, quando se usou uma menor quantidade de proteína inicial, aparentemente mais contaminantes se ligaram à coluna.

Por análise dos géis resultantes da estratégia 1 e 2 (figura 3.2 e 3.3), é ainda possível concluir que as frações se ligam de forma diferente à coluna e por essa razão são eluídas em etapas diferentes. Inicialmente é eluída a fração glicosilada por se ligar de uma forma mais fraca à coluna, e de seguida é eluída a fração não-glicosilada devido à sua ligação à coluna ser mais forte. Isto significa, que a glicosilação diminui o carácter hidrofóbico da frutalina recombinante.

As amostras finais resultantes de ambas as estratégias de purificação por HIC foram analisadas em gel SDS-PAGE e coradas com nitrato de prata (figura 3.4), para confirmar a sua pureza e se efetivamente foi possível separar a fração glicosilada da não-glicosilada para posterior aplicação nas linhas tumorais humanas.

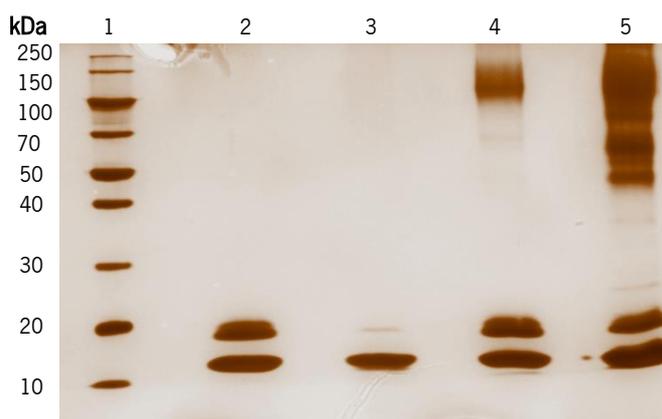


Figura 3.4. Amostras resultantes das purificações por HIC. Análise em gel SDS-PAGE 4%-12%, corado com nitrato de prata, das amostras finais das versões de frutalina recombinante após as diferentes estratégias de HIC. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- FTL enriquecida na fração glicosilada (estratégia 1); 3- FTL desfavorecida na fração glicosilada (estratégia 1); 4- FTL enriquecida na fração glicosilada (estratégia 2); 5- FTL desfavorecida na fração glicosilada (estratégia 2).

Ao analisar o gel verifica-se que na estratégia 1 as amostras são efetivamente puras, e que não foi possível separar totalmente a fração glicosilada da não-glicosilada. No entanto, obteve-se uma amostra de frutalina enriquecida na fração glicosilada (PprFTL-HIC A; poço 2) e outra desfavorecida nesta fração (poço 3). Nestas 2 amostras a fração não-glicosilada é equivalente, diferindo apenas na glicosilada. Recorrendo ao software *Image Lab 4.0*, as bandas do gel SDS-PAGE (poços 2 e 3) foram analisadas. Desta análise foi possível concluir que 35% da versão PprFTLHIC-A é correspondente à fração glicosilada e apenas 8% na versão PprFTLHIC-B corresponde à fração glicosilada, havendo uma diferença de 23% de glicosilação entre ambas as versões. Relativamente à estratégia 2 (poço 4 e 5) verifica-se que esta não separa as frações de modo algum e não purifica.

Por estas razões o método de purificação por HIC segundo a estratégia 1 e 2 não são viáveis, o primeiro porque o seu rendimento é baixo, além de efetivamente não separar as frações, e o segundo porque na realidade não purificou, além de não separar as frações, como o desejado. No entanto, as amostras da estratégia 1 (PprFTL-HIC A e PprFTL-HIC B) são amostras interessantes para testar nas linhas tumorais humanas, de modo a perceber se a glicosilação tem alguma influência no efeito anti-proliferativo da frutalina recombinante, ao passo que as amostras da estratégia 2 não possuem qualquer interesse por não se encontrarem puras [40].

Como a metodologia de purificação por interação hidrofóbica não revelou ter bons rendimentos, a metodologia usada para purificar as restantes produções de frutalina recombinante

foi a cromatografia de exclusão molecular (SEC). Esta técnica foi usada em trabalhos anteriores e permite obter 18-20 mg de frutalina recombinante por cada litro de cultura com elevado grau de pureza apesar de ser uma técnica demorada [16, 46].

Além disso, permite estimar o peso molecular da frutalina recombinante recorrendo à calibração da coluna com proteínas de peso molecular conhecido, neste caso a BSA e a frutalina nativa [16, 45]. Na figura 3.5 encontram-se os 3 cromatogramas obtidos por SEC.

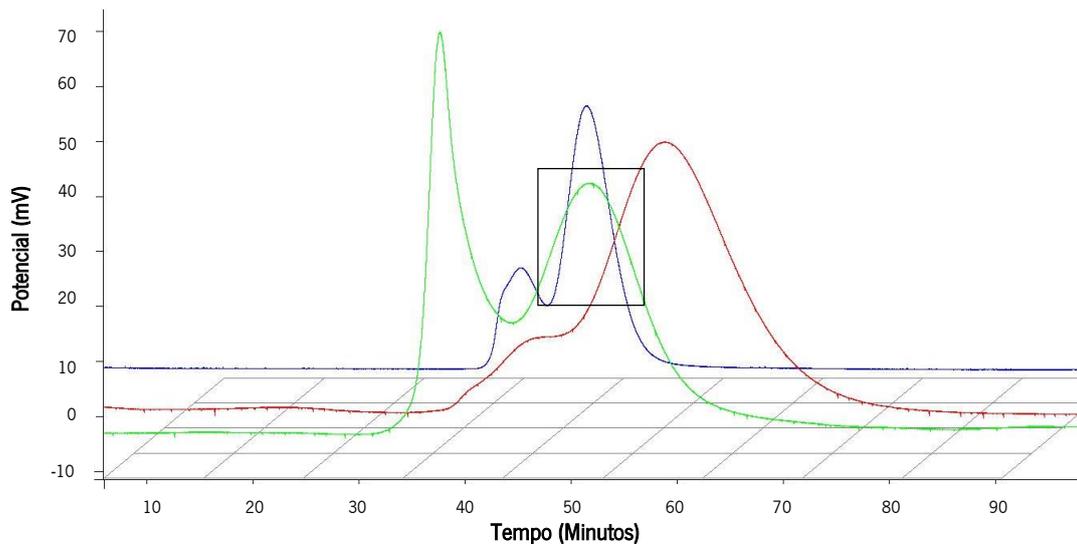


Figura 3.5. Cromatogramas obtidos por SEC. Legenda: Azul- Cromatograma referente à BSA (1 g/L); Vermelho- Cromatograma referente à frutalina nativa (0,8 g/L); Verde- Cromatograma referente à frutalina recombinante (0,5 g/L).

Por análise do cromatograma é possível verificar que o peso molecular da frutalina recombinante é semelhante ao da BSA (66 kDa) e superior ao da frutalina nativa (48-49 kDa) permitindo estimar o peso molecular da frutalina recombinante de aproximadamente 66-65 kDa. Isto sugere que a frutalina recombinante, tal como a frutalina nativa está organizada em tetrámeros e o seu peso superior é devido à não clivagem do *linker* [16]. Contudo em trabalhos anteriores [16, 45], a frutalina recombinante saiu num tempo ligeiramente superior ao da BSA, o que indica que possui um peso molecular inferior e não igual ao da BSA como obtido neste trabalho. Esta diferença poderá ter sido devido a erros de operador ocorridos aquando do início da aquisição do cromatograma, durante a realização da metodologia neste trabalho. Quando é injectada a amostra manualmente a aquisição do cromatograma deverá ser feita simultaneamente, se for antes da injeção vai ocorrer uma antecipação no tempo de saída da frutalina recombinante, ou seja o pico obtido não corresponderá ao tempo exacto de saída mas sim a um tempo ligeiramente inferior,

que coincidiu com o da BSA. Esta diferença poderá também ser devida às diferentes colunas usadas em ambos os trabalhos resultando em diferentes padrões de eluição.

Após a junção de várias amostras purificadas foi possível efetuar um *stock* a -20°C da versão PprFTL-SEC B com uma quantidade total de proteína de 37,7 mg para posteriores estudos em linhas tumorais humanas de forma a corroborar resultados obtidos num trabalho anterior [46].

3.2. Construção da estirpe *P. pastoris* KM71H/pPICZ α A/frutalina recombinante+His₆

Como foi possível verificar anteriormente as metodologias de purificação HIC e SEC não são as mais rentáveis, relativamente ao rendimento e à quantidade de tempo dispendido, respetivamente. De modo a ultrapassar esse problema foi introduzido o His₆, um *tag* de fusão constituído por 6 histidinas, no C-terminal da frutalina recombinante para posterior purificação por afinidade ao níquel (IMAC-Ni).

Nesse sentido, o gene da FTL foi amplificado a partir do DNA molde de pPICZ α A/ frutalina recombinante com os *primers* da tabela 2.2, com a finalidade de colocar o *tag* His₆ e assim obter gFTLHis₆ (figura 3.6), que foi depois ligada ao vetor pPICZ α A (secção 2.6.6).

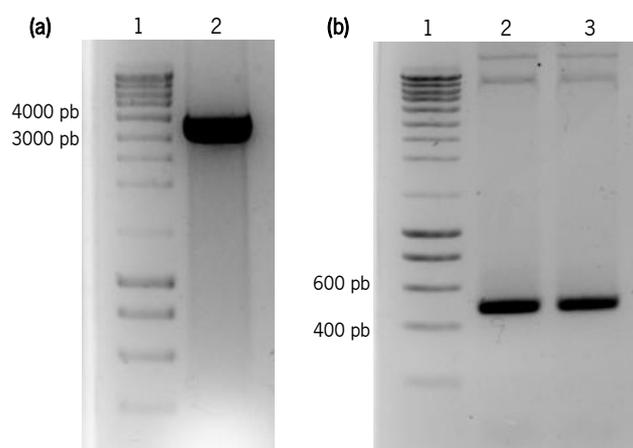


Figura 3.6. Amplificação do gene da FTL e do vector pPICZ α A (a) Digestão do plasmídeo pPICZ α A com aproximadamente 3600 pb. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- DNA plasmídico de pPICZ α A digerido com as enzimas de clonagem; (b) Amplificação de FTLHis₆, com tamanho final de cerca de 500 pb. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2 e 3- gFTLHis₆ digerido com as enzimas de clonagem.

Após a ligação de gFTLHis₆ ao pPICZαA e de transformadas células de *E. coli* (secção 2.6.7), foi feito um PCR colónia com os *primers* α_Histag_KpnI_RV e β_FW para amplificar o *insert* (gFTLHis₆) a 8 dos clones obtidos (figura 3.7) de forma a confirmar a correta inserção do *insert* no pPICZαA.

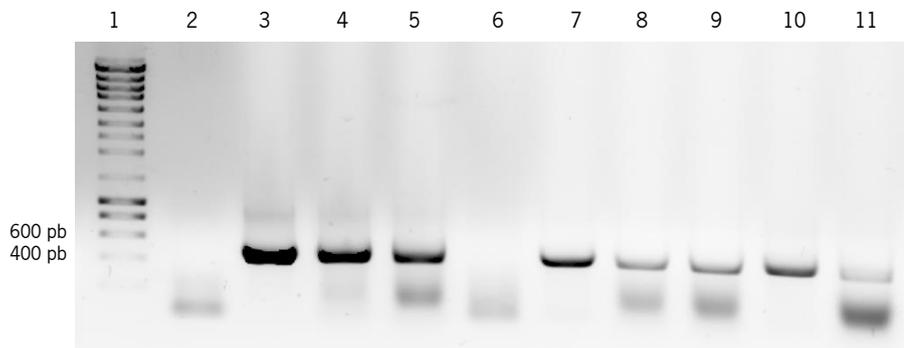


Figura 3.7. Confirmação da inserção de gFTLHis₆ no pPICZαA por PCR de colónia. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- Controlo negativo (vetor vazio); 3- Controlo positivo (DNA molde); 4- Colónia 1; 5- Colónia 2; 6- Colónia 3; 7- Colónia 4; 8- Colónia 5; 9- Colónia 6; 10- Colónia 7; 11- Colónia 8.

Ao analisar o gel obtido é possível verificar que apenas a colónia 3 é negativa, ou seja foi confirmada a inserção nas restantes colónias e escolhida a colónia 1 para isolamento de DNA e transformação de células de *P. pastoris* (secção 2.6.8). Após a transformação foram selecionados alguns transformantes para confirmação da inserção do fragmento de interesse no genoma de *P. pastoris* (figura 3.8).

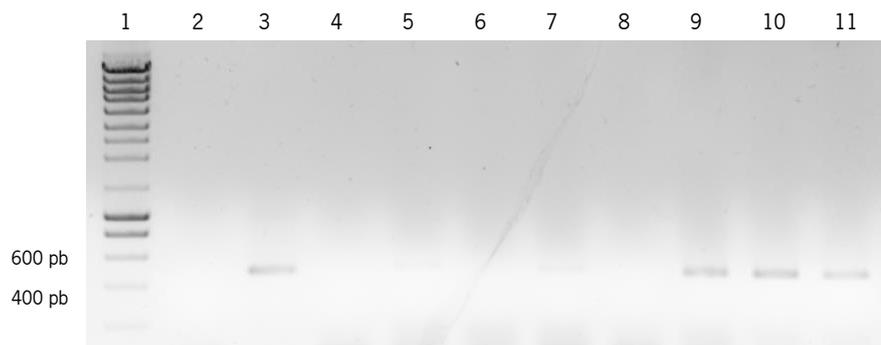


Figura 3.8. Confirmação da inserção de gFTLHis₆ no genoma de *P. pastoris* por PCR de colónia. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- Controlo negativo (vetor vazio); 3- Controlo positivo (DNA molde); 4- Colónia 22 (Resistente a zeocina 100 mg/mL); 5- Colónia 32 (Resistente a zeocina 200 mg/mL); 6- Colónia 24 (Resistente a zeocina 500 mg/mL); 7- Colónia 45 (Resistente a zeocina 500 mg/mL); 8- Colónia 8 (Resistente a zeocina 1000 mg/mL); 9- Colónia 9 (Resistente a zeocina 1000 mg/mL); 10- Colónia 48 (Resistente a zeocina 1000 mg/mL); 11- Colónia 49 (Resistente a zeocina 1000 mg/mL)

Assim é possível verificar que os transformantes das colônias 9, 48 e 49 são positivos, ou seja possuem o gene de interesse, $gFTLHis_6$ no seu genoma. Desses 4 foi escolhido o transformante 49 para posteriores produções por ser resistente à maior concentração de zeocina testada e assim, indicando possuir um maior número de cópias do gene da frutalina integradas no genoma, e possibilitar uma maior produção de PprFTLHis₆.

3.3. Produção e purificação de FTLHis₆ em *P. pastoris*

De forma a confirmar se o clone 49 produzia a PprFTLHis₆, os concentrados dos sobrenadantes das culturas foram analisados por SDS-PAGE (figura 3.9). Tal como a versão PprFTL-SEC B produzida anteriormente em *P. pastoris*, também esta nova proteína aparece como uma banda dupla de pesos moleculares idênticos. Ou seja, a PprFTLHis₆ é também parcialmente glicosilada. Confirmada a produção, as amostras foram purificadas por afinidade ao níquel (IMAC-Ni) tal como pretendido (figura 3.10) com uma quantidade inicial de proteína inicial de 22,9 mg (resultante de 18 produções).

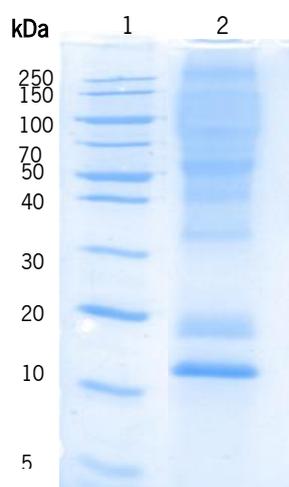


Figura 3.9. Expressão da PprFTLHis₆ em *P. pastoris*. Análise dos sobrenadantes das culturas em gel SDS-PAGE 4%-15% corado com *Coomassie blue*. Legenda: 1- Marcador de pesos moleculares; 2- Concentrado 20x resultante de 2 produções de PprFTLHis₆.

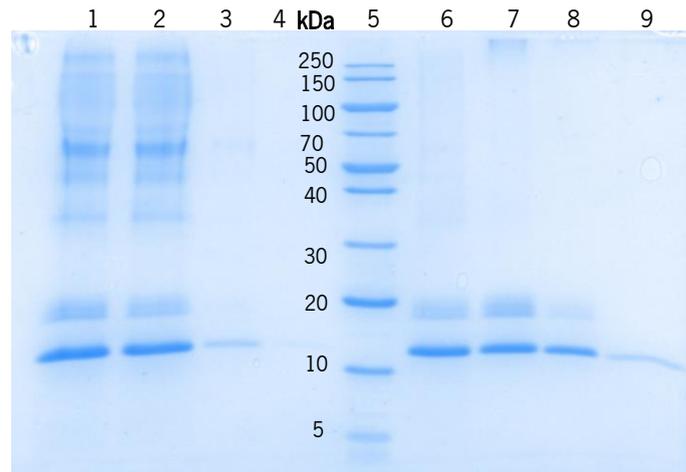


Figura 3.10. Purificação da PprFTLHis₆ por IMAC-Ni. Análise dos passos de purificação em gel SDS-PAGE 4%-15% corado com *Coomassie blue*. Legenda: 1- Amostra inicial de PprFTLHis₆ antes da purificação; 2- *Flow-through*; 3- Lavagem com tampão de equilíbrio; 4- Lavagem com tampão de lavagem; 5- Marcador de pesos moleculares; 6- Eluído 1 com tampão de eluição, 7- Eluído 2 com tampão de eluição; 8- Eluído 3 com tampão de eluição; 9- Lavagem da coluna com EDTA 0,1 M.

Ao analisar o gel (figura 3.10) é possível observar que há muita perda de proteína no *flow-through* e na primeira lavagem (poços 2 e 3), ou seja a amostra apresenta baixa afinidade com a resina de níquel. Esta fraca interação leva a uma quantidade baixa de proteína nos eluídos (3,37 mg), como observado nos poços 6, 7 e 8. Posteriormente foi necessário o processo de ultrafiltração para retirar o imidazole da amostra trocando o tampão para PBS pH 7,4 e obteve-se aproximadamente 0,8 mg de frutalina recombinante pura.

Relativamente ao rendimento do processo de purificação e ultrafiltração este foi de aproximadamente 6%, estimando que a quantidade de frutalina presente na amostra inicial é cerca de 60% da quantidade de proteína total, esta estimativa foi feita por análise do gel SDS-PAGE (figura 3.10; poço 1). No final da purificação e do processo de ultrafiltração foi possível obter 0,8-0,9 mg de frutalina recombinante pura por cada litro de cultura. Este resultado foi obtido mesmo usando uma coluna de purificação nova.

A incapacidade de purificar a proteína PprFTLHis₆ por afinidade ao níquel levou à hipótese de que a estrutura tridimensional da proteína poderá ocultar a cauda de histidinas, não permitindo a sua ligação à resina de níquel, tal como num trabalho feito anteriormente com as proteínas Fh8BMP-2 e Fh8II-10 em que não foi possível purificar por afinidade ao níquel usando o *tag His₆* [42].

3.4. Caracterização da estabilidade de diferentes versões de frutalina recombinante

A caracterização da estabilidade de diferentes versões de frutalina recombinante quanto à atividade hemaglutinante (HA) e à estrutura permitem retirar importantes informações sobre a estabilidade da proteína e suas propriedades funcionais.

3.4.1. *Dynamic Light Scattering*

Os ensaios de DLS (secção 2.12) permitiram caracterizar estruturalmente as várias versões de frutalina recombinante, e assim saber se estas estão organizadas em tetrámeros, a conformação da frutalina nativa [12, 14], ou mesmo se existe uma população homogénea ou heterogénea dependendo do número de picos observados nos gráficos e qual o tamanho dessa mesma população (tabela 3.1 e figura 3.11).

Tabela 3.1. Ensaios de DLS de diferentes versões de frutalina recombinante. Os valores para “r obtido” correspondem à média \pm desvio-padrão de 10 leituras

Frutalina	Tampão	Histórico (Tempo a -20°C)	MW (kDa) estimado Protparam- Expasy	r (nm) esperado DLS	r (nm) obtido DLS
PprFTL-SEC A		~6 Meses*	71,2	3,68	3,5 \pm 0,51
PprFTL-HIC A	PBS pH	1 Mês**	71,2	3,68	3,1 \pm 0,52
EcrFh8FTL	7,4	~6 Meses*	108,8	4,42	5,9 \pm 2,22
EcrCFTL		~6 Meses*	70	3,66	2,9 \pm 0,83
EcrHis ₆ FTL	PBS pH 6,0	~6 Meses*	82	3,91	98,4 \pm 22,9 39,7 \pm 4,21 0,3 \pm 0,04

* Outro investigador

** Este trabalho

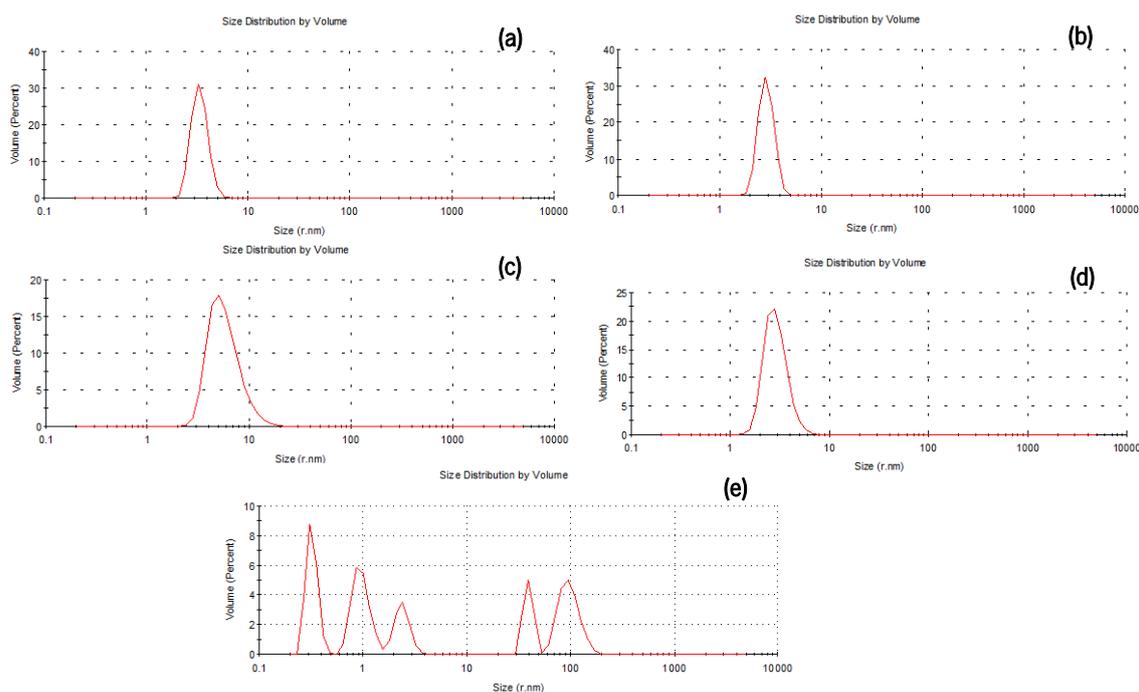


Figura 3.11. Ensaios de DLS das diferentes versões de frutalina recombinante. Distribuição "Tamanho vs Volume". Legenda: (a) Gráfico da versão PprFTL-SEC A; (b) Gráfico da versão PprFTL-HIC A; (c) Gráfico da versão EcrFh8FTL; (d) Gráfico da versão EcrCFTL; (e) Gráfico da versão EcrHis₆FTL.

No primeiro caso, PprFTL-SEC A (figura 3.11-A), verifica-se a existência de uma população homogénea em forma de tetrámero, tal como a frutalina nativa [12, 14]. Além disso é possível concluir que a proteína é estruturalmente estável pois esteve armazenada durante aproximadamente 6 meses e a sua conformação em forma de tetrámero não se alterou. Relativamente à versão PprFTL-HIC A (figura 3.11-B) o resultado é muito semelhante contudo nada é possível concluir sobre a estabilidade desta proteína pois foi armazenada por um curto espaço de tempo.

No que diz respeito à versão EcrFh8FTL (figura 3.11-C) esta parece estar aglomerada em "dímeros de tetrámeros" (uma vez que o "r obtido" é cerca do dobro do esperado) apesar da sua população ser homogénea, isto pode ser devido à proteína de fusão Fh8 ter a possibilidade de apresentar dímeros e oligómeros numa conformação ordenada [42]. Já a versão EcrCFTL (figura 3.11-D), resultante desta anterior, apresenta um resultado muito semelhante à versão PprFTL-SEC A, dado que apresenta uma população homogénea em forma de tetrámero revelando-se também estruturalmente estável quando armazenada [42].

Por último, a EcrHis₆FTL (figura 3.11-E) revela-se um caso extremamente diferente apresentando uma população heterogénea com 5 grupos de diversos tamanhos. Destes 5 grupos

existem 2 populações com um tamanho superior ao esperado ($98,4 \pm 22,9$; $39,7 \pm 4,21$), sugerindo que a EcrHis₆FTL está aglomerada. Além disso, existe ainda uma população com um tamanho inferior ao esperado ($0,3 \pm 0,04$), que poderá corresponder a frutalina desnaturada. A população organizada em forma de tetrâmero, o resultado esperado, é a existente em minoria. Verifica-se também que esta é uma proteína extremamente instável que precipita a pH fisiológico e a qualquer variação de temperatura, o que torna inviável o seu uso.

3.4.2. Ensaio de hemaglutinação

Relativamente à atividade hemaglutinante (secção 2.13) foram feitos 2 ensaios independentes (n=2) em que foram obtidos os mesmos resultados (tabela 3.2).

Tabela 3.2. Atividade hemaglutinante da frutalina nativa e de diferentes versões de frutalina recombinante (concentração inicial $\approx 0,1$ g/L)

Frutalina	Tampão	HA
FTL nativa		1:32
PprFTL-SEC A		Negativo
PprFTL-HIC A	PBS pH 7,4	Negativo
EcrFh8FTL		1:4
EcrCFTL		Negativo
EcrHis ₆ FTL	PBS pH 6,0	1:64

Tal como reportado em trabalhos anteriores a frutalina nativa possui atividade hemaglutinante (HA) de 1:32 em eritrócitos de coelho [12]. Ao contrário desta, a frutalina recombinante expressa em *P. pastoris* não possui HA em eritrócitos de coelho, independentemente do método de purificação usado (versão PprFTL-SEC A e PprFTL-HIC A), o que sugere que a glicosilação inibe a HA, apesar de manter a sua estrutura tetramérica, tal como referido anteriormente [16].

Relativamente à EcrFh8FTL há a possibilidade de formação de “dímeros de tetrâmeros” e perda da HA. No que respeita à EcrCFTL esta manteve a estrutura mas perdeu a HA. Estes resultados não vão de encontro aos obtidos num trabalho anterior [42], contudo nesse trabalho foi usado um tampão diferente (Tris 50 mM, NaCl 150 mM a pH 8.0), o que sugeriu que talvez fosse o tampão usado neste trabalho, PBS com pH 7,4, que estivesse a provocar a perda de HA da proteína. Contudo o tampão usado nestas proteínas é o mesmo da FTL nativa e esta manteve a sua HA. Desse modo, esta diferença poderá ser devida ao pH do tampão que poderá estar a alterar a conformação dos locais de ligação açúcares.

Por fim, a versão EcrHis₆FTL apesar de ser uma população heterogénea, apresentou HA de 1:64, o que implicaria que esta versão tivesse maior HA do que a nativa, o que não faz sentido. Dada a cor e aspeto dos precipitados de eritrócitos observados (diferentes dos causados pela frutalina nativa), outro fenómeno de precipitação poderá ter ocorrido, tendo origem na amostra utilizada (fato não observado no correspondente controlo negativo, PBS pH 6,0).

3.5. Efeito anti-proliferativo das diferentes versões de frutalina recombinante em linhas tumorais humanas

De modo a perceber se as diferentes versões de frutalina recombinante possuem efeito anti-proliferativo, estas foram aplicadas em 2 linhas tumorais humanas HCT 116 p53^{+/+} e p53^{-/-}.

Relativamente às 2 versões produzidas em *E. coli* (EcrHis₆FTL e EcrCFTL) foram realizados 2 ensaios independentes (n=2) e nenhuma delas mostrou ter efeito anti-proliferativo em ambas as linhas, tal como a EcrFh8FTL testada num outro trabalho [2]. Estes resultados sugerem que a glicosilação pode ter um papel importante na atividade da frutalina [11], e a ausência desta leva à inexistência de atividade anti-proliferativa. De referir que a isoforma de frutalina clonada em *E. coli* possui uma sequência consenso para N-glicosilação [10], logo, na natureza, a glicosilação pode fazer parte desta isoforma. Além disso, esta isoforma não é a mesma que clonada em *P. pastoris* e desse modo as suas atividades não são comparáveis.

Em relação às versões produzidas em *P. pastoris* e purificadas por 2 metodologias diferentes foi possível obter 4 versões. As versões resultantes da metodologia de HIC foram usadas para verificar se realmente a glicosilação tem influência na atividade anti-proliferativa da frutalina.

Com as versões resultantes da metodologia SEC pretendeu-se esclarecer a questão da estabilidade da frutalina recombinante ao longo do tempo, visto já se ter comprovado que esta é uma proteína com efeito anti-proliferativo nas linhas celulares HCT 116 p53^{+/+} e p53^{-/-} [2], bem como comparar com as versões resultantes da metodologia HIC. Além disso, ainda foi testada a PprFTLHis₆ de modo a verificar se esta possui efeito anti-proliferativo, e se o *tag* His₆ influencia de alguma forma a atividade da frutalina recombinante produzida em *P. pastoris*.

Os valores de GI₅₀ obtidos para as versões de frutalina recombinante produzidas em *P. pastoris* estão apresentados na figura 3.12. Para cada frutalina foram realizados 2 ensaios independentes (n=2) apenas na linha celular tumoral HCT 116 p53^{+/+}, isto porque num trabalho anterior não se verificaram diferenças nos resultados em ambas as linhas, o que sugeriu que a indução de apoptose não é dependente da p53 [46].

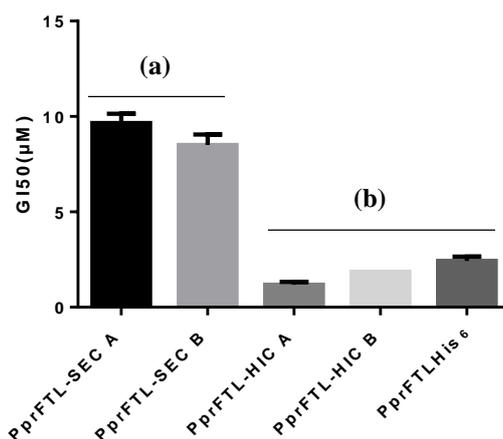


Figura 3.12. Análise estatística dos valores de GI₅₀ em células HCT 116 p53^{+/+} de diferentes versões de frutalina recombinante de *P. pastoris* obtidas por diferentes metodologias de purificação. Os resultados do grupo (a) são significativamente diferentes do grupo (b) ($p < 0,0001$) pelo teste de Tukey.

Analisando os resultados obtidos verificou-se que os valores de GI₅₀ correspondentes à frutalina recombinante purificada por SEC são significativamente diferentes dos valores correspondentes à purificada por HIC e IMAC-Ni. Entre as versões purificadas por SEC não há diferenças significativas, tal como entre as versões purificadas por HIC e IMAC-Ni (PprFTLHis₆).

Em relação às amostras purificadas por SEC não existe diferença significativa entre os valores de GI₅₀, ambas as versões são iguais apenas diferem no tempo de armazenamento a -

20°C e no investigador que levou a cabo a sua produção e purificação. A PprFTL-SEC A foi produzida num trabalho anterior e armazenada durante 6 meses e a PprFTL-SEC B foi produzida neste trabalho e armazenada durante 1 mês antes da sua aplicação nas linhas tumorais humanas. Os resultados obtidos permitiram concluir que frutalina produzida em *P. pastoris* e purificada por SEC é estável estruturalmente e mantém a sua atividade anti-proliferativa mesmo após meses de armazenamento a -20°C. Contudo estas versões de frutalina possuem um efeito citotóxico menor (GI_{50} PprFTL-SEC A=9,66 ± 0,481; GI_{50} PprFTL-SEC B= 8,50 ± 0,552), quando comparadas com as versões obtidas pelas outras metodologias.

As amostras resultantes da metodologia HIC diferem uma da outra na fração glicosilada, sendo a A enriquecida e a B desfavorecida nesta fração (menos 23%). Em relação aos resultados de GI_{50} a PprFTL-HIC A tem cerca do dobro da potência da PprFTL-HIC B (GI_{50} PprFTL-HIC A=1,18 ± 0,159; GI_{50} PprFTL-HIC B= 2,11 ± 0,281), o que sugere que a glicosilação é importante na atividade da frutalina, contudo estas diferenças não são significativas [11].

Em relação à PprFTLHis₆ purificada por IMAC-Ni é possível verificar que o *tag* His₆ não influencia negativamente a atividade anti-proliferativa da frutalina, tendo um valor de GI_{50} relativamente baixo (GI_{50} PprFTLHis₆= 2,44 ± 0,219). Esta versão de frutalina recombinante não possui diferenças significativas quando comparada com as versões purificadas por HIC e todas elas possuem valores de GI_{50} baixos. Ou seja, são potentes agentes de inibição da proliferação celular, quando comparadas com as versões de frutalina purificadas por SEC. Isto pode dever-se a uma seleção de determinadas formas de frutalina recombinante, com maior atividade, em detrimento de outras, com menor atividade, em IMAC-Ni e em HIC, e que não acontece em SEC.

Os resultados da purificação IMAC-Ni já haviam sugerido a ocorrência de diferentes conformações na frutalina recombinante produzida em *P. pastoris*. Esta proteína é uma mistura heterogénea de formas glicosiladas e não-glicosiladas e a combinação destas pode levar à organização de tetrâmeros com e sem glicosilação, e por isso com diferentes conformações, e, consequentemente com diferentes atividades. Além disso, as formas glicosiladas podem variar no conteúdo em manose, como verificado na figura 3.10, onde é possível observar a existência de 2 bandas glicosiladas sobrepostas. Em SEC a frutalina é simplesmente purificada pelo seu peso molecular, logo haverá essa mistura, ao passo que em IMAC-Ni e HIC determinadas conformações da frutalina foram selecionadas, correspondendo às mais ativas.

A seleção na metodologia de IMAC-Ni poderá ser devida à conformação adotada pela proteína (isto é, por cada tetrâmero) aquando do seu enrolamento, tornando em alguns casos o *tag* oculto, não permitindo assim a sua ligação à resina de níquel, e dessa forma provoca alguma seleção de conformações presentes na amostra final, que poderão corresponder às mais potentes (glicosiladas). Relativamente à metodologia de HIC também poderá ocorrer seleção pois aquando do aumento da concentração de sais ocorre a alteração da conformação da frutalina para expor os resíduos hidrofóbicos e ligar-se ao meio HIC. Nesse momento pode acontecer a seleção de determinadas formas devido à diferente exposição dos resíduos hidrofóbicos e assim, se ligarem de forma diferente à coluna sendo eluídas de forma diferenciada, podendo na amostra final existir populações mais potentes (glicosiladas) em detrimento de outras com efeito menor (não-glicosiladas).

Capítulo 4

Conclusões e Perspetivas futuras

4.1. Conclusões

Neste trabalho foram estudadas diferentes versões de frutalina recombinante com vista à sua aplicação biomédica, para isso avaliaram-se dois sistemas de expressão, *P. pastoris* e *E. coli*. A levedura *P. Pastoris* já usada em trabalhos anteriores é capaz de conferir glicosilação e resulta em versões de frutalina recombinante com atividade citotóxica, contudo a metodologia de purificação até então usada, SEC, carece de otimização. Para isso, foram testadas diferentes metodologias de purificação, nomeadamente HIC e IMAC-Ni. Por outro lado, a *E. coli*, como sistema de expressão, aliada à tecnologia de proteínas de fusão permite um processo de produção e purificação mais eficiente, contudo até ao presente trabalho não foi possível a obtenção de versões com efeito citotóxico.

Nesse sentido, foram testadas duas versões de frutalina produzidas em *E. coli*, versões não-glicosiladas, uma delas contendo o *tag* His₆ (EcrHis₆FTL) e outra resultante da clivagem do Fh8 da versão EcrFh8FTL (EcrCFTL), em linhas tumorais humanas com (HCT 116 p53^{+/+}) e sem a forma nativa da p53 (HCT 116 p53^{-/-}), e nenhuma destas versões mostrou ter efeito anti-proliferativo em ambas as linhas tumorais. O que sugere que a glicosilação assume um papel importante na atividade da frutalina e a ausência desta resulta na inexistência de atividade anti-proliferativa, ou a isoforma clonada em *E. coli* é uma isoforma sem atividade. Além disso, a frutalina expressa em *E. coli* com o *tag* de solubilidade Fh8 (EcrFh8FTL) e a versão resultante da clivagem do Fh8 (EcrCFTL) apresentaram populações homogêneas mas perderam a sua HA após o armazenamento a -20°C durante 6 meses. Do ponto de vista estrutural, a EcrFh8FTL forma “dímeros de tetrâmeros” e a EcrCFTL está organizada em forma de tetrâmero, ambas populações homogêneas. Contrariamente a frutalina recombinante expressa em *E. coli* usando o *tag* de purificação His₆ (EcrHis₆FTL) apresentou uma população heterogênea e revelou-se um caso de extrema instabilidade tornando inviável o seu uso.

Relativamente às versões de frutalina produzidas em *P. pastoris*, versões glicosiladas, todas elas mostraram ter efeito anti-proliferativo nas linhas tumorais humanas. A frutalina purificada por SEC é estável estruturalmente e manteve a sua atividade anti-proliferativa na linha HCT 116 p53^{+/+} mesmo após meses de armazenamento a -20°C. Contudo possui um efeito citotóxico menor, talvez devido à sua composição, pois é simplesmente purificada pelo seu peso molecular, logo haverá uma mistura de conformações e atividades. As versões de frutalina

resultantes da purificação por HIC, mostraram ter atividades citotóxicas diferentes, sendo que a versão enriquecida na fração glicosilada possui cerca do dobro da potência da versão desfavorecida nesta fração, o que sugere que a glicosilação é importante na atividade da frutalina, contudo estas diferenças não são significativas. Em relação à PprFTLHis₆ purificada por IMAC-Ni foi possível verificar que o *tag* His₆ não influencia negativamente a atividade anti-proliferativa da frutalina e esta possui um potente efeito anti-proliferativo na linha HCT 116 p53^{+/+}.

As versões de frutalina purificadas por HIC e IMAC não apresentaram diferenças significativas no efeito anti-proliferativo que exibem, contudo as versões purificadas por SEC revelaram-se menos potentes quando comparadas com as anteriores, existindo diferenças significativas. Isto pode dever-se a uma seleção de determinadas conformações de frutalina recombinante, com maior atividade, em detrimento de outras, com menor atividade, em IMAC-Ni e em HIC, e que não acontece em SEC. Posto isto, foi possível concluir que a frutalina recombinante de *P. pastoris* é uma mistura heterogénea de tetrámeros com diferentes conformações e atividades, justificando a variabilidade na atividade das diferentes versões de frutalina recombinante aqui estudadas.

Por fim concluiu-se que a *E. coli*, como sistema de expressão, permite um processo de produção e purificação mais eficiente contudo as versões resultantes continuam a não ter efeito citotóxico. Já a levedura *P. pastoris* apesar de ter um processo de produção eficiente continua a carecer de otimização do processo de purificação usado (SEC). Neste trabalho foram feitas tentativas de otimização, nomeadamente HIC e IMAC-Ni, contudo os resultados não foram satisfatórios e estas revelaram-se metodologias de purificação menos eficientes que SEC. Curiosamente, as amostras resultantes da metodologia de purificação mais eficiente (SEC) mostraram ter menor efeito anti-proliferativo comparativamente com as amostras resultantes das metodologias menos eficientes (HIC e IMAC-Ni) onde foram obtidas amostras de frutalina recombinante com um potente efeito anti-proliferativo em linhas tumorais humanas HCT 116 p53^{+/+}.

4.2. Perspetivas futuras

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, seria interessante como trabalho futuro:

- (1) Produzir a isoforma de frutalina recombinante de *P. pastoris* em *E. coli*, de modo a verificar se a ausência de atividade das versões produzidas em *E. coli* é devida à isoforma clonada ou à ausência de glicosilação conferida pelo sistema de expressão, e assim esclarecer se efetivamente a glicosilação é essencial para o efeito anti-proliferativo da frutalina ou se a isoforma clonada é que influencia este efeito;
- (2) Clonar a frutalina com o *tag* His₆ no N-terminal em *P. pastoris* para purificação por IMAC-Ni, na expectativa de contornar o possível problema de indisponibilidade conformacional do *tag* His₆ quando presente no C-terminal e avaliar a sua atividade citotóxica, ou aumentar o número de histidinas do *tag* usado de modo a tornar a ligação à coluna mais forte e assim reduzir a quantidade de proteína perdida, e consequentemente otimizar o processo de purificação;
- (3) Explorar de uma forma mais profunda o mecanismo de indução de apoptose dependente da via das caspases.

Quando o processo de produção e purificação for otimizado de modo a obter grandes quantidades de frutalina recombinante, esta poderá ser usada como biomarcador tumoral e agente indutor de apoptose de células tumorais. Adicionalmente, poderá ser incorporada em nanopartículas para que seja possível o seu transporte até às células tumorais e a sua libertação controlada, quando usada em modelos *in vivo*.

Capítulo 5

Referências

- [1] B. Liu, H. Bian, and J. Bao, "Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic.," *Cancer Lett.*, vol. 287, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2010.
- [2] S. Haupt, M. Berger, Z. Goldberg, and Y. Haupt, "Apoptosis - the p53 network.," *J. Cell Sci.*, vol. 116, no. Pt 20, pp. 4077–85, Oct. 2003.
- [3] Y. Iijima, Koh Amano, Akikazu Ando, "Production of Fruiting-Body Lectins of *Pleurotus cornucopiae* in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 95, no. 4, pp. 416–418, 2003.
- [4] D. Zupančič, M. Kreft, and R. Romih, "Selective binding of lectins to normal and neoplastic urothelium in rat and mouse bladder carcinogenesis models.," *Protoplasma*, vol. 251, no. 1, pp. 49–59, Jan. 2014.
- [5] C. Oliveira, J. Teixeira, and L. Domingues, "Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools.," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 33, no. 1, pp. 66–80, Mar. 2013.
- [6] L. Fu, C. Zhou, S. Yao, J. Yu, B. Liu, and J. Bao, "Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents.," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 43, no. 10, pp. 1442–9, Oct. 2011.
- [7] H. Astoul, "The size, shape and specificity of the sugar-binding site of the jacalin-related lectins is profoundly affected by the proteolytic cleavage of the subunits," *J. Biochem.*, vol. 367, pp. 817–824, 2002.
- [8] W. Peumans and B. Hause, "The galactose-binding and mannose-binding jacalin-related lectins are located in different sub-cellular compartments," *FEBS Lett.*, vol. 477, pp. 186–192, 2000.
- [9] A. Sahasrabudhe, S. Gaikwad, and M. V. Krishnasastri, "Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin," pp. 3264–3273, 2004.
- [10] C. Oliveira, S. Costa, J. Teixeira, and L. Domingues, "cDNA cloning and functional expression of the alpha-D-galactose-binding lectin frutalin in *Escherichia coli*," *Mol. Biotechnol.*, vol. 43, no. 3, pp. 212–20, Nov. 2009.
- [11] N. Pineau, J. Pousset, J. Preud'Homme, and P. Aucouturier "Structural and functional similarities of breadfruit seed lectin and jacalin," *Mol. Immunol.*, vol. 27, no. 3, pp. 237–240, 1990.
- [12] R. Moreira, C. Castelo-branco, A. Monteiro, R. Tavares, and L. Beltramini, "Isolation and partial characterization of a lectin from *artocarpus incisa* L. seeds," *Phytochemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1183–1188, 1998.

- [13] C. Oliveira, J. Teixeira, and L. Domingues, "Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application - the frutalin case study.," *Front. Plant Sci.*, vol. 5, no. August, p. 390, Jan. 2014.
- [14] P. Campana, D. Moraes, A. Moreira, and L. Belmatrini, "Unfolding and refolding studies of frutalin, a tetrameric D-galactose binding lectin," *J. Biochem.*, vol. 269, pp. 753–758, Mar. 2002.
- [15] T. Nobre, F. Pavinatto, M. Cominetti, H. Selistre de-Araújo, M. Zaniquelli, and L. Beltramini, "The specificity of frutalin lectin using biomembrane models.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1798, no. 8, pp. 1547–55, Aug. 2010.
- [16] C. Oliveira, W. Felix, and R. Moreira, "Expression of frutalin, an alpha-D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*," *Protein Expr. Purif.*, vol. 60, pp. 188–193, 2008.
- [17] C. Oliveira, J. Teixeira, F. Schmitt, and L. Domingues, "A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues.," *BMC Biotechnol.*, vol. 9, p. 78, Jan. 2009.
- [18] A. Brando-Lima, R. Saldanha-Gama, C. Pereira, C. Villela, A. Sampaio, A. Monteiro-Moreira, M. Henriques, R. Moreira, and C. Barja-Fidalgo, "Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase-Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte.," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 6, no. 3, pp. 465–72, Mar. 2006.
- [19] A. Brando-Lima, R. Saldanha-Gama, M. Henriques, A. Monteiro-Moreira, R. a Moreira, and C. Barja-Fidalgo, "Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase.," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 208, no. 2, pp. 145–54, Oct. 2005.
- [20] C. Oliveira, A. Nicolau, J. Teixeira, and L. Domingues, "Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells.," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2011, Jan. 2011.
- [21] A. de Vasconcellos Abdon, G. Coelho de Souza, L. Noronha Coelho de Souza, R. Prado Vasconcelos, C. Araújo Castro, M. Moreira Guedes, R. C. Pereira Lima, R. de Azevedo Moreira, A. de Oliveira Monteiro-Moreira, and A. Rolim Campos, "Gastroprotective potential of frutalin, a D-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions.," *Fitoterapia*, vol. 83, no. 3, pp. 604–8, Apr. 2012.
- [22] D. Mislovičová, P. Gemeiner, A. Kozarova, and T. Kožár, "Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics," *Biologia (Bratisl.)*, vol. 64, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2009.

- [23] A. Markiv, D. Peiris, G. Curley, M. Odell, and M. Dwek, "Identification, cloning, and characterization of two N-acetylgalactosamine-binding lectins from the albumen gland of *Helix pomatia*," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 23, pp. 20260–6, Jun. 2011.
- [24] H. Zwierzinaemail, L. Bergmann, H. Fiebig, S. Aamdal, P. Schöffski, K. Witthohn, and H. Lentzen, "The preclinical and clinical activity of aviscumine: A potential anticancer drug," *Eur. J. Cancer*, vol. 47, no. 10, pp. 1450–1457, 2011.
- [25] N. Yang, X. Tong, Y. Xiang, Y. Zhang, Y. Liang, H. Sun, and D.-C. Wang, "Molecular character of the recombinant antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*," *J. Biochem.*, vol. 138, no. 2, pp. 145–50, Aug. 2005.
- [26] A. Sahasrabudde, N. Ahmed, and M. Krishnasastri, "Stress-induced phosphorylation of caveolin-1 and p38, and down-regulation of EGFR and ERK by the dietary lectin jacalin in two human carcinoma cell lines," *Cell Stress Chaperones*, vol. 11, no. 2, p. 135, 2006.
- [27] Y. Zhang, "Recombinant *Microcystis viridis* lectin as a potential anticancer agent," *Pharmazie*, vol. 65, pp. 1996–1997, 2010.
- [28] S. Lowe and A. Lin, "Apoptosis in cancer," vol. 21, no. 3, pp. 485–495, 2000.
- [29] S. Fulda and K. Debatin, "Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy," *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4798–811, Aug. 2006.
- [30] S. Elmore, "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death," *Natl. Institutes Heal.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [31] D. McIlwain, T. Berger, and T. Mak, "Caspase functions in cell death and disease," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 4, p. a008656, Apr. 2013.
- [32] M. Hengartner, "The biochemistry of apoptosis," *Nature*, vol. 407, no. 6805, pp. 770–6, Oct. 2000.
- [33] M. Olsson and B. Zhivotovsky, "Caspases and cancer," *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 9, pp. 1441–9, Sep. 2011.
- [34] I. Coutinho, G. Pereira, M. Leão, J. Gonçalves, M. Côrte-Real, and L. Saraiva, "Differential regulation of p53 function by protein kinase C isoforms revealed by a yeast cell system," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 22, pp. 3582–8, Nov. 2009.
- [35] J. Fridman and S. Lowe, "Control of apoptosis by p53," *Oncogene*, vol. 22, no. 56, pp. 9030–40, Dec. 2003.
- [36] A. Berlec and B. Strukelj, "Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 3–4, pp. 257–74, Apr. 2013.

- [37] A. Demain and P. Vaishnav, "Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms.," *Biotechnol. Adv.*, vol. 27, no. 3, pp. 297–306, 2009.
- [38] T. Gerngross, "Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 11, pp. 1409–14, Nov. 2004.
- [39] D. Francis and R. Page, "Strategies to optimize protein expression in *E. coli*.," *Curr. Protoc. Protein Sci.*, vol. Chapter 5, no. August, p. Unit 5.24.1–29, Aug. 2010.
- [40] S. Costa, A. Almeida, A. Castro, and L. Domingues, "Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system.," *Front. Microbiol.*, vol. 5, no. February, p. 63, Jan. 2014.
- [41] S. Costa, A. Almeida, A. Castro, L. Domingues, and H. Besir, "The novel Fh8 and H fusion partners for soluble protein expression in *Escherichia coli*: a comparison with the traditional gene fusion technology.," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, no. 15, pp. 6779–91, Aug. 2013.
- [42] S. Costa, "Development of a novel fusion system for recombinant protein production and purification in *Escherichia coli*," Universidade do Minho, 2013.
- [43] S. De-Simone, C. Netto, and F. Silva, "Simple affinity chromatographic procedure to purify beta-galactoside binding lectins.," *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 838, no. 2, pp. 135–8, Jul. 2006.
- [44] G. E. Healthcare, "Strategies for Protein Purification," 2010, pp. 13–26.
- [45] M. Wanderley, C. Oliveira, D. Bruneska, L. Domingues, J. Lima Filho, J. Teixeira, and S. Mussatto, "Influence of trace elements supplementation on the production of recombinant frutalin by *Pichia pastoris* KM71H in fed-batch process," *Chem. Pap.*, vol. 67, no. 7, pp. 682–687, Mar. 2013.
- [46] S. Mendonça, "Elucidation of the molecular mechanisms underlying the cytotoxic effect of recombinant frutalin in human tumor cells," Universidade do Minho, 2013.
- [47] C. Li, P. Luo, J. Liu, E. Wang, W. Li, Z. Ding, L. Mou, and J. Bao, "Recombinant expression of *Polygonatum cyrtoneuma* lectin with anti-viral, apoptosis-inducing activities and preliminary crystallization," *Process Biochem.*, vol. 46, no. 2, pp. 533–542, Feb. 2011.
- [48] Invitrogen, *EasySelect Pichia Expression kit*, no. 25. 2010.
- [49] U. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," *Nature*, vol. 224, pp. 680–685, 1970.
- [50] L. Zhao, C. Liu, Y. Sun, and L. Ban, "A rapid and simplified method for protein silver staining in polyacrylamide gels.," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 14, pp. 2143–4, Jul. 2012.

- [51] K. Kirtikara and V. Vichai, "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening," *Nat. Protoc.*, vol. 1, pp. 1112–1116, 2006.
- [52] J. Queiroz, C. Tomaz, and J. Cabral, "Hydrophobic interaction chromatography of proteins," *J. Biotechnol.*, vol. 87, no. 2, pp. 143–159, May 2001.
- [53] G. Walsh and R. Jefferis, "Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins.," *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 10, pp. 1241–52, Oct. 2006.

Capítulo 6

Anexos

6.1. Sequências

FTL nativa

AEQSGKSQTIVGPGWAKVSGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVQSHTSFIKGF
 PVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSQYVWRSLTFKTNKKTYGPYGVTSPTFNLPIENGLVGFKGSIGYWM
 DYFSMYLSL

PprFTL-SEC e PprFTL-HIC

EAEAENQSGKSQTIVGPGWAKVSTSSNGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVYDLNGSPYV
 QNHKSFITGFTPVKISLDFPSEYIMEVSGYTGNSVQYVWRSLTFKTNKKTYGPYGVTSPTFNLPIENGLI
 VGFKGSIGYWLDYFSMYLSL

PprFTLHis₆

ENQSGKSQTIVGPGWAKVSTSSNGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVYDLNGSPYVQNHK
 SFITGFTPVKISLDFPSEYIMEVSGYTGNSVQYVWRSLTFKTNKKTYGPYGVTSPTFNLPIENGLIVGFKGS
 IGYWLDYFSMYLSLHHHHH

EcrHis₆FTL

MKHHHHHPMSDYDIPTTENLYFQGMGSAEQSGKSQTIVGPGWAKVSTSSNGKAFDDGAFTGIREIN
 LSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVQSHTSFIKGFPTVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSQYVWRSLTFKTN
 KKTYGPYGVTSPTFNLPIENGLVGFKGSIGYWMDYFSMYLSL

EcrFh8FTL

MKHHHHHPMSPSVQVEKLLHVLDRNGDGKVSAAELKAFADDSKCPLDSNKIKAFIKEHDKNKDGKL
 DLKELVSILSSENLYFQSMGSAEQSGKSQTIVGPGWAKVSTSSNGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIG
 DFQVIYDLNGRPFVQSHTSFIKGFPTVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSQYVWRSLTFKTNKKTYGPYGV
 TSGPTFNLPIENGLVGFKGSIGYWMDYFSMYLSL

EcrCFTL

GSMGSAEQSGKSQTIVGPGWAKVSTSSNGKAFDDGAFTGIREINLSYNKETAIGDFQVIYDLNGRPFVQ
 SHTSFIKGFPTVKISLDFPSEYIVEVSGHTGKVSQYVWRSLTFKTNKKTYGPYGVTSPTFNLPIENGLVGF
 KGSIGYWMDYFSMYLSL

Legenda:

Cadeia β

Linker tetrapeptídico "T-S-S-N"

Cadeia α

His₆

Fh8FTL

