



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

# Estudo de Refolding Oxidativo de Proteínas

**Inês Filipa Correia Teixeira**

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de: Eduardo Xavier Pinho e Melo

**Faro, 2012**



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

# Estudo de Refolding Oxidativo de Proteínas

**Inês Filipa Correia Teixeira**

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de: Eduardo Xavier Pinho e Melo

**Faro, 2012**

# Estudo de Refolding Oxidativo de Proteínas

## Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

Copyright © 2012, por \_\_\_\_\_

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográfico, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## AGRADECIMENTOS

---

Ao Professor Doutor Eduardo Xavier Pinho e Melo, agradeço o apoio e disponibilidade constante ao longo da orientação da dissertação de mestrado. Agradeço, igualmente, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

À Doutora Joana Macedo, agradeço o auxílio, a disponibilidade e a paciência ao longo de todo o processo.

Ao Carlos Lopes e Evandro Tavares, agradeço a sempre disponível capacidade de entreatuda e de transmissão de conhecimentos bem como a forma calorosa como me receberam.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã agradeço o apoio incondicional, a paciência e o carinho demonstrado não só nesta fase, mas em todas as etapas que contribuíram para a pessoa que hoje sou.

Gostaria, igualmente à Ana Catarina Águas e Cátia Pires, que me acompanharam ao longo do curso, pelo convívio, amizade, cumplicidade e compreensão.

Por fim, na impossibilidade de agradecimento individual a todas as pessoas que me ajudaram e apoiaram, gostaria de manifestar a todos a minha profunda gratidão.

## RESUMO

---

O *folding* oxidativo de proteínas consiste na formação de pontes dissulfureto intramoleculares envolvendo a oxidação de grupos tiol no sentido da criação de uma ligação entre duas cisteínas. Esta modificação postransducional é essencial para a estabilidade das proteínas, principalmente em proteínas secretadas para o meio extracelular. *In vivo*, o *folding* oxidativo ocorre no retículo endoplasmático e é assistido por uma série de proteínas que atuam como catalisadores. Estas reações em cadeia necessitam da presença de um aceitador final de elétrons.

No presente trabalho foram estudadas duas vias que atuam no retículo endoplasmático para o *refolding* oxidativo da proteína modelo Ribonuclease A: Uma via envolve a interação entre duas proteínas, a *Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1* (Ero1) e a *Protein Disulfide Isomerase* (PDI); A outra via envolve a interação da PDI com a *Peroxiredoxin IV* (PRDX4). Foi igualmente estudado o *refolding* oxidativo com uma enzima homóloga da PRDX4, a PRDX2, no sentido de compreender se existe especificidade na interação entre a PRDX4 e a PDI.

O estudo do *refolding* oxidativo da Ribonuclease foi realizado *in vitro* e avaliado em géis SDS-PAGE-Tricina com o objetivo de verificar a diferença de mobilidades entre a Ribonuclease reduzida e oxidada no gel. Na via da PRDX4/PDI e PRDX2/PDI é necessária a introdução de Glucose e Glucose Oxidase, responsáveis pela produção de peróxido de hidrogénio que atua como aceitador final de elétrons desta via.

Em todas as vias foi observado *refolding* oxidativo da RNase. Na via da Ero1/PDI este foi substancialmente mais rápido e ocorre, embora em muito menor grau, mesmo na ausência da PDI. Na via da PRDX4/PDI o *refolding* é mais lento e foi constatado que não existe especificidade da PRDX4 para a PDI visto que, na presença da PRDX2, os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos com a PRDX4.

**Palavras-chave:** Proteínas, *Folding* Oxidativo de proteínas, Ribonuclease A (RNase), *Protein Disulfide Isomerase*, *Endoplasmic Reticulum Oxireductase*, *Peroxiredoxins*.

## ABSTRACT

---

Proteins control the cellular phenotype through its structure and function and disabilities in proteins can be the cause for many diseases. Protein folding is one of the most important process in protein function and problems like stress, mutations and random errors during the synthesis can cause a decrease on yield or rate of protein folding.

Protein oxidative folding is the formation of intramolecular disulfide bonds involving the oxidation of thiol groups in order to create a bond between two cystein residues. This posttranslational modification is essential for protein stability that is required, mostly for extracellular secreted proteins. *In vivo*, oxidative folding of secretory proteins occurs in endoplasmic reticulum and is assisted by a number of proteins that act like catalysts. These enzymatic reactions require the presence of a final electron acceptor.

In this work we have studied two pathways acting in the endoplasmic reticulum for the oxidative refolding of a model protein, Ribonuclease A. One pathway involves the interaction between Endoplasmic Reticulum Oxiredutase 1 (Ero1) and Protein Disulfide Isomerase (PDI). The other pathway involves the interaction between PDI and Peroxiredoxin IV (PRDX4). We have also studied the oxidative refolding using a PRDX4 homologue, PRDX2, to understand if there is specificity in the interaction between PRDX4 and PDI.

The study of oxidative refolding was carried *in vitro* and evaluated with SDS-PAGE-Tricine gels to examine the differences in mobility between reduced and oxidized RNase. For PRDX4 and PRDX2 pathways it was necessary to introduce Glucose and Glucose Oxidase which are responsible for producing hydrogen peroxide to act as final electron acceptor.

Oxidative refolding of RNase was observed for both pathways. In the Ero1/PDI pathway refolding was substantially faster and occurs also in the absence of PDI at significantly lower rates. In the PRDX4/PDI pathway refolding was slower and it was observed that there is no specificity between PDI and PRDX4 since the results with PRDX2 were similar.

**Key-words:** Proteins, Protein Oxidative Folding, Ribonuclease A (RNase), Protein Disulfide Isomerase, Endoplasmic Reticulum Oxiredutase, Peroxiredoxins.

# Índice

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>III</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>V</b>
<b>Índice de Abreviaturas</b> .....	<b>X</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>XI</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Índice de Gráficos</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 <i>Folding</i> de Proteínas .....	- 1 -
1.1.1 Problemas derivados de erros no <i>Folding</i> Proteico.....	- 3 -
1.1.2 Mecanismo de Controlo de Qualidade do <i>Folding</i> Proteico (“ <i>Protein Quality Control</i> ”)	- 3 -
1.2 Estabilização de proteínas através de Ligações Dissulfureto .....	- 4 -
1.2.1 Pontes Dissulfureto em <i>Escherichia coli</i> .....	- 6 -
1.3 <i>Folding</i> Oxidativo no Retículo Endoplasmático (RE) .....	- 6 -
1.3.1 <i>Protein Disulfide Isomerase</i> (PDI).....	- 8 -
1.3.2 <i>Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1</i> (Ero1).....	- 10 -
1.3.3 <i>Peroxirredoxins</i> II e IV.....	- 13 -
1.4 Estudo do <i>Folding</i> Oxidativo <i>In Vitro</i> .....	- 16 -
<b>2 Materiais e Métodos</b> .....	<b>- 19 -</b>
2.1 Materiais .....	- 19 -
2.1.1 Reagentes .....	- 19 -
2.1.2 Enzimas .....	- 19 -
2.1.3 Plasmídeos .....	- 19 -
2.1.4 Antibióticos.....	- 19 -
2.1.5 Estirpes de <i>E. coli</i> .....	- 20 -

2.1.6	Composição de Meios, Soluções e Tampões.....	20 -
2.1.7	Lista de Equipamentos .....	21 -
2.2	Métodos .....	21 -
2.2.1	Produção das Proteínas.....	22 -
2.2.1.1	Obtenção de Células Competentes.....	22 -
2.2.1.2	Transformação celular .....	22 -
2.2.1.3	Composição do meio de cultura.....	23 -
2.2.1.4	Fermentação do pré-inóculo e inóculo .....	23 -
2.2.1.5	Centrifugações .....	24 -
2.2.2	Lise Celular.....	24 -
2.2.3	Purificação da Proteína.....	25 -
2.2.4	Avaliação da expressão e da eficiência da purificação por SDS-PAGE .....	26 -
2.2.4.1	Preparação das amostras para correr no gel.....	28 -
2.2.4.2	Voltagem para a Eletroforese .....	29 -
2.2.4.3	Coloração e Descoloração do gel.....	29 -
2.2.4.4	Digitalização dos géis.....	30 -
2.2.5	Diálise das Proteínas .....	30 -
2.2.6	Quantificação de Proteínas pelo método de Bradford.....	31 -
2.2.7	Corte da Ero1 pela proteína ULP .....	31 -
2.2.8	Estudo de <i>Refolding</i> Oxidativo da Ribonuclease A (RNase) .....	32 -
2.2.8.1	SDS-PAGE-Tricina.....	32 -
2.2.8.2	Redução da RNase e PDI.....	34 -
2.2.8.3	Reação de <i>Refolding</i> .....	35 -
2.2.8.4	Voltagem .....	37 -
2.2.8.5	Coloração e Descoloração dos géis.....	38 -
2.2.8.6	Digitalização dos Géis.....	38 -

<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>- 39 -</b>
3.1	<i>Protein Disulfide Isomerase (PDI)</i> .....	- 39 -
3.1.1	Crescimento do Pré-inóculo.....	- 39 -
3.1.2	Propagação de Inóculos e Crescimento .....	- 40 -
3.1.3	Avaliação da Sobreexpressão .....	- 42 -
3.1.4	Purificação .....	- 44 -
3.1.5	Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford .....	- 45 -
3.2	<i>Peroxiredoxin IV (PRDX4)</i> .....	- 46 -
3.2.1	Crescimento do Pré-inóculo.....	- 46 -
3.2.2	Propagação de Inóculos e Crescimento .....	- 47 -
3.2.3	Avaliação da Sobreexpressão .....	- 48 -
3.2.4	Purificação .....	- 51 -
3.2.5	Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford .....	- 51 -
3.3	<i>Ubiquitin-Like Protein Protease (ULP)</i> .....	- 52 -
3.3.1	Crescimento do Pré-inóculo.....	- 52 -
3.3.2	Propagação de Inóculos e Crescimento .....	- 53 -
3.3.3	Avaliação da Sobreexpressão .....	- 54 -
3.3.4	Purificação .....	- 55 -
3.3.5	Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford .....	- 56 -
3.4	<i>Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1 (Ero1)</i> .....	- 57 -
3.4.1	Crescimento do Pré-inóculo.....	- 57 -
3.4.2	Propagação de Inóculos e Crescimento .....	- 58 -
3.4.3	Avaliação da Sobreexpressão .....	- 59 -
3.4.4	Purificação a fusão GST-Ero1 .....	- 60 -

3.4.5	Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford .....	- 61 -
3.4.5.1	Corte da fusão GST- Ero1 e purificação da Ero1 .....	- 61 -
3.5	<i>Peroxiredoxin</i> II (PRDX2) .....	- 62 -
3.5.1	Crescimento do Pré-inóculo.....	- 62 -
3.5.2	Propagação de Inóculos e Crescimento .....	- 63 -
3.5.3	Avaliação da Sobreexpressão .....	- 64 -
3.5.4	Purificação .....	- 65 -
3.5.5	Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford .....	- 66 -
3.6	Estudo do <i>Refolding</i> Oxidativo.....	- 66 -
3.6.1	Via da PDI/Ero1 .....	- 67 -
3.6.2	Via da PDI/PRDX4 .....	- 70 -
3.6.3	Via da PDI/PRDX2 .....	- 75 -
<b>4</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>- 81 -</b>
<b>5</b>	<b>Perspetivas Futuras .....</b>	<b>- 83 -</b>
<b>6</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>- 84 -</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

---

Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de Amónio
Asp	Aspartato
C <sub>f</sub>	Concentração final
Cys	Cisteína
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
DO	Densidade Ótica
FAD	Dinucleótido Flavina Adenina
Glu	Glutamato
His	Histidina
IPTG	Isopropiltioβ-D-galactosidase
Kan	Canamicina
k <sub>cat</sub>	Constante catalítica de reação enzimática
kDa	Quilo Daltons
K <sub>M</sub>	Constante de <i>Michaellis-Menten</i>
LB	Luria Bertani
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Um	Mili unidades
O/N	<i>Over Night</i>
p/v	Unidade de peso por volume
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoreto de Fenilmetanosulfonil
RE	Retículo Endoplasmático
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
UV	Ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

- Figura 1.1** Diagrama de energia para um polipéptido hipotético. O estado desenrolado é representado por U (*Unfolded state*), o estado mal enrolado por M (*Misfolded state*) e o estado enrolado por F (*Folded state*); (a) hipótese energética para o *folding in vitro*; (b) o mesmo diagrama para casos *in vivo* com a influência da rede proteica que intervém na eficiência do *folding* através da minimização dos agregados e de proteínas mal enroladas [4]. ..... - 2 -
- Figura 1.2** Formação de uma ponte dissulfureto de uma cadeia polipeptídica (rosa) com dois resíduos de cisteína (amarelo). A aproximação dos resíduos de cisteína induz o enrolamento da cadeia no sentido do *folding* proteico. (Imagem adaptada de [9])..... - 4 -
- Figura 1.3** a) Imagem ilustrativa do retículo endoplasmático: RE liso e RE rugoso que contém ribossomas agregados; b) Microscopia Eletrónica do RE (85,000x) ..... - 7 -
- Figura 1.4** Imagem da *Protein Disulfide Isomerase* (PDI). Domínio a' (vermelho), domínio a (lilás), domínio b' (amarelo), domínio b (azul) e domínio c (verde). A estrutura da PDI revela que os quatro domínios estão arrançados em forma de "U" com os centros ativos de frente uns para os outros nas extremidades do "U". Assim, os dois domínios inativos estão inseridos entre os dois domínios ativos e a cauda no "C" terminal. A interação entre a PDI e as proteínas desenroladas é facilitada pela presença de resíduos hidrofóbicos no interior da superfície em forma de "U. Os átomos de enxofre das cisteínas dos centros ativos dos domínios a e a' são representados a amarelo [21]...... - 9 -
- Figura 1.5** Comparação estrutural dos domínios individuais da PDI. Os domínios são mostrados na mesma orientação relativa, com o lado da "hélice longa" abaixo da folha  $\beta$  [21]......- 10 -
- Figura 1.6** Reação esquemática da reação de oxidação catalisada pela PDI. (Imagem adaptada de [23]) .....- 10 -
- Figura 1.7** Estrutura da Ero1 de levedura. Os resíduos de cisteína são representados em esferas a verde e amarelo e o cofator FAD é representado em traços laranja. O domínio polipeptídico (resíduos 90-175) contendo o par de cisteínas transportadoras é colorido a vermelho. As pontes dissulfureto reguladoras contêm as cisteínas na região vermelha (Cys90 e Cys150) e uma cisteína no centro helicoidal [25]......- 11 -
- Figura 1.8** Mecanismo proposto para a troca de tiol-dissulfureto entre a Ero1 e um domínio ativo da PDI. O intermediário "*mixed disulfide*" é estabilizado por ácido devido

à protonação de tióis reativos, e também pela substituição de cada cisteína no centro ativo no C-terminal da PDI por serina [8].	12 -
<b>Figura 1.9</b> Formação de pontes dissulfureto do RE de eucariotas. Os equivalentes oxidantes podem ser introduzidos no lúmen do RE por duas vias paralelas: os equivalentes oxidantes podem fluir via Ero1 para a PDI que pode oxidar diretamente proteínas clientes; A enzima QSOX deverá atuar de forma semelhante à Ero1 na oxidação da PDI embora consiga oxidar diretamente proteínas <i>in vitro</i> . Quer a Ero1 quer a QSOX pode receber elétrons do oxigénio molecular numa maneira dependente do FAD [10].	13 -
<b>Figura 1.10</b> Representação esquemática dos 6 membros da família das Peroxirredoxinas. As posições das Cys essenciais para a atividade da peroxidase são indicadas como SH. A Prx3 e Prx5 têm sinais de importação mitocondrial na cadeia N-terminal. A Prx5 possui um sinal de localização peroxissomal no C-terminal. A Prx4 tem um péptido sinal para secreção no N-terminal que a direciona para o retículo endoplasmático [29].	14 -
<b>Figura 1.11</b> Estrutura da PRDX4 na forma de dímero e decâmero, respetivamente. Na estrutura em dímero as cisteínas são mostradas em amarelo. Na estrutura de decâmero, os terminais N e C são assinalados como N e C, respetivamente [31].	15 -
<b>Figura 1.12</b> Modelo das reações de <i>refolding</i> oxidativo: Na reação mediada pela Ero1, a PDI oxidada é reduzida pela formação da ponte dissulfureto na proteína substrato (S-S). A Ero1 oxidada actua sobre a PDI reduzida, reoxidando-a novamente. A reoxidação da Ero1 envolve a redução do oxigénio molecular com formação de peróxido de hidrogénio. Na reação mediada pela PRDX4, a PDI oxidada é igualmente reduzida pela formação de pontes dissulfureto na proteina substrato sendo posteriormente reoxidada pela PRDX4 oxidada. A PRDX4 reduzida é reoxidada por transferência de eltrões para o peróxido de hidrogénio, com formação de duas moléculas de água.(Imagem adaptada de [30])	16 -
<b>Figura 1.13</b> Estrutura na Ribonuclease A do pâncreas de bovino (RNase A). É uma proteína pequena, com 124 resíduos e 4 pontes dissulfureto: 26-84, 40-95, 58-110 e 65-72 [36].	18 -
<b>Figura 2.1</b> Esquema de montagem dos vidros para polimerização do gel; Diferentes camadas do gel SDS 12% (Imagem adaptada de [37]).	28 -
<b>Figura 2.2</b> Bandas do Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standart</i> ; Bandas de 10 proteínas <i>standart</i> com peso molecular entre 10-250 kDa.	29 -

<b>Figura 2.3</b> Esquema representativo do corte do conjunto Ero1 (verde)/GST (azul) catalisado pela enzima ULP (vermelho). O ligando (laranja) que une as duas proteínas fica ligado à GST após o corte.....	31 -
<b>Figura 2.4.</b> Reação de Oxidação da Glucose por ação da enzima Glucose Oxidase com o Peróxido de Hidrogénio como subproduto reacional.....	35 -
<b>Figura 3.1</b> Gel de avaliação da expressão da PDI: 1- Amostra recolhida após a adição de IPTG ( <i>Erlenmeyer</i> 1); 2- Amostra recolhida após a adição de IPTG ( <i>Erlenmeyer</i> 4); 3- Amostra do <i>pellet</i> recolhido após lise celular.....	43 -
<b>Figura 3.2</b> Gel de avaliação da expressão da PDI: M- Marcador Precision Plus Protein™ Unstained Standard; 1- Amostra recolhida antes da adição de IPTG ( <i>erelenmayer</i> 1); 2- Amostra recolhida após a adição de IPTG ( <i>erelenmayer</i> 1); 3- Amostra recolhida antes da adição de IPTG ( <i>erelenmayer</i> 2);4-Amostra recolhida após a adição de IPTG ( <i>erelenmayer</i> 2). .....	44 -
<b>Figura 3.3</b> Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da PDI; M- Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ;1- Amostra do <i>flow-through</i> ; 2- Amostra do pico 1.....	46 -
<b>Figura 3.4</b> Gel de avaliação da expressão da PRDX4: M- Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ; 1-Amostra recolhida antes da adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 2; 2- Amostra recolhida antes a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 3; 3- Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 2 ressuspendida em 100 µL de dH <sub>2</sub> O; 4- Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 3 ressuspendida em 100 µL de dH <sub>2</sub> O; 5- Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 2 ressuspendida em 100 µL + 24.2 µL de dH <sub>2</sub> O; 6- Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 3 ressuspendida em 100 µL + 24.9 µL de dH <sub>2</sub> O.....	49 -
<b>Figura 3.5</b> Gel de avaliação das frações solúvel e insolúvel da PRDX4:M-Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ;1- <i>Pellet</i> recolhido no final da lise celular; 2-Sobrenadante recolhido no final da lise celular. ....	50 -
<b>Figura 3.6</b> Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da PRDX4;1- Amostra recolhida antes do processo de purificação; 2-Amostra do <i>flow-through</i> ; 3- Amostra do pico 1; 4-Amostra do pico 2; M- Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ; .....	52 -
<b>Figura 3.7</b> Gel de avaliação da expressão da ULP:M- Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ;1-Amostra recolhida antes da adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 1;2-Amostra recolhida antes a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 4;3- Amostra	

recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 1;4-Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 4.....	55 -
<b>Figura 3.8</b> Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da ULP;1-Amostra recolhida antes do processo de purificação;2-Amostra do <i>flow-through</i> ;3-Amostra do pico 1;4-Amostra do pico 2;M-Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ; .....	57 -
<b>Figura 3.9</b> Gel de avaliação da expressão da Ero1:M-Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ;1-Amostra recolhida antes da adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 3;2-Amostra recolhida antes a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 4;3-Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 3; 4-Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 4.....	60 -
<b>Figura 3.10</b> Gel SDS-PAGE para avaliar a eficiência do corte Ero1/GST. M-Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ; 1- Amostra 1 do <i>flow-through</i> ; 2- Amostra 2 do <i>flow-through</i> ; 3- Amostra do Pico. ....	62 -
<b>Figura 3.11</b> Gel de avaliação da expressão da PRDX2: M- Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ; 1- Amostra recolhida antes da adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 1; 2- Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> ; 3- Amostra recolhida antes a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 2; 4- Amostra recolhida após a adição de IPTG do <i>erlenmeyer</i> 2 .....	65 -
<b>Figura 3.12</b> Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da PRDX2: M-Marcador <i>Precision Plus Protein™ Unstained Standard</i> ; 1- Amostra do <i>Flow-through</i> ; 2- Amostra do pico 1; 3- Amostra do pico 2; 4- Amostra do <i>pellet</i> antes da purificação .....	66 -
<b>Figura 3.13</b> Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/Ero1: <b>Ensaio 1</b> ; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e Ero1 (5µM) e controlos sem Ero1 e sem PDI; Amostras reacionais recolhidas após 20 e 40 minutos de reação; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.....	68 -
<b>Figura 3.14</b> Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/Ero1: <b>Ensaio 2</b> ; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e Ero1 (5µM) e controlos sem Ero1 e sem PDI; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....	68 -
<b>Figura 3.15</b> Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/Ero1: <b>Ensaio 3</b> ; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e Ero1	

(5µM) e controlos sem Ero1 e sem PDI; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....- 69 -

**Figura 3.16** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e PRDX4 (5µM) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. .... - 71 -

**Figura 3.17** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX4, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....- 71 -

**Figura 3.18** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e PRDX4 (5µM) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....- 72 -

**Figura 3.19** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX4, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....- 73 -

**Figura 3.20** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e PRDX4 (5µM) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....- 74 -

**Figura 3.21** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX4, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência. ....- 74 -

**Figura 3.22** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e PRDX2

(5µM) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controles sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

.....- 76 -

**Figura 3.23** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX2, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.....- 76 -

**Figura 3.24** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e PRDX2 (5µM) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

.....- 77 -

**Figura 3.25** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX2, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.....- 78 -

**Figura 3.26** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5µM) e PRDX2 (5µM) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência .

.....- 79 -

**Figura 3.27** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX2, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.....- 79 -

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> Plasmídeos utilizados para a produção das proteínas de interesse, com referência ao antibiótico de resistência e ao tag de afinidade. ....	19 -
<b>Tabela 2.2.</b> Composição das soluções utilizadas no trabalho experimental.....	20 -
<b>Tabela 2.3.</b> Lista de equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental com referência à marca e modelo.....	21 -
<b>Tabela 2.4</b> Composição padrão do meio LB da Sigma-Aldrich®.....	23 -
<b>Tabela 2.5.</b> Composição do gel de Resolução 12% e do gel de Concentração 5% ...	27 -
<b>Tabela 2.6.</b> Composição da solução de coloração e descoloração dos Géis SDS. ....	30 -
<b>Tabela 2.7.</b> Composição do tampão utilizado na corrida dos géis SDS-tricina e da solução Gel Buffer (3x) utilizado na formação dos géis.....	33 -
<b>Tabela 2.8.</b> Composição das 3 fases do gel de SDS-Tricina: Gel de resolução (16,5%), Gel espaçador (10%) e Gel de concentração (4%). Os volumes apresentados são referentes a dois géis.....	34 -
<b>Tabela 2.9.</b> Concentrações das proteínas utilizadas nos ensaios de <i>refolding</i> oxidativo da RNase. ....	35 -
<b>Tabela 3.1</b> Valores de DO obtidos para os pré-inóculos da PDI.....	39 -
<b>Tabela 3.2</b> Volumes de pré-inóculo a adicionar ao meio para iniciar fermentação da PDI com DO=0.1 (Equação 1) .....	40 -
<b>Tabela 3.3</b> Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 4. A caixa assinalada a preto representa o momento de adição de IPTG.....	41 -
<b>Tabela 3.4</b> Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PRDX4.....	46 -
<b>Tabela 3.5</b> Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 2 e 3. A caixa assinalada a preto representa o momento de adição de IPTG.....	47 -
<b>Tabela 3.6</b> Valores de DO obtidos para os pré-inóculos da ULP.....	52 -
<b>Tabela 3.7</b> Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 4. A caixa a preto representa o momento da adição de IPTG.....	53 -
<b>Tabela 3.8</b> Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da Ero1 .....	58 -
<b>Tabela 3.9</b> Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 3 e 4. A caixa a preto representa o momento da adição de IPTG.....	58 -
<b>Tabela 3.10</b> Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PRDX2.....	63 -
<b>Tabela 3.11</b> Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 2. A caixa a preto representa o momento da adição de IPTG.....	63 -

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 3.1</b> Curva de crescimento da produção de PDI do balão 1. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 41 -
<b>Gráfico 3.2</b> Curva de crescimento da produção de PDI do balão 4. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 42 -
<b>Gráfico 3.3</b> Cromatograma da Purificação da PDI obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Laranja) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Azul).-	45 -
<b>Gráfico 3.4</b> Curva de crescimento da produção de PRDX4 do balão 2. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 48 -
<b>Gráfico 3.5</b> Curva de crescimento da produção de PRDX4 do balão 3. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 48 -
<b>Gráfico 3.6</b> Cromatograma da Purificação da PRDX4 obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Verde). ...	- 51 -
<b>Gráfico 3.7</b> Curva de crescimento da produção de ULP do balão 4. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 54 -
<b>Gráfico 3.8</b> Curva de crescimento da produção de ULP do balão 1. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 54 -
<b>Gráfico 3.9</b> Cromatograma da Purificação da ULP obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Vermelho). ....	- 56 -
<b>Gráfico 3.10</b> Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 3. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 59 -
<b>Gráfico 3.11</b> Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 4. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 59 -
<b>Gráfico 3.12</b> Cromatograma da Purificação da Ero1 obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Laranja).-	61 -
<b>Gráfico 3.13</b> Curva de crescimento da produção de PRDX2 do balão 1. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....	- 64 -

**Gráfico 3.14** Curva de crescimento da produção de PRDX2 do balão 2. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG. ....- 64 -

**Gráfico 3.15** Cromatograma da Purificação da PRDX2 obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Roxo) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Verde). .- 65 -

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 *Folding* de Proteínas

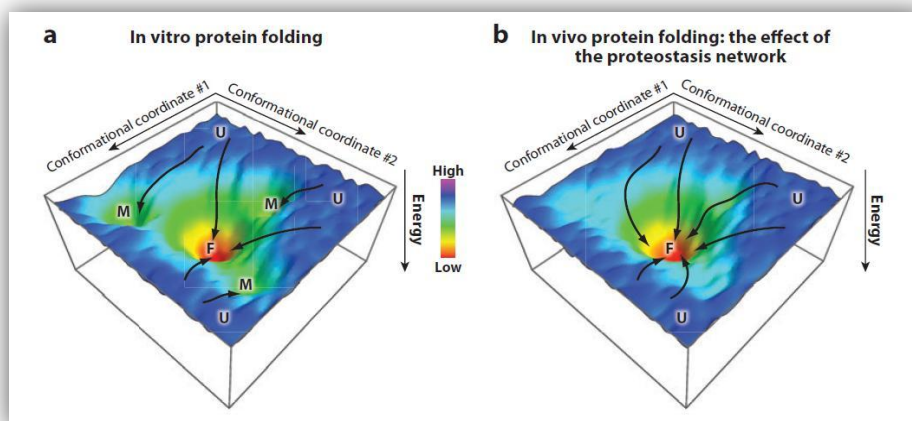
Numa célula, a síntese de proteínas é feita de forma linear conduzindo à formação de uma cadeia sequencial de resíduos de aminoácidos que, geralmente, se encontra inativa. Este facto acontece porque a maioria das proteínas apenas adquire funcionalidade quando enrola em estruturas tridimensionais únicas. A capacidade de determinar de que forma uma sequência de aminoácidos enrola no sentido de formar uma estrutura biologicamente ativa constitui uma das tarefas mais importantes e desafiantes da Biologia [1].

O *folding* ou enrolamento de uma proteína representa um dos processos mais importantes ao nível da função da proteína [2]. Em geral, as reações de *folding* proteico são bastante rápidas e os seus intermediários são transientes e altamente dinâmicos [1]. Além disso, a eficiência deste tipo de transições depende fortemente das condições ambientais, genéticas e metabólicas, pelo que, condições que interrompam ou interfiram no *folding* proteico representam uma ameaça à viabilidade celular [2].

O processo de *folding* é explicado pelos princípios básicos e ancestrais apresentados por Anfinsen (1972) que afirmam que uma proteína no estado nativo e enrolado é considerada como a estrutura termodinamicamente mais estável, sendo este conjunto estrutural determinado pela sequência de aminoácidos e pelas condições ambientais [3]. Este facto implica que, de alguma forma, a informação necessária para que uma proteína adquira a estrutura tridimensional nativa esteja impressa na sequência primária da proteína [1].

Uma visão mais contemporânea do *folding* de proteínas é explicada através de um diagrama de energias (Figura 1.1). Segundo este princípio, o estado desenrolado de uma proteína, representado pelo estado de maior energia, pode enrolar através de várias vias alternativas no sentido de atingir o estado enrolado de menor energia e termodinamicamente mais estável. Apesar de existirem várias formas de uma proteína atingir o estado nativo, existem também estados parcialmente enrolados, mal enrolados e até mesmo agregados que apresentam menor energia do que o estado desenrolado e onde as proteínas podem ficar retidas (Figura 1.1(a)). No entanto, são impostas

restrições devido à química e à energia da própria cadeia polipeptídica que limitam o número possível de vias que uma cadeia polipeptídica pode seguir em determinadas condições. Apesar desta possibilidade, a formação de aglomerados com características hidrofóbicas e electrostáticas pode constituir um entrave da aquisição do estado enrolado [4].



**Figura 1.1** Diagrama de energia para um polipéptido hipotético. O estado desenrolado é representado por U (*Unfolded state*), o estado mal enrolado por M (*Misfolded state*) e o estado enrolado por F (*Folded state*); (a) hipótese energética para o *foldin* *in vitro*; (b) o mesmo diagrama para casos *in vivo* com a influência da rede proteica que intervém na eficiência do *foldin* através da minimização dos agregados e de proteínas mal enroladas [4].

*In vivo*, o *foldin* de proteínas é assistido por uma série de proteínas que se ligam aos estados de transição fazendo com que o enrolamento da proteína seja conduzido no sentido correto, e, conseqüentemente, evitando os estados proteicos mencionados acima (Figura 1.1 (b)) [3]. Cada proteína interveniente neste processo contribui para o *foldin* de forma diferente e de acordo com as propriedades e necessidades de cada proteína que se encontra no processo de *foldin* [4].

Assim, além do *foldin* conformacional das cadeias polipeptídicas conduzido no sentido do estado com menor energia livre ocorrem, igualmente, várias reações adicionais que podem influenciar o enrolamento e a estrutura final, incluindo reações de glicosilação, oligomerização e formação de ligações dissulfureto [5].

### **1.1.1 Problemas derivados de erros no *Folding* Proteico**

A maior parte das proteínas secretadas enrolam de forma correta, contudo problemas como *stress*, mutações e erros aleatórios durante a síntese proteica podem provocar uma diminuição do rendimento ou até mesmo da taxa de *folding* das proteínas [4].

As proteínas controlam o fenótipo celular através da sua estrutura e função e, como tal, possíveis deficiências nas proteínas são uma das maiores causas de doenças [6]. Por exemplo, existem doenças que resultam da degradação de uma proteína mal enrolada devido a uma mutação genética e que, por ser destruída, não desempenha as suas funções normais. Outras doenças são derivadas da acumulação de proteínas que deveriam ter sido removidas da célula e, de alguma forma, podem interferir com a maquinaria responsável pela degradação proteica. Da mesma forma, existem outras doenças que afetam diretamente os componentes do sistema de controlo de qualidade, nomeadamente no retículo endoplasmático (RE) e no citosol e conduzem a uma incapacidade global das células para lidarem com proteínas mal enroladas [7].

Mais de 100 distúrbios tais como a fibrose cística, doença do fígado, epilepsia, arritmias cardíacas, cegueira e *Alzheimer* partilham patologias celulares resultantes de proteínas com *folding* incorreto que são prematuramente degradadas ou acumuladas como agregados tóxicos no RE [4].

### **1.1.2 Mecanismo de Controlo de Qualidade do *Folding* Proteico (“*Protein Quality Control*”)**

O problema da ocorrência de erros no enrolamento de proteínas em células eucarióticas foi atenuado pelo desenvolvimento de um sistema de controlo de qualidade proteico que está presente em todos os organelos celulares [7]. No retículo endoplasmático, onde ocorre a biossíntese de proteínas secretoras, existe um vasto número de proteínas que fazem parte do mecanismo de controlo da qualidade do *folding* proteico e que permitem a maturação correta das proteínas antes de transitarem para o complexo de Golgi. Nos restantes organelos celulares a avaliação da qualidade do *folding* proteico acontece de forma mais limitada [5]. Este sistema de controlo contribui para o *folding* correto das proteínas, mas também interfere nos casos em que as

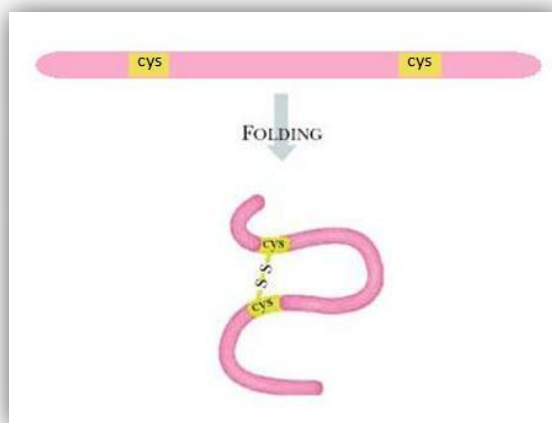
proteínas enrolaram em estruturas incorretas encaminhando-as para o sistema de degradação proteico (“*Unfolded Protein Response*” - UPR) [7].

O dispositivo de controlo de qualidade das proteínas sintetizadas tem grande importância nomeadamente ao nível das doenças que estão associadas ao enrolamento incorreto das proteínas [7].

## 1.2 Estabilização de proteínas através de Ligações Dissulfureto

O processo de formação de pontes dissulfureto intramoleculares envolve a oxidação dos grupos tiol (SH) das proteínas no sentido da criação de uma ligação entre duas cisteínas (Cys) bem como o rearranjo de pontes não nativas [8].

Sobre condições oxidantes e na presença de dois resíduos de cisteína numa cadeia polipeptídica pode ocorrer a ligação destes resíduos fazendo com que a cadeia polipeptídica enrole no sentido da aproximação dos resíduos de cisteína. (Figura 1.2). Assim sendo, a formação de pontes dissulfureto é um dos fatores principais para a manutenção da estrutura 3D de muitas proteínas auxiliando o processo de *fold*ing [9].



**Figura 1.2** Formação de uma ponte dissulfureto de uma cadeia polipeptídica (rosa) com dois resíduos de cisteína (amarelo). A aproximação dos resíduos de cisteína induz o enrolamento da cadeia no sentido do *fold*ing proteico. (Imagem adaptada de [9])

Esta modificação postransducional é um passo essencial na maturação e estabilidade das proteínas uma vez que são ligações de natureza covalente. Este tipo de

ligações têm a capacidade de restringir alterações energeticamente favoráveis que poderiam resultar em conformações não nativas garantindo assim o posicionamento correto para a promoção do *fold*ing. São igualmente capazes de estabilizar a proteína através da redução da entropia do estado desenrolado, isto é, diminuindo a entropia do estado desnaturado e, conseqüentemente, favorecendo o estado nativo [10]. No entanto, deve ser tido em conta que estas ligações podem conduzir a conformações torcidas caso os dois resíduos de cisteína não se encontrem apropriadamente alinhados sendo que, nestes casos, podem surgir estruturas menos estáveis [9]. Assim, pode concluir-se que o efeito de uma ponte dissulfureto numa dada proteína depende da posição da mesma na estrutura proteica [10].

O efeito estabilizador da estrutura de uma ponte dissulfureto está relacionado com a distância entre os dois resíduos de cisteína na cadeia polipeptídica, sendo que este depende do número de aminoácidos existentes entre as duas cisteínas envolvidas na ponte [10]. Observou-se então que a distância média entre duas Cys que compõem uma ponte dissulfureto deve ser cerca de 15 aminoácidos, apesar do tamanho do *loop* formado através da ligação ser proporcional à estabilidade transmitida [11].

As pontes dissulfureto aumentam a estabilidade de uma conformação proteica e por isso a sua formação é muito importante particularmente nas proteínas encontradas no exterior da célula visto que aqui o ambiente é diferente do citosol nomeadamente ao nível de condições *redox* e concentração de certos iões [5] [10]. Assim sendo, a formação destas pontes é de elevada importância protegendo as proteínas dos danos provocados nomeadamente por fatores como enzimas oxidantes e proteolíticas [10].

Estudos anteriores na área do *fold*ing proteico indicam que a formação de pontes dissulfureto ocorre num processo espontâneo e que, *in vitro*, a própria cadeia polipeptídica consegue alcançar a sua conformação nativa. No entanto, relativamente aos restantes processos intervenientes no *fold*ing, a formação destas pontes é mais lenta uma vez que é dependente de uma reação *redox* que, por sua vez, requer a presença de um elemento aceitador de eletrões [12]. Devido à complexidade deste processo, a formação de ligações dissulfureto é considerada como uma etapa limitante ao nível das taxas de biogénese de proteínas [10]. Portanto, apesar da extrema importância destas ligações na estabilidade proteica, a sua formação é, em geral, difícil de atingir, particularmente em proteínas com elevado número de pontes possíveis, uma vez que a

probabilidade de ocorrência de pontes dissulfureto incorretas aumenta fatorialmente com o aumento do número de cisteínas [13].

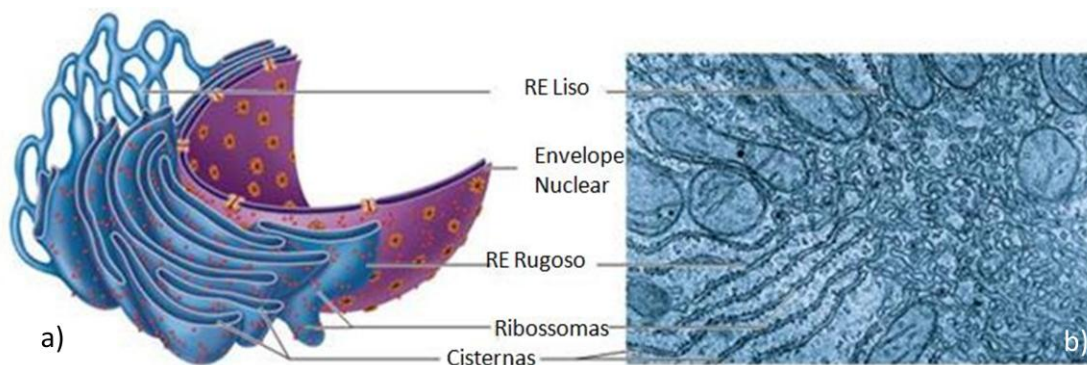
### **1.2.1 Pontes Dissulfureto em *Escherichia coli***

A formação de pontes dissulfureto em *E. coli* tem sido altamente estudada. Neste organismo, as pontes dissulfureto são introduzidas no periplasma celular por uma família de proteínas denominada Dsb (*Disulfide Bond Protein*), sendo que o oxidante primário da proteína cliente é a proteína DsbA. A ligação dissulfureto da DsbA é muito instável e é rapidamente transferida para as proteínas desenroladas sendo a DsbA, de seguida, reoxidada pela proteína DsbB localizada no interior da membrana que transfere elétrons da DsbA para a cadeia transportadora de elétrons [14].

### **1.3 *Folding* Oxidativo no Retículo Endoplasmático (RE)**

Como referido anteriormente, o enrolamento e compactação de proteínas constitui um desafio para a célula eucariótica uma vez que a proteína em questão deverá ter a capacidade de funcionar corretamente no local onde é requisitada. Para ultrapassar este problema a célula eucariótica desenvolveu um organelo reticular, o retículo endoplasmático, onde o ambiente é oxidante e as condições são semelhantes às condições presentes no exterior da célula [5].

O retículo endoplasmático está organizado numa espécie de labirinto membranar ramificado e interconectado sendo que a sua membrana forma uma placa única abrangendo um único espaço interno, o lúmen de RE (Figura 1.3). Esta compartimentação do RE longe do citosol permite a existência das condições *redox* necessárias para a formação de ligações dissulfureto. Deve, portanto, existir uma regulação eficiente do potencial *redox* presente neste compartimento uma vez que sobre fortes condições redutoras a formação de pontes dissulfureto é termodinamicamente desfavorável e sobre condições excessivamente oxidantes pode ocorrer *misfolding* devido à formação de pontes intra e intermoleculares incorretas [10].



**Figura 1.3** a) Imagem ilustrativa do retículo endoplasmático: RE liso e RE rugoso que contém ribossomas agregados; b) Microscopia Eletrônica do RE (85,000x)

Este compartimento apresenta concentrações milimolares de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) numa proporção que varia de 1:1 até 3:1, respetivamente. Tendo em conta a abundância relativa da GSSG no lúmen do RE, pensou-se que esta poderia estar na origem da capacidade oxidante utilizada durante a formação de pontes dissulfureto *in vivo*. No entanto, parece que a glutatona não está diretamente envolvida no processo de formação de pontes dissulfureto *in vivo*, indicando que a sua formação envolve outro aceitador de eletrões [8].

No lúmen do RE existem muitas proteínas em constante movimento para outros destinos, nomeadamente membrana plasmática e espaço extracelular. Além destas, existem outras proteínas que permanecem retidas no RE devido a um sinal de retenção de 4 aminoácidos (Lys-Asp-Glu-Leu) na extremidade C terminal. Estas proteínas residentes funcionam como catalisadores de muitas reações e algumas fazem parte do sistema de controlo de qualidade proteico mencionado anteriormente [15]. Algumas destas enzimas residentes do RE estão envolvidas na formação de pontes dissulfureto e contribuem para o *fold*ing oxidativo das proteínas no RE [10].

O estudo do *fold*ing oxidativo revelou que, *in vitro*, a ocorrência do fenómeno de formação de pontes dissulfureto é espontânea, mas lenta, podendo demorar horas a dias. Contrariamente, foi observado que, *in vivo*, este processo é rápido indicando assim que a formação e o rearranjo de pontes dissulfureto é catalisada em células vivas por um conjunto de proteínas [8]. Assim, o *fold*ing oxidativo revelou um elevado grau de diversidade dos mecanismos de *fold*ing que são maioritariamente manifestados pela heterogeneidade das estruturas intermediárias [16].

No conjunto de reações envolvidas no *folding* oxidativo, foram identificadas, isoladas e caracterizadas algumas proteínas intervenientes na aquisição da estrutura enrolada e na formação de pontes dissulfureto. Quer as células procariotas, quer as eucariotas possuem várias proteínas e cofatores que aceleram a formação de pontes dissulfureto de uma forma correta [17].

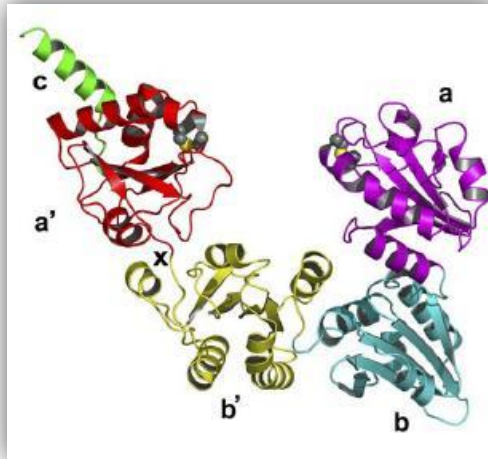
Neste conjunto de proteínas eucariotas está envolvida uma proteína da família das oxireductases e dependente do Dinucleótido Flavina Adenina (FAD) denominada *Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1* (Ero1) e uma proteína da família das isomerases denominada por *Protein Disulfide Isomerase* (PDI). Foi reportado que a Ero1 é oxidada pelo oxigénio molecular e, por sua vez, atua como oxidante da PDI que tem assim potencial de oxidar as cisteínas em proteínas enroladas. De igual forma, foram investigados outros possíveis candidatos que possam eventualmente intervir, de forma paralela à Ero1, tendo sido evidenciada uma outra proteína, a *Peroxisredoxin IV* (PRDX4), que, na presença de hidroperóxidos é capaz de oxidar a PDI sendo a oxidação das proteínas substrato atingida [18].

Assim, em qualquer sistema *redox* de fluxo de eletrões para a introdução de pontes dissulfureto, estão envolvidos quatro componentes: uma proteína cliente a oxidar, um dador direto de ligações dissulfureto como a PDI, uma enzima geradora de pontes dissulfureto capaz de oxidar a PDI e um cofator aceitador de eletrões [17].

### **1.3.1 *Protein Disulfide Isomerase* (PDI)**

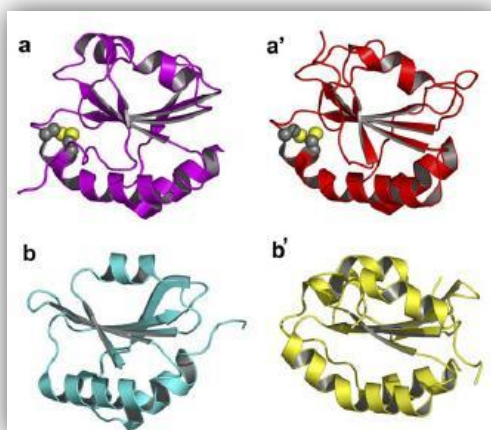
Uma das proteínas residente no RE que mostrou ser essencial na catálise da oxidação de grupos SH em ligações dissulfureto (S-S) é a PDI [15]. Esta proteína foi das primeiras a ser identificada, tem um peso molecular de 55 kDa e pertence à superfamília proteica das tioredoxinas [10].

Esta proteína é encontrada em concentrações na ordem do milimolar (mM) no lúmen do RE quer de leveduras quer de células de mamíferos [19]. Estruturalmente, a PDI purificada de eucariotas mamíferos é constituída por quatro domínios principais (a, a', b e b'), por uma região de ligação entre os domínios b' e a' com cerca de 19 aminoácidos e ainda por uma extensão de resíduos na extremidade C terminal (c) (Figura 1.4) [20].



**Figura 1.4** Imagem da *Protein Disulfide Isomerase* (PDI). Domínio a' (vermelho), domínio a (lilás), domínio b' (amarelo), domínio b (azul) e domínio c (verde). A estrutura da PDI revela que os quatro domínios estão arranjados em forma de "U" com os centros ativos de frente uns para os outros nas extremidades do "U". Assim, os dois domínios inativos estão inseridos entre os dois domínios ativos e a cauda no "C" terminal. A interação entre a PDI e as proteínas desenroladas é facilitada pela presença de resíduos hidrofóbicos no interior da superfície em forma de "U". Os átomos de enxofre das cisteínas dos centros ativos dos domínios a e a' são representados a amarelo [21].

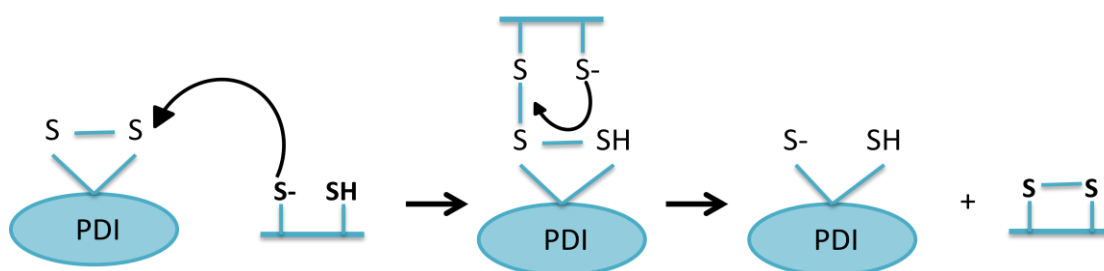
Os domínios a e a' são semelhantes e cada um deles contém dois resíduos de cisteína cataliticamente ativos, ao contrário dos domínios b e b' que não apresentam qualquer resíduo de cisteína ativo (Figura 1.5). Os domínios a e a' desta proteína são capazes de catalisar dois tipos de reação: oxidação e isomerização [10]. Esta capacidade pode ser explicada pela presença de pares de Cys no centro catalítico da PDI: caso as Cys se encontrem na forma oxidada, a PDI atua através da doação destes dissulfuretos a proteínas substrato promovendo a sua consequente oxidação; contrariamente, se as Cys estão na forma reduzida podem atacar pontes dissulfureto que foram incorretamente estabelecidas [22].



**Figura 1.5** Comparação estrutural dos domínios individuais da PDI. Os domínios são mostrados na mesma orientação relativa, com o lado da “hélice longa” abaixo da folha  $\beta$  [21].

Esta bifuncionalidade faz com que a PDI seja considerada como uma enzima notavelmente versátil sendo que, o desempenho de cada uma destas funções depende do ambiente *redox* presente no lúmen do RE [10].

A formação de pontes dissulfureto entre os grupos tiol (SH) de dois resíduos de cisteína, com auxílio da PDI, envolve a desprotonação de um tiol livre para produzir um anião tiolato ( $-S^-$ ). Forma-se então uma ligação covalente transiente entre a proteína catalisadora e a proteína cliente que se denomina *mixed disulfides*. De seguida, dá-se uma segunda troca onde o anião tiolato ataca esta ligação transiente e elimina-a. Como resultado, surge um par de cisteínas oxidado e outro reduzido e a ponte intramolecular é efetivamente passada de um par de cisteínas para outro (Figura 1.6) [10].



**Figura 1.6** Reação esquemática da reação de oxidação catalisada pela PDI. (Imagem adaptada de [23])

### 1.3.2 *Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1 (Ero1)*

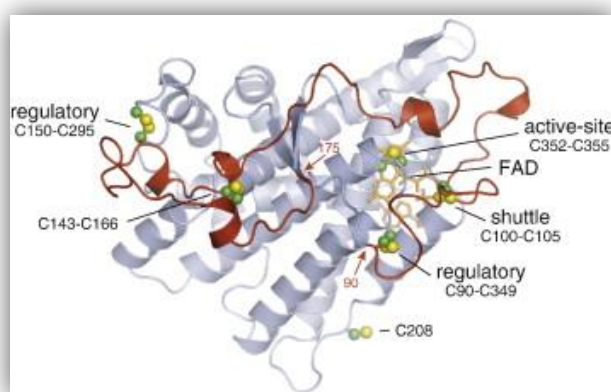
A utilização da PDI como oxidante na formação das pontes dissulfureto faz com que esta fique na forma reduzida no final da reação. Assim, para que a célula não desperdice uma molécula de PDI por cada ponte formada, é necessária a presença de um

fator responsável pela reoxidação da PDI para que esta volte a adquirir a sua função no processo [22]. Com esta função identificou-se a enzima Ero1, responsável pela reoxidação da PDI [10].

A Ero1 é uma glicoproteína residente no RE, associada à membrana que utiliza o FAD como cofator e é considerada uma enzima chave para a formação de pontes dissulfureto em células eucariotas em ambientes aeróbios e anaeróbios. Em ambientes aeróbios, foi demonstrado que a Ero1 é capaz de transferir elétrons dos seus grupos tiol para o oxigénio molecular. Contudo, o destino dos elétrons em condições anaeróbias permanece por descobrir. Foi reportado que o FAD livre em solução é suficiente para conduzir a formação de pontes dissulfureto em condições anaeróbias, permitindo assim, conhecer os mecanismos para a regeneração da Ero1 oxidada e manter a formação de pontes dissulfureto nestas condições [24].

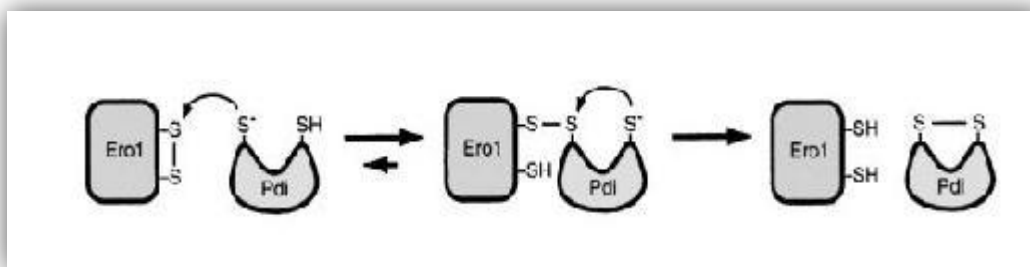
Esta proteína está presente nos eucariotas onde foram identificados dois homólogos funcionais relativamente à Ero1 das leveduras: hEro1-La ( $\alpha$ ) e hEro1-Lb ( $\beta$ ) sendo que ambos são capazes de oxidar a PDI [10].

Esta proteína apresenta dois pares de cisteínas catalíticas, capazes de oxidar a PDI: as cisteínas do centro ativo e as cisteínas “shuttle” (Figura 1.7). A oxidação direta da PDI ocorre pelo par de cisteínas “shuttle” que, por sua vez, é reoxidado pelas cisteínas do centro ativo. As cisteínas do centro ativo são depois reoxidadas, por transferência de elétrons para o cofator FAD e para o oxigénio molecular, com produção de peróxido de hidrogénio [25].



**Figura 1.7** Estrutura da Ero1 de levedura. Os resíduos de cisteína são representados em esferas a verde e amarelo e o cofator FAD é representado em traços laranja. O domínio polipeptídico (resíduos 90-175) contendo o par de cisteínas transportadoras é colorido a vermelho. As pontes dissulfureto reguladoras contêm as cisteínas na região vermelha (Cys90 e Cys150) e uma cisteína no centro helicoidal [25].

A transferência de uma ponte dissulfureto entre a Ero1 e a PDI envolve a troca entre grupos tiol e dissulfuretos entre uma enzima na forma reduzida e a outra enzima na forma oxidada. Nesta reação forma-se um intermediário com uma ligação dissulfureto intermolecular (*mixed disulfide*) devido ao ataque nucleófilo da ponte dissulfureto na espécie oxidada (Ero1) pelo anião tiolato derivado da cisteína reativa na espécie reduzida (PDI). Este intermediário é resolvido pelo ataque intramolecular feito por um segundo anião tiolato derivado da mesma enzima (Figura 1.8) [8].

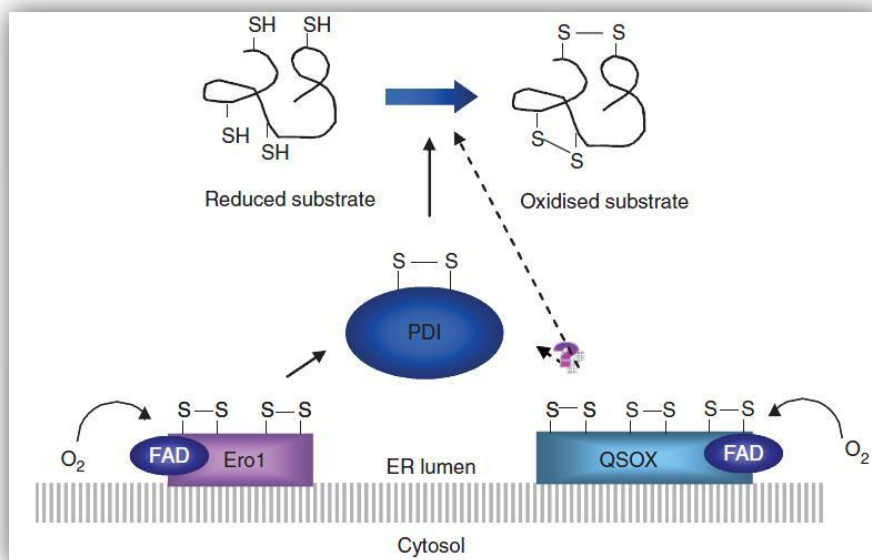


**Figura 1.8** Mecanismo proposto para a troca de tiol-dissulfureto entre a Ero1 e um domínio ativo da PDI. O intermediário "*mixed disulfide*" é estabilizado por ácido devido à protonação de tióis reativos, e também pela substituição de cada cisteína no centro ativo no C-terminal da PDI por serina [8].

A atividade enzimática da Ero1 deve ser regulada uma vez que a cada formação de uma ponte dissulfureto por esta enzima está associada a produção de uma molécula de peróxido de hidrogénio cuja acumulação induz *stress* oxidativo. Assim, para manter o equilíbrio *redox* do RE, a Ero1 está sob ação de um mecanismo de regulação no qual dois pares de cisteínas não reativas funcionam como sensores do ambiente *redox* [17]. Em condições oxidantes a formação de pontes dissulfureto nas cisteínas reguladoras limita a capacidade das cisteínas "*shuttle*" oxidarem a PDI. Em condições redutoras, a redução das cisteínas reguladoras possibilita o movimento do *loop* que contém as cisteínas "*shuttle*" permitindo a atividade oxidante da Ero1 [25].

Além da via da PDI/Ero1 foi reportado recentemente a funcionalidade de uma enzima, QSOX (*Quiescin-sulfhydryl Oxidase*), que aparentemente também catalisa a formação de pontes dissulfureto (Figura 1.9). Apesar das suas funções e substratos fisiológicos permanecerem sob investigação, sabe-se que esta enzima é encontrada predominantemente do aparelho de *Golgi* e é secretada das células. A presença desta enzima após a ação da Ero1 na via secretora sugere que o seu papel principal poderá ser promover uma maturação melhor e mais ordenada ou a junção de proteínas secretadas, em vez da introdução de pontes dissulfureto em proteínas individuais. No entanto, a

QSOX pode ser o oxidante de algumas proteínas substrato, no caso em que a PDI não representa o oxidante direto, introduzindo assim pontes dissulfureto [17]. A QSOX apresenta um ou mais domínios de tioredoxinas e um domínio de ligação de Flavina num único polipéptido. Ou seja, a observação de que esta enzima é monomérica sugere que a via de transporte de elétrões acontece no interior da enzima.

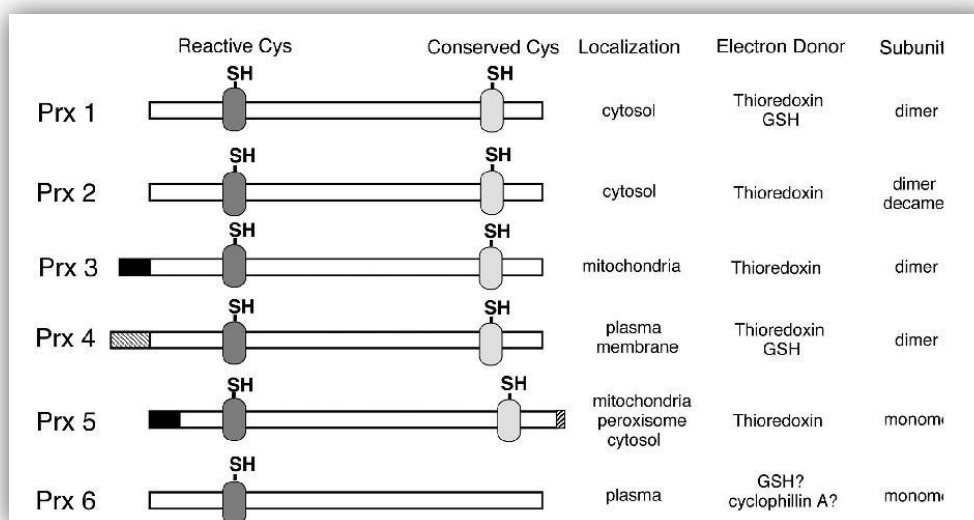


**Figura 1.9** Formação de pontes dissulfureto do RE de eucariotas. Os equivalentes oxidantes podem ser introduzidos no lúmen do RE por duas vias paralelas: os equivalentes oxidantes podem fluir via Ero1 para a PDI que pode oxidar diretamente proteínas clientes; A enzima QSOX deverá atuar de forma semelhante à Ero1 na oxidação da PDI embora consiga oxidar diretamente proteínas *in vitro*. Quer a Ero1 quer a QSOX pode receber elétrões do oxigénio molecular numa maneira dependente do FAD [10].

### 1.3.3 Peroxirredoxins II e IV

As peroxirredoxinas (Prx ou PRDX) compõem uma família de peroxidases encontradas em procariontas, arqueobactérias e eucariotas. Esta classe proteica pode ser classificada em 3 subfamílias de acordo com o seu mecanismo celular ou em 5 subfamílias de acordo com a sua homologia ao nível da sequência [26]. Estas enzimas reduzem o peróxido de hidrogénio e hidroperóxidos alquilo a água e álcool respetivamente com a utilização de equivalentes redutores derivados de moléculas dadoras como grupos tiol [27]. Nos eucariotas existe um elevado número de genes que codificam para peroxirredoxinas devido à existência de muitas isoformas destinadas a compartimentos subcelulares diferentes e também devido à aquisição de novas funções.

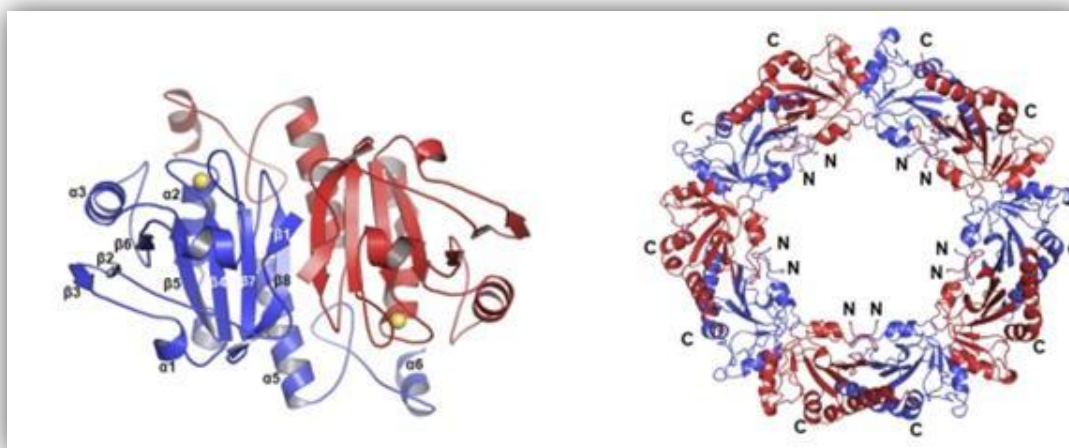
Embora esta classe proteica tenha sido identificada inicialmente em leveduras, a presença de inúmeras isoformas bem como a sua caracterização foi alcançada em células de mamíferos. Cada uma das isoformas é única no sentido que apresenta padrões de expressão distintos durante o desenvolvimento, tem uma distribuição diferente nos organelos e é submetida a diferentes intermediários reacionais durante a catálise (Figura 1.10). Algumas destas isoformas conferem defesa contra os danos oxidativos enquanto outras parecem participar na sinalização através do controlo da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [28].



**Figura 1.10** Representação esquemática dos 6 membros da família das Peroxirredoxinas. As posições das Cys essenciais para a atividade da peroxidase são indicadas como SH. A Prx3 e Prx5 têm sinais de importação mitocondrial na cadeia N-terminal. A Prx5 possui um sinal de localização peroxissomal no C-terminal. A Prx4 tem um péptido sinal para secreção no N-terminal que a direciona para o retículo endoplasmático [29].

As Peroxirredoxinas I, II, III e IV de mamíferos pertencem a um subgrupo e possuem resíduos de cisteínas conservados nas cadeias terminais NH<sub>2</sub>- e COOH- que são separados por 121 resíduos de aminoácidos. A PRDX I e PRDX II contêm 199 resíduos e encontram-se no citosol. A PRDX IV ou PRDX4 contém uma extensão hidrofóbica no NH<sub>2</sub>- terminal que é tipicamente uma sequência sinal para proteínas secretoras [28]. A estrutura da PRDX IV humana mostra que a enzima forma um decâmero em forma de anela comprimindo um pentâmero de dímeros, tal como outras peroxirredoxinas no seu estado reduzido. No entanto, a PRDX IV é a única que mantém

uma estrutura em decâmero estável independentemente de seu estado *redox* (Figura 1.11) [30].



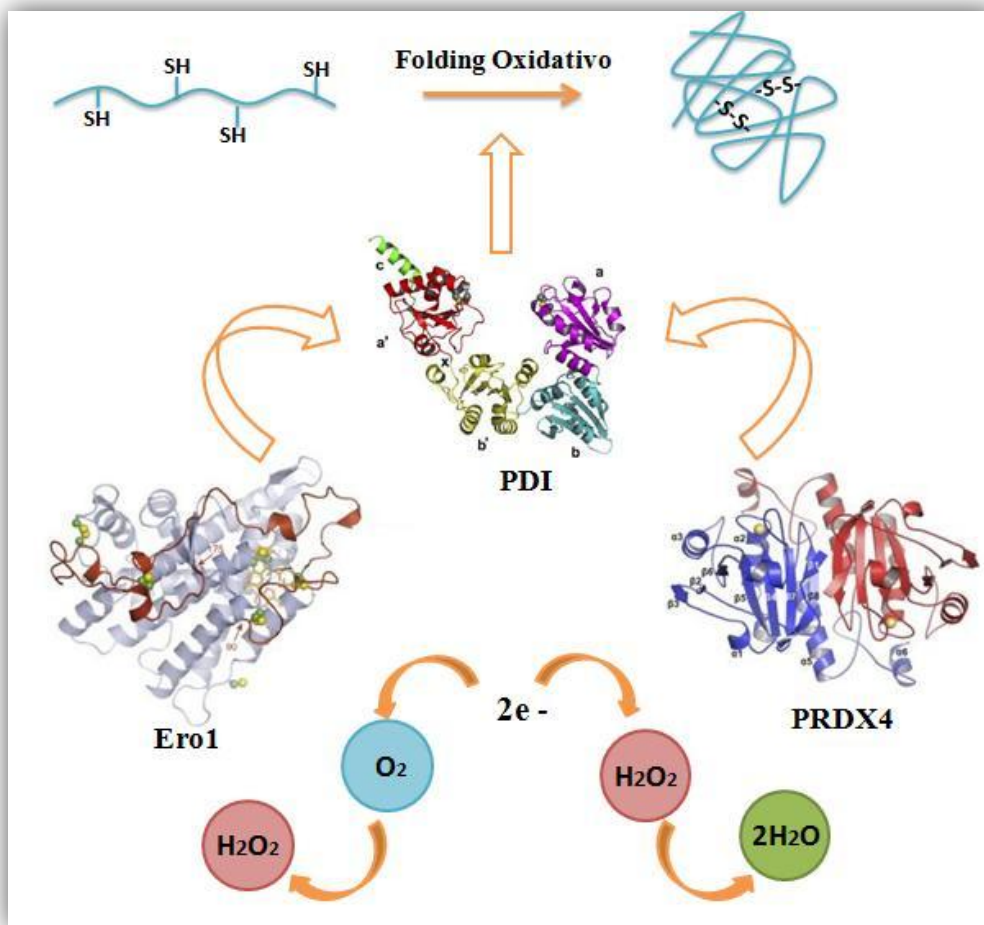
**Figura 1.11** Estrutura da PRDX4 na forma de dímero e decâmero, respetivamente. Na estrutura em dímero as cisteínas são mostradas em amarelo. Na estrutura de decâmero, os terminais N e C são assinalados como N e C, respetivamente [31].

Tal como referido anteriormente, tem-se tentado identificar vias alternativas para explicar a formação de ligações dissulfureto no RE paralelamente à via da Ero1. A descoberta das possíveis alternativas foi feita através do isolamento de proteínas oxidantes da PDI. Nestes estudos identificou-se a PRDX4 [18].

A deleção do gene codificante da Ero1 permitiu observar que a formação de pontes dissulfureto continua a ocorrer de um modo eficiente, e também foi observado que na ausência de Ero1 os fibroblastos embrionários de ratinho são intolerantes ao *knockdown* da PRDX4 evidenciando que esta proteína pode contribuir e ter um papel fulcral na formação de ligações dissulfureto em células deficientes em Ero1 [18].

Além deste facto e, tendo em conta que a Ero1 aceita eletrões diretamente do centro ativo reduzido da PDI, pensou-se que esta via alternativa utilizaria um passo semelhante na transferência de eletrões. Os estudos realizados permitiram concluir que a PRDX4 é capaz de promover a formação de pontes dissulfureto na presença da PDI e que, para tal, é necessária a expressão desta proteína no RE sendo que as suas cisteínas estão envolvidas na atividade de aceleração do *folding* oxidativo dependente da presença de peróxido de hidrogénio.

A Figura 1.12 resume esquematicamente as duas vias para o *refolding* oxidativo.



**Figura 1.12** Modelo das reações de *refolding* oxidativo: Na reação mediada pela Ero1, a PDI oxidada é reduzida pela formação da ponte dissulfureto na proteína substrato (S-S). A Ero1 oxidada actua sobre a PDI reduzida, reoxidando-a novamente. A reoxidação da Ero1 envolve a redução do oxigénio molecular com formação de peróxido de hidrogénio. Na reação mediada pela PRDX4, a PDI oxidada é igualmente reduzida pela formação de pontes dissulfureto na proteína substrato sendo posteriormente reoxidada pela PRDX4 oxidada. A PRDX4 reduzida é reoxidada por transferência de eltrões para o peróxido de hidrogénio, com formação de duas moléculas de água.(Imagem adaptada de [30])

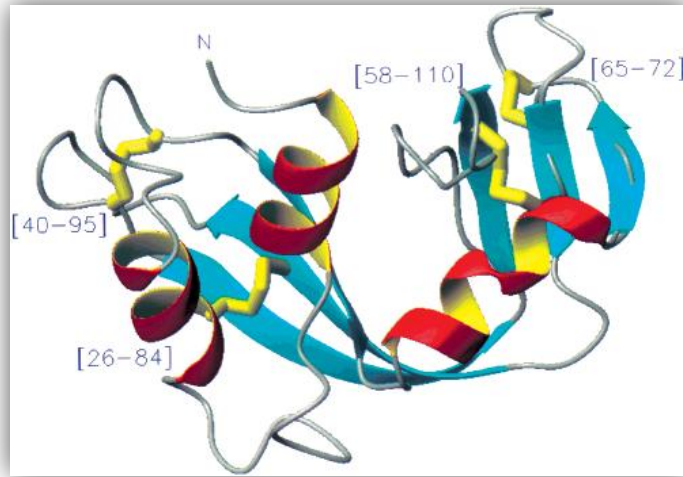
#### 1.4 Estudo do *Folding Oxidativo In Vitro*

A combinação de estudos genéticos e bioquímicos utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e mais recentemente sistemas animais e de plantas começaram a revelar as proteínas e os mecanismos envolvidos no processo fundamental do *folding* [12]. Mais recentemente, os detalhes moleculares do processo de *folding* oxidativo têm sido elucidados, particularmente, no funcionamento de sistemas presentes no periplasma de *E. coli* [32], no retículo endoplasmático de levedura [25] e no espaço intermembranar da mitocôndria [33] [17].

Como referido anteriormente, as evidências experimentais de Anfinsen afirmam que a formação de pontes dissulfureto ocorre espontaneamente sobre as condições oxidantes apropriadas. No entanto, comparada com a taxa de síntese e secreção necessária, *in vivo*, o *fold*ing oxidativo *in vitro* de proteínas não-catalisado é muitas vezes um processo muito lento e mais suscetível a erros [17]. Apesar disso, o estudo do *fold*ing oxidativo e das vias de *un*folding redutor de proteínas com pontes dissulfureto requer métodos de *quenching* rápidos e irreversíveis que permitam o isolamento efetivo das diferentes espécies conformacionais encontradas ao longo desta via.

O *fold*ing oxidativo de proteínas é um processo no qual uma proteína reduzida e desenroladas não só forma o seu conjunto nativo de pontes dissulfureto como também sofre *fold*ing conformacional, conduzindo à formação de uma forma nativa e biologicamente ativa. Num estudo comum de *fold*ing oxidativo, as proteínas são inicialmente completamente reduzidas e desnaturadas. Os agentes desnaturantes e redutores são removidos, e a proteína é reenrolada na presença de tampões adequados que contêm agentes *redox*. Em vários intervalos é adicionado um reagente que extingue a formação de pontes dissulfureto e assim interrompe o processo de *fold*ing oxidativo. Os intermediários do *fold*ing apreendidos são então separados, identificados e quantificados [34].

Ensaio *in vitro* em proteínas relativamente simples como a Ribonuclease A (RNase A) (Figura 1.13) podem ajudar a determinar fatores que afetam a regeneração das pontes dissulfureto nativas *in vivo* e em complexos proteicos [35].



**Figura 1.13** Estrutura na Ribonuclease A do pâncreas de bovino (RNase A). É uma proteína pequena, com 124 resíduos e 4 pontes dissulfureto: 26-84, 40-95, 58-110 e 65-72 [36].

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Reagentes

Todos os reagentes foram comprados à Sigma Aldrich®, Merk®, VWR™, NZYTech, Ultra-Pure™ e Invitrogen™.

#### 2.1.2 Enzimas

As enzimas comerciais utilizadas ao longo do trabalho (DNase, RNase, Glucose Oxidase) foram compradas à Sigma Aldrich® e Roche.

#### 2.1.3 Plasmídeos

Todos os plasmídeos usados neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Professor David Ron do *Institute of Metabolic Sciences* da Universidade de Cambridge no Reino Unido e são descritos na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** Plasmídeos utilizados para a produção das proteínas de interesse, com referência ao antibiótico de resistência e ao tag de afinidade.

Proteína	Plasmídeo Alvo	Antibiótico de Resistência do Plasmídeo	Tag de Afinidade
PDI	pRSET A	Ampicilina	His
Ero1	pGEX	Ampicilina	Glutathione S-transferase (GST)
PRDX4	pRSET A	Ampicilina	His
PRDX2	pRSET A	Ampicilina	His
ULP	pET-28b	Canamicina	His

#### 2.1.4 Antibióticos

Os antibióticos utilizados foram comprados à NZYTech e as soluções *stock* utilizadas tinham uma concentração de 500 µg/mL.

### 2.1.5 Estirpes de *E. coli*

A bactéria *Escherichia coli* é o hospedeiro mais utilizado para a expressão de proteínas recombinantes. As estirpes de células competentes utilizadas para a transformação com o plasmídeo recombinante são a BL21 (DE3) e a *Rosetta*.

### 2.1.6 Composição de Meios, Soluções e Tampões

Na tabela 2.2 são apresentadas as composições dos tampões, e soluções utilizadas ao longo do trabalho experimental.

**Tabela 2.2.** Composição das soluções utilizadas no trabalho experimental.

Solução		Composição	
Tampão de Diálise		24h	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl
		24h	50 mM Tampão Fosfato pH8; 150 mM NaCl
Tampões de Purificação	Equilíbrio da coluna (A)	PDI	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazole
		PRDX4	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazole
		ULP	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazole
		Ero1	PBS pH 7.3; 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		PRDX2	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazole
	Eluição (B)	PDI	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazole
		PRDX4	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazole
		ULP	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazole
		Ero1	50 mM Tris-HCl pH8; 40 mM Glutathione Reduzida
		PRDX2	50 mM Tampão Fosfato pH8; 300 mM NaCl; 500 mM Imidazole
Tampão de Reação (10x)		500 mM Tris-HCl pH 7.5; 1.5 M NaCl	
Tampões de Corrida de Eletroforese		SDS-PAGE Glicina (10x)	250 mM Tris; 2.5 M Glicina; 1% SDS
		SDS-PAGE Tricina (10x)	1 M Tris; 1 M Tricina; 1% SDS
Tampão de Corte da Ero1/GST		50 mM Tris-HCl pH7.5; 100 mM NaCl; 0.5 mM EDTA	
Loading Dye (SDS-PAGE Glicina) Vf=10 ml (Alíquotas de 900 µL)		0.02g Orange G; 0.8 g SDS (C <sub>f</sub> = 2%); 4 ml glicerol (C <sub>f</sub> = 10%); 2.5 ml Tris-HCl 1M pH 6.8 (C <sub>f</sub> = 62.5 mM); 3.5 ml dH <sub>2</sub> O; 100 µL β-mercaptoetanol a cada alíquota	
Loading Dye (SDS-PAGE Tricina)		0.02g Orange G; 0.8 g SDS (C <sub>f</sub> = 2%); 4 ml glicerol (C <sub>f</sub> = 10%); 2.5 ml Tris-HCl 1M pH 6.8 (C <sub>f</sub> = 62.5 mM); 3.5 ml dH <sub>2</sub> O	

### 2.1.7 Lista de Equipamentos

Na tabela 2.3 são apresentados os equipamentos utilizadas ao longo do trabalho experimental, bem como a respectiva marca e modelo.

**Tabela 2.3.** Lista de equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental com referência à marca e modelo.

<b>Nome do Equipamento</b>	<b>Função</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
<b>Sonicador</b>	Lise celular	Vibra cell™ 75186	VCX 130
<b>Centrífuga de Bancada</b>	Centrifugação de eppendorfs	VWR™	2416
<b>Ultracentrífuga de chão</b>	Centrifugação após lise celular	Beckman Coulter	J14-MC
<b>Ultracentrífuga de chão</b>	Centrifugação após final da fermentação	eppendorf®	5810 R
<b>Estufa</b>	Incubação com temperatura	Nüv	EN400
<b>Orbital</b>	Incubação com temperatura e agitação	Arbalab-Agitorb	200 IC
<b>Leitor de Placas</b>	Medições espectrofotométricas	Tekan	Infinity m-200
<b>Espectrofotômetro</b>	Medições espectrofotométricas	Pharma-Spec	
<b>Balança</b>	Pesagem	ae ADAM	ACB plus 600H
<b>FPLC- ÄKTA</b>	Purificação	GE Healthcare	Micro
<b>Oscilador</b>	Agitação	Heidolph Duomax	1030
<b>Medidor de pH</b>	Medições de pH	Hanna Instruments	pH 210

## 2.2 Métodos

No presente capítulo descrevem-se os procedimentos experimentais realizados com referência, em simultâneo, aos equipamentos utilizados, reagentes químicos e métodos analíticos.

## 2.2.1 Produção das Proteínas

### 2.2.1.1 Obtenção de Células Competentes

As estirpes de *E. coli* foram deixadas a crescer em 5 mL de meio LB (40 g/L) *overnight* (O/N), a 37°C. Posteriormente foram inoculados 100 µl da cultura, em 50 ml de meio LB, que por sua vez são incubados nas mesmas condições de temperatura até ser atingida uma Densidade Ótica (DO) a 600 nm de 0.5. A cultura foi colocada em gelo durante 3-5 minutos, com agitação constante e depois, centrifugada durante 8 minutos a 6000 rpm e 4°C, numa centrífuga de modelo 5810R (eppendorf®). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 10 mL de Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 0.1M e colocado em gelo durante 5-10 minutos. Este processo foi repetido novamente mas a cultura foi deixada em gelo durante 20 minutos. Após uma nova centrifugação nas mesmas condições, o *pellet* foi ressuscitado em 1800 µL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M e 300 µL de glicerol (86%). São feitas alíquotas de 100 µL e armazenadas a -80°C.

### 2.2.1.2 Transformação celular

O processo de transformação baseia-se na introdução do plasmídeo de interesse (3 µL) nas células competentes (100 µL), previamente obtidas (Ponto 2.2.1.1). De seguida a amostra que contem o plasmídeo e as células foi colocada durante 30 minutos no gelo, sendo depois sujeita a choque térmico durante 1 minuto a 42°C de modo a permitir a entrada do plasmídeo no interior da célula. A amostra foi mantida no gelo por mais 5 minutos e de seguida foram adicionados 250 µL de meio LB (20 g/L) de modo a estimular o crescimento celular que aconteceu nos 45 minutos seguintes estando as células incubadas a 37°C num bloco de aquecimento com agitação (~400 rpm). A cultura foi plaqueada (50 µL/placa) em placas de LB/agar (25g/L LB e 15 g/L Agar) com o antibiótico que confere resistência de modo a que apenas cresçam colónias que contenham o gene de resistência. Estas placas foram deixadas a incubar durante a noite, numa estufa EN400 da Nüv a 37°C.

Todas as proteínas, com exceção da *Protease Ubiquitin-Like Protein* (ULP), foram produzidas na presença da Ampicilina (Amp) sendo que nas placas de LB/agar este antibiótico está presente numa concentração de 100 µg/mL. No caso da ULP, o

antibiótico utilizado foi a Canamicina (Kan) numa concentração de 50 µg/mL nas placas.

### 2.2.1.3 Composição do meio de cultura

O meio de cultura, *Luria-Bertani* (LB Broth), da marca Sigma-Aldrich® é usado para a manutenção e propagação de *Escherichia coli*. Esta bactéria cresce rápido neste meio devido à triptona e devido ao extrato de levedura que fornece os fatores de crescimento essenciais que, de outra forma, a *E.coli* teria de sintetizar. Este meio contém também eletrólitos essenciais para o transporte e para o balanço osmótico, devido à presença de Cloreto de sódio (NaCl) (Tabela 2.4).

**Tabela 2.4** Composição padrão do meio LB da Sigma-Aldrich®

Composto	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L

O meio LB foi utilizado numa concentração de 20 g/L, sendo dissolvido em dH<sub>2</sub>O. Para preparar o meio do pré-inóculo e inóculo foram pesados 43 g de LB que são diluídas em dH<sub>2</sub>O. A esterilização do meio foi feita em autoclave (Raypa®) durante 20 minutos à temperatura de 121°C.

Os pré-inóculos foram preparados em *erlenmeyers* de 250 mL, com volume útil de 50 mL e as fermentações foram preparadas em *erlenmeyers* de 2000 mL com volume útil de 500 mL. A relação entre o volume disponível e o volume útil tem a ver com o arejamento necessário para o crescimento adequado da cultura.

### 2.2.1.4 Cultura do pré-inóculo e inóculo

As proteínas foram produzidas numa cultura em *batch*. Todas as culturas foram realizadas a 37°C com agitação de aproximadamente 180 rpm, com exceção da produção da proteína *Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1* (Ero1) em que a temperatura de incubação do inóculo foi de 16°C (O/N).

Das placas de LB/agar foram selecionadas colónias isoladas que foram incubadas em meio LB com antibiótico (100 µg/mL Amp e 50 µg/mL Kan) constituindo assim o pré-inóculo. Para tal, utilizaram-se três *erlenmeyers* (3 x 50 mL) e, para cada um deles, foi selecionada uma única colónia de cada placa de LB/agar. O crescimento do pré-inóculo decorreu durante a noite, a 37°C e 180 rpm e até se atingir uma DO de cerca de 2 a 600 nm. No caso da Ero1 o pré-inóculo cresceu durante o dia nas mesmas condições.

A cultura (4 x 500 mL) decorreu a partir do pré inóculo e na presença do antibiótico, iniciando-se com uma DO de 0.1 e seguindo-se o crescimento até uma DO entre 0.6-0.8, altura em que se adicionou 500 µL de isopropiltioβ-D-galactosidase 1M (IPTG) ( $C_f = 1 \text{ mM}$ ) a cada *erlenmeyer*, de modo a induzir a expressão da proteína de interesse. Após a adição de IPTG esperou-se que as culturas atingissem a fase estacionária, verificada pela estabilização da DO. A monitorização do crescimento foi feita em intervalos de 30 minutos antes da adição de IPTG e após esta etapa, em intervalos de 1 hora através da medição da DO num espectrofotómetro *Pharma-Spec*.

#### **2.2.1.5 Centrifugações**

Após o processo de cultura que terminou quando as culturas atingem a fase estacionária, foram efetuadas duas centrifugações (4 x 250 mL de cada vez) numa centrífuga 5810R (ependorf®) a 4000 rpm durante 15 minutos e a uma temperatura de 4°C com rotor basculante. O sobrenadante foi descartado sendo constituído maioritariamente por meio de cultura. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos no menor volume possível de sobrenadante e transferidos para um tubo *falcon* de 50 mL. Realizou-se uma nova centrifugação nas mesmas condições, mas com rotor fixo. O processo podia ser parado nesta fase e o *pellet* obtido é armazenado a -20°C até ao dia seguinte.

#### **2.2.2 Lise Celular**

O *pellet* foi ressuspensado em 15-20 mL de tampão de equilíbrio, sendo este tampão utilizado posteriormente na purificação da proteína de interesse. Além do tampão foram também adicionadas 150 µL de DNase (50 µg/mL) e 150 µL de fluoreto

de fenilmetanosulfonil 1mM (PMSF) que vão, respetivamente, degradar o DNA após rutura celular e inibir as protéases libertadas pela rutura celular.

As células foram lisadas por sonicação num sonicador Vibra cell™, 75186 VCX 130 com amplitude 50/5 w em 4 pulsos durante 2 minutos num total de 4 ciclos. Este processo foi feito em gelo e entre cada ciclo foi verificado se a agulha do sonicador não toca nas paredes no tubo e se o nível de gelo é suficiente para garantir que a amostra não aquece. O lisado foi transferido para um tubo cónico de 50 mL e centrifugado numa ultracentrifuga de chão, da marca Beckman Coulter, J14-MC, a 18000 rpm durante 30 minutos a uma temperatura de 4°C com rotor de ângulo fixo. Uma vez que as células já sofreram rutura nesta fase, o sobrenadante foi recolhido sendo que no *pellet* permanecem os fragmentos celulares. Nesta fase foi recolhida uma amostra do *pellet* que constitui a fração insolúvel da proteína, uma vez que se esta permanecer sob a forma de corpos de inclusão, ficará retida com os restantes fragmentos celulares. O sobrenadante foi colocado num copo onde se adicionou polietilenamina com uma concentração final de 0.5% p/v de modo a precipitar os ácidos nucleicos em suspensão (~0.08 g). A solução ficou a agitar a 4°C durante 20 minutos e de seguida foi novamente centrifugada durante 40 minutos a 15000 rpm e 4°C, na mesma centrífuga.

Após esta fase foi recolhida uma do sobrenadante constituindo a fração solúvel. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de 0.22 µm e armazenado a 4°C até ao passo de purificação.

### **2.2.3 Purificação da Proteína**

A purificação das proteínas de interesse com exceção da Ero1 foi realizada num processo de cromatografia de afinidade (IMAC - cromatografia de metalo-afinidade), num equipamento denominado FPLC-ÄKTA™ (GE Healthcare). Neste processo foram utilizadas colunas pré-empacotadas com 5 ml de resina Ni Sepharose™ (HiTrap *affinity columns*) da GE Healthcare. A matriz cromatográfica é estável e tolerante aos tampões aquosos geralmente utilizados bem como a agentes desnaturantes (Cloreto de Guanidina, Ureia). Estas colunas são carregadas com iões metálicos (iões níquel) que retêm seletivamente as proteínas com um “tag” de 6 histidinas caso estas se encontrem expostas à superfície proteica, garantindo uma capacidade de ligação de, no mínimo, 40 mg/mL. Esta retenção permite purificar amostras proteicas com esse “tag” de afinidade

e, através da passagem de um tampão com imidazole, ocorre a libertação da proteína da matriz com iões Ni.

Este equipamento permite visualizar, em tempo real, a absorção das amostras eluídas a 280 nm bem como o pH, condutividade entre outros parâmetros, através da utilização de *software* especializado (Unicorn).

O sistema de bombagens do equipamento foi sujeito a limpeza (função “*Pump Wash*”) com Etanol 20% ou água Elix antes de se iniciar o processo de purificação. Os capilares A1 e B1 foram colocados nos frascos com o tampão de equilíbrio (A) e o tampão de eluição (B), respetivamente. Realizou-se uma nova limpeza das bombas agora com os tampões A e B. Após esta fase foi inserida a coluna pré-empacotada no sistema e o caudal usado não excedeu o limite de pressão suportado pela coluna. A coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão A, antes da injeção da amostra. Esta injeção foi feita através de um sistema denominado *super-loop* previamente lavado com água Elix. Antes da injeção foi acionada a função “*auto-zero*” definindo a absorvância a 280 nm como zero. O volume máximo do *super-loop* é 10 mL pelo que, se o volume a purificar for superior, são efetuadas duas injeções intercaladas. Após a inserção da amostra no *super-loop* ativou-se a função “*Inject*” que fez com que a amostra entrasse na coluna cromatográfica. Quando o êmbolo do *super-loop* chegou ao fim a função “*Load*” foi ativada para continuar a passar tampão A pela coluna. No cromatograma surgem os picos referentes ao conteúdo proteico (*flow-through* ou fase móvel) presente na amostra que não ligou à matriz cromatográfica sendo esperado que a proteína de interesse ficasse retida na coluna, por afinidade. Após a estabilização do sinal de absorvância a 280nm em aproximadamente zero, iniciou-se o gradiente com o tampão B entre 0 e 100% num intervalo de 30 minutos, que provoca a libertação da proteína de interesse dos iões metálicos (Ni). Neste intervalo surge(m) o(s) pico(s) referente à proteína que ficou retida na coluna e que é eluída pelo tampão B. A etapa de purificação foi concluída com a limpeza das bombas e do sistema primeiro com o tampão A e depois com Etanol 20% e H<sub>2</sub>O Elix.

#### **2.2.4 Avaliação da expressão e da eficiência da purificação por SDS-PAGE**

Ao longo do processo fermentativo foram recolhidas amostras das antes e depois da adição de IPTG. Além destas, foram igualmente recolhidas amostras das frações

solúvel e insolúvel da proteína durante a fase de lise celular e também dos picos e do *flow-through* na fase da purificação.

Para avaliar se ocorreu sobreexpressão da proteína de interesse e se a purificação foi eficiente utiliza-se a técnica de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) que consiste num método de separação de proteínas por eletroforese, num gel de poliacrilamida na presença de SDS que atua como desnaturante das proteínas e confere carga negativa a todas as proteínas. A separação de proteínas por SDS-PAGE pode ser utilizada para estimar a massa molecular relativa, para determinar a abundância relativa das proteínas numa amostra e para determinar a distribuição de proteínas entre frações.

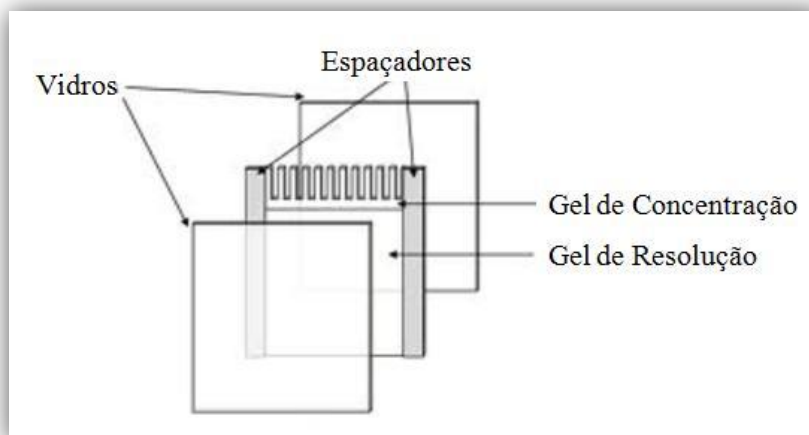
O gel é composto por duas fases: gel de resolução e gel de concentração sendo que o gel de resolução constitui a maior parte do gel (Figura 2.1). Na tabela 2.5 são apresentadas as composições de cada fase do gel SDS.

**Tabela 2.5.** Composição do gel de Resolução 12% e do gel de Concentração 5%

	<b>Gel de Resolução 12% (10 mL)</b>	<b>Gel de Concentração 5% (4mL)</b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	4.3 mL	2.9 mL
<b>1M Tris-HCl pH 6.8</b>	-	0.5 mL
<b>1.5 M Tris-HCl pH 8.8</b>	2.5 mL	-
<b>Acrilamida/Bisacrilamida 40%</b>	3 mL	0.5 mL
<b>10% SDS</b>	100 µL	40 µL
<b>10% APS</b>	100 µL	40 µL
<b>TEMED</b>	4 µL	4 µL

O gel de resolução foi preparado sendo que o Persulfato de Amónio (APS) e o N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) foram os últimos componentes a serem adicionadas visto que são os responsáveis pela aceleração e iniciação da polimerização do gel, respetivamente. Uma vez adicionados, a solução foi imediatamente inserida entre os vidros para polimerizar. No final, adicionou-se uma camada de dH<sub>2</sub>O no topo da camada de gel de modo a remover bolhas de ar e assegurar uma superfície plana no gel. A polimerização demorou entre 20 a 30 minutos e quando foi atingida, a dH<sub>2</sub>O

adicionada anteriormente foi removida, com recurso a papel absorvente. O gel de concentração foi preparado da mesma forma mas, neste caso, depois de ser colocado entre os vidros inseriu-se o pente que conduz à formação dos poços onde são carregadas as amostras (Figura 2.1).



**Figura 2.1** Esquema de montagem dos vidros para polimerização do gel; Diferentes camadas do gel SDS 12% (Imagem adaptada de [37]).

Após o gel estar completamente polimerizado foi colocado em suportes próprios do equipamento de eletroforese da BioRad e na respetiva tina com tampão de corrida cuja composição é apresentada na tabela 2.2 do capítulo dos Materiais, sendo este diluído dez vezes.

Para fazer o tampão de corrida foi necessário controlar o pH do tampão Tris pelo que inicialmente foi acertado o pH e depois foram adicionados os restantes componentes, visto que não alteram o pH. Este tampão pode ser utilizado 3 vezes pelo que, depois, deverá ser substituído por uma nova solução.

#### **2.2.4.1 Preparação das amostras para correr no gel**

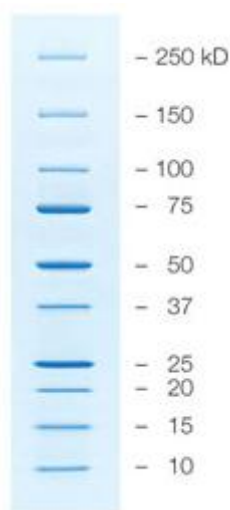
As amostras recolhidas ao longo da fermentação foram centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos numa centrífuga de bancada VWR™, 2416. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* é ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$ .

Para carregar no gel foram utilizados 15  $\mu\text{L}$  de cada amostra aos quais foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de *Loading Dye* a cada perfazendo um volume total de 20  $\mu\text{L}$  de

amostra em cada poço. A composição do *Loading Dye* é apresentada na tabela 2.2 dos Materiais.

As amostras foram submetidas a aquecimento à temperatura de 100°C durante 5 minutos, de seguida foi feito um spin na mesma centrífuga de bancada de modo a que a amostra fique no fundo do *micro-tubo* e depois foram carregadas nos poços do gel.

O marcador utilizado foi o *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* da BioRad, apresentado na Figura 2.2.



**Figura 2.2** Bandas do Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; Bandas de 10 proteínas *standart* com peso molecular entre 10-250 kDa.

#### 2.2.4.2 Voltagem para a Eletroforese

Após o suporte estar corretamente preparado e as amostras carregadas, os elétrodos na tampa da tina foram conectados à fonte de alimentação onde é controlada a voltagem e/ou amperagem ao longo da corrida. Inicialmente utilizou-se uma voltagem de 40 V durante aproximadamente 15 minutos ou até as amostras percorrerem o gel de concentração. Seguidamente alterou-se a voltagem para 90 V durante 15 minutos e, por fim, deixou-se o gel a 120 V no resto da corrida que foi terminada antes que as amostras coradas saíssem do gel.

#### 2.2.4.3 Coloração e Descoloração do gel

Quando a corrida do gel terminou o gel foi corado numa solução cuja composição se encontra descrita na tabela 2.6. Em geral, o gel foi deixado nesta solução O/N e no

dia seguinte foi colocado na solução para descorar (tabela 2.6) até serem visíveis as bandas obtidas. Por vezes, o gel pode ser deixado em dH<sub>2</sub>O após a passagem pela solução descorante.

**Tabela 2.6.** Composição da solução de coloração e descoloração dos Géis SDS.

<b>Coloração (1L)</b>	2 g Brilliant Blue R – Sgima Aldrich® 500 mL Etanol 96% 75 mL Ácido Acético 100% dH <sub>2</sub> O até perfazer o volume total
<b>Descoloração (1L)</b>	200 mL Etanol 96% 100 mL Ácido Acético 100% dH <sub>2</sub> O até perfazer o volume total

#### 2.2.4.4 Digitalização dos géis

Após serem visíveis as bandas nos géis estes foram digitalizados num equipamento próprio, AlphaImager HP, da Cell Biosciences™ que permite obter uma fotografia dos géis em formato digital.

#### 2.2.5 Diálise das Proteínas

A diálise é um processo onde as moléculas em solução são separadas segundo um gradiente de concentração conjugado com um *cut-off* da membrana de diálise que apenas deixa passar moléculas abaixo de um certo peso molecular. As mangas de diálise são assim semipermeáveis, sendo constituídas por celulose regenerada ou éster de celulose. A diálise foi usada para remover o imidazole da amostra proteica eluída da coluna cromatográfica.

Para fazer a diálise das proteínas foram feitos dois tampões sendo que o segundo possui metade da concentração de sal (NaCl) relativamente ao primeiro (Tabela 2.2 dos Materiais). Este decréscimo gradual da concentração de sal minimiza a precipitação da proteína. A diálise decorreu ao longo de 2 ou 3 dias com mudança de tampão em intervalos de aproximadamente 12 horas.

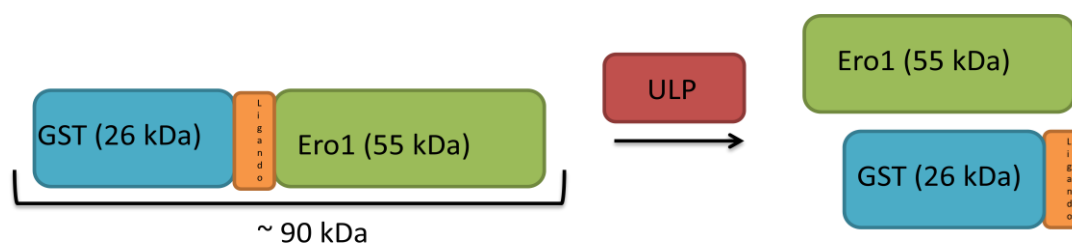
## 2.2.6 Quantificação de Proteínas pelo método de Bradford

A quantificação das proteínas produzidas foi feita pelo método de Bradford. O reagente foi comprado à BioRad e a reta de calibração feita com uma solução *stock* de BSA (0.5 mg/ml) entre 0 e 60 µg/mL. As amostras de proteína a quantificar foram diluídas 100 e 200 vezes de modo a que os valores de DO das amostras, a 595 nm, se encontrassem inseridas na reta de calibração permitindo assim determinar, por interpolação da reta de regressão linear, a concentração da amostra proteica. A leitura das DO foi feita num leitor de microplacas Infinite® M-200 da Tecan.

O método de Bradford é um procedimento simples que permite a determinação da concentração de proteínas solubilizadas. Envolve a adição de um corante ácido à solução proteica onde o grupo trifenil-metano do corante se liga às estruturas apolares da proteína e os iões sulfonato interagem com aminoácidos polares. Este método é simples e rápido de executar e apresenta um número reduzido de substâncias interferentes.

## 2.2.7 Corte da Ero1 pela proteína ULP

A Ero1 foi produzida fundida com a Glutathione S-transferase (GST) sendo necessário separar estas duas proteínas de modo a que a Ero1 fique isolada e pura. Esta separação foi levada a cabo numa reação enzimática catalisada pela protease ULP, que é responsável pelo corte entre as duas proteínas (Figura 2.3).



**Figura 2.3** Esquema representativo do corte do conjunto Ero1 (verde)/GST (azul) catalisado pela enzima ULP (vermelho). O ligando (laranja) que une as duas proteínas fica ligado à GST após o corte.

A determinação das concentrações de cada proteína a utilizar na reação foi feita com base no seguinte:

- Com base em experiências prévias que mostraram que a ULP deve ser diluída de 1:100 relativamente ao volume da solução de Ero1 (Comunicação oral Prof. Eduardo Melo).
- Com base no protocolo da GE Healthcare, HiTrap *Affinity Columns* para a coluna GSTrap são elaboradas outras duas possíveis formulações para testar a que gera mais eficiência no corte:
  - a) Adicionar 1  $\mu$ L de ULP para cada 100  $\mu$ g de Ero1, sendo que para esta formulação é necessário conhecer a concentração de Ero1.
  - b) Assumindo que a Ero1 se encontra numa concentração de cerca de 8 mg/mL adicionar 80  $\mu$ L de ULP por cada 1 mL de amostra contendo Ero1.

Os cálculos foram reajustados, uma vez que a concentração era conhecida e foram utilizadas 3 concentrações de ULP em 3 reações separadas que foram realizadas durante cerca de 4 horas e a 4°C com agitação. Para confirmar a eficiência do corte foi realizado um gel SDS-PAGE e só depois se procedeu à purificação de modo a remover a GST da amostra de interesse. Esta etapa de purificação foi levada a cabo no ÄKTA, com uma coluna cromatográfica GSTrap. A coluna GSTrap é utilizada para purificar proteínas com afinidade para a glutathione. A GST é retida na coluna, por afinidade, enquanto que a Ero1 sai através do *flow-through*. Para remover a GST da coluna foi feito um gradiente com uma concentração de glutathione reduzida superior à que se encontra na matriz promovendo a ligação da GST à glutathione reduzida do tampão de eluição. Esta purificação foi feita com caudais muito reduzidos (0.2-0.3 mL/min) uma vez que a cinética de ligação entre a glutathione e a GST é relativamente baixa.

## **2.2.8 Estudo de *Refolding* Oxidativo da Ribonuclease A (RNase)**

### **2.2.8.1 SDS-PAGE-Tricina**

O estudo do *Refolding* Oxidativo da RNase foi analisado em géis SDS-PAGE com tricina em vez de glicina no tampão de corrida. Os géis de acrilamida-SDS-tricina cobrem gamas estreitas de pesos moleculares e oferecem elevada resolução, especialmente para gamas de proteínas pequenas. A concentração de *cross-linker* (Bisacrilamida) e a inclusão de 6M de Ureia nestes géis aumenta ainda mais a resolução de proteínas pequenas.

O gel é formado por 3 camadas: gel de concentração com 4%T e 3%C; gel espaçador com 10%T e 3%C; gel de resolução ou separação com 16.5%T e 6%C em que “T” é a percentagem total de acrilamida (acrilamida e bisacrilamida) e “C” é a percentagem do *cross-linker* no total (bisacrilamida). O gel de resolução deve ser adicionado num volume de cerca de 4 mL, enquanto que deve ser adicionado cerca de 1 mL do gel espaçador. O volume restante corresponde ao gel de concentração onde é igualmente inserido o pente para formar os poços onde são inseridos as amostras. Tal como nos géis SDS 12%, o APS e o TEMED são os últimos componentes a serem adicionados e o procedimento é igual (ponto 2.2.4).

As soluções *stock* dos tampões e da acrilamida/bisacrilamida são preparadas conforme mostrado na tabela 2.7 [38].

**Tabela 2.7.** Composição do tampão utilizado na corrida dos géis SDS-tricina e da solução Gel Buffer (3x) utilizado na formação dos géis.

Tampão	Tris (M)	Tricina (M)	HCl	pH	%SDS (p/v)
Corrida	1	1	-	~8.25	1
Gel Buffer (3x)	3	-	1	8.45	0.3

Foram preparadas duas soluções de Acrilamida e Bisacrilamida em que a diferença entre elas consiste na percentagem de Bisacrilamida em solução. Assim, a solução Acrilamida-Bisacrilamida-3 (AB3) apresenta 49.5%T e 3%C e a solução Acrilamida-Bisacrilamida-6 apresenta 49.5%T e 6% C. Estas soluções foram preparadas num volume final de 50 mL em dH<sub>2</sub>O.

A composição das 3 camadas do gel é apresentada na tabela 2.8.

**Tabela 2.8.** Composição das 3 fases do gel de SDS-Tricina: Gel de resolução (16,5%), Gel espaçador (10%) e Gel de concentração (4%). Os volumes apresentados são referentes a dois géis.

	16,5%	10%	4%
AB3	-	0.5 mL	0.33 mL
AB6	3.3 mL	-	-
Gel Buffer (3x)	3.3 mL	0.83 mL	1 mL
Ureia	3.6 g	-	-
dH <sub>2</sub> O	-	1.17 mL	2.67 mL
APS (10%)	33.3 µL	12.5 µL	30 µL
TEMED	3.3 µL	1.25 µL	3 µL

### 2.2.8.2 Redução da RNase e PDI

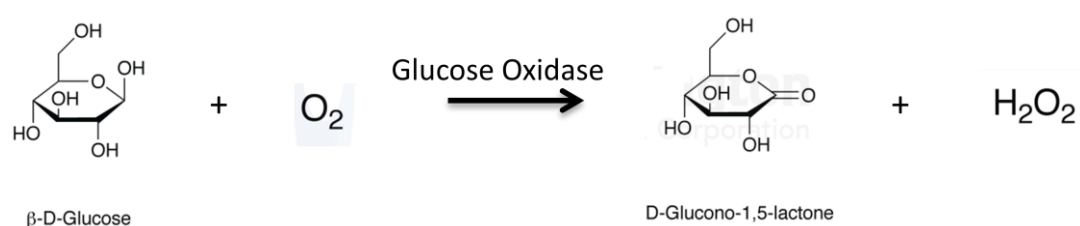
A RNase, no estado oxidado, encontra-se armazenada em alíquotas de 500 µL a -20°C e a PDI oxidada encontra-se a 4°C em gelo, num tubo *falcon*. A RNase foi reduzida em 6M de Cloreto de Guanidina (GdnHCl) e 140 mM de *Dithiothreitol* (DTT). Foram igualmente adicionados 50 µL de Tris HCl 1M pH 8 para que a proteína reduzida fique num pH estável. A PDI foi reduzida com 50 mM de DTT. As reações de redução foram realizadas num volume final de 500 µL e durante 1 hora à temperatura ambiente com agitação num oscilador Heidolph Duomax, 1030.

Após a reação de redução, as amostras foram passadas em colunas PD-10 *Desalting* da GE Healthcare, por gravidade, para remover o excesso de GdnHCl e do DTT. A utilização destas colunas consistiu em passar 3 vezes 1 mL do tampão de reação no qual as proteínas se encontram para limpar e equilibrar a coluna sendo depois adicionados os 500 µL da amostra. Por fim, adicionou-se 1 mL do mesmo tampão do qual se recolheram aproximadamente 750 µL para um tubo micro-tubo. A coluna foi limpa com tampão de reação, 3 vezes, e deixada em Etanol 20% para conservar a matriz.

As amostras das proteínas reduzidas e a RNase oxidada foram quantificadas pelo método de Bradford, como especificado no ponto 2.2.6.

### 2.2.8.3 Reação de *Refolding*

No presente trabalho foram estudadas duas vias possíveis para o *refolding* oxidativo da RNase: A via da Ero1/PDI e a via da PRDX4/PDI. Além destas, a especificidade da PRDX4 para a PDI foi comparada com a especificidade de um homólogo da PRDX4, a PRDX2 residente no citoplasma de células de mamífero. Para estudar a via onde intervém a PRDX4 ou o seu homólogo foi necessária a introdução de uma fonte de peróxido de hidrogénio que atua como aceitador final de eletrões sendo, após redução convertido a água. Como tal foi adicionada Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (Gox) (10 mU/ml) que desencadeiam a seguinte reação (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Reação de Oxidação da Glucose por ação da enzima Glucose Oxidase com o Peróxido de Hidrogénio como subproduto reacional.

As concentrações das proteínas utilizadas nas reações de estudo do *refolding* oxidativo são apresentadas na tabela 2.9.

**Tabela 2.9.** Concentrações das proteínas utilizadas nos ensaios de *refolding* oxidativo da RNase.

Proteína	Concentração (μM)
RNase Oxidada	15
RNase Reduzida	15
PDI	5
PRDX4	5
Ero1	5
PRDX2	5

Para cada ensaio foram feitos controlos com RNase reduzida e oxidada em tampão de reação que foram carregados no gel junto das amostras reacionais e que permitiram comparar o estado de oxidação das amostras reacionais com base nas diferenças de mobilidade manifestadas pelos dois estados estruturais.

As reações foram feitas em micro-tubos num volume final de 40  $\mu$ L de modo a que fosse possível recolher amostras de 10  $\mu$ L ao fim de 20 e 40 minutos de reação.

#### 2.2.8.3.1 Via da Ero1/PDI

Para estudar o *refolding* oxidativo nesta via realizaram-se 3 reações:

- A reação com a via completa (Ero1, PDI e RNase reduzida);
- A reação de controlo sem a Ero1;
- A reação de controlo sem a PDI.

A ordem de colocação dos componentes da reação é importante uma vez que se trata de um processo no qual se quer avaliar a evolução ao longo do tempo do *refolding* oxidativo da RNase. Assim, os componentes de reação foram adicionados na seguinte ordem: Tampão de reação, PDI reduzida, Ero1 e por fim RNase reduzida para iniciar a reação.

#### 2.2.8.3.2 Via da PRDX4/PDI

Para estudar o *refolding* nesta via realizaram-se 4 reações:

- A reação com a via completa (Gox, PDI, PRDX4 e RNase reduzida);
- A reação de controlo sem a Gox;
- A reação de controlo sem a PDI;
- A reação de controlo sem a PRDX4.

A ordem de colocação dos componentes da reação foi: Tampão de reação, Glucose, PDI reduzida, PRDX4, RNase reduzida e Gox, pelo que assim que esta última é adicionada a reação é iniciada.

#### 2.2.8.3.3 Via da PRDX2/PDI

Para estudar o *refolding* nesta via realizaram-se 4 reações:

- A reação com a via completa (Gox, PDI, PRDX2 e RNase reduzida);
- A reação de controlo sem a Gox;
- A reação de controlo sem a PDI;
- A reação de controlo sem a PRDX2.

A ordem de colocação dos componentes da reação foi: Tampão de reação, Glucose, PDI, PRDX2, RNase reduzida e Gox, pelo que assim que esta última é adicionada a reação é iniciada.

Após a quantificação das amostras reduzidas e da RNase oxidada pelo método de Bradford foram calculados os volumes necessários de cada proteína para as concentrações finais desejadas (tabela 2.9). O volume de tampão de reação em cada uma das reações foi determinado por diferença relativamente ao volume final de reação (40 µL).

Assim que se deu início às reações foram preparados micro-tubos com 2 µL de *N-Ethylmaleimide* 0.5M (NEM), que é responsável pelo término da reação na medida em que reage covalentemente com os grupos tióis livres. Aos tubos com NEM foram posteriormente adicionados 10 µL de cada amostra retiradas ao fim de 20 e 40 minutos de reação. Os micro-tubos com NEM foram mantidos em gelo antes e após a adição das amostras. O NEM atua durante cerca de 20 minutos, sendo que depois foi adicionado o *Loading Dye*, cuja composição é apresentada na tabela 2.2 dos materiais. A partir desta fase, as amostras foram manuseadas da mesma forma explicada no ponto 2.2.4.1.

Para estes ensaios utilizou-se um marcador *All Blue*, da BioRad (*Precision Plus Proteins™ Standards*) cujas bandas são visíveis ao longo da corrida e têm os pesos moleculares iguais aos da figura 2.2. A utilização de marcadores visíveis durante a corrida foi necessária visto que, neste tipo de gel, as amostras coradas saem do gel e assim foi possível ter uma noção de quando deve ser terminada a corrida.

#### **2.2.8.4 Voltagem**

O gel correu ao longo de cerca de 7 horas e as voltagens variaram entre os 40 e os 150 V sendo a primeira utilizada enquanto as amostras se encontram no gel de concentração. A voltagem foi aumentada para 90 V até as amostras percorrerem o gel espaçador e mais tarde para 120V. Quando o marcador se encontra praticamente todo no gel de resolução a voltagem foi elevada para 150V e mantida assim até ao final da corrida.

Devido às percentagens elevadas de Acrilamida e Bisacrilamida estes géis apresentam alguma resistência à passagem da corrente elétrica pelo que é necessária

especial atenção à amperagem uma vez que pode afetar a corrida. A polimerização correta do gel é muito importante uma vez que, caso a ureia não fique bem dissolvida, a corrida do gel pode ser prejudicada.

Para que o processo de corrida decorra normalmente e sem sobreaquecimento, a tina de eletroforese deve ser colocada em gelo e deve ser colocado apenas um gel por cada tina.

#### **2.2.8.5 Coloração e Descoloração dos géis**

Este processo foi realizado da mesma forma que os géis de SDS-Glicina e encontra-se explicado no ponto 2.2.4.3.

#### **2.2.8.6 Digitalização dos Géis**

A digitalização dos géis foi feita da mesma forma dos géis SDS-Glicina e encontra-se explicada no ponto 2.2.4.4.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

#### 3.1 *Protein Disulfide Isomerase* (PDI)

Ao longo dos crescimentos foram medidos os valores de densidade ótica (DO) do pré-inóculo e das fermentações. Os pré-inóculos ficaram a incubar durante a noite e a DO foi medida na manhã seguinte. A DO das fermentações foi monitorizada ao longo do crescimento.

A determinação dos volumes de pré-inóculo a transferir para iniciar a fermentação é calculada através da equação 3.1, com o objetivo de iniciar a fermentação com uma DO de 0,1 de modo a garantir que a fase exponencial é facilmente identificada ao longo do crescimento.

$$OD_i \times V_i = OD_f \times V_f \quad \text{Equação 3.1}$$

O volume de pré-inóculo a adicionar ( $V_i$ ) é calculado com base na OD do pré-inóculo ( $OD_i$ ), na OD que se quer iniciar a fermentação ( $OD_f$ ) e o volume com que se inicia a fermentação ( $V_f$ ).

##### 3.1.1 Crescimento do Pré-inóculo

Os *erlenmeyers* utilizados para a produção do pré-inóculo foram numerados de 1 a 3 de modo a facilitar o trabalho.

Na tabela 3.1 são apresentados os valores de DO dos 3 *erlenmeyers* de pré-inóculo da PDI após incubação O/N a 37°C.

**Tabela 3.1** Valores de DO obtidos para os pré-inóculos da PDI

<i>Erlenmeyer</i>	DO (600 nm)
1	2.301
2	2.214
3	2.280

### 3.1.2 Propagação de Inóculos e Crescimento

Os *erlenmeyers* onde decorreram as culturas foram, igualmente, numerados de 1 a 4 de modo a facilitar o trabalho.

Através da equação 3.1 foram determinados os volumes de pré-inóculo necessários para começar a cultura com uma DO de 0.1.

A cultura foi monotorizada em dois balões, selecionados aleatoriamente, permitindo ter uma noção mais correta da evolução do crescimento, por comparação entre as DO observadas assegurando que o crescimento nos vários *erlenmeyers* se encontra na mesma fase. Após o início do crescimento foram retiradas amostras em intervalos de 30 minutos até ser atingida uma DO entre 0.6 e 0.8, sendo que nesta altura foi induzida a expressão da proteína de interesse através da adição de “Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside” (IPTG) às culturas. Após a indução da expressão foram retiradas amostras em intervalos de 1 hora até a cultura atingir a fase estacionária.

Os valores obtidos através da Equação 3.1 são apresentados, como exemplo, na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** Volumes de pré-inóculo a adicionar ao meio para iniciar a cultura da PDI com DO=0.1 (Equação 1)

Pré-Inóculo	Inóculo	
1	21.7 mL	1
	20.6 mL	2*
2	22.6 mL	3
3	21.9 mL	4

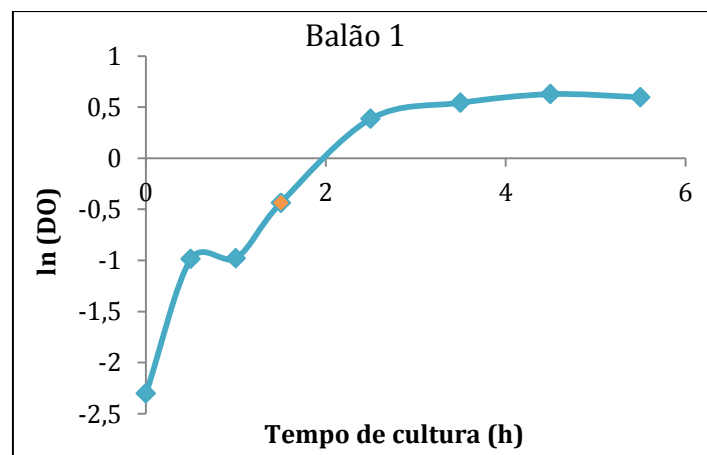
\*Nota: O *erlenmeyer* 1 do pré-inóculo não apresentava volume suficiente para que os dois *erlenmeyers* de cultura (1 e 2) apresentassem uma DO de 0.1. O balão nº 2 ficou com uma DO de 0.095, sendo esta diferença considerada insignificante pelo que se iniciou a cultura com esta DO.

Ao fim de 1.5 horas de crescimento foi induzida a expressão da proteína apesar de o balão nº4 não apresentar ainda uma DO que o justificasse. A tabela 3.3 apresenta os valores da DO obtidos ao longo da cultura, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a azul.

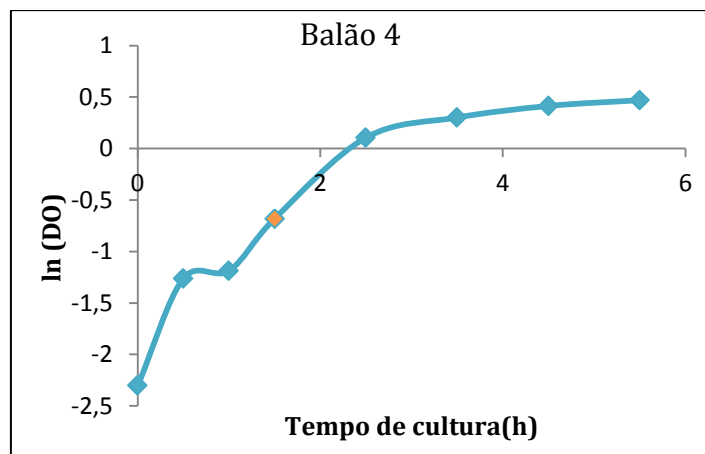
**Tabela 3.3** Monotorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 4. A caixa assinalada a preto representa o momento de adição de IPTG.

Amostra	Tempo(h)	DO (600nm) (1)	DO (600nm) (4)
0	0	0.100	0.100
1	0.5	0.373	0.283
2	1	0.376	0.305
3	1.5	0.647	0.506
4	2.5	1.47	1.112
5	3.5	1.721	1.352
6	4.5	1.872	1.512
7	5.5	1.817	1.599

Com os valores de DO recolhidos foi elaborada uma curva de crescimento, semi-logarítmica, em função do tempo de cultura que permite ter noção da evolução da cultura (Gráficos 3.1 e 3.2). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a laranja.



**Gráfico 3.1** Curva de crescimento da produção de PDI do balão 1. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

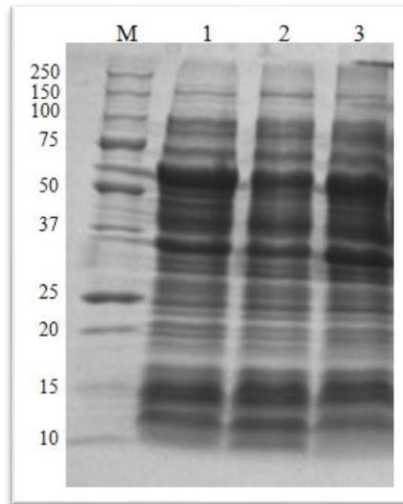


**Gráfico 3.2** Curva de crescimento da produção de PDI do balão 4. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

### 3.1.3 Avaliação da Sobreexpressão

Para verificar se a indução da expressão proteica foi efetiva foram realizados géis SDS-PAGE. Como tal, é esperado que nas amostras recolhidas no fim da cultura (após a adição de IPTG) sejam visíveis bandas mais intensas relativamente às amostras recolhidas antes da adição de IPTG.

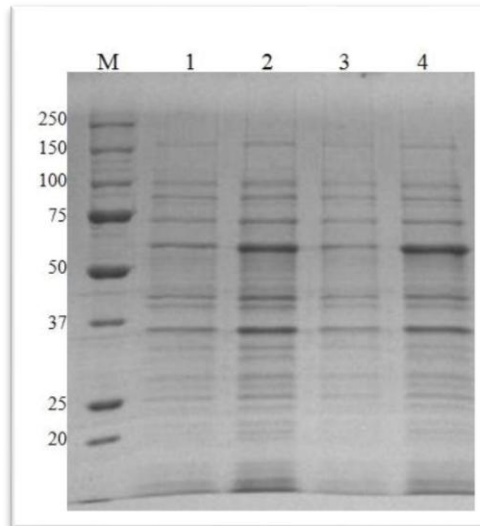
O primeiro gel SDS-PAGE realizado para avaliar a expressão da PDI resultante da produção (PM = 55 kDa) não gerou resultados positivos (dados não apresentados). O gel foi repetido, mas na ausência das amostras recolhidas antes da adição de IPTG, pelo que não é possível avaliar concretamente se o IPTG induziu o aumento da expressão da PDI (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Gel de avaliação da expressão da PDI: 1- Amostra recolhida após a adição de IPTG (*Erlenmeyer1*); 2- Amostra recolhida após a adição de IPTG (*Erlenmeyer4*); 3- Amostra do *pellet* recolhido após lise celular.

Por comparação com o marcador, é visível a presença de bandas mais fortes nas 3 amostras, ligeiramente acima da banda de 50 kDa do marcador, o que é indicador da presença da PDI em quantidades significativas nas amostras. São igualmente identificadas outras bandas correspondentes a outras proteínas expressas ao longo do crescimento e que, mais tarde, são separadas da PDI no processo de purificação. A presença da banda de 55 kDa na amostra do *pellet* indica que uma parte da proteína permaneceu na fase insolúvel, sob a forma de corpos de inclusão.

Numa fase mais avançada do trabalho foi necessário produzir novamente a PDI visto que a proteína previamente produzida apresentava algumas contaminações de microrganismos, reveladas pelo cheiro e turbidez da amostra. No gel SDS-PAGE relativo a esta segunda produção, pode verificar-se a ocorrência de sobreexpressão, apesar da concentração proteica na amostra ser relativamente baixa (Figura 3.2).



**Figura 3.2** Gel de avaliação da expressão da PDI: M- Marcador Precision Plus Protein™ Unstained Standart; 1- Amostra recolhida antes da adição de IPTG (*erelemayer1*); 2- Amostra recolhida após a adição de IPTG (*erelemayer1*); 3- Amostra recolhida antes da adição de IPTG (*erelemayer2*); 4- Amostra recolhida após a adição de IPTG (*erelemayer2*).

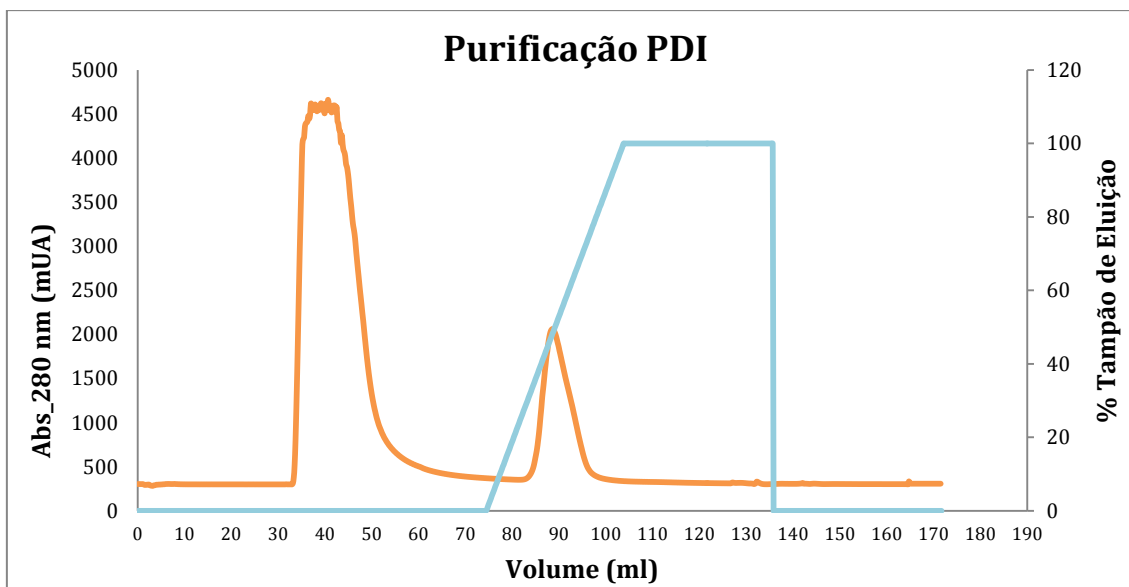
É visível um ligeiro aumento da espessura das bandas entre as amostras recolhidas antes e depois do IPTG pelo que se pode concluir que ocorreu sobreexpressão.

É possível concluir que a proteína se encontra presente na amostra final após os processos de produção, lise e centrifugação.

### 3.1.4 Purificação

A purificação tem como objetivo remover outras proteínas que se encontrem presentes na amostra para se obter a proteína pura.

O cromatograma apresentado no gráfico 3.3 mostra a purificação da PDI por IMAC numa coluna de Níquel. Após a injeção da amostra e da saída do *flow-through* o gradiente é iniciado e o pico onde se encontra a proteína que ligou à matriz cromatográfica começa a eluir, aproximadamente 15 mL após o início do gradiente. Apesar da proteína eluir antes do gradiente terminar, este foi levado até ao fim para verificar se surgiam outros picos.



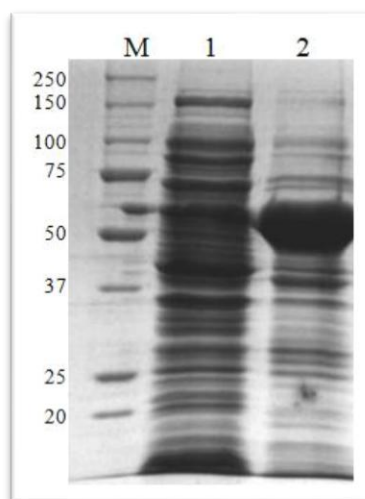
**Gráfico 3.3** Cromatograma da Purificação da PDI obtido no equipamento FPLC-ÅKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Laranja) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Azul).

### 3.1.5 Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford

Ao longo de todas as purificações efetuadas foram recolhidas as amostras do *flow-through* e dos picos obtidos. Antes de se proceder à diálise das proteínas, estas amostras são corridas num gel SDS-PAGE 12% para confirmar a eficiência da purificação e se é necessário repetir o processo uma vez que a proteína de interesse pode não ter ficado eficientemente ligada à coluna ou pode não ter sido corretamente eluída.

A quantificação é realizada no final da etapa de purificação, pelo método de Bradford.

É visível que a PDI foi eficientemente eluída uma vez que a amostra referente ao pico obtido contém quase exclusivamente a proteína em questão. A banda de referência do marcador é a de 50 kDa e na amostra do pico obteve-se uma banda bastante carregada o que significa que a PDI está presente numa concentração elevada. No *flow-through* são visíveis algumas bandas referentes à totalidade do conteúdo proteico da amostra e pode igualmente verificar-se uma pequena banda equivalente à PDI o que pode significar que uma parte da proteína não ficou retida na coluna pré-empacotada e, como tal, saiu através do *flow-through* (Figura 3.3).



**Figura 3.3** Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da PDI; M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1- Amostra do *flow-through*; 2- Amostra do pico 1.

Poderia ter sido, igualmente, corrida a amostra recolhida antes da purificação o que permitiria comparar a presença de proteínas com o *flow-through* e verificar se só a proteína de interesse ficou retida na coluna.

Na quantificação desta proteína pelo método de Bradford obteve-se, para a primeira produção, uma concentração de aproximadamente 5 mg/ml que corresponde a uma concentração molar de 92  $\mu$ M e, para a segunda produção, uma concentração de aproximadamente 7 mg/ml correspondendo a 124  $\mu$ M.

## 3.2 *Peroxiredoxin IV (PRDX4)*

### 3.2.1 Crescimento do Pré-inóculo

Na tabela 3.4 são apresentados os valores de DO do pré-inóculo da PRDX4 após incubação O/N a 37°C.

**Tabela 3.4** Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PRDX4.

<i>Erlenmeyer</i>	DO (600 nm)
1	2.312
2	2.312
3	2.280

### 3.2.2 Propagação de Inóculos e Crescimento

O inóculo para a produção de PRDX4 foi realizada em 3 *erlenmeyers* dado que um não ficou corretamente esterilizado.

Através da equação 3.1 foram calculados os volumes de pré-inóculo necessários para que a cultura fosse iniciada com DO=0.1.

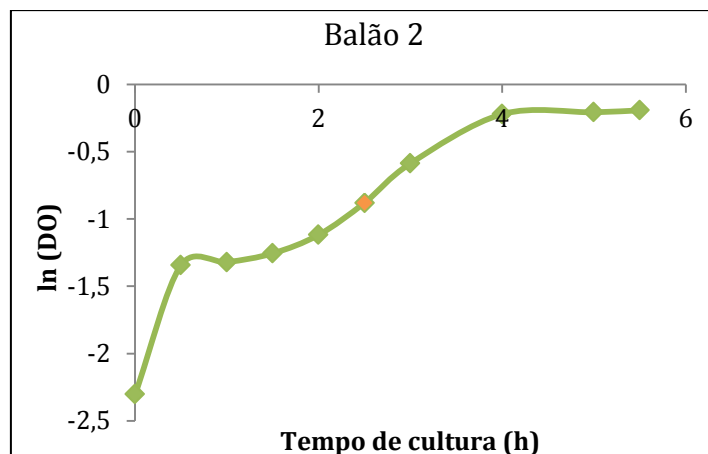
Ao fim de 3 horas de crescimento foi induzida a expressão da proteína de interesse apesar de o balão nº 2 não apresentar ainda uma DO que o justificasse. A tabela 3.5 apresenta os valores da DO obtidos ao longo da cultura, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a azul.

**Tabela 3.5** Monotorização do crescimento através dos balões numerados com 2 e 3. A caixa assinalada a preto representa o momento de adição de IPTG.

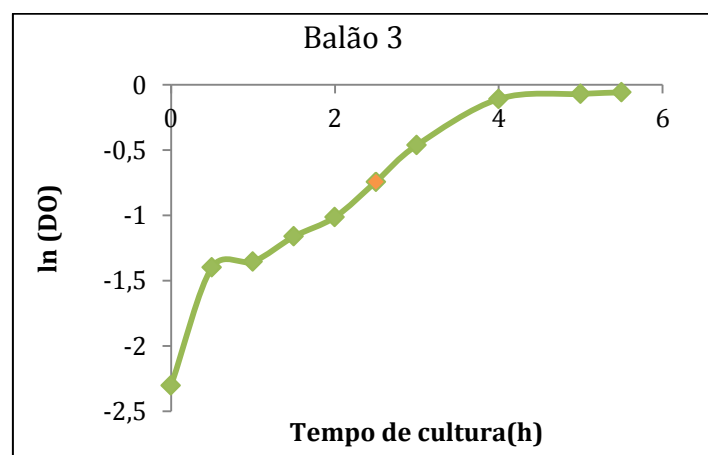
Amostra	Tempo (h)	DO (600nm) (2)	DO (600nm) (3)
0	0	0.100	0.100
1	0.5	0.261	0.247
2	1	0.267	0.258
3	1.5	0.285	0.313
4	2	0.327	0.363
5	2.5	0.415	0.476
6	3	0.556	0.63
7	4	0.802	0.898
8	5	0.813	0.933
9	5.5	0.825	0.944

Comparativamente com a PDI, esta cultura cresceu mais lentamente e atingiu a fase estacionária para valores de DO inferiores.

Com os valores de DO recolhidos foi elaborada uma curva de crescimento, semi-logarítmica, em função do tempo de cultura que permite ter noção da evolução da cultura (Gráficos 3.4 e 3.5). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a laranja.



**Gráfico 3.4** Curva de crescimento da produção de PRDX4 do balão 2. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.



**Gráfico 3.5** Curva de crescimento da produção de PRDX4 do balão 3. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

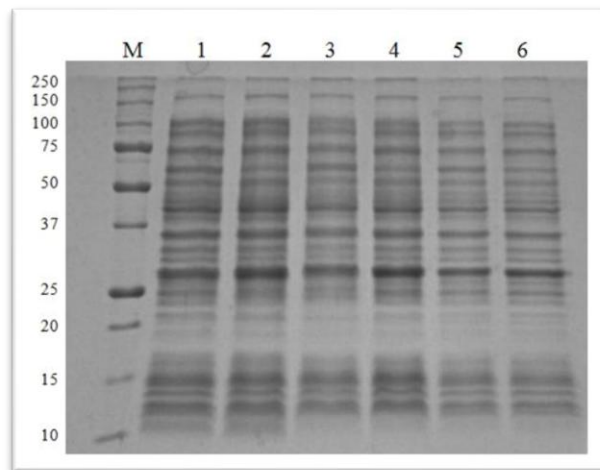
### 3.2.3 Avaliação da Sobreexpressão

Com o objetivo de avaliar a sobreexpressão da PRDX4 optou-se por outra forma de tratamento das amostras antes de carregar no gel. Como descrito no protocolo, as amostras recolhidas antes e depois da indução da expressão foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspendido em 100  $\mu$ L de dH<sub>2</sub>O. As amostras recolhidas após a adição de IPTG foram divididas em duas amostras de 50  $\mu$ L cada sendo que cada uma é tratada de forma distinta:

- Uma das amostras é carregada no gel diretamente;
- Para a outra amostra foi calculada a razão (x) entre as DOs das amostras recolhidas de cada balão através da Equação 3.2.

$$x = \frac{DO_{\text{Depois IPTG}}}{DO_{\text{Antes IPTG}}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Assim, para o balão 2 obteve-se uma razão de 1.484 e para o balão 3, de 1.489. Esta razão é multiplicada pelo volume de amostra (50 µL) sendo que esse resultado corresponde à quantidade total de dH<sub>2</sub>O que deve ser adicionada ao *pellet*, das amostras recolhidas após a adição de IPTG, além dos 50 µL, de modo a que as amostras recolhidas antes e depois do IPTG apresentem a mesma concentração de células. Este facto permite ter uma melhor noção acerca da variação da expressão após a adição de IPTG (Figura 3.4).



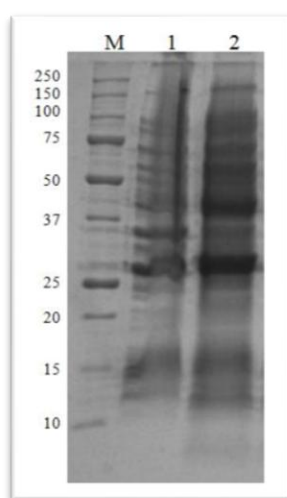
**Figura 3.4** Gel de avaliação da expressão da PRDX4: M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1-Amostra recolhida antes da adição de IPTG do *erlenmeyer 2*; 2- Amostra recolhida antes a adição de IPTG do *erlenmeyer 3*; 3- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer 2* ressuspendida em 100 µL de dH<sub>2</sub>O; 4- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer 3* ressuspendida em 100 µL de dH<sub>2</sub>O; 5- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer 2* ressuspendida em 100 µL + 24.2 µL de dH<sub>2</sub>O; 6- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer 3* ressuspendida em 100 µL + 24.9 µL de dH<sub>2</sub>O.

A banda de 25 kDa do marcador é utilizada como referência sendo possível verificar que existe uma banda mais evidente que corresponde à PRDX4 (PM ~31 kDa) e que é a proteína mais expressa na cultura. As variações na expressão entre as amostras recolhidas antes e depois da adição de IPTG não são visíveis e, se considerarmos que os

poços 2 e 3 e 6 e 7 apresentam a mesma concentração pode concluir-se que não é visível sobreexpressão.

Com base nos resultados pode concluir-se que o manuseamento das amostras com base na razão entre as DO das amostras recolhidas antes e depois da adição de IPTG não gera resultados diferentes relativamente ao protocolo normal pelo que o método selecionado é indiferente.

As amostras referentes às frações solúvel e insolúvel após rutura celular foram carregadas num gel em separado (Figura 3.5).



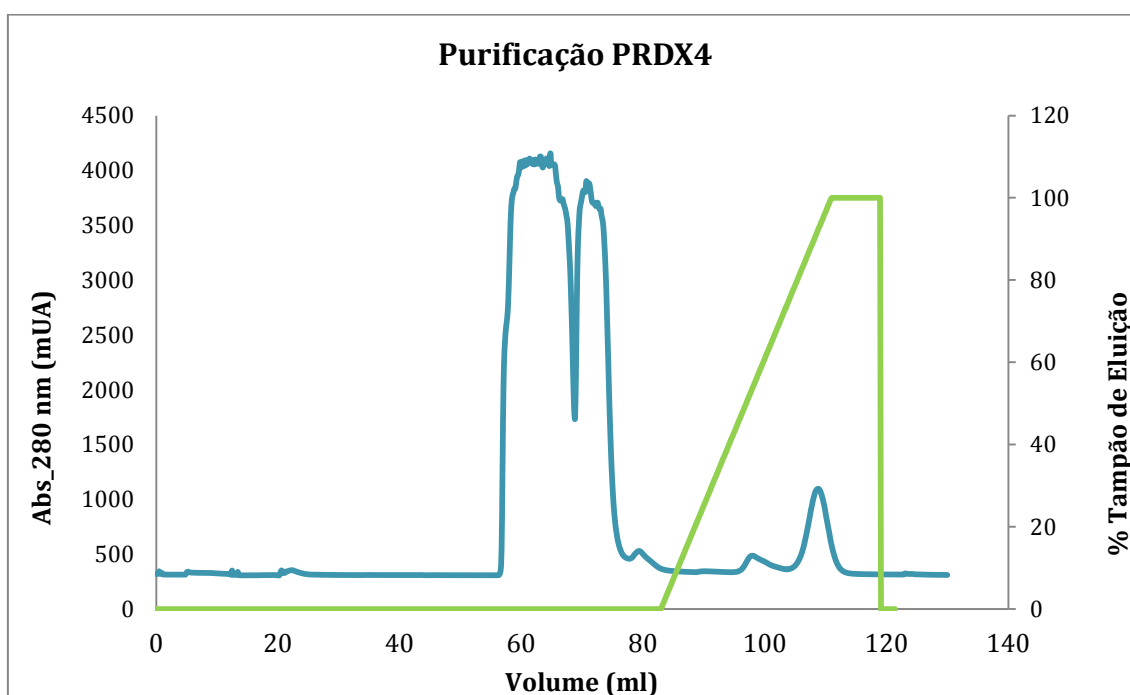
**Figura 3.5** Gel de avaliação das frações solúvel e insolúvel da PRDX4: M-Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1- *Pellet* recolhido no final da lise celular; 2- Sobrenadante recolhido no final da lise celular.

A fração insolúvel que corresponde ao *pellet* obtido após rutura celular não apresenta boa resolução e é visível algum arraste das bandas, o que pode ser justificado devido à elevada concentração.

Tal como no gel de avaliação da expressão, é visível, em ambas as amostras, a presença da mesma banda correspondente ao peso molecular da PRDX4. Na fração insolúvel, é possível verificar a presença da banda da PRDX4 o que significa que uma parte da proteína permaneceu na fase insolúvel sob a forma de corpos de inclusão. A amostra do sobrenadante, ou fração solúvel, apresenta várias bandas. No entanto, a banda mais intensa corresponde à PRDX4 mostrando que grande parte da proteína está solúvel.

### 3.2.4 Purificação

No cromatograma apresentado no Gráfico 3.6 é visível uma descida acentuada da absorvância a 280 nm no *flow-through* antes de se iniciar o gradiente de eluição que pode ser devida à passagem de uma bolha de ar na coluna. Após ter sido iniciado o gradiente ocorrem dois picos, sendo que o primeiro foi pequeno e praticamente desprezável. Apesar disso, ambos os picos foram recolhidos em separado para posterior avaliação em gel SDS-PAGE.

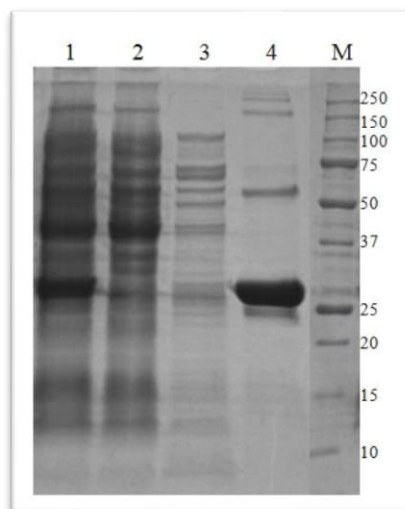


**Gráfico 3.6** Cromatograma da Purificação da PRDX4 obtido no equipamento FPLC-ÅKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Verde).

### 3.2.5 Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford

É visível que a proteína ficou maioritariamente presente no segundo pico onde, no entanto, surge uma pequena banda de outra proteína mas que não é considerada significativa (Figura 3.6). É possível verificar comparando a amostra antes da purificação e do *flow-through* a banda referente à PRDX4 é inexistente neste ultimo mostrando que a proteína ficou retida na coluna. No *flow-through* aparecem algumas bandas que são relativas a outras proteínas presentes na amostra. Na amostra do pico 1

encontram-se algumas bandas de proteínas mas presentes em baixa concentração. Pode concluir-se que a purificação foi eficaz.



**Figura 3.6** Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da PRDX4; 1- Amostra recolhida antes do processo de purificação; 2-Amostra do *flow-through*; 3-Amostra do pico 1; 4-Amostra do pico 2; M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*;

Na quantificação da PRDX4 pelo método de Bradford obteve-se uma concentração de aproximadamente 1.8 mg/ml que equivale a 59  $\mu$ M.

### 3.3 *Ubiquitin-Like Protein Protease (ULP)*

#### 3.3.1 Crescimento do Pré-inóculo

No caso da ULP foram utilizados apenas dois balões para o pré-inóculo, um deles com um volume útil de 50 mL e outro com 100 mL. Para esta proteína o antibiótico utilizado quer nas placas de LB/agar quer no pré-inóculo e cultura foi a Canamicina (Kan) (50 $\mu$ g/ml). Na tabela 3.6 são apresentados os valores de DO obtidos no pré-inóculo da ULP após incubação O/N.

**Tabela 3.6** Valores de DO obtidos para os pré-inóculos da ULP

<i>Erlenmeyer</i>	DO (600 nm)
1	2.358
2	2.312

### 3.3.2 Propagação de Inóculos e Crescimento

Através da equação 3.1 foram calculados os volumes de pré-inóculo necessários para que o crescimento do inóculo fosse iniciado com DO=0.1.

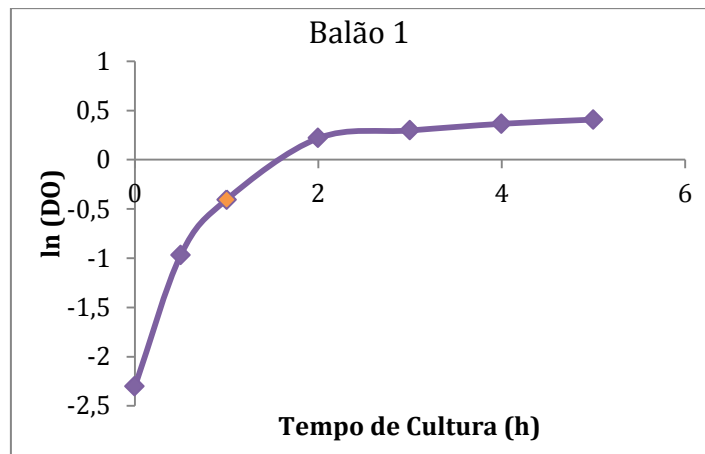
Ao fim de 1 hora de cultura do inóculo foi induzida a expressão da proteína. A tabela 3.7 apresenta os valores da DO obtidos ao longo do crescimento do inóculo, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a azul.

**Tabela 3.7** Monotorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 4. A caixa a preto representa o momento da adição de IPTG.

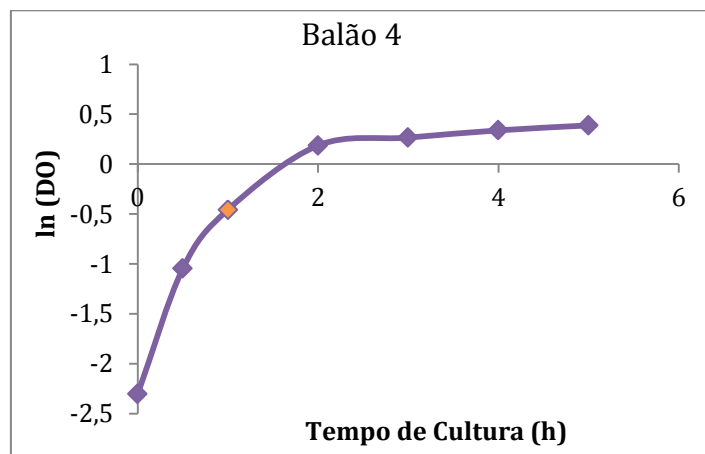
Amostra	Tempo(h)	DO (600nm) (1)	DO (600nm) (4)
0	0	0.1	0.1
1	0.5	0.38	0.351
2	1	0.667	0.633
3	2	1.245	1.205
4	3	1.346	1.304
5	4	1.44	1.402
6	5	1.503	1.474

Comparativamente com as produções anteriores, a indução da expressão foi realizada mais cedo e os valores de DO recolhidos são relativamente semelhantes aos da PDI.

Com os valores de DO recolhidos foi elaborada uma curva de crescimento, semi-logarítmica, em função do tempo que permite ter noção da evolução da cultura (Gráficos 3.7 e 3.8). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a laranja.



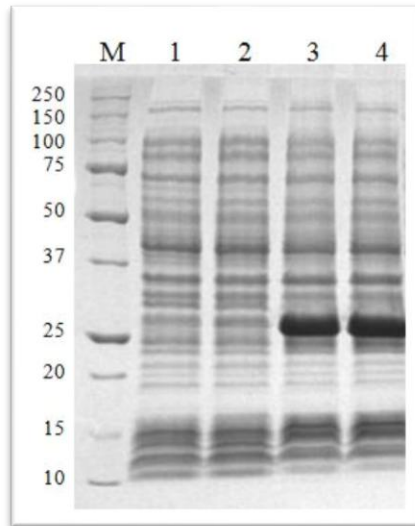
**Gráfico 3.7** Curva de crescimento da produção de ULP do balão 4. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.



**Gráfico 3.8** Curva de crescimento da produção de ULP do balão 1. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

### 3.3.3 Avaliação da Sobreexpressão

No gel de expressão da ULP (PM 26 kDa) é bastante visível a ocorrência de sobreexpressão proteica após a adição do IPTG uma vez que, tendo como referência a banda de 25 kDa do marcador surgem duas bandas, ligeiramente acima, mais evidentes comparativamente com as restantes (Figura 3.7).



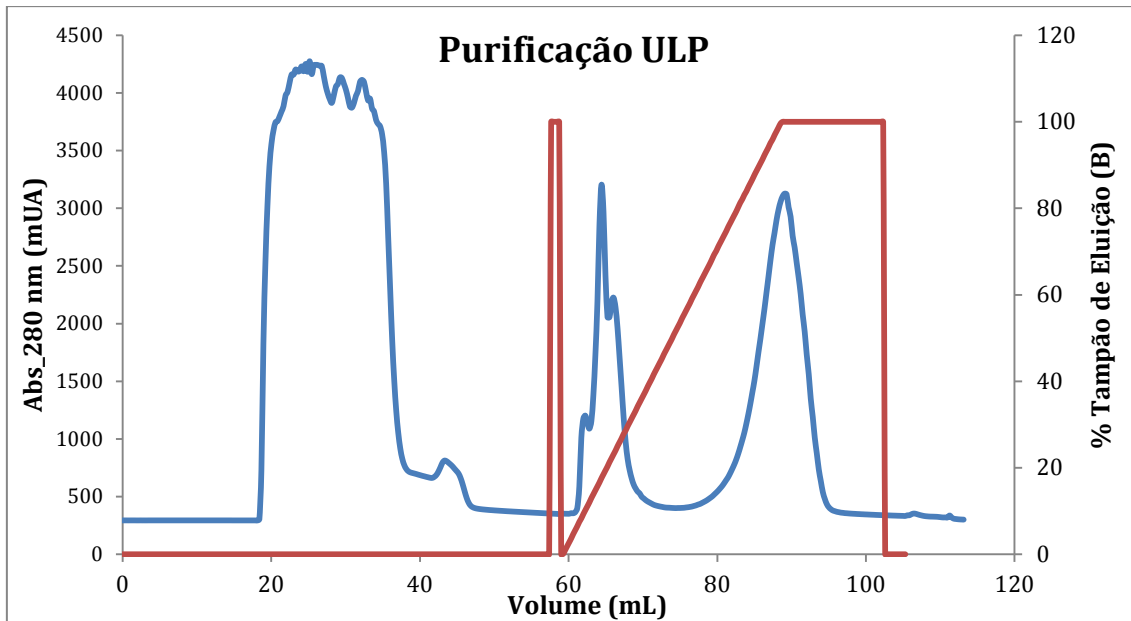
**Figura 3.7** Gel de avaliação da expressão da ULP:M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*;1-Amostra recolhida antes da adição de IPTG do *erlenmeyer 1*;2-Amostra recolhida antes a adição de IPTG do *erlenmeyer 4*;3- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer 1*;4-Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer 4*.

É de notar que se verifica sobreexpressão apenas da proteína de interesse, como esperado, já que não há outras bandas que apresentam diferenças entre as amostras recolhidas antes e depois do IPTG.

### 3.3.4 Purificação

Na purificação desta proteína ocorreu um problema com a lavagem da bomba B, responsável pelo bombeamento do tampão de eluição. Geralmente e tal como descrito no protocolo, esta lavagem é efetuada no início do processo de purificação mas caso isso não aconteça e a lavagem seja efetuada antes do início do gradiente, significa que o tampão de eluição vai ficar no sistema de tubagens. Assim, quando é iniciado o gradiente, a concentração do tampão é bastante elevada, ou até máxima. Ou seja, em vez de um gradiente, existe uma mudança brusca da concentração do tampão de eluição o que pode provocar a saída da proteína da coluna. Essa variação brusca é assinalada, no cromatograma, a vermelho para um volume de eluição de aproximadamente 60 mL e pode verificar-se que, após a ocorrência deste pulso de tampão surge um pico praticamente na fase em que é iniciado o gradiente (Gráfico 3.9).

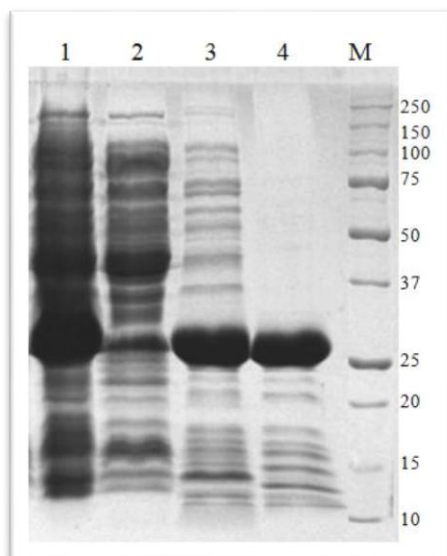
Assim, ao longo do gradiente ocorreram dois picos que podem, ou não ser referentes à mesma proteína, facto que foi mais tarde confirmado por SDS-PAGE.



**Gráfico 3.9** Cromatograma da Purificação da ULP obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Vermelho).

### 3.3.5 Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford

Como se observa no gráfico 3.9, comparando a amostra antes da purificação e a do *flow-through* é visível que a banda referente à ULP não se encontra presente nesta última, indicando que a proteína ficou retida na coluna cromatográfica. As amostras dos dois picos observados durante o gradiente de eluição revelam a presença da ULP. O gel SDS-PAGE confirma esse facto visto que as duas bandas correspondem ao peso molecular da ULP podendo concluir-se que, apesar do problema que ocorreu, a purificação foi eficiente.



**Figura 3.8** Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da ULP;1-Amostra recolhida antes do processo de purificação;2-Amostra do *flow-through*;3-Amostra do pico 1;4-Amostra do pico 2;M-Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*;

Na quantificação da ULP obteve-se uma concentração de aproximadamente 4 mg/ml que equivale a uma concentração molar de aproximadamente 150  $\mu$ M. Em geral, os dois picos deveriam ter sido quantificados em separado e só depois, consoante a concentração obtida é que se tomaria a decisão de os juntar ou não. No entanto, os picos foram misturados antes da quantificação o que poderá ter provocado uma diminuição da concentração.

### 3.4 *Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1 (Ero1)*

#### 3.4.1 Crescimento do Pré-inóculo

No caso da Ero1, a cultura foi realizada de maneira diferente relativamente às restantes proteínas. Assim, o pré-inóculo foi incubado durante o dia a 37°C e o crescimento do inóculo decorreu durante a noite a 16°C, após indução com IPTG. Na tabela 3.8 são apresentados os valores de DO do pré-inóculo da Ero1 após incubação durante o dia.

**Tabela 3.8** Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da Ero1

<i>Erlenmeyer</i>	DO (600 nm)
1	2.157
2	2.150
3	2.135

### 3.4.2 Propagação de Inóculos e Crescimento

O processo de produção da Ero1 diferiu das restantes proteínas uma vez que o pré-inóculo foi incubado durante o dia e a cultura do inóculo decorreu durante a noite a uma temperatura de 16°C. No entanto, esta temperatura não chegou a ser atingida devido à agitação da orbital e à própria temperatura da sala onde esta se encontra. Este facto poderá, eventualmente, ter aumentado a percentagem de proteína que formou corpos de inclusão uma vez que a temperatura, neste caso, é mais reduzida relativamente às restantes culturas com o objetivo de diminuir a quantidade de proteína que permanece na fração insolúvel, sob a forma de corpos de inclusão. O tempo de expressão desta proteína é superior às restantes devido ao facto de se ter utilizado uma temperatura inferior e as recolhas das amostras são mais espaçadas.

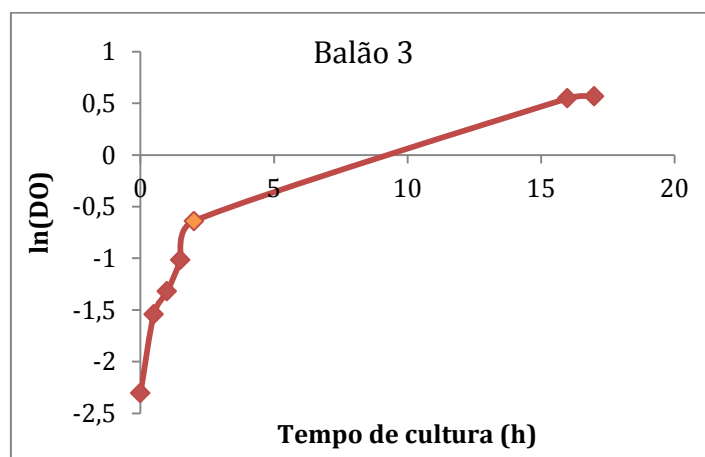
Através da equação 3.1 foram calculados os volumes de pré-inóculo necessários para que o crescimento do inóculo fosse iniciado com DO=0.1.

Ao fim de 2 horas de cultura foi induzida a expressão da proteína. A tabela 3.9 apresenta os valores da DO obtidos ao longo do crescimento do inóculo, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a azul.

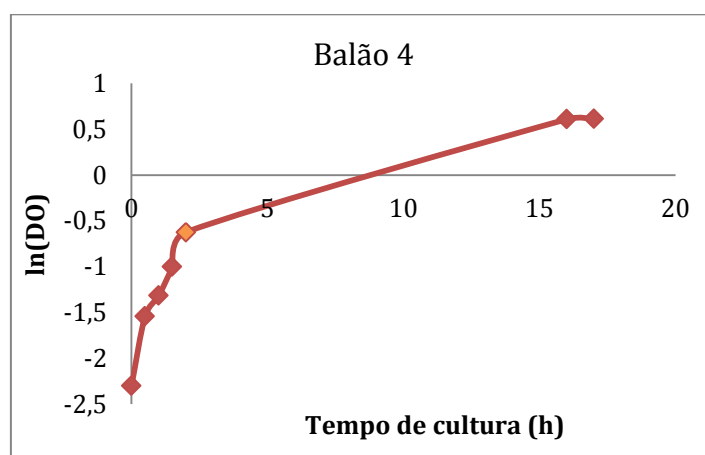
**Tabela 3.9** Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 3 e 4. A caixa a preto representa o momento da adição de IPTG.

Amostra	Tempo(h)	DO (600nm) (3)	DO (600nm) (4)
0	0	0.1	0.1
1	0.5	0.214	0.214
2	1	0.267	0.268
3	1.5	0.362	0.367
4	2	0.528	0.536
5	16	1.729	1.838
6	17	1.762	1.841

Com os valores de DO recolhidos foi elaborada uma curva de crescimento, semi-logarítmica, em função do tempo que permite ter noção da evolução da cultura (Gráficos 3.10 e 3.11). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a laranja.



**Gráfico 3.10** Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 3. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

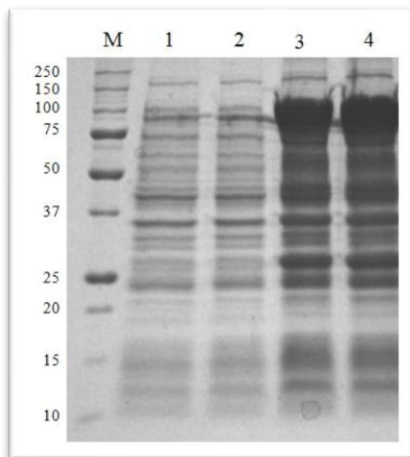


**Gráfico 3.11** Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 4. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

### 3.4.3 Avaliação da Sobreexpressão

Esta proteína é produzida conjugada com a GST (Glutathione S-Transferase) e quando é realizado o gel SDS-PAGE para a avaliação da expressão proteica não é esperada a ocorrência de bandas com o peso molecular da Ero1 (~55 kDa) mas sim o aparecimento de bandas correspondentes ao peso molecular das duas proteínas em

conjunto (55 kDa + 26 kDa). Além das duas proteínas existe, ainda uma sequência de ligação (*linker*) que une as duas proteínas pelo que a banda esperada deve apresentar um peso molecular de aproximadamente 90 kDa (Figura 3.9).

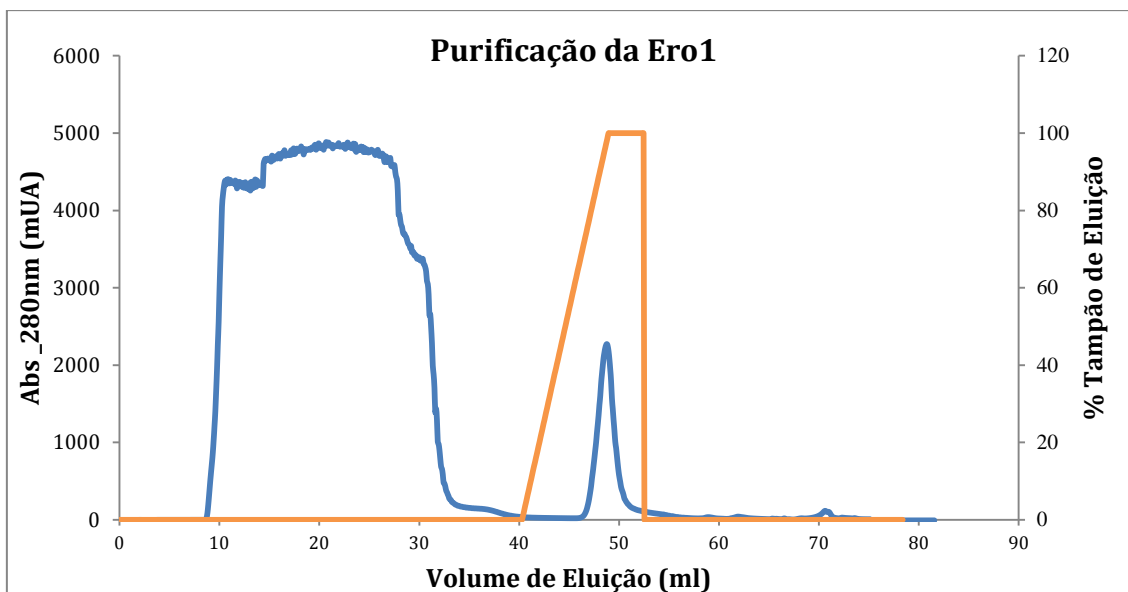


**Figura 3.9** Gel de avaliação da expressão da Ero1:M-Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1-Amostra recolhida antes da adição de IPTG do *erlenmeyer* 3; 2-Amostra recolhida antes a adição de IPTG do *erlenmeyer* 4; 3-Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer* 3; 4-Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer* 4.

É bastante visível que, entre as bandas de referência do marcador de 75 kDa e 100 kDa existe uma banda cuja intensidade aumenta muito depois da adição de IPTG. Como tal, pode afirmar-se de que se trata do conjunto da GST e Ero1.

#### 3.4.4 Purificação a fusão GST-Ero1

A purificação do conjunto GST- Ero1 decorreu como previsto e após o início do gradiente de eluição ocorreu apenas um pico (Gráfico 3.12). Relativamente aos cromatogramas anteriores os pontos da DO iniciam-se no zero uma vez que antes da injeção da amostra foi criada uma linha de base (Função auto-zero descrita no protocolo).



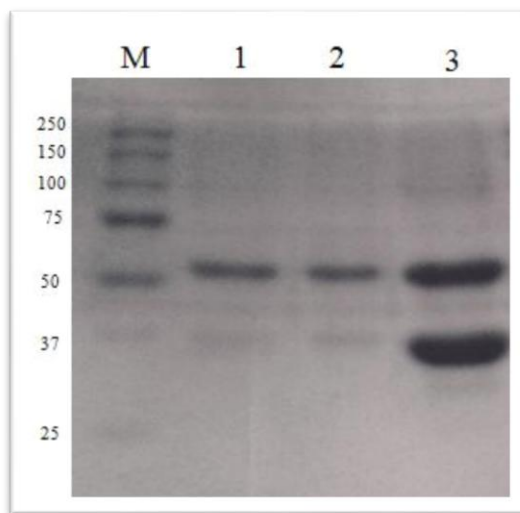
**Gráfico 3.12** Cromatograma da Purificação da Ero1 obtido no equipamento FPLC-ÅKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Laranja).

### 3.4.5 Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford

#### 3.4.5.1 Corte da fusão GST- Ero1 e purificação da Ero1

Com o objetivo de estudar o *refolding* oxidativo foi necessário obter a Ero1 pura, sem a GST ligada. Como descrito no protocolo foram efetuadas 3 reações em volumes reduzidos e com diferentes concentrações de ULP, enzima responsável pelo corte. A eficiência do corte foi verificada num gel SDS-PAGE (dados não apresentados). Após o corte, seria esperado a ocorrência de 3 bandas no gel: Ero1 isolada (55 kDa), GST (26 kDa) e ULP (26 kDa) que dão origem apenas a uma banda e Ero1+GST (90 kDa) que só se observa caso o corte não seja 100% eficaz. Foi selecionada, como ótima, a reação em que a ULP deve ser diluída de 1:100 relativamente ao volume da solução de Ero1. Para separar a Ero1 da GST e da ULP foi feita uma purificação no AKTA utilizando novamente a coluna pré-empacotada GSTrap. Nesta segunda coluna espera-se que a Ero1 saia no *flow-through* e a GST juntamente com o *linker* de reconhecimento para a ULP saiam no gradiente de eluição.

Verifica-se no gel da figura 3.10 que o corte foi eficiente e que parte da Ero1 saiu através do *flow-through* mas, no pico eluído com glutatona é visível que ao contrário do esperado, uma percentagem da Ero1 ficou retida na coluna.



**Figura 3.10** Gel SDS-PAGE para avaliar a eficiência do corte Ero1/GST. M-Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1- Amostra 1 do *flow-through*; 2- Amostra 2 do *flow-through*; 3- Amostra do Pico.

Após a produção da Ero1 foi realizada a quantificação, pelo mesmo método usado nas restantes proteínas e obteve-se uma concentração de 0.5 mg/ml o que equivale a 10  $\mu$ M. Esta concentração é baixa para se utilizar no ensaio de *refolding* oxidativo uma vez que a Ero1 é utilizada numa concentração de 5  $\mu$ M. Assim, foi necessário proceder à concentração da proteína através da utilização de um *Centricon*. Foi possível aumentar a concentração da Ero1 para cerca de 30  $\mu$ M.

## 3.5 *Peroxiredoxin II (PRDX2)*

### 3.5.1 Crescimento do Pré-inóculo

A PRDX2 foi produzida em menores quantidades relativamente às restantes proteínas. O pré-inóculo foi incubado em dois balões com 50 mL de volume útil. Na tabela 3.10 são apresentados os valores de DO do pré-inóculo da PRDX2 após incubação O/N a 37°C.

**Tabela 3.10** Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PRDX2

<i>Erlenmeyer</i>	DO (600 nm)
1	2.466
2	2.520

### 3.5.2 Propagação de Inóculos e Crescimento

Tal como referido anteriormente, a cultura desta proteína foi feita em apenas 2 *erlenmeyers* com um volume útil de 500 mL.

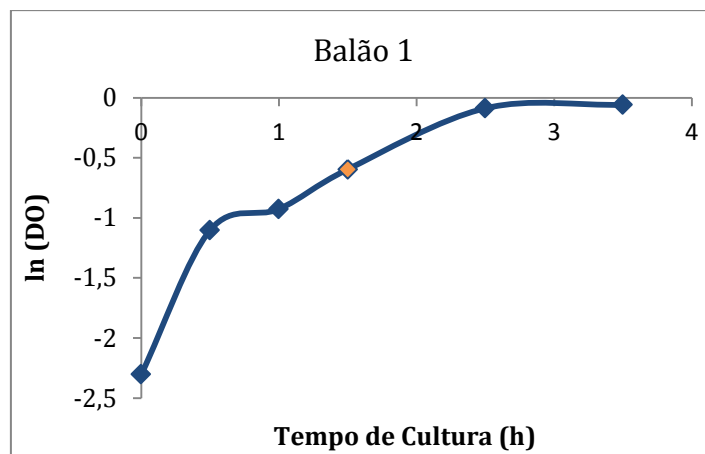
Através da equação 3.1 foram calculados os volumes de pré-inóculo necessários para que a cultura fosse iniciada com DO=0.1.

A indução foi feita após 1.5 horas de cultura. A tabela 3.11 apresenta os valores da DO obtidos ao longo da cultura, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a azul.

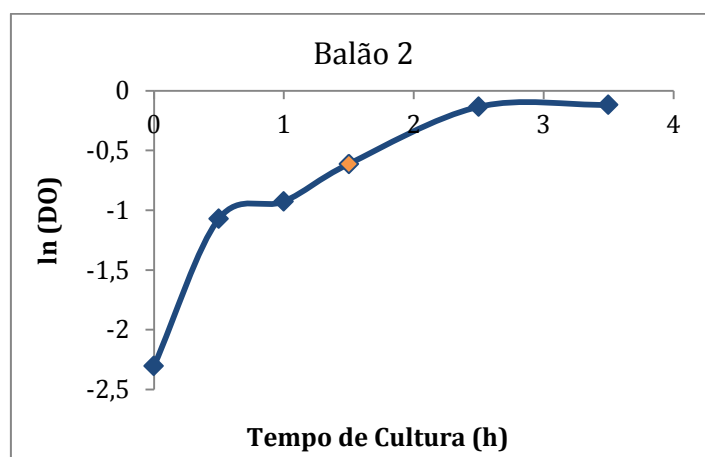
**Tabela 3.11** Monotorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 2. A caixa a preto representa o momento da adição de IPTG.

Amostra	Tempo (h)	DO (600nm) (1)	DO (600nm) (2)
0	0	0.1	0.1
1	0.5	0.332	0.343
2	1	0.396	0.396
3	1.5	0.551	0.542
4	2.5	0.916	0.874
5	3.5	0.943	0.888

Com os valores de DO recolhidos foi elaborada uma curva de crescimento, semi-logarítmica, em função do tempo que permite ter noção da evolução da cultura (Gráficos 3.13 e 3.14). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a laranja.



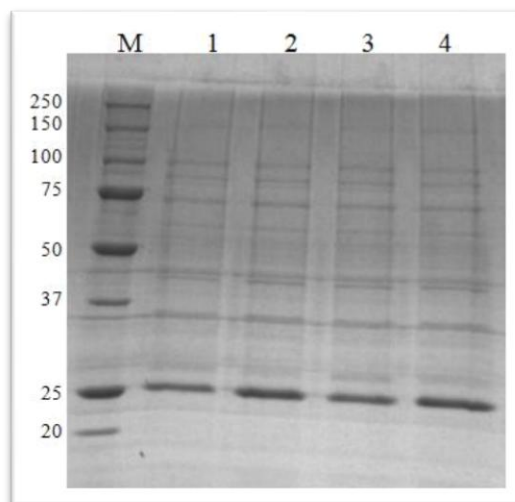
**Gráfico 3.13** Curva de crescimento da produção de PRDX2 do balão 1. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.



**Gráfico 3.14** Curva de crescimento da produção de PRDX2 do balão 2. O ponto assinalado a laranja corresponde à altura da indução com IPTG.

### 3.5.3 Avaliação da Sobreexpressão

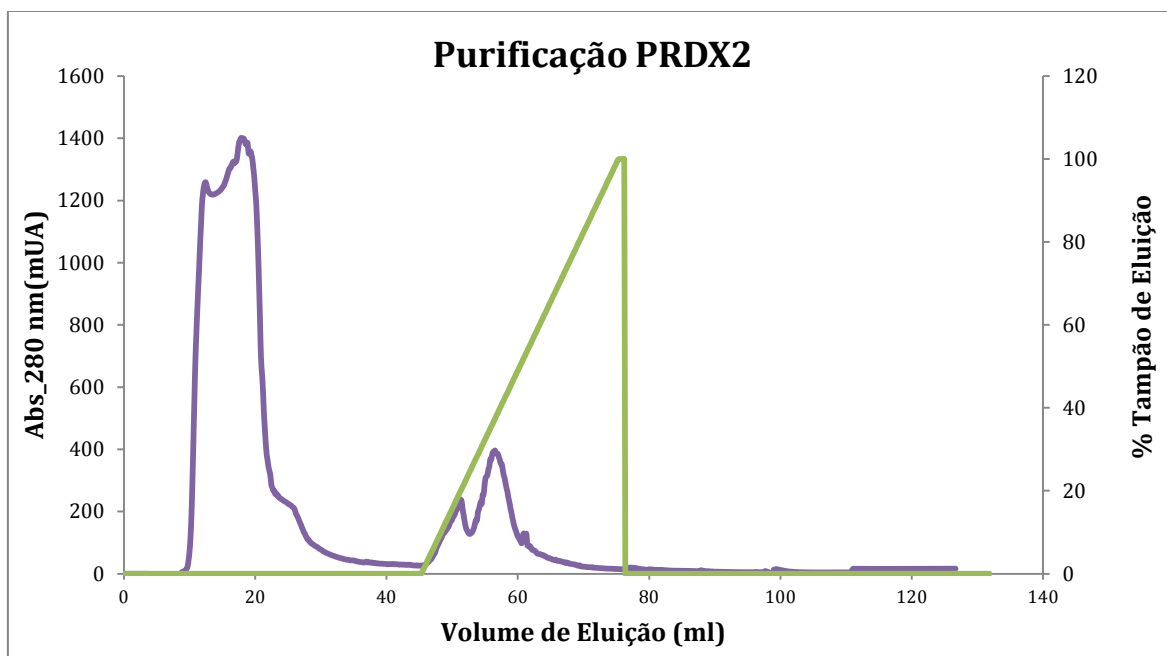
Tal como no segundo gel apresentado no ponto 3.1.3, a quantidade de proteína carregada no gel é relativamente baixa mas, apesar disso, é visível alguma sobreexpressão da proteína nas amostras após a adição do IPTG. Apesar da proteína apresentar um PM de 24 kDa, quando corrida num gel SDS-PAGE sobre condições redutoras, esta surge numa banda de cerca de 27 kDa (Figura 3.11).



**Figura 3.11** Gel de avaliação da expressão da PRDX2: M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1- Amostra recolhida antes da adição de IPTG do *erlenmeyer* 1; 2- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer*; 3- Amostra recolhida antes a adição de IPTG do *erlenmeyer* 2; 4- Amostra recolhida após a adição de IPTG do *erlenmeyer* 2

### 3.5.4 Purificação

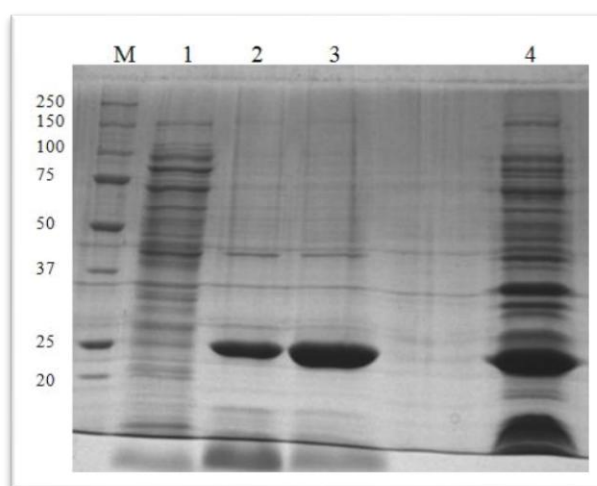
Após o início do gradiente surgem dois picos mal resolvidos cuja identidade foi posteriormente verificada por SDS-PAGE. (Gráfico 3.15).



**Gráfico 3.15** Cromatograma da Purificação da PRDX2 obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Roxo) e percentagem (%) do Tampão de Eluição (B) no sistema (Verde).

### 3.5.5 Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford

A amostra relativa ao sobrenadante antes da purificação não foi recolhida pelo que não é possível ter uma noção acerca da diferença entre os componentes totais da amostra e aqueles que saíram no *flow-through*. No entanto, é visível na figura 3.12 que ambos os picos obtidos apresentam a proteína sem contaminações significativas. Na amostra do *pellet* nota-se a presença da PRDX2 pelo que se pode concluir que uma parte da proteína permaneceu na fração insolúvel sob a forma de corpos de inclusão. Pode mais uma vez concluir-se que a purificação foi eficaz.



**Figura 3.12** Gel SDS-PAGE de avaliação da eficiência da Purificação da PRDX2: M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; 1- Amostra do *Flow-through*; 2- Amostra do pico 1; 3- Amostra do pico 2; 4- Amostra do *pellet* antes da purificação

Na quantificação da PRDX2 os dois picos foram quantificados em separado pelo que o pico 1 apresenta uma concentração de 0.6 mg/ml que equivale a 24  $\mu$ M e o pico 2 cerca de 1.2 mg/ml que corresponde a 46  $\mu$ M. Uma vez que estes valores são algo díspares foi utilizado apenas a proteína do pico 2 nos ensaios.

### 3.6 Estudo do *Refolding* Oxidativo

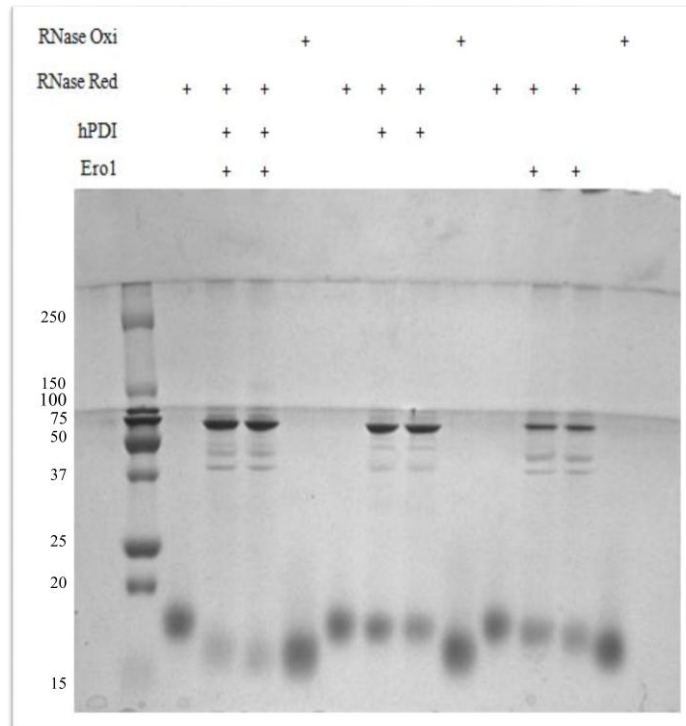
Foram realizados vários ensaios para estudar, *in vitro*, o *refolding* oxidativo da RNase catalisado pelas vias enzimáticas que operam no reticulo endoplasmático. Esta

proteína modelo apresenta um peso molecular de 13.7 kDa e 4 pontes dissulfureto. A mobilidade eletroforética da proteína pode variar com a redução das pontes dissulfureto internas. Esta variação surge como uma variação aparente de massa de 2 a 4 kDa no gel ou, se a quebra de pontes for incompleta como uma banda dupla com diferença de massa aparente de 2-4 kDa [38]. Ou seja, a proteína no seu estado oxidado apresenta maior mobilidade uma vez que está mais compactada estruturalmente enquanto que a proteína reduzida apresenta uma estrutura mais estendida devido a ausência das pontes dissulfureto e, como tal, tem mobilidade mais limitada. É então esperado que, ao longo da reação de *refolding* oxidativo a proteína adquira gradualmente mais mobilidade no gel e, como tal, seja visível uma descida das bandas ao longo do tempo.

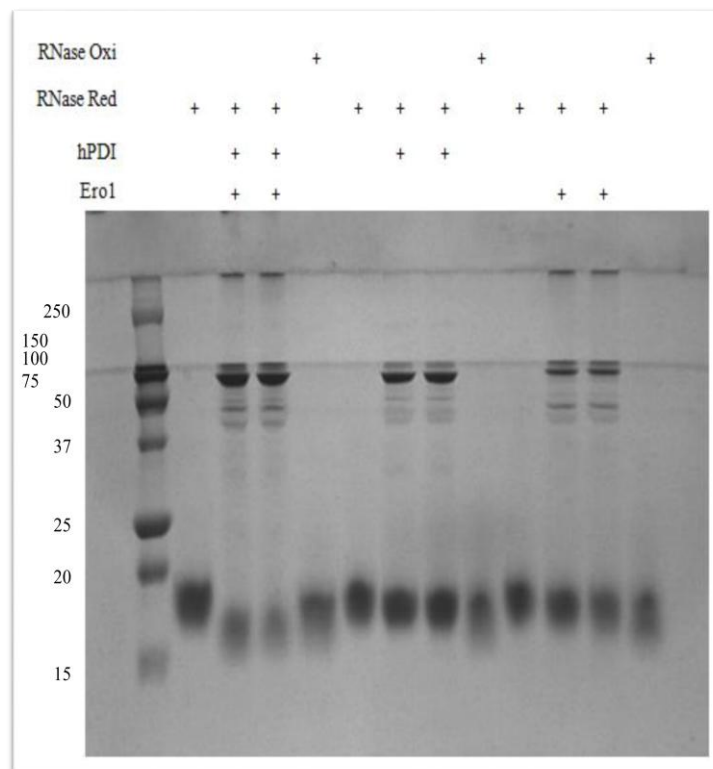
Numa primeira fase os géis relativos a cada via foram realizados em separado mas, mais tarde, foi feita uma tentativa de correr todos os géis em simultâneo. Este facto permitiu concluir que os géis devem ser corridos separadamente, ou seja, um gel por cada tina e que, para não ocorrer um aquecimento elevado, as tinas devem estar em gelo.

### **3.6.1 Via da PDI/Ero1**

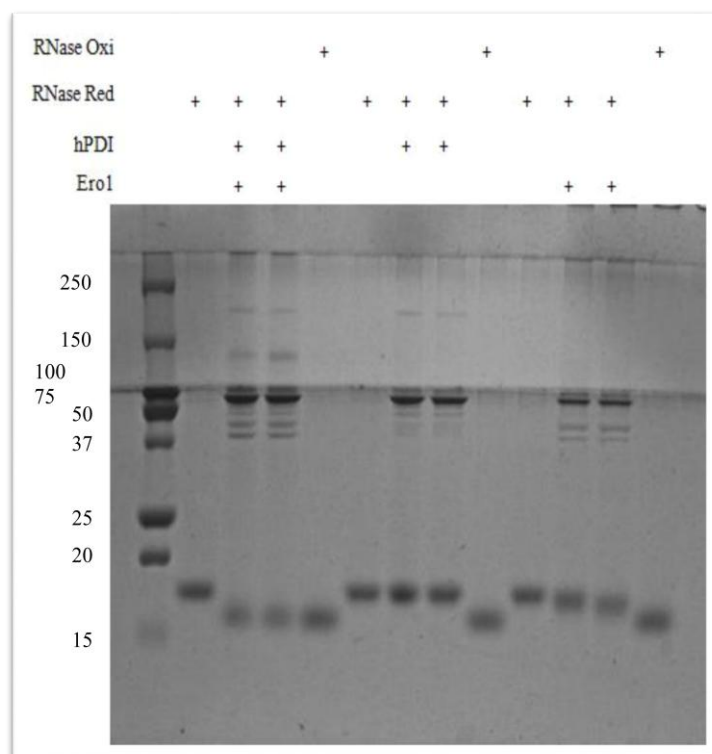
O estudo desta via (Figuras 3.13, 3.14 e 3.15) requer apenas a realização de um gel visto que, para além da reação principal, são feitos apenas dois controlos (sem Ero1 e sem PDI). Assim, este ensaio foi sempre realizado isoladamente dos restantes e foi o que gerou resultados mais claros.



**Figura 3.13** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/Ero1: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e Ero1 (5 $\mu$ M) e controlos sem Ero1 e sem PDI; Amostras reacionais recolhidas após 20 e 40 minutos de reação; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.



**Figura 3.14** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/Ero1: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e Ero1 (5 $\mu$ M) e controlos sem Ero1 e sem PDI; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.



**Figura 3.15** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/Ero1: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e Ero1 (5 $\mu$ M) e controlos sem Ero1 e sem PDI; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

O gel da figura 3.13, realizado numa fase inicial do trabalho, apesar de revelar *refolding* para a reação na presença da PDI e da Ero1, apresenta algum arrastamento das bandas possivelmente devido ao facto da corrida não ter sido realizada em gelo. Nas amostras relativas à reação não é totalmente perceptível que a amostra recolhida após 40 minutos de reação se encontra mais oxidada relativamente à amostra recolhida após 20 minutos de reação. Além disso, as amostras dos controlos com RNase reduzida e oxidada não apresentam boa resolução o que complica a comparação entre os estados reduzido e oxidado. Outro fator que faz com que este resultado não seja claro é um tempo da corrida do gel insuficiente o que também conduz a que as diferenças não sejam tão nítidas.

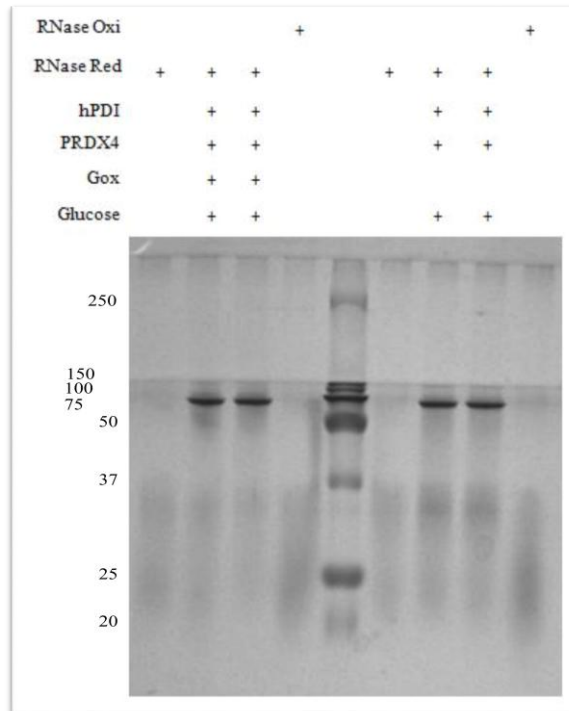
O gel da figura 3.14 mostra, com mais clareza, a eficiência de *refolding* oxidativo pela via PDI/Ero1, apesar de ainda se notar alguma indefinição nas bandas. O *refolding* é claramente visível visto que as bandas referentes aos dois tempos da reação apresentam diferenças de mobilidade no gel, ficando a banda da amostra recolhida após 40 minutos praticamente ao nível da banda do controlo com RNase oxidada. As

amostras recolhidas da reação que decorreu na ausência da Ero1 revelam que não ocorre *refolding* nestas condições ressaltando a importância da Ero1 neste processo. As bandas referentes às amostras da reação que decorreu sem PDI mostram a existência de algum *refolding* mas significativamente mais lento do que a reação com as duas proteínas. Este resultado não era esperado, e pode ser devido ao facto da Ero1 poder, eventualmente, ser reduzida não cataliticamente pela RNase e reduzir algum oxigénio molecular a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O peróxido de hidrogénio produzido é oxidante e pode oxidar quimicamente a RNase.

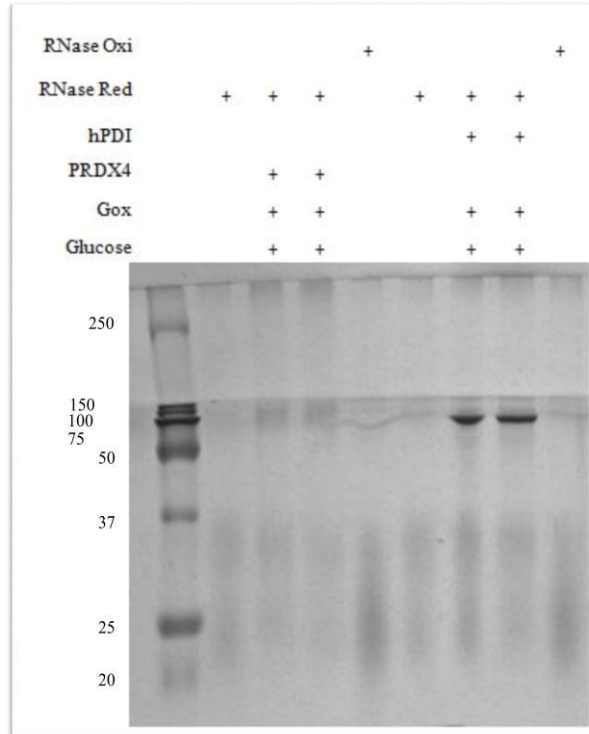
O gel da figura 3.15 constitui o melhor resultado obtido para o estudo desta via. As bandas obtidas são bastante nítidas e não ocorre qualquer arrastamento das amostras. O *refolding* das amostras da reação é completamente visível e conclui-se que após 20 minutos de reação, o *refolding* é praticamente completo visto que a banda está no mesmo nível do que a banda do controlo com RNase oxidada. As amostras da reação na ausência de Ero1, mais uma vez, mostram que não ocorre qualquer alteração de estado da RNase concluindo assim que a PDI no estado reduzido não é capaz de oxidar a RNase. Tal como no gel apresentado na figura 3.14, pode verificar-se que nas amostras sem PDI ocorre algum *refolding* oxidativo da RNase mas significativamente mais lento do que na reação com as duas proteínas.

### 3.6.2 Via da PDI/PRDX4

Para efetuar o estudo do *refolding* oxidativo nesta via foram necessários dois géis por cada ensaio, uma vez que além da reação principal, foram feitos 3 controlos (sem Glucose Oxidase, sem PDI e sem PRDX4). Como referido anteriormente, a presença de glucose e glucose oxidase funciona como fonte de produção de peróxido de hidrogénio para atuar como aceitador final de eletrões desta via. Numa fase inicial, os dois géis foram corridos na mesma tina e nunca foram obtidos resultados conclusivos. A partir do momento em que os géis foram realizados nas condições descritas na introdução, os resultados melhoraram e permitiram obter conclusões acerca do *refolding* oxidativo da RNase com as proteínas em questão.

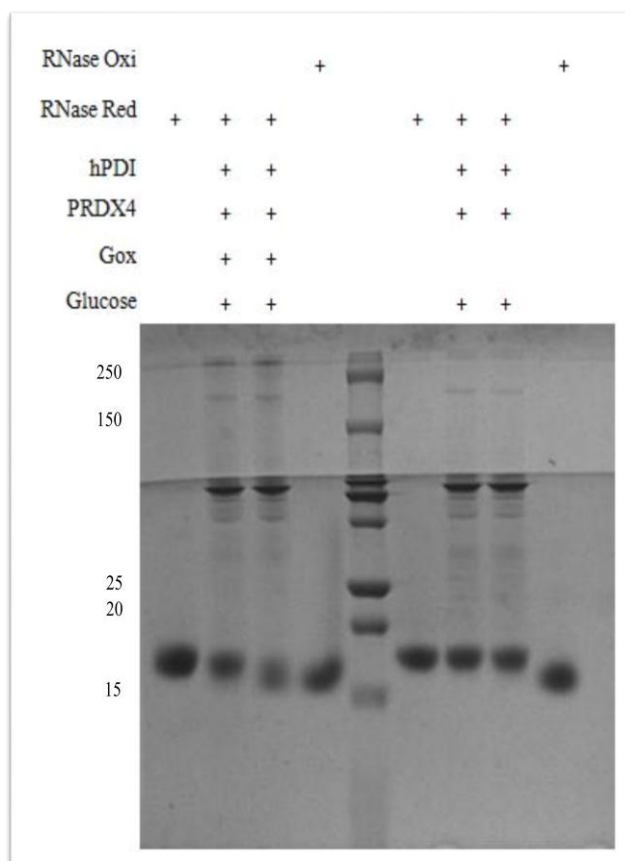


**Figura 3.16** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e PRDX4 (5 $\mu$ M) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controles sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

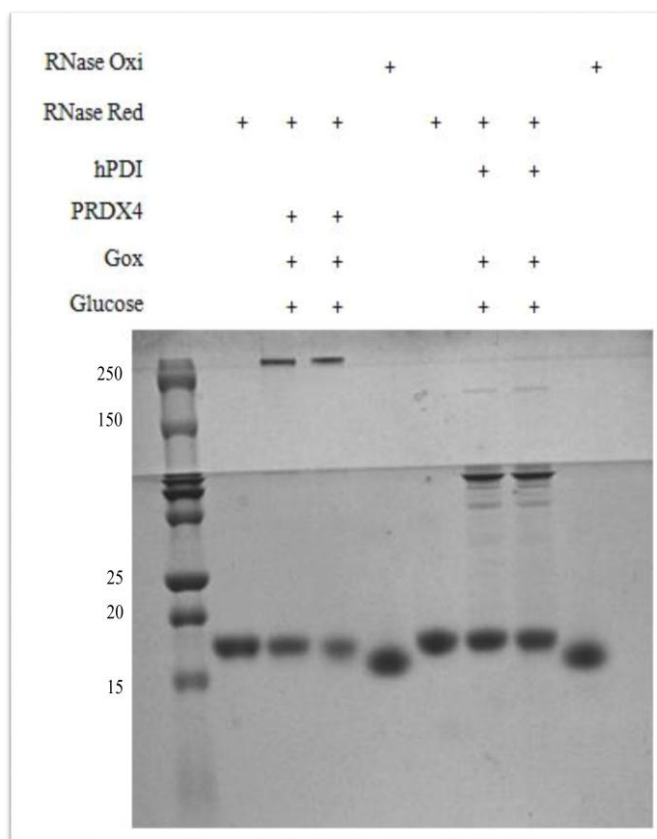


**Figura 3.17** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX4, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

As figuras 3.16 e 3.17 são relativas a um ensaio realizado sob as condições anteriores, ou seja, os dois géis foram colocados na mesma tina e esta foi mantida à temperatura ambiente, sem gelo. Os resultados obtidos não permitem concluir nada visto que não são visíveis bandas, apenas um grande arraste das mesmas.

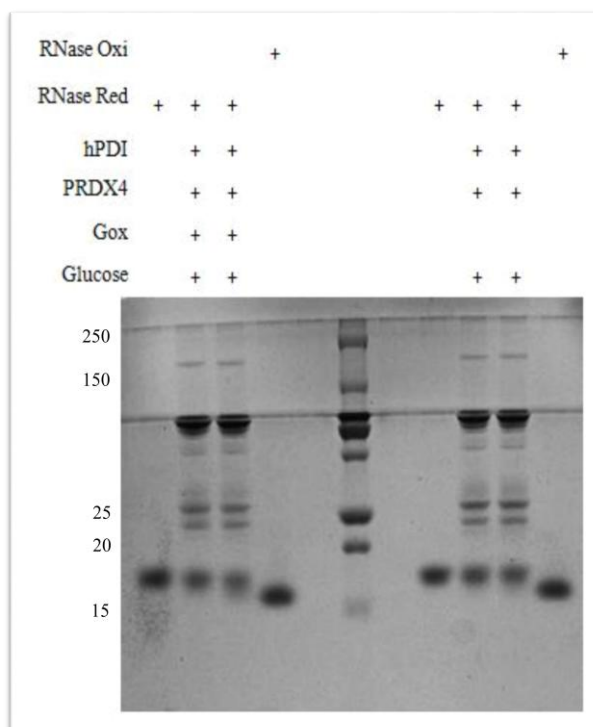


**Figura 3.18** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e PRDX4 (5 $\mu$ M) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

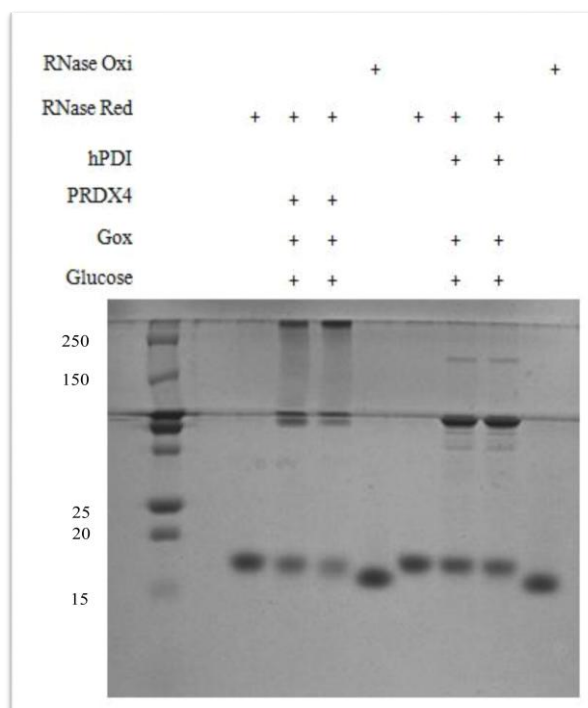


**Figura 3.19** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX4, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

As figuras 3.18 e 3.19 são referentes ao ensaio com resultados mais claros. Pode verificar-se a alteração da mobilidade das bandas dos dois tempos de reação apenas nas amostras onde estão presentes todas as proteínas. O controlo com RNase oxidada inserido junto dessas amostras apresenta um pequeno arraste que pode ter sido influenciado pela presença do marcador no poço seguinte pelo que nos ensaios posteriores foi deixado um poço de intervalo entre este e as amostras. As reações de controlo revelam que em nenhum dos casos ocorre *refolding* oxidativo o que indica que, para esta via, todas as proteínas são essenciais.



**Figura 3.20** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e PRDX4 (5 $\mu$ M) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controles sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.



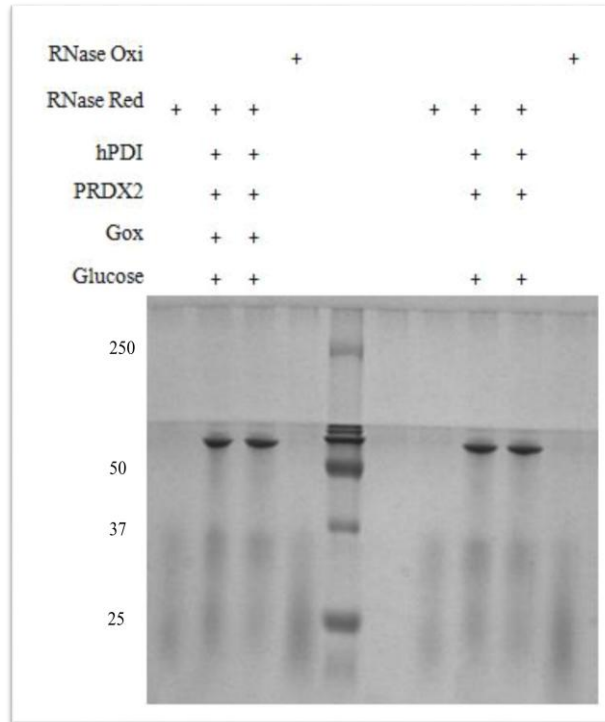
**Figura 3.21** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX4: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX4, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

As figuras 3.20 e 3.21 são referentes a um ensaio realizado no final do trabalho experimental. Apesar de ser visível algum *refolding* nas amostras em que todas as proteínas estão presentes, este parece não ser tao evidente como no ensaio mostrado anteriormente (Figuras 3.18 e 3.19). Este facto pode ser devido à PRDX4 aparentar algum tipo de contaminação uma vez que apresentava uma turbidez pouco comum. Com o objetivo de eliminar ou pelo menos atenuar este problema, a proteína foi filtrada num filtro de 0.22  $\mu\text{M}$  e passada numa coluna PD-10. Mais tarde, de modo a obter uma concentração razoável para realizar o ensaio, visto que a proteína foi diluída e ficou com uma concentração de 7  $\mu\text{M}$ , foi utilizado um *Centricon* de modo a aumentar a concentração. Assim, conseguiu obter-se uma concentração de 29  $\mu\text{M}$  mas a estabilidade e a funcionalidade da proteína poderiam estar comprometidas visto que, além do problema mencionado, esta já tinha sido produzida há cinco meses e estava armazenada a 4°C.

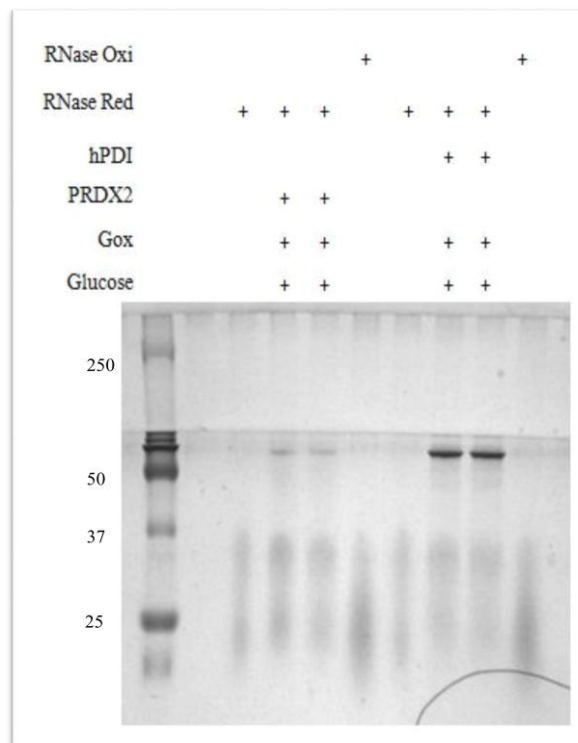
Assim sendo, este resultado menos evidente pode ter sido devido ao estado desta proteína uma vez que, como será mostrado mais à frente, num ensaio com as mesmas condições em que não é utilizada a PRDX4 mas sim a PRDX2 que foi produzida muito depois desta, os resultados obtidos são mais esclarecedores.

### **3.6.3 Via da PDI/PRDX2**

Tal como no estudo da via PDI/PRDX4, para esta via foram, igualmente, necessários dois géis por cada ensaio, uma vez que além da reação principal, foram feitos 3 controlos (sem Glucose Oxidase, sem PDI e sem PRDX2). As condições experimentais foram as mesmas relativamente à via anteriormente descrita.

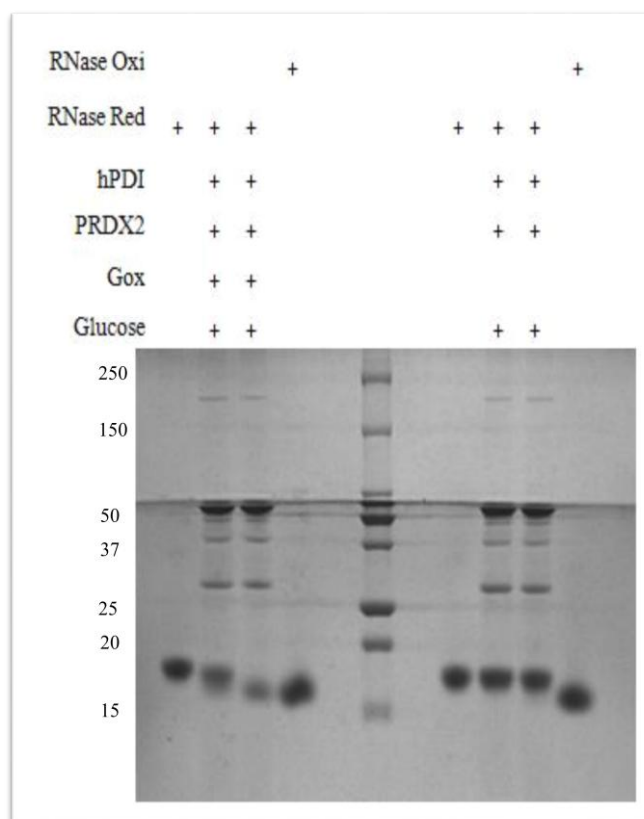


**Figura 3.22** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e PRDX2 (5 $\mu$ M) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controles sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

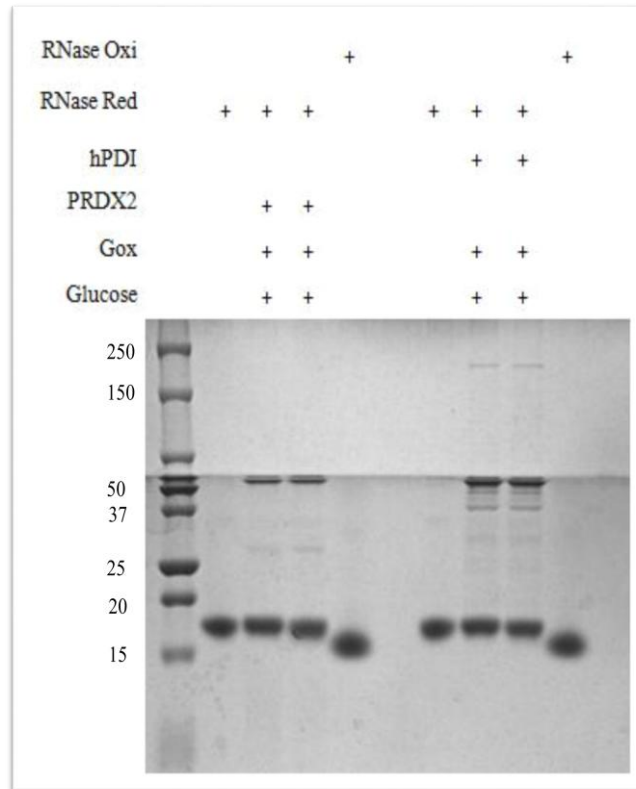


**Figura 3.23** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 1**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX2, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

As figuras 3.22 e 3.23 são relativas a um ensaio realizado sob as condições anteriores, ou seja, os dois géis foram colocados na mesma tina e esta foi mantida à temperatura ambiente. Os resultados obtidos, tal como no estudo da via da PDI/PRDX4, não permitem concluir nada visto que não são visíveis bandas, apenas um grande arraste das mesmas.

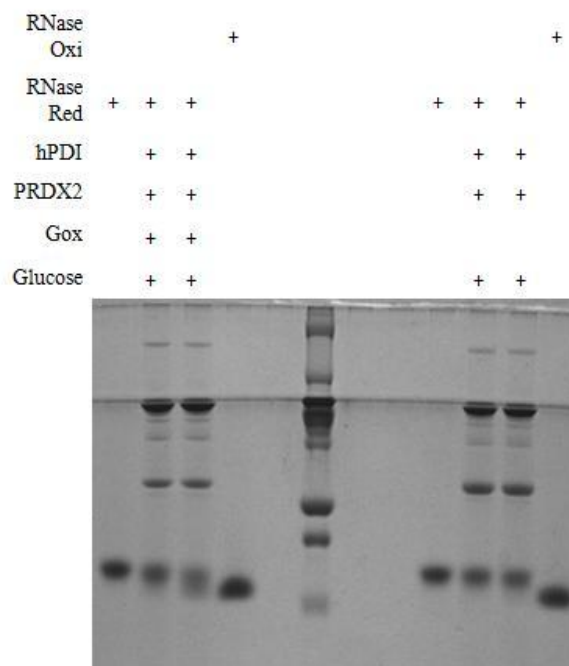


**Figura 3.24** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e PRDX2 (5 $\mu$ M) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controlos sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

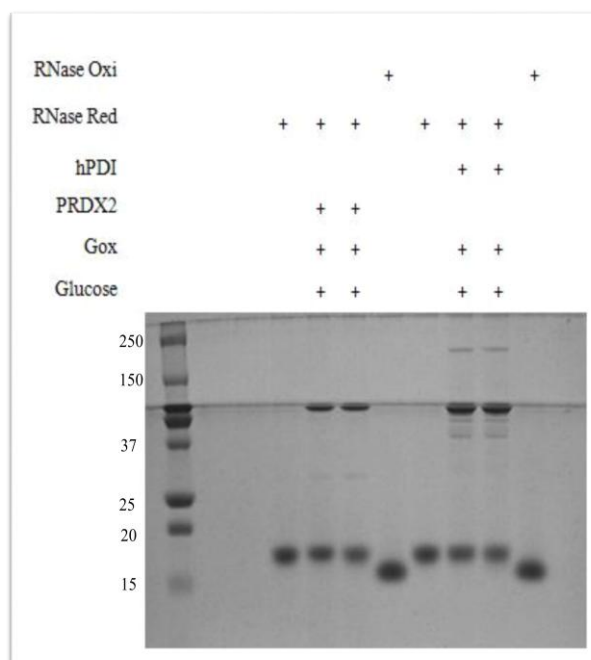


**Figura 3.25** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 2**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX2, respectivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

As figuras 3.24 e 3.25 mostram que realmente ocorre *refolding* oxidativo da RNase na presença da PRDX2 e dos restantes intervenientes. As bandas obtidas nas amostras da reação principal não apresentam grande definição e a banda dos 40 minutos de reação não é muito nítida. Apesar disso, é visível que as bandas destas amostras possuem maior mobilidade no gel estando a última banda praticamente ao mesmo nível da banda do controlo oxidado. Esta banda do controlo também não apresenta grande nitidez e surge com algum arraste o que pode querer dizer que a concentração de RNase oxidada utilizada para os controlos pode ter sido elevada. Relativamente às reações de controlo pode concluir-se que não ocorre *refolding* da RNase em nenhuma delas, como esperado.



**Figura 3.26** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida com a PDI (5 $\mu$ M) e PRDX2 (5 $\mu$ M) na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL) e controles sem Gox; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.



**Figura 3.27** Gel SDS-PAGE-Tricina da Via PDI/PRDX2: **Ensaio 3**; Coloração com Comassie após reação da RNase desnaturada e reduzida na presença de Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (10 mU/mL); Controlos sem PDI e sem PRDX2, respetivamente; Amostra de RNase nativa oxidada e reduzida para utilizar como referência.

As figuras 3.26 e 3.27 são correspondentes ao último ensaio que foi realizado na mesma fase do 3º ensaio da via da PDI/PRDX4 cujas figuras foram mostradas acima (figuras 3.20 e 3.21). É visível que ocorre algum *refolding* apesar da banda correspondente à amostra recolhida após 40 minutos de reação não estar muito nítida. Nas reações de controlo não ocorre *refolding*, tal como esperado.

## 4 CONCLUSÕES

---

O estudo das duas vias possíveis para o *Refolding* Oxidativo da RNase permitiu observar que em todos os casos ocorre oxidação da proteína em estudo e, como tal, esta readquire a sua conformação nativa, verificada pelo aumento de mobilidade no gel. Esta conformação é atingida através da formação de pontes dissulfureto anteriormente quebradas pelo DTT.

Na via da PDI/Ero1 verifica-se um *refolding* rápido, por vezes atingido logo após 20 minutos do início da reação (Ensaio 3). O estudo da via alternativa da PDI/PRDX4 permitiu concluir que ocorre *refolding* da RNase, de uma forma mais lenta relativamente à reação com a Ero1.

O estudo da via com a PRDX2, homólogo da PRDX4, teve como objetivo verificar a existência de uma possível especificidade da PRDX4 para a PDI que os restantes homólogos não apresentassem. Os resultados obtidos permitiram concluir que esta especificidade não se verifica uma vez que os ensaios com a PRDX2 revelaram a ocorrência de *refolding* da RNase indicando que ocorre, igualmente, interação entre a PDI e a PRDX2. No entanto, esta interação é apenas verificada *in vitro* uma vez que, *in vivo*, a PRDX2 está presente no citoplasma e a PDI é residente no RE.

Relativamente às velocidades de reação observa-se que a reação de *refolding* na presença da Ero1 é mais rápida do que a reação com a PRDX4. Assim, e tendo em conta que se tratam de reações em cadeia onde a velocidade desta equivale à velocidade do passo limitante pode concluir-se que a substituição da PRDX4 pela Ero1 conduz a um aumento da velocidade da reação de *refolding* permitindo assumir que o passo limitante na via alternativa envolve a PRDX4.

Na via da PDI/Ero1 verificou-se que ocorre *refolding* oxidativo da RNase na ausência da PDI que, tal como referido anteriormente, pode ser devido à capacidade da RNase reduzir não cataliticamente a Ero1. A comprovação desta hipótese é possível comparando os potenciais oxidação/redução das cisteínas da RNase e das cisteínas “*shuttle*” da Ero1.

Um fator importante a ter em conta no trabalho desenvolvido é que se tratam de proteínas e a sua estabilidade pode ser comprometida por muitos fatores, nomeadamente, as condições de armazenamento. Como tal, considerando que as proteínas produzidas para o trabalho permaneceram algum tempo à temperatura de 4°C pode assumir-se que, na fase final do trabalho, estas se encontrem degradadas e possam eventualmente afetar a eficiência do *refolding*.

## 5 PERSPETIVAS FUTURAS

---

Ao longo do trabalho desenvolvido foi estudado o *refolding* oxidativo de uma proteína substrato, a *Riboflavin Binding Protein*. Neste estudo teria sido possível verificar a ocorrência de *refolding* através da diminuição de fluorescência do ligando da proteína substrato, a Riboflavina. Apesar de termos purificado a proteína e iniciado o estudo em questão não foi possível obter resultados conclusivos no espaço de tempo deste trabalho.

Para contornar o facto mencionado acima, tencionamos fazer uma aproximação a este estudo através de uma nova proteína substrato, a *HyPer*. Esta proteína fluorescente apresenta alterações na fluorescência consoante o seu estado oxidado ou reduzido. Esta característica permite seguir em modo contínuo a formação de pontes dissulfureto através das duas vias estudadas neste trabalho [39].

Pretendemos igualmente medir a constante de especificidade de cada via, através da razão  $k_{cat}/K_M$  fazendo variar a concentração da proteína substrato, *HyPer*, permitindo assim distinguir qual é a via cataliticamente mais eficiente na oxidação de proteínas substrato.

## 6 BIBLIOGRAFIA

---

- [1] R. J. Y. Chang e S. Ventura, “Oxidative Folding: Coupling Conformational Folding and Disulfide Formation,” em *Folding of Disulfide Proteins*, London, Springer Science + Business Media, 2011.
- [2] J. D. Malhotra e R. J. Kaufman, “Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: Mechanisms and Link Disease,” em *Protein Misfolding Diseases: Current and Emerging Principles and Therapies*, New Jersey, USA, Wiley, 2010, pp. 21-30.
- [3] E. T. Powers, R. I. Morimoto, A. Dillin, J. W. Kelly e W. E. Balch, “Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency,” *Annual Review of Biochemistry*, vol. 78, pp. 959-991, 2009.
- [4] J. L. Brodsky e W. R. Skach, “Protein Folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 23, n.º Membranes and Organelles, pp. 1-12, 2011.
- [5] M. J. Feige e L. M. Hendershot, “Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis,” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 23, n.º Cell Regulation, pp. 1-9, 2010.
- [6] N. C. Mishra, *Introductuib to Proteomics: Principles and Applications*, New Jersey, USA: Wiley, 2010.
- [7] M. B. Metzger, *Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cytosol*, USA: ProQuest LLC, 2009.
- [8] A. R. Frand e C. A. Kaiser, “Ero1p Oxidizes Protein Disulfide Isomerase in a Pathway for Disulfide Bond Formation in the Endoplasmic Reticulum,” *Molecular Cell*, vol. 4, pp. 469-477, 1999.
- [9] D. P. Clark e N. J. Pazdernik, *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*, Academic Press, 2009.
- [10] J. Buchner e L. Moroder, *Oxidative Folding of Peptides and Proteins*, RSC Publishing, 2009, pp. 179-213.
- [11] S. F. Betz, “Disulfide Bonds and the Stability of Globular Proteins,” *Protein Science*, vol. 2, pp. 1551-1558, 1993.

- [12] B. P. Tu e J. S. Weissman, "Oxidative protein folding in eucaryotes: mechanisms and consequences," *The Journal of Cell Biology*, vol. 164, pp. 341-346, 2004.
- [13] G. Ren e J. C. A. Bardwell, "Engineered Pathways for Correct Disulfide Bond Oxidation," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 14, pp. 2399-2412, 2011.
- [14] J.-F. Collet, *Redox Biology*, Brussels.
- [15] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*, New York, 2002.
- [16] R. J. Y. Chang e S. Ventura, *Folding Of Disulfide Proteins*, Springer, 2011.
- [17] K. Inaba, "Structural basis of protein disulfide bond generation," *Genes to Cells*, vol. 15, pp. 935-943, 2010.
- [18] E. Zito, E. P. Melo, Y. Yang, A. Wahlander, T. A. Neubert e D. Ron, "Oxidative Protein Folding by an Endoplasmic Reticulum-Localized Peroxiredoxin," *Molecular Cell*, vol. 40, pp. 787-797, 2010.
- [19] K. W. Walker e H. F. Gilbert, "Effect of Redox Environment on the in Vitro and in Vivo Folding of RTEM-1 P-Lactamase and Escherichia coli Alkaline Phosphatase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, pp. 28487-28493, 1994.
- [20] C. Wang, S. Chen, X. Wang, L. Wang, R. B. Freedman e C.-c. Wang, "Plasticity of Human Protein Disulfide Isomerase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, pp. 26788-26797, 2010.
- [21] G. Tian, S. Xiang, R. Noiva, W. J. Lennarz e H. Schindelin, "The Crystal Structure of Yeast Protein Disulfide Isomerase Suggests Cooperativity between Its Active Sites," *Cell*, vol. 124, pp. 61-73, 2006.
- [22] R. E. Dalbey e G. Heijne, *Protein Targeting, Transport & Translocation*, London: Academic Press, 2002.
- [23] F. Hatahet e L. W. Ruddock, "Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 11, pp. 2807-2850, 2009.
- [24] E. Gross, C. S. Sevier, N. Heldman, E. Vitu, M. Bentzur, C. A. Kaiser, C. Thorpe e D. Fass, "Generating disulfides enzymatically: Reaction products and electron acceptors of the endoplasmic reticulum thiol oxidase Ero1p," *PNAS*, vol. 103, pp. 299-304, 2005.

- [25] C. S. Sevier e C. A. Kaiser, “Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmicreticulum,” *Molecular Cell Research*, vol. 1783, n.º Redox regulation of protein folding, pp. 549-556, 2008.
- [26] L. Flohé e J. R. Harris, *Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions*, Springer, 2007.
- [27] “National Center for Biotechnology Information,” National Library of Medicine (NLM), [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Acedido em Setembro 2012].
- [28] S. G. Rhee, S. W. Kang, T.-S. Chang e W. Jeong, “Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases,” *IUBMB Life*, vol. 52, pp. 35-41, 2001.
- [29] J. Fujii e Y. Ikeda, “Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein,” *Redox Report*, vol. 7, 2002.
- [30] Y. Sato e K. Inaba, “Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals,” *The FEBS Journal*, vol. 279, p. 2262–2271, 2012.
- [31] Z. Cao, T. J. Tavender, A. W. Roszak, R. J. Cogdell e N. J. Bulleid, “Crystal Structure of Reduced and of Oxidized Peroxiredoxin IV Enzyme Reveals a Stable Oxidized Decamer and a Non-disulfide-bonded Intermediate in the Catalytic Cycle,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, p. 42257–42266, 2011.
- [32] K. Ito e K. Inaba, “The disulfide bond formation (Dsb) system,” *Current Opinion in Structural Biology*, vol. 18, pp. 450-458, 2008.
- [33] A. Chacinska, C. M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow e N. Pfanner, “Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms,” *Cell*, vol. 138, pp. 628-644, 2009.
- [34] B. S. Mamathambika e J. C. Bardwell, “Disulfide-Linked Protein Folding Pathways,” *The Annual Review of Cell and Developmental y is online at cellbio.annualreviews.org*, vol. 24, pp. 211-235, 2008.
- [35] M. Narayan, E. Welker, W. J. Wedemeyer e H. A. Scheraga, “Oxidative Folding of Proteins,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 33, pp. 805-812, 2000.
- [36] M. Narayan, E. Welker, W. J. Wedemeyer e H. A. Scheraga, “Oxidative Folding of Proteins,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 33, pp. 805-812, 2000.
- [37] T. U. o. Queensland, “University of Queensland, Diamantina Institute,” 2007.

- [Online]. Available: <http://www.di.uq.edu.au>. [Acedido em Setembro 2012].
- [38] H. Schägger, "Tricine-SDS-PAGE," *Nature Publishing Group*, vol. 1, pp. 16-22, 2006.
- [39] V. Belousov, A. F. Fradkov, K. A. Lukyanov, D. B. Staroverov, K. S. Shakhbazov, A. V. Terskikh e S. Lukyanov, "Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide," *Nature*, vol. 3, 2006.