



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

**Catálise de pontes dissulfureto pelas vias enzimáticas que
atuam no retículo endoplasmático usando como substrato a
proteína fluorescente HyPer**

Fernando Alberto Lemos Rodrigues

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biológica

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

2015



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Catálise de pontes dissulfureto pelas vias enzimáticas que atuam no retículo endoplasmático usando como substrato a proteína fluorescente HyPer

Fernando Alberto Lemos Rodrigues

Dissertação para obtenção do grau de mestre em Engenharia Biológica

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

2015

Catálise de pontes dissulfureto pelas vias enzimáticas que atuam no retículo endoplasmático usando como substrato a proteína fluorescente HyPer

Declaração de autoria de trabalho:

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

Copyright © 2015 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 ao longo da orientação da dissertação de mestrado, além da sabedoria e amizade transmitidas, bem como esta oportunidade.

À Doutora Joana Macedo, agradeço o auxílio e a disponibilidade ao longo deste trabalho.

Ao Evandro Tavares e Carlos Lopes, agradeço a disponibilidade, orientação e ajuda que têm vindo a prestar e o incentivo de sempre esforçar e ir mais além.

À minha mãe, ao meu pai e à minha irmã agradeço o apoio, paciência e amor ao longo de toda a minha vida que moldaram-me na pessoa que me tornei.

Quero agradecer também ao André Cardoso e ao Ricardo Pereira pela amizade e por me apoiarem quando mais precisava.

RESUMO

O *fold*ing oxidativo de proteínas é uma modificação pos-transducional que consiste na formação de pontes dissulfureto intramoleculares pela oxidação de grupos tiol de duas cisteínas. Esta modificação química é essencial para a estabilidade das proteínas, principalmente em proteínas secretadas para o meio extracelular. *In vivo*, o *fold*ing oxidativo de proteínas secretadas pela célula ocorre no retículo endoplasmático e é assistido por uma série de proteínas que atuam como catalisadores. Estas reacções necessitam da presença de um aceitador final de electrões.

No presente trabalho foram estudadas duas vias enzimáticas que atuam no retículo endoplasmático. Uma via envolve um fluxo de electrões entre duas proteínas, a *Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1* (Ero1) e a *Protein Disulfide Isomerase* (PDI); A outra via envolve a PDI e a *Peroxiredoxin IV* (PRDX4).

O estudo destas vias enzimáticas foi realizado *in vitro* e avaliado por espectros de fluorescência usando as proteínas fluorescentes Hydrogen Peroxide Sensor (HyPer), e a *reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein* (roGFP) . Analisou-se as velocidades de oxidação da HyPer e roGFP com concentrações diferentes das enzimas envolvidas nas vias de modo a determinar o passo limitante destas reacções redox, bem como qual destas duas vias é a mais importante.

O estudo das duas vias possíveis permitiu observar que em todos os casos ocorre oxidação das proteínas fluorescente quando estão presentes todas as enzimas necessárias para a reacção ocorrer. Na via da PDI/Ero1 usando HyPer como sensor, a PDI desempenha um papel limitante da velocidade da reacção porque a velocidade total de oxidação é mais dependente da concentração de PDI do que da de Ero1.

Palavras-chave: Enzimas, *Folding* Oxidativo de proteínas, *Hydrogen Peroxide Sensor*, *reduction-oxidation sensitive Green Fluorescent Protein* *Protein Disulfide Isomerase*, *Endoplasmic Reticulum Oxiredutase*, *Peroxiredoxins*.

Abstract

Oxidative protein folding is the formation of intramolecular disulfide bonds involving the oxidation of thiol groups from two cystein residues. This post-translational modification is essential for protein stability and is mostly required, for proteins that follow the secretory pathway towards the membrane. 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 the two main enzymatic pathways that act in the endoplasmic reticulum for oxidative protein folding were studied. One pathway involves the flow of electrons between the Endoplasmic Reticulum Oxiredutase 1 (Ero1) and Protein Disulfide Isomerase (PDI). The other pathway involves PDI and Peroxiredoxin IV (PRDX4).

The study of these enzymatic pathways was carried in vitro and was evaluated through the fluorescent spectra of Hydrogen Peroxide Sensor (HyPer), and reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein (roGFP) in the presence of different concentrations of enzymes to identify the rate-limiting step and which pathway is more important.

It was possible to observe that in all cases, oxidation of the fluorescent proteins occurs when all the enzymes that form the pathway are present.

Oxidation of HyPer as client protein by PDI is the rate-limiting step on the full PDI/Ero1 pathway as the velocity of oxidation is more dependent from the PDI than from the Ero1 concentration.

Key-words: Enzymes, Oxidative Protein Folding, Hydrogen Peroxide Sensor, Protein Disulfide Isomerase, Endoplasmic Reticulum Oxireductase, Peroxiredoxins.

Índice

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VI
Índice	VII
Índice de abreviaturas	XII
Índice de figuras	XIII
Índice de tabelas	XVIII
1. Introdução	- 1 -
1.1. Folding de Proteínas.....	- 1 -
1.1.1. Doenças resultantes de erros no folding protéico.....	- 3 -
1.1.2. Mecanismo de Controlo de Qualidade do <i>Folding</i> Proteico (“ <i>Protein Quality Control</i> ”)-	4 -
1.2. Estabilização de proteínas através de Ligações Dissulfureto	- 4 -
1.3. Folding Oxidativo no Retículo Endoplasmático (RE)	- 5 -
1.3.1. Protein Disulfide Isomerase (PDI)	- 8 -
1.3.2. Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1 (Ero1).....	- 10 -
1.3.3. Peroxirredoxin IV (PRDX4)	- 13 -
1.4. Estudo da cinética da Oxidação <i>In Vitro</i>	- 18 -

1.4.1.	Hydrogen Peroxide sensor (HyPer).....	- 18 -
1.4.2.	<i>Reduction-oxidation sensitive Green Fluorescent Protein (roGFP)</i>	- 19 -
2.	Materiais e Métodos	- 21 -
2.1.	Materiais.....	- 21 -
2.1.1.	Reagentes	- 21 -
2.1.2.	Enzimas	- 21 -
2.1.3.	Plasmídeos.....	- 21 -
2.1.4.	Antibióticos	- 22 -
2.1.5.	Estirpes de <i>E.coli</i>	- 22 -
2.1.6.	Composição de meios, Soluções e Tampões.....	- 22 -
2.1.7.	Lista de Equipamentos	- 24 -
2.2.	Métodos.....	- 25 -
2.2.1.	Produção das proteínas.....	- 25 -
2.2.1.1.	Obtenção de células competentes.....	- 25 -
2.2.1.2.	Transformação celular.....	- 25 -
2.2.1.3.	Composição do meio de cultura	- 26 -
2.2.1.4.	Fermentação do pré-inóculo e inóculo	- 27 -
2.2.1.5.	Centrifugações.....	- 27 -
2.2.2.	Lise celular	- 28 -
2.2.3.	Purificação das proteínas por IMAC (<i>immobilized metal affinity chromatography</i>)... -	28 -
2.2.4.	Purificação da Ero1 por cromatografia de afinidade em coluna pré-empacotada. -	30 -

2.2.5.	Purificação da Ero1 em batch.....	- 30 -
2.2.6.	Avaliação da expressão da eficiência da purificação por SDS-PAGE.....	- 31 -
2.2.6.1.	Preparação das amostras para correr no gel	- 33 -
2.2.6.2.	Voltagem para a electroforese.....	- 34 -
2.2.6.3.	Coloração e descoloração do gel.....	- 34 -
2.2.6.4.	Digitalização dos géis.....	- 35 -
2.2.7.	Diálise das proteínas.....	- 35 -
2.2.8.	Quantificação de proteínas pelo método de Bradford.....	- 35 -
2.2.9.	Corte das proteínas pela protéase ULP	- 36 -
2.2.10.	Estudo da oxidação da HyPer e roGFP.	- 36 -
2.2.10.1.	Espectrofluorímetro.....	- 36 -
2.2.10.2.	Redução da HyPer , PDI e roGFP.....	- 36 -
2.2.10.3.	Reação de oxidação.....	- 37 -
2.2.10.4.	Via da Ero1/PDI com HyPer.....	- 38 -
2.2.10.5.	Via da PRDX4/PDI com roGFP.....	- 38 -
3.	Resultados e discussão	- 40 -
3.1.	<i>Hydrogen Peroxide Sensor</i> (Hyper).....	- 40 -
3.1.1.	Crescimento de pré-inóculo	- 40 -
3.1.2.	Propagação de inóculos e crescimento.....	- 41 -
3.1.3.	Avaliação da sobreexpressão	- 43 -
3.1.4.	1ª Purificação da HyPer.....	- 44 -

3.1.5.	Corte da <i>His-tag</i> e 2 ^a cromatografia	- 45 -
3.1.6.	Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford-	46 -
3.2.	<i>Peroxiredoxin IV (PRDX4)</i>	- 47 -
3.2.1.	Crescimento do pré-inóculo	- 47 -
3.2.2.	Propagação de inóculos e crescimento	- 47 -
3.2.3.	Avaliação da sobreexpressão	- 49 -
3.2.4.	Purificação.....	- 50 -
3.2.5.	Avaliação da eficiência de purificação e quantificação pelo método de Bradford-	50 -
3.3.	<i>Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1 (Ero1)</i>	- 51 -
3.3.1.	Crescimento do pré-inóculo	- 51 -
3.3.2.	Propagação de inóculos e crescimento	- 51 -
3.3.3.	1 ^o Purificação da fusão GST-Ero1	- 54 -
3.3.4.	Corte da fusão GST-Ero1 e diálise.....	- 54 -
3.3.5.	Purificação após corte com ULP da Ero1	- 55 -
3.3.6.	Avaliação da eficiência da purificação.....	- 55 -
3.3.7.	Purificação da Ero1 em batch.....	- 56 -
3.4.	Protein Disulfide Isomerase (PDI)	- 57 -
3.4.1.	Crescimento do pré-inóculo	- 57 -
3.4.2.	Progagação de inóculos e crescimento	- 57 -
3.4.3.	Avaliação da Sobreexpressão.....	- 59 -
3.4.4.	Purificação.....	- 60 -

3.4.5.	Avaliação da eficiência da purificação.....	- 61 -
3.5.	Estudo do <i>refolding</i> oxidativo.....	- 62 -
3.5.1.	Via da PDI/Ero1 usando HyPer como substrato.....	- 62 -
3.5.2.	roGFP como substrato.....	- 68 -
4.	Conclusões.....	- 71 -
5.	Bibliografia.....	- 72 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
Cf	Concentração final
Cys	Cisteína
dH ₂ O	Água destilada
DO	Densidade Ótica
FAD	Dinucleótido Flavina Adenina
His	Histidina
IPTG	Isopropiltioβ-D-galactosidase
Kan	Canamicina
k _{cat}	Constante catalítica de reação enzimática
kDa	Quilo Daltons
K _M	Constante de <i>Michaellis-Menten</i>
LB	Luria Bertani
mu	Mili unidades
O/N	<i>Over Night</i>
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 uma proteína, representando os mínimos locais de energia da proteína (Wrong) , e o estado mínimo de energia que a proteína pode adquirir (Right). [21]- 2 -
- Figura 1.2** Imagem ilustrativa do retículo endoplasmático: RE liso e RE rugoso que contém ribossomas agregados..... - 6 -
- Figura 1.3** Organização do domínio da PDI. (a) Modelo de PDI humana e PDI de levedura. ... - 8 -
- Figura 1.4** Esquema da reação de oxidação catalisada pela PDI. (Imagem adaptada de [30]) - 10 -
- Figura 1.5** Estrutura da Ero1 de levedura. Os resíduos de cisteína são representados em esferas (verde e amarelo) e o cofator FAD 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 [17] - 11 -
- Figura 1.6** 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. Imagem adaptada de [36]..... - 12 -
- Figura 1.7** 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 Cterminal. A Prx4 tem um péptido sinal para secreção no N-terminal que a direciona para o retículo endoplasmático [36]..... - 14 -
- Figura 1.8** 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 [37]. - 15 -
- Figura 1.9** 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 atua 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 eletrões para o peróxido de hidrogénio, com formação de duas moléculas de água.(Imagem adaptada de [35])..... - 16 -

Figura 1.10 Representação da velocidade de reação (V_0) como uma função da concentração do substrato ($[S]$) para um enzima que segue o modelo cinético de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis (K_M) é a concentração de substrato para a qual a velocidade é metade da máxima. [38] - 17 -

Figura 1.11 Picos de excitação da fluorescência da HyPer a 420nm e 500nm e um pico de emissão aos 516nm. [39]..... - 18 -

Figura 1.12 Variação dos picos da HyPer com exposição a H_2O_2 . Curva 1 — Sem H_2O_2 ; Curva 2 — 25 nM H_2O_2 ; Curva 3 — 100 nM H_2O_2 ; Curva 4 — 250 nM H_2O_2 . Emissão medida aos 530 nm [39] - 19 -

Figura 1.13 Ratiometria da roGFP. A intensidade de fluorescência relativa aos dois picos de excitação altera-se dependendo do seu estado *redox*: redução causa um decréscimo na excitação a 400nm e um aumento a 480 nm. [43]..... - 20 -

Figura 2.1 Bandas do Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; Bandas de 10 proteínas *standard* com peso molecular entre 10-250 kDa..... - 33 -

Figura 3.1 Curva de crescimento da produção de HyPer de amostras do balão 2. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG. - 42 -

Figura 3.2 Curva de crescimento da produção de HyPer amostra do balão 3. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG..... - 43 -

Figura 3.3 Gel de avaliação da expressão da HyPer: 1- Amostra recolhida no final da fermentação; 2- Amostra recolhida no final da fermentação; 3- Amostra recolhida antes da adição de IPTG; 4- Amostra recolhida antes da adição de IPTG; M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA). - 44 -

Figura 3.4 Cromatograma da Purificação da HyPer obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Vermelho) e percentagem (%) do Tampão de Eluição no sistema (Azul). - 45 -

Figura 3.5 Gel de avaliação da purificação da HyPer: 1- Amostra da eluição após corte com ULP ; 2- Amostra recolhida depois da adição de ULP; 3- Amostra antes da adição de ULP; 4 – Amostra do *flow-through*; M - Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA). - 46 -

Figura 3.6 Curva de crescimento da produção de PRDX4 de amostras do balão 1. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG. - 48 -

Figura 3.7 Curva de crescimento da produção de PRDX4 de amostras do balão 3. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG. - 49 -

Figura 3.8 Gel de avaliação da expressão da PRDX4: 1,3- Amostras recolhidas no final da fermentação; 2- Amostra recolhida antes da adição de IPTG; M - Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA). - 49 -

Figura 3.9 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 no sistema (Vermelho). - 50 -

Figura 3.10 Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 1. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG. - 53 -

Figura 3.11 Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 2. O ponto assinalado a verde - 53 -

Figura 3.12 Cromatograma da 1ª 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 no sistema (Vermelho)..... - 54 -

Figura 3.13 Gel de avaliação da purificação da Ero1:2-Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA); 1- Eluição com glutatona na segunda cromatografia; 3- *Flowthrough* da segunda cromatografia ; 4- Ero1 depois da ULP ; 5, 6 e 7- Ero1 antes da ULP; 8- *Flowthrough* da primeira cromatografia. - 56 -

Figura 3.14 Curva de crescimento da produção de PDI do balão 1. O ponto assinalado a vermelho corresponde à altura da indução com IPTG. - 58 -

Figura 3.15 Curva de crescimento da produção de PDI do balão 2. O ponto assinalado a vermelho corresponde à altura da indução com IPTG. - 59 -

Figura 3.16 Gel de avaliação da expressão da PDI:M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA); 1 e 3- Amostras recolhidas antes da adição de IPTG; 2 e 4- Amostras recolhidas no final da fermentação. - 59 -

Figura 3.17 Cromatograma da purificação da PDI obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição no sistema (Vermelho)..... - 60 -

Figura 3.18 Gel de avaliação da purificação da PDI:M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA); 1 a 6- Amostras recolhidas do pico de eluição. - 61 -

Figura 3.19 Exemplo de um gráfico de um ensaio com 3µM Hyper, 1µM Ero1, 1µM PDI da via da PDI/Ero1. Reação completa (azul), reação com HyPer e PDI (vermelho), reação com HyPer e Ero1 (verde), reação da HyPer ao ar (púrpura) e limites com H₂O₂ (azul claro) e DTT (laranja). - 63 -

Figura 3.20 Exemplo de um gráfico de um ensaio da via PDI/Ero1. Reação completa (vermelho); a recta de regressão linear (Linha preta) foi feita considerando os primeiros pontos que mostravam uma tendência linear. A intensidade de fluorescência representa a razão entre as fluorescências a 420nm e 500nm. - 64 -

Figura 3.21 Derivação da equação de Michaelis-Menten para uma cinética de inibição de substrato - 65 -

Figura 3.22 Gráfico dos ‘fits’ para a via da PDI/Ero1, comparando as velocidades de oxidação com o aumento da enzima PDI. - 66 -

Figura 3.23 Gráfico dos ‘fits’ para a via da PDI/Ero1, comparando as velocidades de oxidação com o aumento da enzima Ero1. - 66 -

Figura 3.24 Gráfico dos ‘fits’ para a via da PDI/Ero1 e PDI/PRDX4 usando roGFP como sensor. - 69 -

Índice de tabelas

Tabela 2.1 Plasmídeos utilizados para a produção das proteínas de interesse, com referência ao antibiótico de resistência e ao tag de afinidade.	- 22 -
Tabela 2.2 Composição das soluções utilizadas ao longo do trabalho.....	- 23 -
Tabela 2.3 Lista de equipamentos utilizados ao longo do trabalho experimental com referência à marca e modelo.	- 24 -
Tabela 2.4 Composição padrão do meio LB da Sigma-Aldrich®	- 26 -
Tabela 2.5 Composição do gel de Resolução 12% e do gel de Concentração 5%.....	- 32 -
Tabela 2.6 Composição da solução de coloração e descoloração dos Géis SDS.....	- 34 -
Tabela 2.7. Concentração de proteínas usadas nos ensaios de refolding.	- 38 -
Tabela 3.1 Valores de DO obtidos para os pré-inóculos da HyPer	- 40 -
Tabela 3.2 Volumes de pré-inoculo a adicionar ao meio para iniciar a produção da HyPer com DO=0.1.....	- 41 -
Tabela 3.3 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 2 e 3. A adição de IPTG é assinalada a verde.	- 42 -
Tabela 3.4 Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PRDX4.	- 47 -
Tabela 3.5 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 3. A adição de IPTG é assinalada a verde.	- 48 -
Tabela 3.6 Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da Ero1	- 51 -
Tabela 3.7 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 2. A adição de IPTG é assinalada a verde.	- 52 -
Tabela 3.8 Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PDI.	- 57 -

Tabela 3.9 Monotorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 2. A adição de IPTG é assinalada a verde. - 58 -

Tabela 3.10 Valores das velocidades de oxidação da HyPer para diferentes concentrações dos catalizadores Ero1 e PDI. - 62 -

Tabela 3.11 Constantes cinéticas dos ‘fits’ considerando inibição pelo substrato..... - 67 -

Tabela 3.12 Valores das velocidades de oxidação para diferentes concentrações de roGFP na reação completa e ao ar. - 68 -

Tabela 3.13 Valores das constantes cinéticas da via da PDI/PRDX4 usando roGFP como sensor.- 69 -

Tabela 3.14 Constantes cinéticas dos ‘fits’ para as vias usando a roGFP..... - 70 -

1. Introdução

1.1. Folding de Proteínas

O *fold*ing de proteínas é um processo complexo. Estas organizam-se em estruturas terciárias únicas que conferem à proteína a sua funcionalidade através de um conjunto de mudanças conformacionais. Além disso, estas passam por estruturas intermediárias que são estruturas parcialmente enroladas por onde a proteína passa para adquirir a sua estrutura enrolada nativa. [1]

A capacidade de determinar como este enrolamento é feito no sentido de formar uma estrutura biologicamente ativa é um dos desafios mais importantes da Biologia. [1]

A eficiência do enrolamento das proteínas é ditada pelas condições ambientais, genéticas e metabólicas. Condições que perturbam o normal enrolamento vão pôr em causa a viabilidade da célula. [2]

O folding de proteínas pode ser explicado através de um diagrama de energias (Figura 1.1) em que o enrolamento das proteínas nas suas estruturas nativas é baseada no conceito de minimização da energia livre. À medida que a proteína começa a enrolar, o número de estruturas intermediárias que pode adquirir decresce, diminuindo assim também a energia livre até esta adquirir a sua estrutura nativa, que é a estrutura que confere mais estabilidade e cuja energia livre é mínima. Além disso, pode haver mínimos de energia locais que podem aprisionar a proteína num estado estável e diminuir a velocidade com que adquire a sua estrutura nativa. [2] .

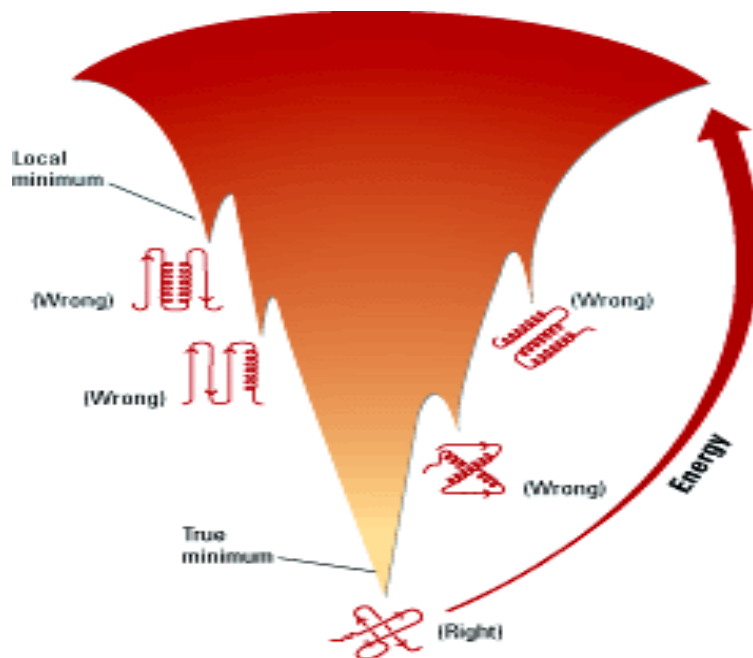


Figura 1.1 Diagrama de energia para uma proteína, representando os mínimos locais de energia da proteína (Wrong), e o estado mínimo de energia que a proteína pode adquirir (Right). [21]

In vivo existem proteínas denominadas *chaperones* que ajudam a proteína alvo a atingir a estrutura nativa, evitando assim os estados conformacionais menos favoráveis [3].

Finalmente, existe uma série de reações adicionais que ocorrem no retículo endoplasmático (RE) e podem influenciar o folding da proteína, tais como glicosilação, oligomerização e formação de pontes dissulfureto. [20]

1.1.1. Doenças resultantes de erros no folding protéico

A maior parte das proteínas secretadas enrolam de forma correta. Porém condições de *stress*, mutações e erros aleatórios podem provocar uma diminuição do rendimento ou até mesmo da taxa de *folding* das proteínas [4].

Existem doenças que resultam da degradação de uma proteína mal enrolada devido a uma mutação genética e que, por enrolamento incorrecto, 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 RE e no citosol e conduzem a uma incapacidade global das células para lidarem com proteínas mal enroladas [6].

Citando a investigadora Susan Lindquist “O *misfolding* de proteínas pode estar na origem de até metade das doenças humanas”[5], tais como fibrose cística, doença do fígado, epilepsia, arritmias cardíacas, cegueira e *Alzheimer*. Há evidências que estas doenças são provocadas pelo *folding* incorrecto de proteínas, sendo estas prematuramente degradadas ou acumuladas como agregados tóxicos no RE.[4]

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

Para impedir problemas resultantes de erros de folding proteico, as células desenvolveram mecanismos de controlo de qualidade. Muitas das proteínas em eucariotas são sintetizadas para o RE, que é um compartimento celular oxidante e possui proteínas que facilitam o folding e previnem a formação de agregados. [6]

Além disso, se no RE existir uma acumulação de proteínas mal enroladas (*misfolded*) devido a erros de folding, este pode aumentar a sua capacidade de lidar com estas proteínas, ou destruí-las. A primeira opção é chamada de “*unfolded protein response*” (UPR), e a segunda é chamada de “*ER associated degradation*” (ERAD) [6]

O estudo destes mecanismos tem grande importância devidos às doenças associadas ao *misfolding* proteico. [6]

1.2. Estabilização de proteínas através de Ligações Dissulfureto

A formação de pontes dissulfureto intramoleculares envolve a oxidação dos grupos tiol (SH) das cisteínas (Cys) para se formar uma ligação entre elas, chamada ponte disulfureto. Outro processo fundamental é o rearranjo de pontes disulfureto não nativas que impedem a formação da estrutura nativa da proteína [7].

Sobre condições oxidantes e na presença de dois resíduos de cisteína numa cadeia polipeptídica pode ocorrer a ligação covalente destes resíduos fazendo com que a cadeia polipeptídica enrole no sentido da aproximação dos resíduos de cisteína, auxiliando assim o processo de folding. 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 *folding* [8].

Estas pontes dissulfureto podem contribuir para a estabilidade da proteína e para a sua estrutura nativa. Além disso, o estado redox dos resíduos de cisteínas pode regular a actividade da proteína. 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 [8]. Assim, pode concluir-se que o efeito de uma ponte disulfureto numa dada proteína depende da sua posição na estrutura proteica [16].

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 [17].

1.3. Folding Oxidativo no Retículo Endoplasmático (RE)

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. Além disso, este organelo está equipado com proteínas *chaperone* e enzimas que ajudam no processo de folding e no controlo de qualidade das mesmas[9].

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 1.2). Esta compartimentação do RE 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 [16].

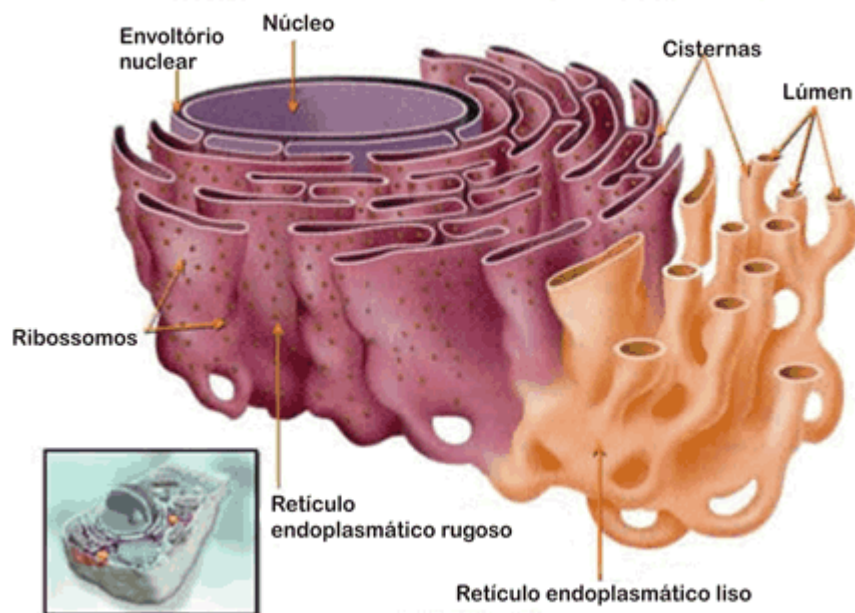


Figura 1.2 Imagem ilustrativa do retículo endoplasmático: RE liso e RE rugoso que contém ribossomas agregados.

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 [7].

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 [18]. Algumas destas enzimas residentes do RE estão envolvidas na formação de pontes dissulfureto e contribuem para o *fold*ing oxidativo das proteínas no RE [16].

O estudo do *fold*ing oxidativo revelou que, *in vitro*, a ocorrência do fenômeno 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 [7]. Assim, o *fold*ing oxidativo revelou um elevado grau de diversidade dos mecanismos de *fold*ing que são majoritariamente manifestados pela heterogeneidade das estruturas intermediárias [19].

No conjunto de reações envolvidas no *fold*ing 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 [22].

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 *Peroxi*redoxin IV (PRDX4), que, na presença de hidroperóxidos é capaz de oxidar a PDI sendo a oxidação das proteínas substrato atingida [23].

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 aceitador final de eletrões [22].

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 [18]. Esta proteína foi das primeiras a ser identificada, tem um peso molecular de 55 kDa e pertence à superfamília proteica das tioredoxinas [16].

Esta proteína é encontrada em concentrações na ordem do milimolar (mM) no lúmen do RE quer de leveduras quer de células de mamíferos [24].

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 1.3) [25].

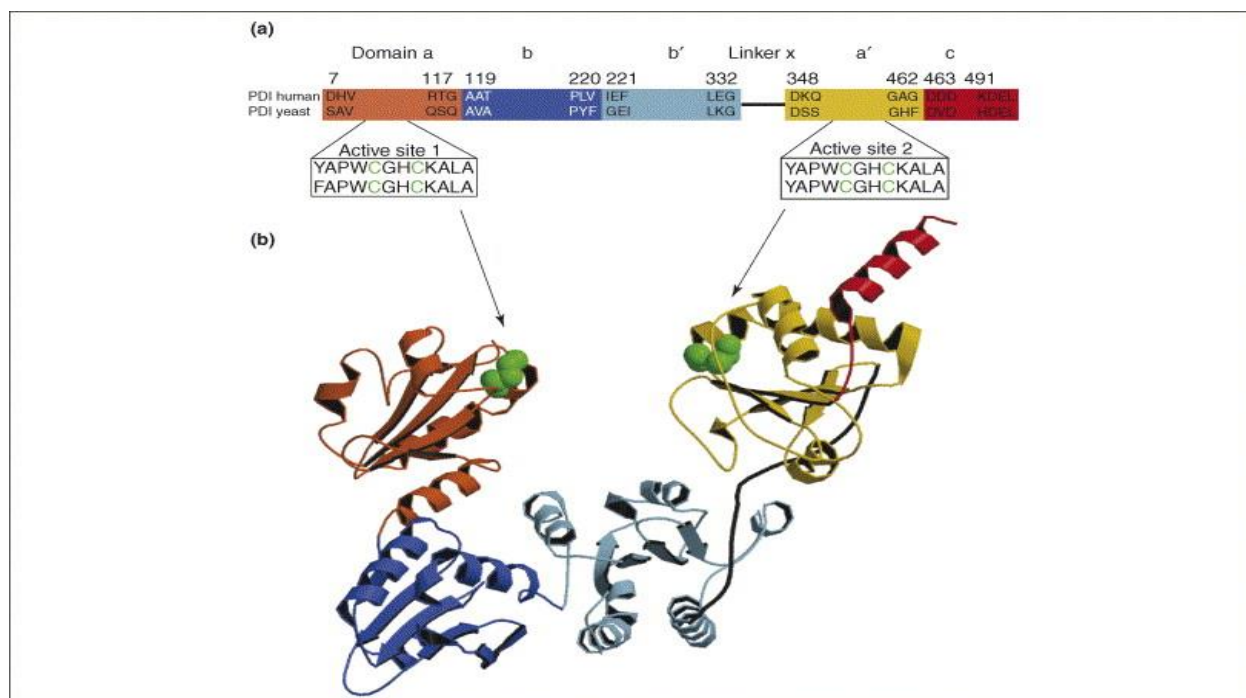


Figura 1.3 Organização do domínio da PDI. (a) Modelo de PDI humana e PDI de levedura. A arquitectura da PDI consiste em cinco domínios e um linker organizados na ordem abb'xa'c. Domínios a (laranja), a' (amarelo), b (azul escuro), b' (azul claro), linker x (preto) e domínio c (vermelho). Os resíduos estão numerados de acordo com a PDI humana. Os limites dos resíduos e dos dois domínios estão alinhados para a PDI humana (topo) e de levedura (fundo). (b) Diagrama de fitas, mostrando o sítio activo das cisteínas representado a verde. Cores dos domínios são os mesmos que em (a). [26]

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. Os domínios a e a' desta proteína são capazes de catalisar dois tipos de reação: oxidação e isomerização [16]. 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 [29].

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 [16].

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. 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 1.4) [16].

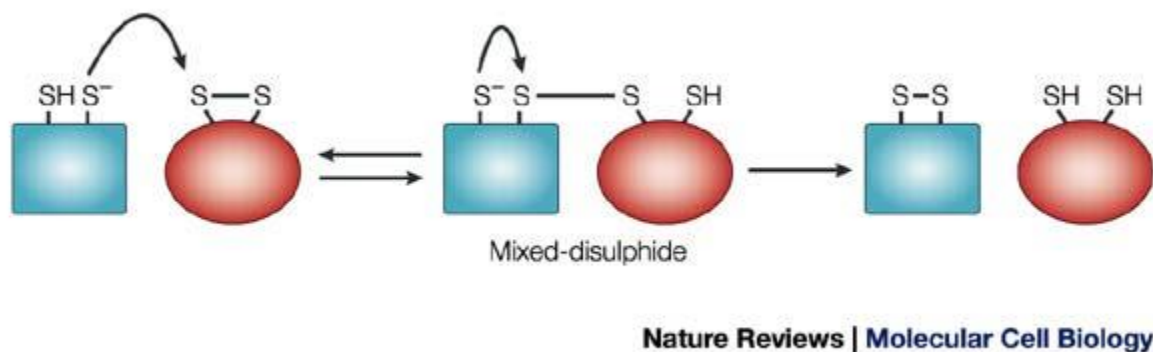


Figura 1.4 Esquema da reação de oxidação catalisada pela PDI. (Imagem adaptada de [30])

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 [31]. Existem mecanismos que promovem a reoxidação da PDI, nomeadamente, a enzima Ero1 [26].

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 eletrões dos seus grupos tiol para o oxigénio molecular. Contudo, o destino dos eletrões 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 [32].

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 1.6) [7].

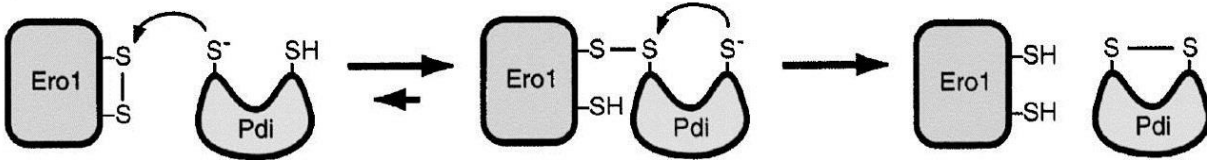


Figura 1.6 Mecanismo proposto para a troca de tiol-dissulfureto entre a Ero1 e um domínio ativo da PDI. O intermediário "mixed disulfide" é estabilizado por ácido devido à protonação de tióis reativos, e também pela substituição de cada cisteína no centro ativo no C-terminal da PDI por serina. Imagem adaptada de [36]

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* [22].

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 [33].

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. 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 [22].

1.3.3. Peroxirredoxin IV (PRDX4)

Peroxirredoxinas (PRDXs) são uma família de seis enzimas antioxidantes (PRDX1-6) que manifestam os seus efeitos via a actividade peroxidase ($\text{ROOH} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$), onde H_2O_2 , peroxinitrato e outros hidroperóxidos orgânicos são reduzidos e detoxificados. Estas enzimas identificadas em células mamíferas estão distribuídas na maioria dos compartimentos celulares. PRDX1, 2 e 6 estão localizadas no citosol, PRDX3 é expressa maioritariamente nas mitocôndrias, PRDX4 está localizada no RE e é excretada extracelularmente, a PRDX5 está localizada em mitocôndrias e peroxissomas [18]

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 1.7). Algumas destas isoformas conferem defesa contra os danos oxidativos enquanto outras parecem participar na sinalização através do controlo da concentração de peróxido de hidrogénio[34].

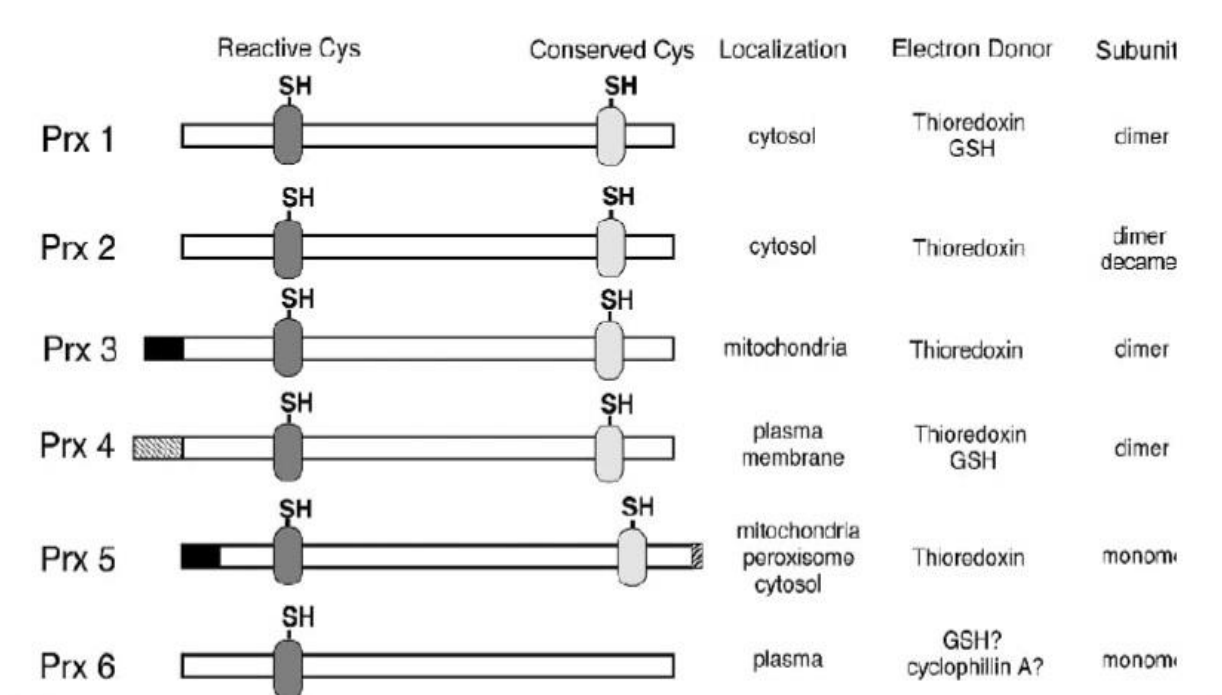


Figura 1.7 Representação esquemática dos 6 membros da família das Peroxirredoxinas. As posições das Cys essenciais para a atividade da peroxidase são indicadas como SH. A Prx3 e Prx5 têm sinais de importação mitocondrial na cadeia N-terminal. A Prx5 possui um sinal de localização peroxissomal no C-terminal. A Prx4 tem um péptido sinal para secreção no N-terminal que a direciona para o retículo endoplasmático [36].

As Peroxirredoxinas I, II, III e IV de mamíferos pertencem a um subgrupo e possuem resíduos de cisteínas conservados nas cadeias terminais NH₂- 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 NH₂- terminal que é tipicamente uma sequência sinal para proteínas secretoras [34]. A estrutura da PRDX IV humana mostra que a enzima forma um decâmero em forma de anel 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 1.8) [35].

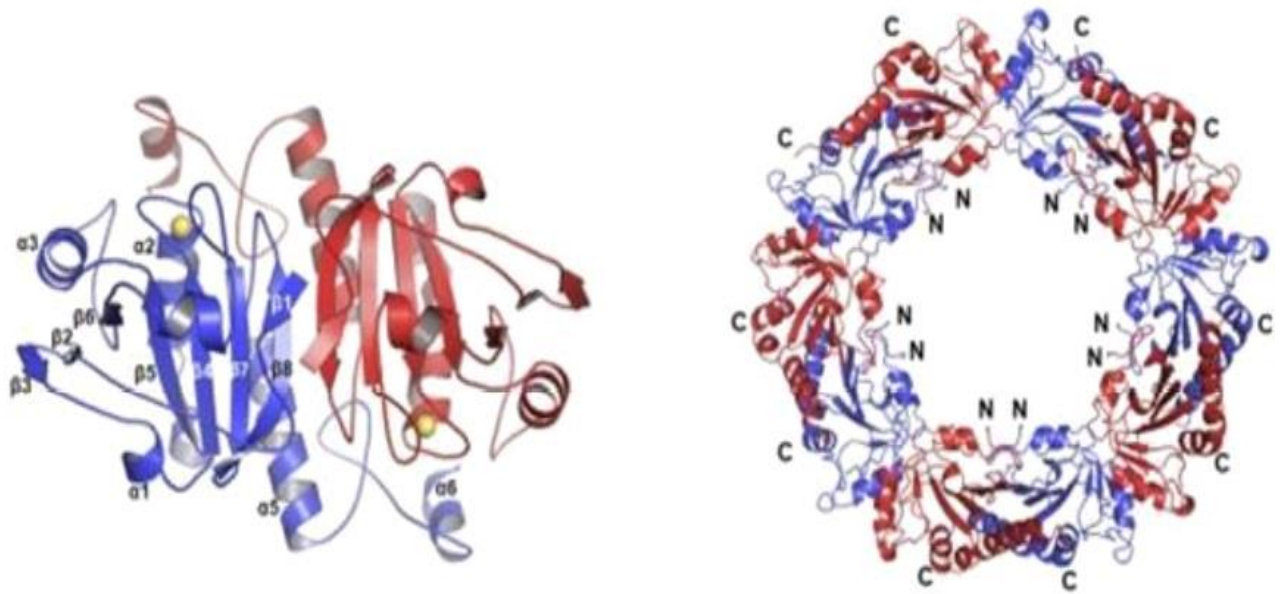


Figura 1.8 Estrutura da PRDX4 na forma de dímero e decâmero, respetivamente. Na estrutura em dímero as cisteínas são mostradas em amarelo. Na estrutura de decâmero, os terminais N e C são assinalados como N e C, respetivamente [37].

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 [23].

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 rato 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 [23].

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 1.9 resume esquematicamente as duas vias para o *refolding* oxidativo.

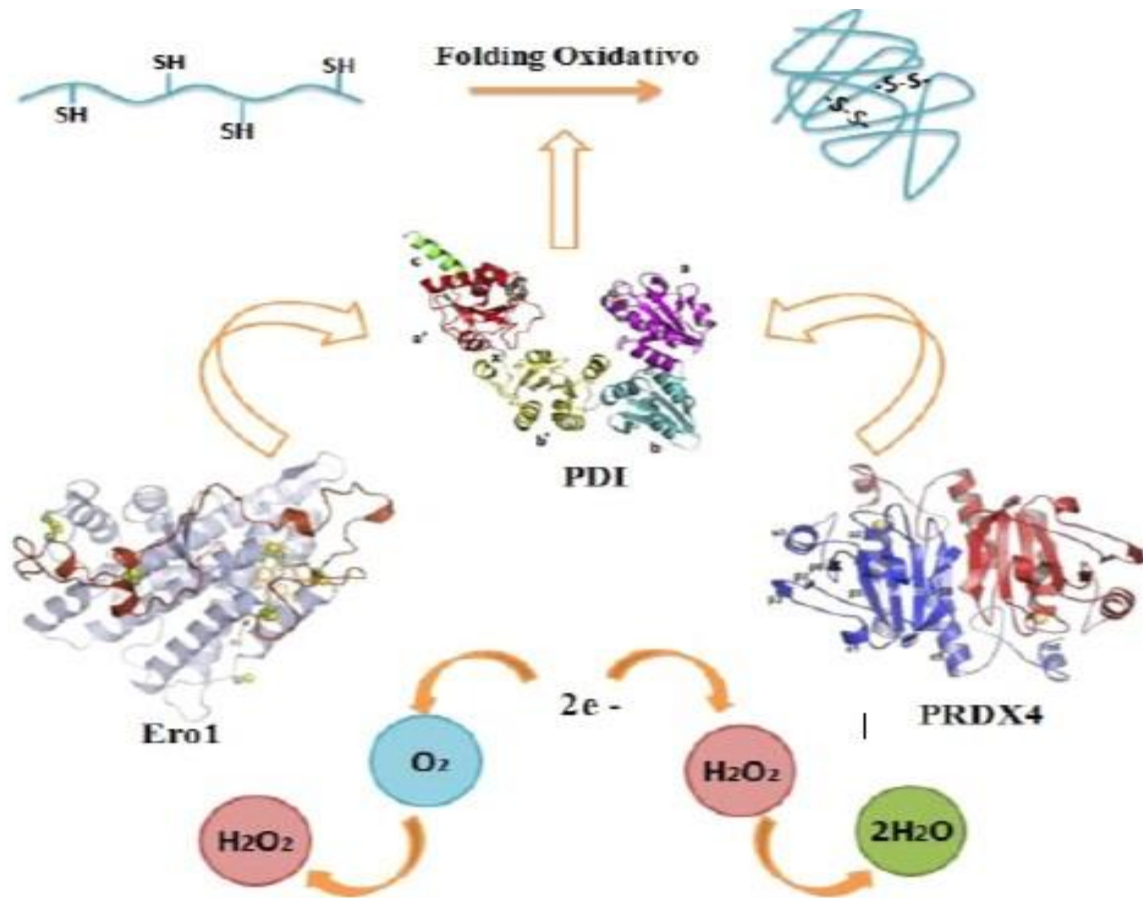


Figura 1.9 Modelo das reações de refolding oxidativo: Na reação mediada pela Ero1, a PDI oxidada é reduzida pela formação da ponte dissulfeto na proteína substrato (S-S). A Ero1 oxidada atua sobre a PDI reduzida, reoxidando-a novamente. A reoxidação da Ero1 envolve a redução do oxigênio molecular com formação de peróxido de hidrogênio. Na reação mediada pela PRDX4, a PDI oxidada é igualmente reduzida pela formação de pontes dissulfeto na proteína substrato sendo posteriormente reoxidada pela PRDX4 oxidada. A PRDX4 reduzida é reoxidada por transferência de elétrons para o peróxido de hidrogênio, com formação de duas moléculas de água. (Imagem adaptada de [35])

A função primária das enzimas é aumentar as velocidades de reação de modo a serem compatíveis com as necessidades do organismo. Para perceber isto, precisamos de uma descrição da sua actividade cinética.

Para muitas enzimas, a velocidade de catálise (V_0), que é definida pelo número de moles de produto formado por segundo, varia com a concentração de substrato ($[S]$) (Figura 1.10). A velocidade de catálise aumenta linearmente à medida que a concentração de substrato também aumenta até atingir a fase de saturação e a sua velocidade máxima. [38]

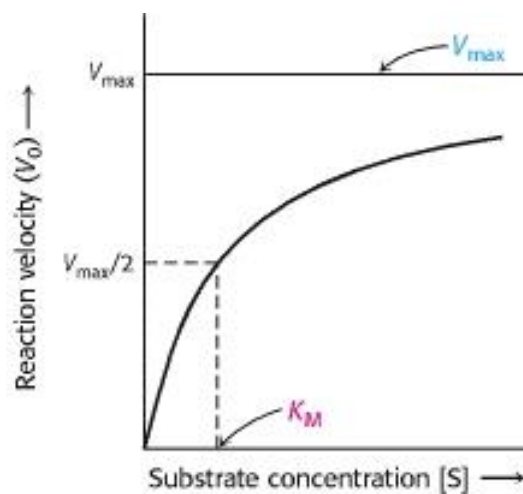


Figura 1.10 Representação da velocidade de reação (V_0) como uma função da concentração do substrato ($[S]$) para um enzima que segue o modelo cinético de Michaelis-Menten. A constante de Michaelis (K_M) é a concentração de substrato para a qual a velocidade é metade da máxima. [38]

1.4. Estudo da cinética da Oxidação *In Vitro*

1.4.1. Hydrogen Peroxide sensor (HyPer)

A HyPer é uma proteína fluorescente sensor de H₂O₂ que foi desenhada ao inserir a proteína fluorescente amarela (YFP) no domínio regulador da proteína OxyR (OxyR-RD) de E.coli. [40]

Este sensor é capaz de detetar peróxido de hidrogénio intracelular (H₂O₂)[39] e apresenta grande afinidade pelo H₂O₂, não sendo sensível a outros oxidantes. Pode ser usada para a deteção de mudanças na concentração de H₂O₂ em compartimentos celulares diferentes e sobre condições variadas. [39]

A proteína fluorescente HyPer apresenta alterações conformacionais consoante o seu estado oxidado ou reduzido, que se traduz numa mudança dos dois picos de excitação a 420nm e 500nm (Figura 1.11). Esta característica permite seguir em modo contínuo a oxidação através de medições ratiométricas (Figura 1.12) [39].

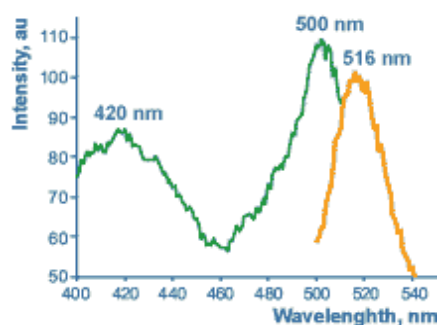


Figura 1.11 Picos de excitação da fluorescência da HyPer a 420nm e 500nm e um pico de emissão aos 516nm. [39]

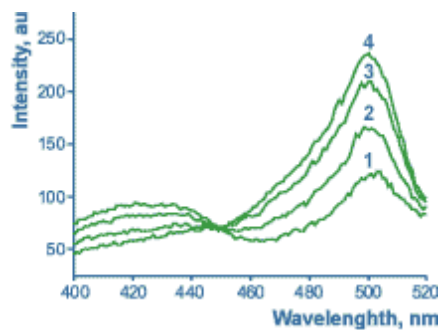


Figura 1.12 Variação dos picos da HyPer com exposição a H_2O_2 . Curva 1 — Sem H_2O_2 ; Curva 2 — 25 nM H_2O_2 ; Curva 3 — 100 nM H_2O_2 ; Curva 4 — 250 nM H_2O_2 . Emissão medida aos 530 nm [39]

1.4.2. *Reduction-oxidation sensitive Green Fluorescent Protein (roGFP)*

A roGFP é uma proteína geneticamente modificada, produto da substituição de resíduos expostos da *green fluorescent protein* (GFP) de *Aequorea victoria* com cisteínas em posições apropriadas para formar pontes dissulfureto, cujos picos de excitação são 400 e 490 nm [41].

Esta proteína pode ser utilizada como um indicador do estado redox devido à mudança do estado de oxidação destas cisteínas, modificando assim as propriedades fluorescentes. [42]

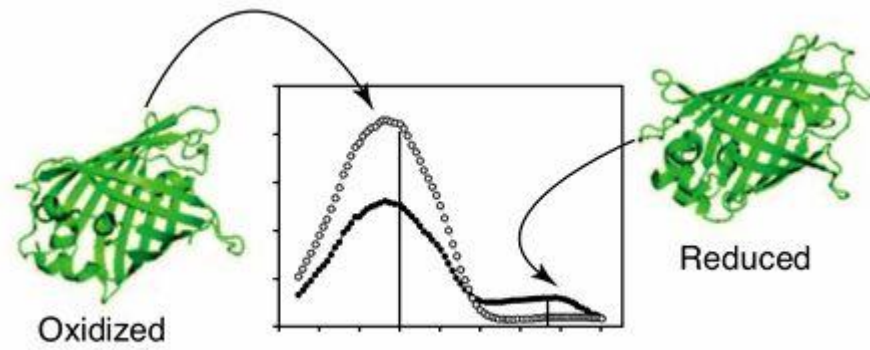


Figura 1.13 Ratiometria da roGFP. A intensidade de fluorescência relativa aos dois picos de excitação altera-se dependendo do seu estado *redox*: redução causa um decréscimo na excitação a 400nm e um aumento a 480 nm. [43]

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Reagentes

Meio fermentativo Luria-Bertani (LB), Glutathiona reduzida, β -mercaptoetanol, glicerol e glicina foram compradas à Sigma Aldrich®.

Tris e Cloreto de Sódio (NaCl) foram comprados à Merk®.

Isopropiltio β -D-galactosidase (IPTG) foi comprado à NZYTech.

2.1.2. Enzimas

As enzimas comerciais utilizadas ao longo do trabalho (DNase, RNase, Glucose Oxidase) foram compradas às empresas 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 ao plasmídeo	Tag de afinidade
HyPer	pET-28	Canamicina	His-tag
PDI	pRSET A	Ampicilina	
PRDX4	pRSET A		
roGFP	pRSET		
Ero1	pGEX		

2.1.4. Antibióticos

Os antibióticos utilizados (Ampicilina e Canamicina) foram comprados à NZYTech.

2.1.5. Estirpes de *E.coli*

As estirpes de células competentes da *Escherichia coli* 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 ao longo do trabalho.

Solução	Composição
Tampão de equilíbrio para a cromatografia da HyPer, roGFP, PDI e PRDX4	100mM Tris; 150mM NaCl; 20mM Imidazole; pH 7.5
Tampão de eluição para a cromatografia da HyPer, roGFP, PDI e PRDX4	50mM Tris; 150mM NaCl; 500mM Imidazole; pH 7.5
Tampão de equilíbrio para a cromatografia da Ero1	50mM Tris; 150mM NaCl; pH 7.5
Tampão de eluição para a primeira e segunda cromatografia da Ero1	50mM Tris; 150mM NaCl; 40mM Glutathione reduzida; pH 8
Tampão de equilíbrio para a segunda cromatografia da HyPer, roGFP, e Ero1	50mM Tris; 150mM NaCl; pH 7.5
Tampão de eluição para a segunda cromatografia da HyPer e roGFP	50mM Tris; 150mM NaCl; 500mM Imidazole; pH 7.5
Tampão de Reação (10x)	1.5M NaCl; 500mM Tris; pH 7.5
Tampão de diálise	150mM NaCl; 50mM Tris; pH 7.5
Tampão de Corrida (10x)	250 mM Tris; 2.5M Glicina; 1% SDS
<i>Protein loading dye with Orange G</i> (4x) Vf=10 ml (Alíquotas de 900 µL)	0.02g Orange G; 0,8 g SDS (Cf = 2%); 4 ml glicerol (Cf= 10%); 2.5 ml Tris-Hcl 1M pH 6.8 (Cf = 62.5 mM); 3.5ml dH ₂ O; 100 µL β-mercaptoetanol a cada alíquota

2.1.7. Lista de Equipamentos

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

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

Nome do Equipamento	Função	Marca	Modelo
Sonicador	Lise celular	Vibracell	75186
Centrífuga de bancada	Centrifugação de eppendorfs	VWR™	2416
Centrífuga de chão	Centrifugação após lise celular	Beckman Coulter	J14-MC
Centrífuga de chão	Centrifugação após fermentação	eppendorf®	5810 R
Estufa	Incubação com temperatura	Nüv	EN400
Orbital	Incubação com temperatura e agitação	Arlab-Agitorb	200IC
Leitor de placas	Medições espectrofotométricas	Tekan	Infinity m-200
Espectrofotómetro	Medições espectrofotométricas	Pharma-Spec	UV-1700
Balança	Pesagem	Ae ADAM	ACB plus 600H
FPLC- ÄKTA	Purificação	GE Healthcare	Micro
Medidor de pH	Medição de pH	Hanna Instruments	pH 210
Espectrofluorímetro	Medições espectrofluorométricas	Horiba	Fluoromax-3

2.2. Métodos

Neste capítulo descrevem-se os procedimentos experimentais realizados, referindo-se também os 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. Após isso, inoculou-se 100 µl da cultura, em 50 ml de meio LB, e incubava-se a 37°C 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* ressuspenso em 12,5 mL de Cloreto de Cálcio (CaCl₂ 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 ressuspenso em 2250 µL de CaCl₂ 0.1M e 375 µL de glicerol (86%). São feitas alíquotas de 100 µL e armazenadas a -80°C.

2.2.1.2. Transformação celular

Numa alíquota de células competentes (100 µL), foi introduzido o plasmídeo de interesse (1µL), e de seguida deixa-se em gelo durante 30 minutos. Após esse período de tempo, a cultura é sujeita a choque térmico durante 1 minuto a 42°C de modo a permitir a entrada do plasmídeo no interior da célula, e de seguida 5 minutos de repouso em gelo. Por fim foram adicionados 250 µL de meio LB (20 g/L) de modo a estimular o crescimento durante cerca de 60 minutos 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 de selecção, 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.

O antibiótico de selecção para a produção da maior parte das proteínas foi a Ampicilina (Amp) sendo que nas placas de LB/agar, este antibiótico está presente numa concentração de 100µg/mL. A única excepção foi a proteína Hyper, cujo antibiótico de selecção foi a canamicina, sendo que nas placas de LB/agar este antibiótico está presente numa concentração de 50 µg/mL.

2.2.1.3. Composição do meio de cultura

Para crescimento da bactéria *Escherichia coli*, foi usado o meio de cultura LB Broth. Esta bactéria tem um crescimento rápido devido à presença de triptona e extracto de levedura, factores de crescimento essenciais para a *E.coli*.

Além disso, este meio contém também eletrólitos essenciais para o transporte e para o balanço osmótico, devido à presença de NaCl (Tabela 2.4).

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

Composto	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
Cloreto de Sódio	5

O meio LB foi utilizado numa concentração de 20 g/L, sendo dissolvido em dH₂O. Desta mistura foram preparados os pré inóculos e inóculos, sendo depois esterilizados. A esterilização dos 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 efectuadas em *erlenmeyers* de 2000 mL com volume útil de 500 mL. Esta relação entre o volume disponível e o volume útil é necessária para fornecer um arejamento favorável ao crescimento adequado da cultura.

2.2.1.4.Fermentação do pré-inóculo e inóculo

As proteínas foram produzidas num processo fermentativo em *batch*. Todas as fermentações 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 foi de 16°C (O/N) após adição do indutor IPTG.

Das placas de LB/agar foram selecionadas colónias isoladas que foram incubadas em meio LB com o antibiótico de seleção (100 µg/mL Amp ou 50 µg/mL Kan) constituindo assim o pré-inóculo. Para tal, utilizaram-se *erlenmeyers* de 250ml 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 180rpm. No caso da Ero1 o pré-inóculo cresceu durante o dia nas mesmas condições.

A fermentação, usando *erlenmeyers* de 2000 mL, decorreu a partir do pré inóculo e na presença do antibiótico de seleção, iniciando-se com uma DO de 0.1 e seguindo-se o crescimento até uma DO entre 0.6-0.8, chegado a este valor, procedeu-se à adição de 500 µL de IPTG 1M (C f = 1 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 depois, em intervalos de 1 hora através da medição da DO num espectrofotómetro *Pharma-Spec*.

2.2.1.5.Centrifugações

Após o processo fermentativo que terminou quando as culturas atingem a fase estacionária, foram efetuadas duas centrifugações (4 x 250 mL de cada vez) numa centrífuga 5810R (eppendorf®) a 4000 rpm durante 20 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 ressuspendidos no menor volume possível de tampão de equilíbrio e transferidos para um tubo *falcon* de 50 mL. O pellet resuspenso foi armazenado a -20°C para futura utilização.

2.2.2. Lise celular

Ao pellet após resuspensão foi adicionado 2 µg de DNase, 2 µg de RNase, 100 µL de fluoreto de fenilmetanosulfonil 1mM (PMSF), e 10 µL de Cloreto de Mágnesio que vão, respetivamente, degradar o DNA e RNA após rutura celular, inibir as protéases libertadas pela rutura celular e servir de cofactor para a enzima DNase.

As células foram lisadas por sonicação num sonicador Vibra cell™, 75186 VCX 130 usando uma amplitude 70% em pulsos de 10 segundos *off* e *on* durante 3 minutos num total de 2 ciclos, usando uma ponta de 6 milímetros. 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 gelo é suficiente para manter a amostra a uma temperatura baixa. O lisado foi transferido para um tubo cónico de 50mL e centrifugado numa centrífuga 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.

No pellet permanecem os fragmentos celulares, e no sobrenadante está presente a proteína de interesse. 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 das proteínas por IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*)

A purificação das proteínas de interesse com exceção da Ero1 foi realizada num processo de cromatografia de afinidade IMAC, no equipamento denominado FPLC-ÄKTA™ (GE Healthcare). Foram usados neste processo colunas pré-empacotadas de 5 ml contendo 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, 40mg/mL. Esta

retenção permite purificar amostras proteicas com esse “tag” de afinidade e após passagem de um tampão contendo imidazole, ocorre a eluição da proteína da matriz.

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* específico (Unicorn).

O sistema de bombagens do equipamento foi sujeito a limpeza (função “*Pump Wash*”) com Etanol 20% ou água MiliQ antes de se iniciar o processo de purificação. Os capilares A e B foram colocados nos frascos com o tampão de equilíbrio e o tampão de eluição, 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 de equilíbrio, antes da injeção da amostra. Esta injeção foi feita através de um sistema denominado *super-loop* previamente lavado com água MiliQ. 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 mais injeções intercaladas.

Após a inserção da amostra no *super-loop* ativou-se a função “Inject” fazendo com que a amostra entrasse na coluna cromatográfica. Quando o êmbolo do *super-loop* chegou ao fim, mudou-se para a função “Load” para continuar a passar tampão de equilíbrio pela coluna. No cromatograma surgem os picos referentes ao conteúdo proteico (*flow-trough* ou fase móvel) presente na amostra que não ligou à matriz cromatográfica. Após a estabilização do sinal de absorvância a 280nm em aproximadamente zero, iniciou-se o gradiente com o tampão de eluição entre 0 e 100% num intervalo de 25 minutos, que provoca a libertação da proteína de interesse dos iões metálicos (Ni). Durante a fase de eluição surgem os picos referente à proteína que ficou retida na matriz. A etapa de purificação foi concluída com a limpeza das bombas e do sistema primeiro com o tampão de equilíbrio e depois com Etanol 20% e H₂O MiliQ.

2.2.4. Purificação da Ero1 por cromatografia de afinidade em coluna pré-empacotada

Para a purificação da Ero1 por cromatografia, foi usado o equipamento FPLC-ÄKTA™ usando colunas pré-empacotadas de 5 ml contendo *Glutathione Sepharose* (GSTrap *affinity columns*) da GE Healthcare. A matriz cromatográfica é estável e tolerante aos tampões aquosos geralmente utilizados. Estas colunas são carregadas com glutathione que retêm seletivamente as proteínas com um “tag” de GST caso esta se encontre exposta na superfície proteica, garantindo uma capacidade de ligação de, no mínimo, 10mg/mL. Esta retenção permite purificar amostras proteicas com esse “tag” de afinidade e após passagem de um tampão contendo glutathione reduzida, ocorre a eluição da proteína da matriz.

Procedeu-se do mesmo modo como na purificação por IMAC, a única diferença foi se ter usado um caudal menor para aumentar a capacidade de ligação.

2.2.5. Purificação da Ero1 em batch

Para a purificação da Ero1 em batch, retirou-se 10 mL de beads de sefarose derivatizada com glutathione para um falcon de 50 mL. Deixou-se em repouso para as beads sedimentarem, retirou-se o sobrenadante com muito cuidado para não retirar as beads, depois adicionou-se 10 mL de tampão de equilíbrio da Ero1 e agitou-se com o auxílio de uma roda durante 10 minutos, deixando as beads sedimentarem de novo para se retirar o sobrenadante. Este processo de adicionar tampão, agitação e retirada do sobrenadante foi repetido 3 vezes para uma lavagem efectiva das beads com tampão. De seguida, adicionou-se o sobrenadante proveniente da lise celular ao falcon que contém as beads, este ficou a agitar na roda *overnight* para permitir a ligação da Ero1 às beads. No dia seguinte, deixou-se as beads sedimentarem antes de recolher o sobrenadante, procedeu-se à lavagem das beads com tampão de equilíbrio como referido anteriormente as vezes necessárias até que o sobrenadante estivesse límpido. Após isso adicionou-se 100uL de *Ubiquitin-like-specific protease* (ULP) e deixou-se o falcon a agitar numa

roda durante 4 horas à temperatura ambiente para ocorrer clivagem do tag GST da Ero1. Quando este tempo de espera terminou, deixou-se as beads sedimentarem para se recolher o sobrenadante que contém a Ero1 pura, ficando agarrado às beads o GST-tag que foi cortado pela ULP. Este tag foi eluído das beads com a adição de tampão de eluição da Ero1 contendo 40mM de glutathione reduzida. Após este passo, as beads foram limpas com tampão de equilíbrio e guardadas em etanol 20%.

Durante esta purificação foram retiradas amostras do sobrenadante antes e depois da Ero1 estar em contacto com as beads, do sobrenadante após o corte com a ULP e do sobrenadante após a adição de tampão de eluição.

2.2.6. Avaliação da expressão da eficiência da purificação por SDS-PAGE

Ao longo do processo fermentativo foram recolhidas duas amostras (1mL) antes da adição de IPTG e duas amostras no final da produção. Além destas, foram igualmente recolhidas amostras do *flow-trough* 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. 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%.

Componentes	Gel de resolução 12% (10mL)	Gel de Concentração 5% (4mL)
dH ₂ O	4,3mL	2,9mL
1M Tris-HCl pH 6.8	-	0,5mL
1.5M Tris-HCl pH 8.8	2,5mL	-
Acrilamida/Bisacrilamida 40%	3mL	0,5mL
10% SDS	100 µL	40 µL
10% APS	100 µL	40 µL
TEMED	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, respectivamente. Uma vez adicionados, a solução foi imediatamente inserida entre os vidros para polimerizar. No final, adicionou-se uma camada de dH₂O 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 dH₂O 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.

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.

2.2.6.1.Preparação das amostras para correr no gel

As amostras recolhidas ao longo da fermentação foram centrifugadas a 12000 rpm durante 5 minutos numa centrífuga de bancada VWR™, 2416. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* é ressuspendido em 100 μ L de dH₂O.

Para preparar as amostras, foram retirados 30 μ L de cada amostra aos quais foram adicionados 10 μ L de *Loading Dye* a cada perfazendo um volume total de 40 μ L de amostra, à excepção das amostras do final da fermentação, das quais foram utilizados 30 μ L de amostra e adicionados 30 μ L de dH₂O e 20 μ L de *Loading Dye*. 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 os fragmentos celulares fiquem no fundo do *micro-tubo* e depois foram carregadas 30 μ L nos poços do gel.

O marcador utilizado foi o *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* da BioRad, apresentado na Figura 2.1.

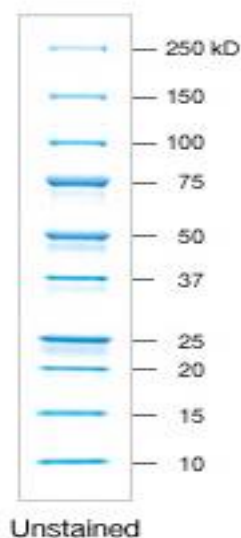


Figura 2.1 Bandas do Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard*; Bandas de 10 proteínas *standart* com peso molecular entre 10-250 kDa.

2.2.6.2.Voltagem para a electroforese

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 até as amostras percorrerem o gel de concentração. Seguidamente alterou-se a voltagem para 90 V no resto da corrida que foi terminada antes que as amostras coradas saíssem do gel.

2.2.6.3.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. 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. Este gel pode ser guardado em dH₂O após este passo.

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

Soluções	Composição
Solução corante (1L)	2g Brilliant Blue R - SigmaAldrich® 500 mL Etanol 96% 75 mL Ácido Acético 100% dH 2 O até perfazer o volume total
Solução descorante (1L)	200 mL Etanol 96% 100 mL Ácido Acético 100% dH2O até perfazer o volume total

2.2.6.4. 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.

2.2.7. 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 de IMAC. Para o caso da diálise da amostra contendo Ero1, a diálise teve o intuito de remover a glutatona reduzida usada na eluição. Em cada situação, o tampão foi mudado duas vezes.

2.2.8. 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 incluídas 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 que permite a determinação da concentração de proteína total solubilizada. 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.

2.2.9. Corte das proteínas pela protéase ULP

A Ero1 foi produzida fundida com a Glutathione S-transferase (GST) e a HyPer e roGFP foram produzidas fundidas com uma His-tag. É necessário separar estas proteínas dos seus tags de afinidade de modo a que as proteínas de interesse fiquem isoladas e puras. Esta separação foi levada a cabo numa reação enzimática catalisada pela protease ULP, que é responsável pelo corte entre essas partes. A ULP foi diluída de 1:100 relativamente ao volume de solução e deixada a agitar durante a noite a 4°C com agitação baixa.

2.2.10. Estudo da oxidação da HyPer e roGFP.

2.2.10.1. Espectrofluorímetro

O estudo da oxidação da HyPer e da roGFP foi realizado por fluorescência num espectrofluorímetro Fluoromax-3™, usando uma cuvete de quartzo com 1cm de percurso óptico. O uso deste tipo de aparelho permite grande resolução nas medições devido às suas fendas ajustáveis pelo computador, e também possuir um monocromador com um espelho elíptico que permite a captação de todos os comprimentos de onda pela fenda.

2.2.10.2. Redução da HyPer , PDI e roGFP

A Hyper, PDI e a roGFP foram reduzidas usando 40 mM DTT em tubos eppendorf com um volume final de 550 µL durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação num oscilador Heidolph Duomax, 1030. Após este tempo, as amostras foram passadas em colunas PD-10 *Desalting* da GE Healthcare, por gravidade, para remover o excesso de 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 800 µL para um eppendorf, que foi depois dividido em 4 micro-tubos de 200 µL e guardado a -80°C. A coluna foi limpa com tampão de reação, 3 vezes, e deixada em Etanol 20% para conservar a matriz. Foi recolhido também uma amostra das proteínas reduzidas para quantificação pelo método de Bradford, como especificado no ponto 2.2.6.

2.2.10.3. Reação de oxidação

No presente trabalho estava previsto estudar duas vias possíveis para a oxidação da Hyper: a via da Ero1/PDI e a via da PRDX4/PDI.

Porém após testes preliminares, observou-se que a HyPer é muito sensível ao peróxido de hidrogénio, que na via da PRDX4/PDI é produzido pela glucose oxidase e por isso decidiu-se usar outra proteína que não é sensível ao peróxido de hidrogénio, a roGFP.

Estudou-se também as duas vias na oxidação da roGFP, a via da Ero1/PDI e a via da PRDX4/PDI.

Como referido em cima, para estudar a via onde intervém a PRDX4 foi necessária a introdução de uma fonte de peróxido de hidrogénio que atua como aceitador final de eletrões sendo este, após redução convertido a água. Como tal foi adicionada Glucose (2.5 mM) e Glucose Oxidase (GOx) (10 mU/ml) aos ensaios para estudar a via da PRDX4/PDI.

As concentrações das proteínas utilizadas no estudo da reacção de oxidação são apresentadas na tabela 2.7

Tabela 2.7. Concentração de proteínas usadas nos ensaios de oxidação.

Proteína	Concentração (μM)
Hyper	0,1; 0,5; 1; 3; 5; 7; 10; 13; 16
PDI	1; 3; 5
Ero	1; 3; 5
PRDX4	1; 3; 5
roGFP	0,1; 0,5; 1; 3; 5; 7; 10

Para cada ensaio foram feitos controlos com HyPer ou roGFP reduzida e oxidada pela adição de uma solução 1M de DTT (50 μL) e de uma solução 0.5 μM de peróxido de hidrogénio (25 μL), respectivamente,.

2.2.10.4. Via da Ero1/PDI com HyPer

Para estudar a oxidação catalizada por esta via realizaram-se 4 reacções:

- A reacção com a via completa (Ero1, PDI reduzida e HyPer reduzida);
- A reacção com HyPer e Ero1;
- A reacção com HyPer e PDI;
- A reacção de controlo da HyPer ao ar para quantificar a oxidação pelo oxigénio atmosférico.

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

Após a quantificação das proteínas pelo método de Bradford foram calculados os volumes necessários de cada proteína para as concentrações finais desejadas (tabela 2.7). O volume de tampão de reacção a adicionar foi determinado por diferença relativamente ao volume final de reacção (1400 μL)

2.2.10.5. Via da PRDX4/PDI com roGFP

Para estudar a oxidação por esta via realizaram-se 5 reacções:

- A reacção com a via completa (Gox, Glucose, PDI reduzida, PRDX4 e roGFP reduzida);
- A reacção da via completa sem a Gox;
- A reacção da via completa sem a PDI;
- A reacção da via completa sem a PRDX4.
- A reacção de controlo da roGFP ao ar.

A ordem de colocação dos componentes da reacção foi: tampão de reacção, Glucose, PDI reduzida, PRDX4, roGFP reduzida e Gox, pelo que assim que esta ultima é adicionada a reacção é iniciada.

2.2.10.6. Via da Ero1/PDI com roGFP

Para estudar a oxidação por esta via realizaram-se 4 reacções:

- A reacção com a via completa (Ero1, PDI reduzida e roGFP reduzida);
- A reacção com roGFP e Ero1;
- A reacção com roGFP e PDI;
- A reacção de controlo da roGFP ao ar.

A ordem de colocação dos componentes da reacção foi: tampão de reacção, PDI reduzida, Ero1 e por fim roGFP reduzida para iniciar a reacção.

3. Resultados e discussão

3.1. *Hydrogen Peroxide Sensor (Hyper)*

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

A determinação dos volumes de pré-inóculo a adicionar para inocular é calculada através da equação 3.1, com o objectivo de iniciar a fermentação com uma DO de 0,1 de modo a garantir que as fermentações atinjam a fase exponencial do crescimento ao mesmo tempo. 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).

$$OD_i * V_i = OD_f * V_f$$

Equação 3.1

3.1.1. Crescimento de pré-inóculo

Os *erlenmeyers* utilizados para a produção do pré-inóculo foram numerados de 1 a 4 de modo a facilitar o processo.

Na tabela 3.1 são apresentados os valores de DO dos 4 *erlenmeyers* de pré-inóculo da HyPer após incubação O/N a 37°C.

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

Erlenmeyer	DO(600nm)
1	2,063
2	2,081
3	2,128
4	2,121

3.1.2. Propagação de inóculos e crescimento

Os *erlenmeyers* onde decorreram as fermentações foram, igualmente, numerados de 1 a 8 de modo a facilitar o processo.

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

Foram seleccionados 2 balões em cada medição para monitorizar a evolução do crescimento na fermentação, 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). Após a indução da expressão foram retiradas amostras dos mesmos 2 balões 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-inoculo a adicionar ao meio para iniciar fermentação da HyPer com DO=0.1.

Pré-Inóculo	Volume a adicionar (mL)	Inóculo
1	24,230	1
		2
2	24,027	3
		4
3	23,496	5
		6
4	23,573	7
		8

Ao fim de 1,5 horas de crescimento foi induzida a expressão da proteína.

A tabela 3.3 apresenta os valores da DO obtidos ao longo da fermentação, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a verde.

Tabela 3.3 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 2 e 3. A adição de IPTG é assinalada a verde.

Amostra	Tempo(h)	DO(600nm) (2)	DO(600nm) (3)
1	0	0,1	0,1
2	0,5	0,236	0,229
3	1	0,422	0,434
4	1,5	0,698	0,714
5	3	1,300	1,328
6	4	1,355	1,426
7	6,5	1,678	1,610
8	9	1,741	1,649

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 (Figuras 3.1 e 3.2). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a verde.

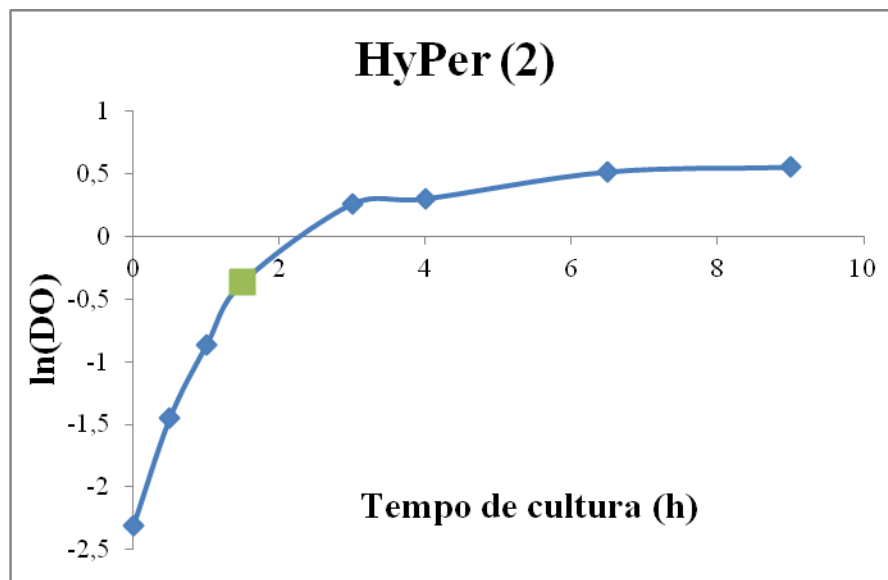


Figura 3.1 Curva de crescimento da produção de HyPer de amostras do balão 2. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG.

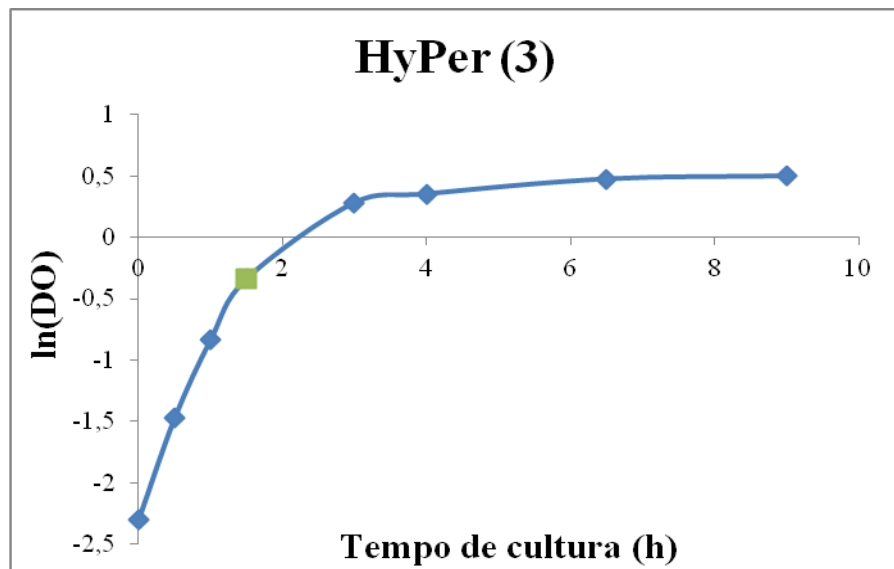


Figura 3.2 Curva de crescimento da produção de HyPer amostra do balão 3. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG.

3.1.3. Avaliação da sobreexpressão

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

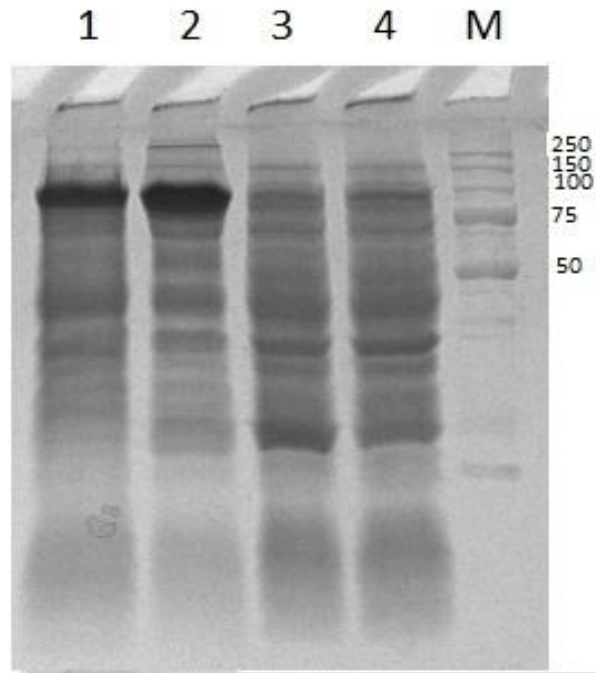


Figura 3.3 Gel de avaliação da expressão da HyPer: 1- Amostra recolhida no final da fermentação; 2- Amostra recolhida no final da fermentação; 3- Amostra recolhida antes da adição de IPTG; 4- Amostra recolhida antes da adição de IPTG; M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDa).

No gel SDS-PAGE realizado para avaliar a expressão da HyPer resultante da produção ($PM = 93$ kDa), embora nem todas as bandas do marcador sejam totalmente visíveis, pode-se ver uma banda mais carregada perto da banda do marcador de 100kDa, nas amostras recolhidas no fim da fermentação em relação às amostras antes da adição de IPTG, o que quer dizer que houve sobreexpressão da proteína de interesse.

Este gel também revela outras bandas correspondentes a outras proteínas que foram expressas ao longo da fermentação, estas vão ser separadas da HyPer no processo de purificação.

3.1.4. 1ª Purificação da HyPer

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

O cromatograma apresentado na figura 3.4 mostra a purificação da HyPer por IMAC numa coluna de Níquel. Após a injeção da amostra e da saída do *flow-trough* o gradiente com tampão contendo imidazol 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.

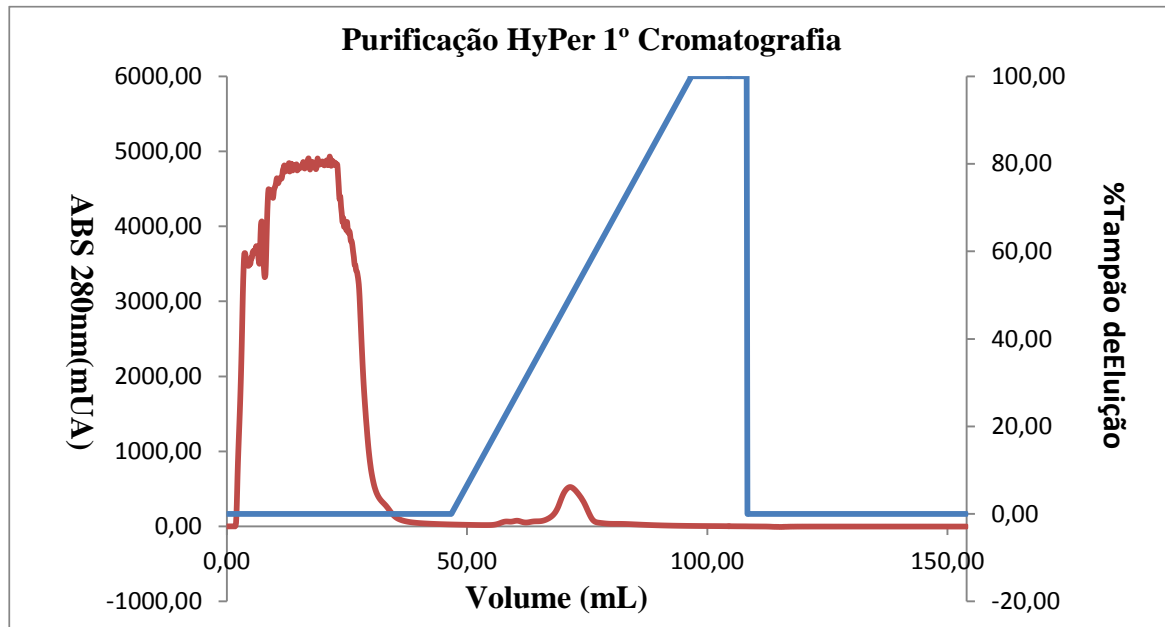


Figura 3.4 Cromatograma da Purificação da HyPer obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Vermelho) e percentagem (%) do Tampão de Eluição no sistema (Azul).

3.1.5. Corte da *His-tag* e 2ª cromatografia

O corte da fusão da Histidine-tag (*His-tag*) consistiu em adicionar ULP à amostra na proporção de 1:100 e deixou-se *overnight* a cortar. No dia seguinte realizou-se as diálises para eliminar o imidazole. Para separar a HyPer da *His-tag* foi feita uma purificação no AKTA utilizando novamente a mesma coluna pré-empacotada. Nesta segunda cromatografia espera-se que a HyPer seja recolhida no *flow-trough* e a *His-tag* recolhida quando se realizar o gradiente de eluição.

3.1.6. Avaliação da eficiência da purificação e quantificação pelo método de Bradford

Ao longo de todas as purificações efetuadas foram recolhidas as amostras do *flow-trough* 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 HyPer 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 HyPer está presente numa concentração elevada. No *flow- trough* são visíveis algumas bandas referentes à totalidade do conteúdo proteico da amostra e pode-se verificar que a ausência de uma banda forte na zona dos 50kDa significa que a HyPer aderiu na sua totalidade à coluna pré-empacotada.

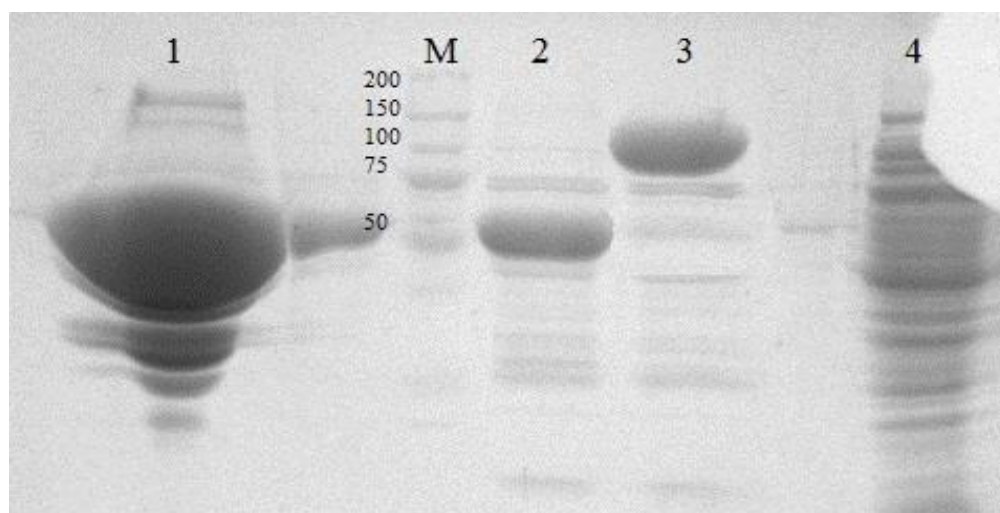


Figura 3.5 Gel de avaliação da purificação da HyPer: 1- Amostra da eluição após corte com ULP ; 2- Amostra recolhida depois da adição de ULP; 3- Amostra antes da adição de ULP; 4 – Amostra do *flow-through*; M - Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDa).

3.2. *Peroxiredoxin* IV (PRDX4)

3.2.1. Crescimento do pré-inóculo

Na tabela 3.4 são apresentados os valores de DO de 4 pré-inóculos da PRDX4 após incubação O/N a 37°C.

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

Erlenmeyer	DO(600nm)
1	2,021
2	2,132
3	2,117
4	2,206

3.2.2. Propagação de inóculos e crescimento

O inóculo para a produção de PRDX4 foi realizada em 4 *erlenmeyers*.

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

Ao fim de 3 horas de crescimento foi induzida a expressão pela adição de IPTG. A tabela 3.5 apresenta os valores da DO obtidos ao longo da fermentação, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a verde.

Tabela 3.5 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 3. A adição de IPTG é assinalada a verde.

Amostra	Tempo(h)	DO(600nm)(1)	DO(600nm)(3)
1	0	0,1	0,1
2	0,5	0,213	0,225
3	1	0,234	0,251
4	1,5	0,276	0,311
5	2	0,339	0,365
6	2,5	0,436	0,457
7	3	0,614	0,648
8	4	0,834	0,828
9	5	0,867	0,896
10	7	0,987	0,968

Em relação à cultura para expressão da HyPer, 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 (Figuras 3.6 e 3.7). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a verde.

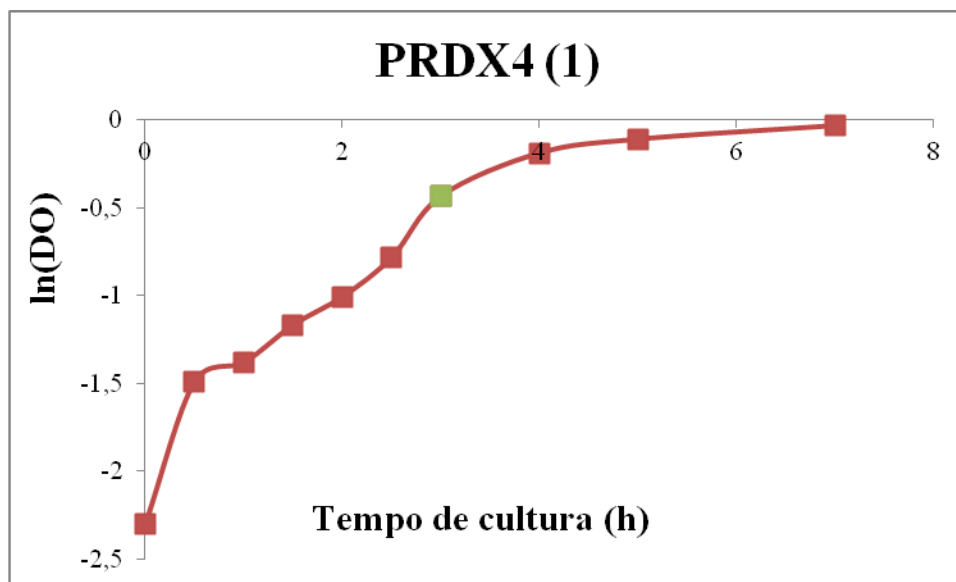


Figura 3.6 Curva de crescimento da produção de PRDX4 de amostras do balão 1. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG.

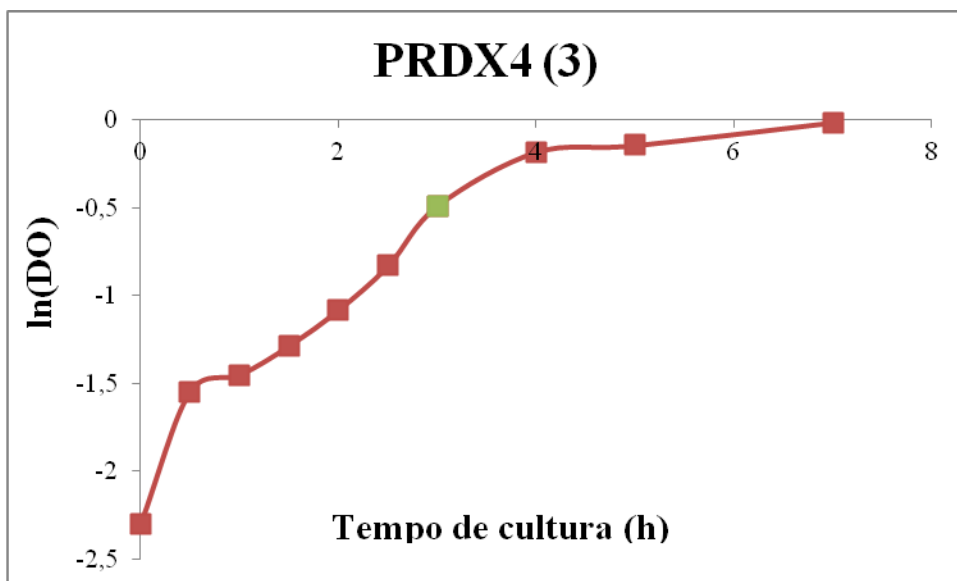


Figura 3.7 Curva de crescimento da produção de PRDX4 de amostras do balão 3. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG.

3.2.3. Avaliação da sobreexpressão

Para avaliar a sobreexpressão da PRDX4 usou-se o mesmo processo descrito anteriormente.

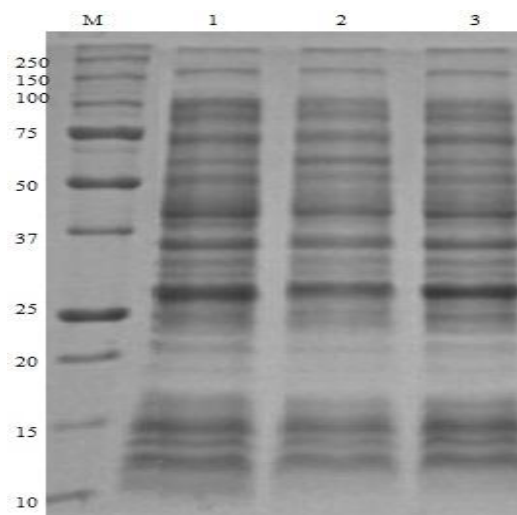


Figura 3.8 Gel de avaliação da expressão da PRDX4: 1,3- Amostras recolhidas no final da fermentação; 2- Amostra recolhida antes da adição de IPTG; M - Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDa).

É possível notar a banda correspondente à PRDX4 (~30kDA) sobreexpressa nas amostras recolhidas no final da fermentação.

3.2.4. Purificação

No cromatograma apresentado na figura 3.9, após ter sido iniciado o gradiente, foi observado um pico. As frações que correspondem a este pico foram recolhidas para posterior avaliação em gel SDS-PAGE.

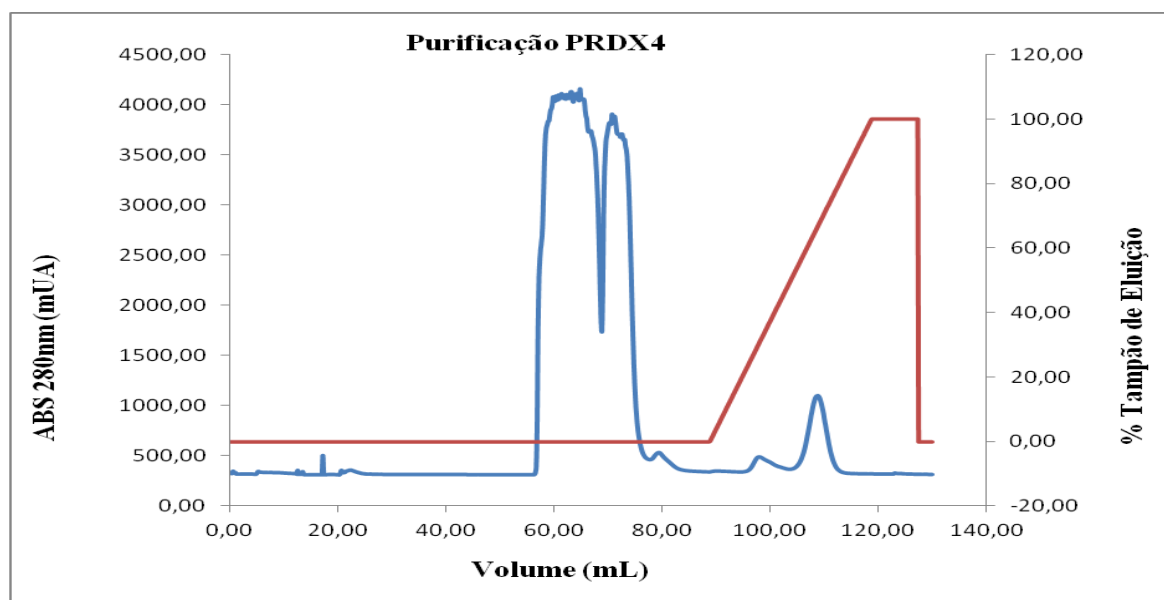


Figura 3.9 Cromatograma da Purificação da PRDX4 obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição no sistema (Vermelho).

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

Embora o gel obtido para caracterizar a purificação não tenha corrido adequadamente (dados não apresentados), foi possível observar uma banda forte que corresponde à PRDX4 com cerca de ~30kDA.

3.3. Endoplasmic Reticulum Oxireductase 1 (Ero1)

3.3.1. Crescimento do pré-inóculo

No caso da Ero1, o processo fermentativo foi realizado de maneira diferente relativamente às restantes proteínas. O pré-inóculo foi incubado durante o dia a 37°C e a fermentação decorreu durante a noite a 16°C, após indução com IPTG. Na tabela 3.6 são apresentados os valores de DO do pré-inóculo da Ero1 após incubação durante o dia.

Tabela 3.6 Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da Ero1

Erlenmeyer	DO(600nm)
1	2,054
2	2,118
3	2,132

3.3.2. Propagação de inóculos e crescimento

Devido à incubadora orbital não possuir um sistema de refrigeração, a temperatura atingida por esta foi a temperatura da sala onde esta se encontrava. Este factor poderá ter aumentado a percentagem de proteína que formou corpos de inclusão que permaneceram na fracção insolúvel. 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 2,5 horas de fermentação 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 verde.

Tabela 3.7 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 2. A adição de IPTG é assinalada a verde.

Amostra	Tempo(h)	DO(600nm)(1)	DO(600nm)(2)
1	0	0,1	0,1
2	1	0,272	0,286
3	2	0,543	0,562
4	2,5	0,617	0,667
5	3,5	0,980	0,878
6	4,5	1,233	1,319
7	5,5	1,435	1,473
9	18,5	1,909	1,950

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 (Figuras 3.10 e 3.11). A indução da expressão proteica através da adição de IPTG está assinalada a verde.

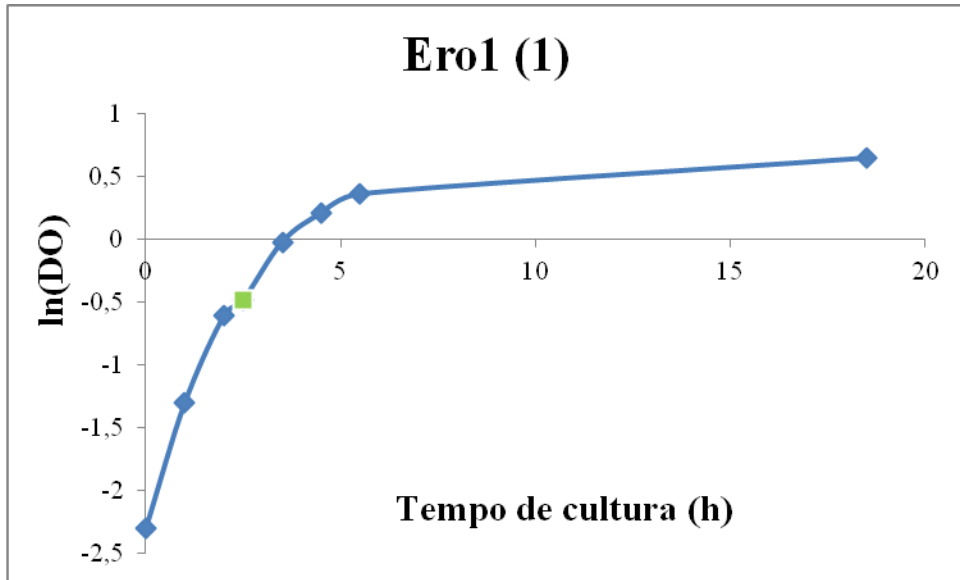


Figura 3.10 Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 1. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG.

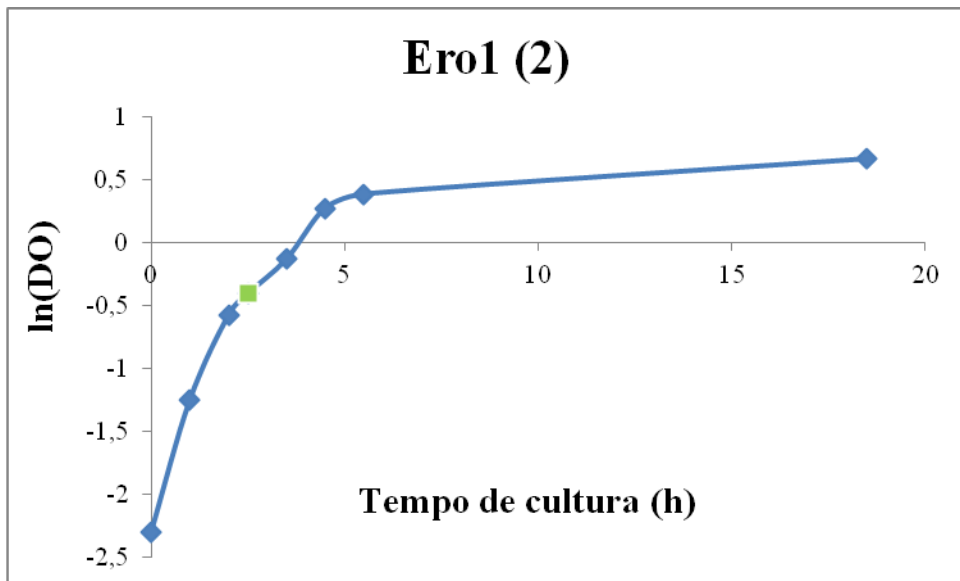


Figura 3.11 Curva de crescimento da produção de Ero1 do balão 2. O ponto assinalado a verde corresponde à altura da indução com IPTG.

3.3.3. 1º Purificação da fusão GST-Ero1

A purificação do conjunto GST- Ero1 decorreu como previsto e após o início do gradiente de eluição com glutatona reduzida ocorreu apenas um pico (Figura 3.12).

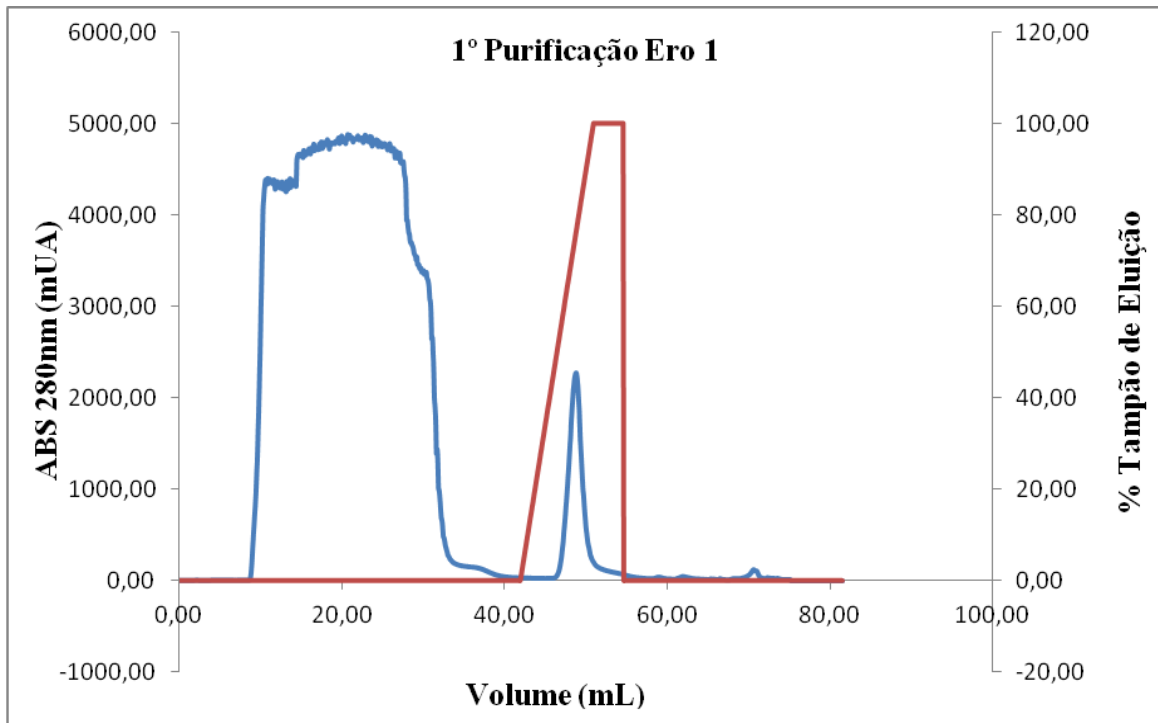


Figura 3.12 Cromatograma da 1º Purificação da Ero1 obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição no sistema (Vermelho).

3.3.4. Corte da fusão GST-Ero1 e diálise

O corte da fusão da GST-Ero1 consistiu em adicionar ULP à amostra na proporção de 1:100 como foi realizado para a HyPer e deixou-se *overnight* a cortar. No dia seguinte realizou-se as diálises para eliminar a glutatona reduzida.

3.3.5. Purificação após corte com ULP da 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-trough* e a GST juntamente com o *linker* de reconhecimento para a ULP saiam no gradiente de eluição.

3.3.6. Avaliação da eficiência da purificação

Ao analisar a eficiência da purificação pelos géis (Figura 3.3) , pode-se notar que existem 3 bandas nas amostras antes da ULP, uma entre as bandas 100 e 75, outra perto dos 50 e outra perto dos 37, era esperado apenas existir uma entre as bandas de 100 e 75, que corresponde à proteína de fusão.

As outras duas bandas provavelmente são a proteína Ero1 e a GST tag, possivelmente derivado da actividade de uma protéase no processo de purificação. Essa hipótese foi testada usando um inibidor de protéase, porém os resultados foram os mesmos. Contudo, a purificação foi um sucesso visto que na amostra do *flowthrough* da segunda cromatografia temos maioritariamente a banda correspondente à Ero1 pura.

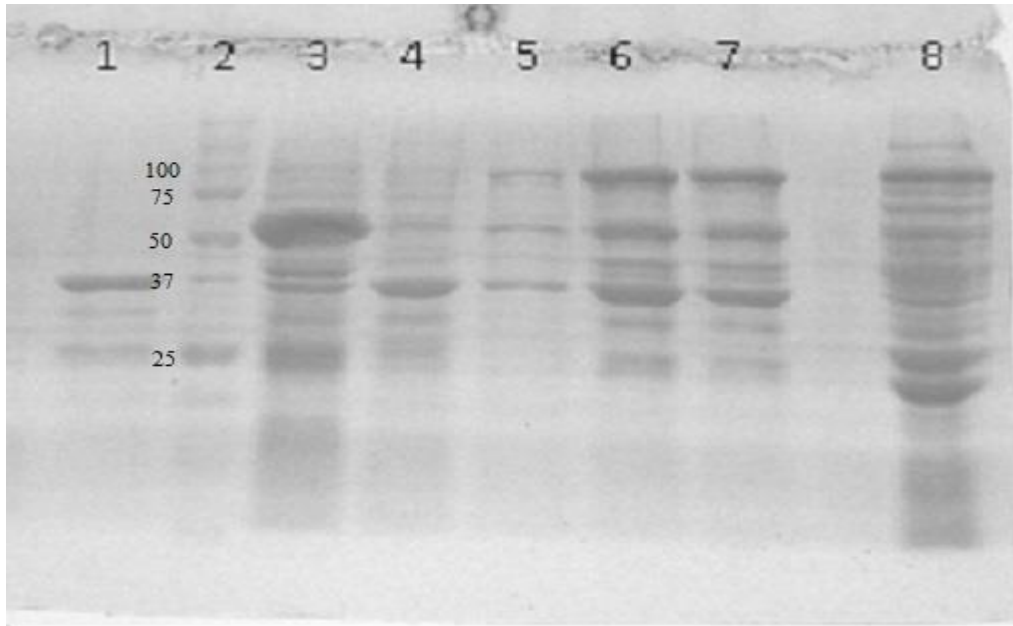


Figura 3.13 Gel de avaliação da purificação da Ero1:2-Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA); 1- Eluição com glutationa na segunda cromatografia; 3- *Flowthrough* da segunda cromatografia ; 4- Ero1 depois da ULP ; 5, 6 e 7- Ero1 antes da ULP; 8- *Flowthrough* da primeira cromatografia.

Após a produção da Ero1 foi realizada a quantificação, pelo mesmo método usado nas restantes proteínas .

3.3.7. Purificação da Ero1 em batch

Devido a alguns problemas de purificação que foram surgindo ao longo do trabalho com o anterior método de purificação, foi sugerido pelo professor usar-se beads de sefarose para extração em batch, procedendo como está descrito nos métodos.

3.4. Protein Disulfide Isomerase (PDI)

3.4.1. Crescimento do pré-inóculo

A PDI 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 3.8 são apresentados os valores de DO do pré-inóculo da PDI após incubação O/N a 37°C.

Tabela 3.8 Valores de DO obtidos para os Pré-inóculos da PDI.

Erlenmeyer	DO(600nm)
1	2,310
2	2,236
3	2,229

3.4.2. Progagação de inóculos e crescimento

O inóculo para a produção de PDI foi realizada em 3 *erlenmeyers*.

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

Ao fim de 1,5 horas de crescimento foi induzida a expressão da pela adição de IPTG. A tabela 3.9 apresenta os valores da DO obtidos ao longo da fermentação, bem como o tempo de cultura. A indução da expressão é assinalada a verde.

Tabela 3.9 Monitorização do crescimento através dos balões numerados com 1 e 2. A adição de IPTG é assinalada a verde.

Amostra	Tempo(h)	DO(600nm)(1)	DO(600nm)(2)
1	0	0,1	0,1
2	0,5	0,302	0,294
3	1	0,374	0,396
4	1,5	0,679	0,662
5	2,5	1,367	1,423
6	3,5	1,711	1,673
7	4,5	1,832	1,799
9	5,5	1,852	1,837

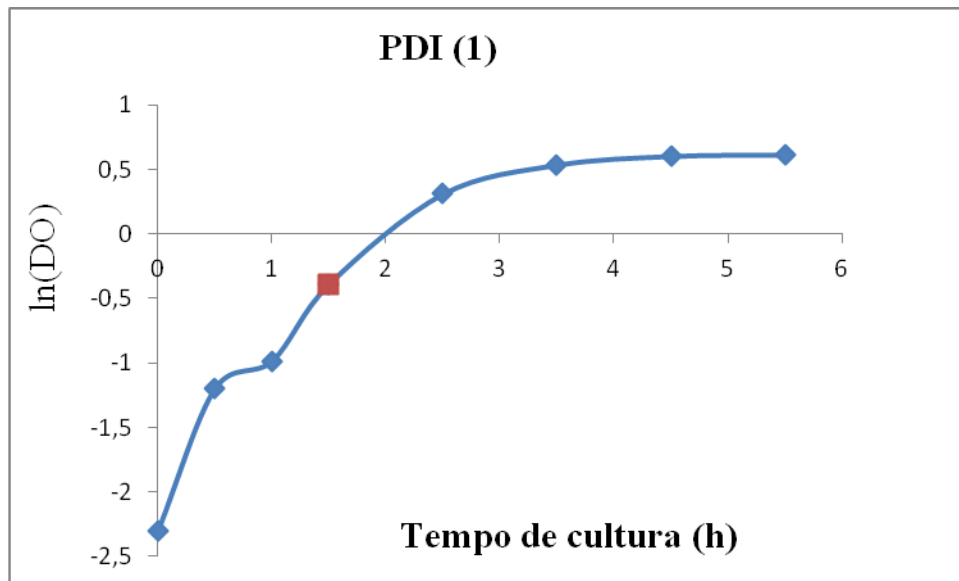


Figura 3.14 Curva de crescimento da produção de PDI do balão 1. O ponto assinalado a vermelho corresponde à altura da indução com IPTG.

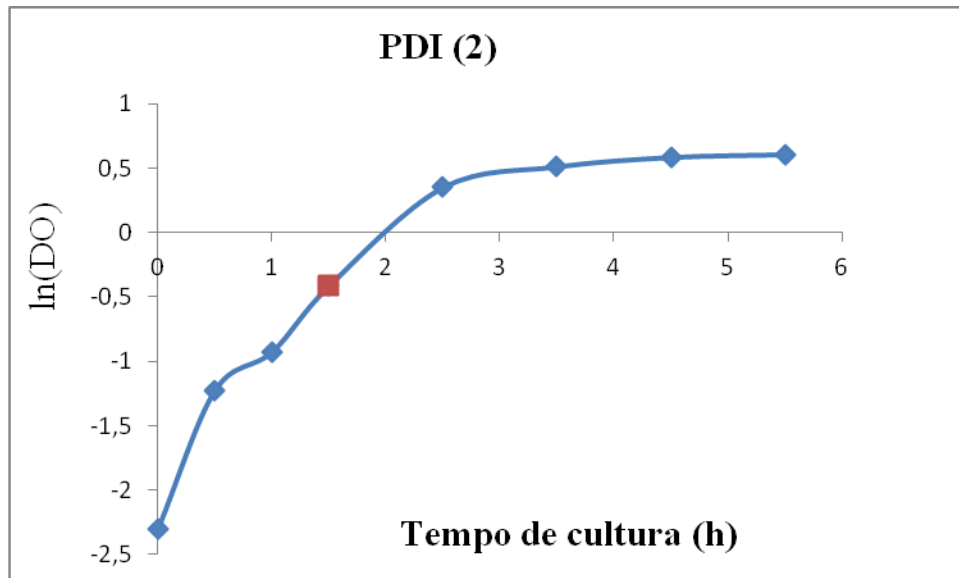


Figura 3.15 Curva de crescimento da produção de PDI do balão 2. O ponto assinalado a vermelho corresponde à altura da indução com IPTG.

3.4.3. Avaliação da Sobreexpressão

Como descrito anteriormente, foram realizados géis SDS-Page para verificar a sobreexpressão da PDI (Figura 3.16)

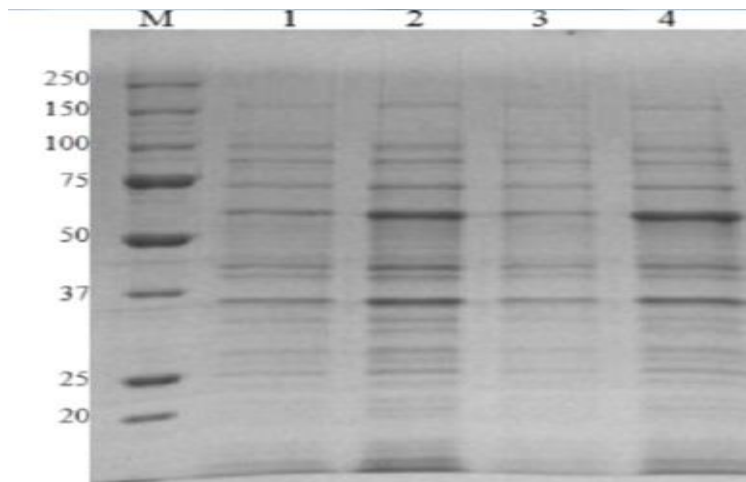


Figura 3.16 Gel de avaliação da expressão da PDI: M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDA); 1 e 3- Amostras recolhidas antes da adição de IPTG; 2 e 4- Amostras recolhidas no final da fermentação.

É visível um ligeiro aumento da espessura da banda de 55kDA~ correspondente à PDI nas amostras recolhidas depois da adição de IPTG, pelo que se pode concluir que ocorreu sobreexpressão da PDI.

3.4.4. Purificação

Após a injeção da amostra e da saída do *flow-trough* 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.

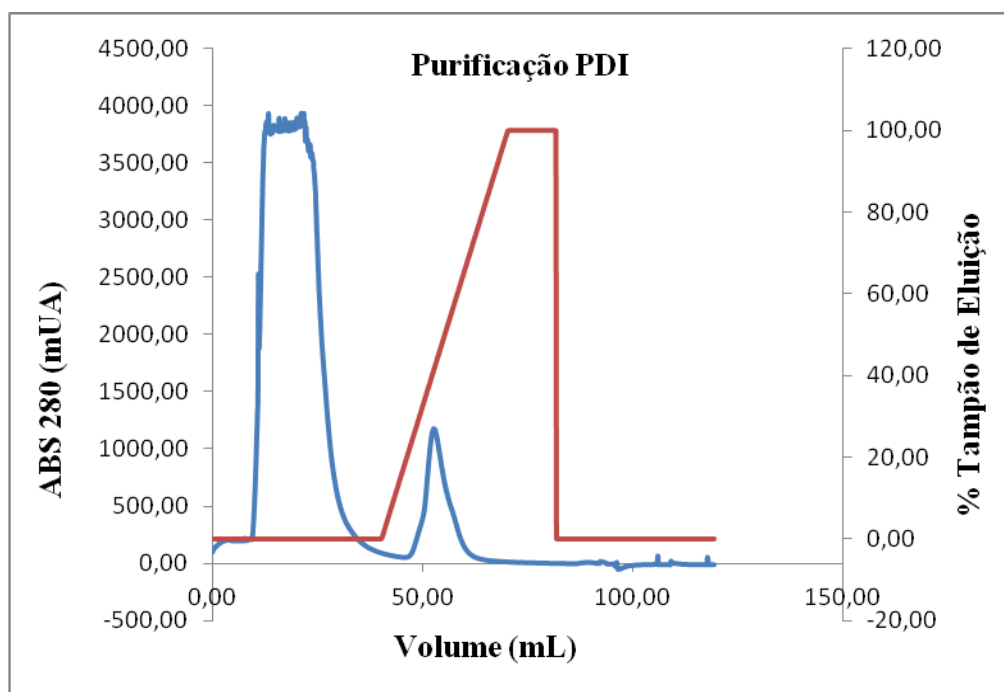


Figura 3.17 Cromatograma da purificação da PDI obtido no equipamento FPLC-ÄKTA; Parâmetros avaliados: Absorvância a 280 nm em mili-unidades de Absorvância (mUA) (Azul) e percentagem (%) do Tampão de Eluição no sistema (Vermelho).

3.4.5. Avaliação da eficiência da purificação

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 (~55kDa) está presente numa concentração elevada. (Figura 3.18)

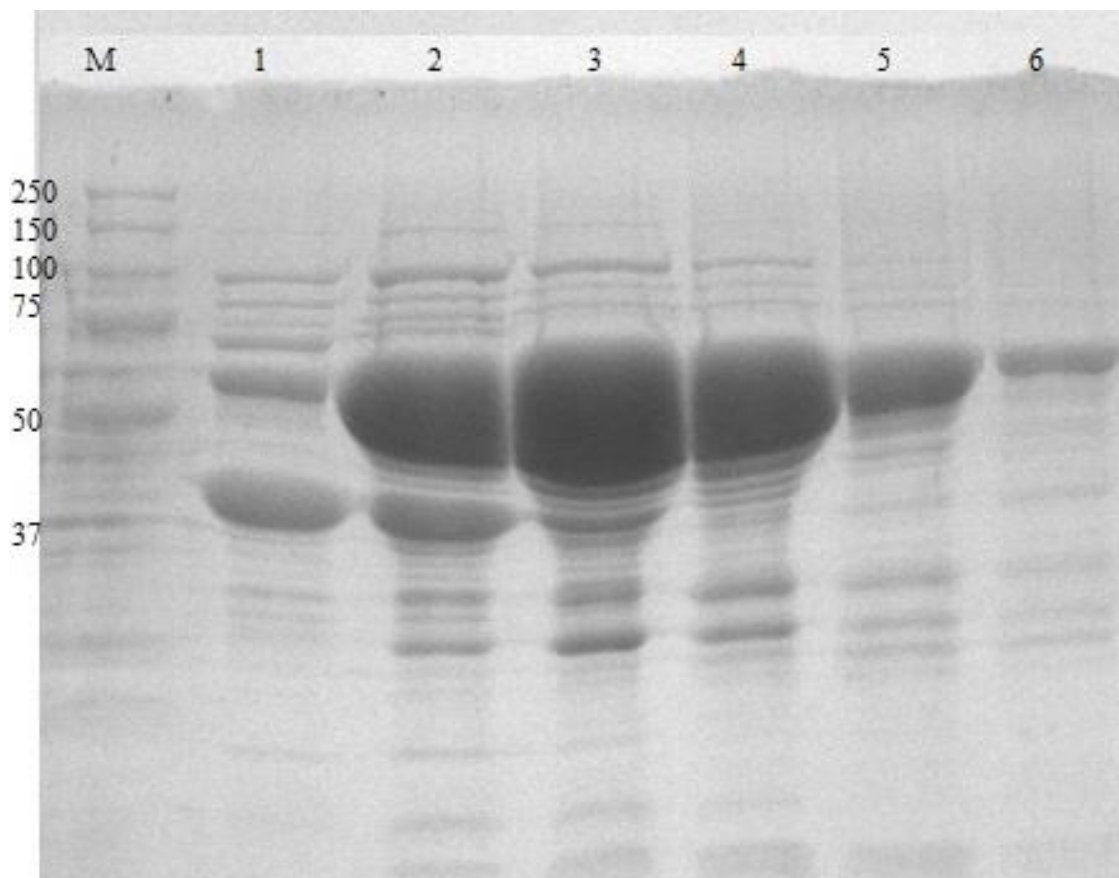


Figura 3.18 Gel de avaliação da purificação da PDI: M- Marcador *Precision Plus Protein™ Unstained Standard* (kDa); 1 a 6- Amostras recolhidas do pico de eluição.

3.5. Estudo do *refolding* oxidativo

Foram realizados vários ensaios para estudar, *in vitro*, a oxidação da HyPer catalisado pelas vias enzimáticas que operam no retículo endoplasmático. Esta proteína modelo apresenta um peso molecular de 53 kDa. A fluorescência da proteína varia com o aumento da concentração de peróxido de hidrogénio ao longo do tempo. Essa variação surge como uma variação da razão do valor de intensidade de fluorescência entre os picos a 500nm e 420nm. Ou seja, se a proteína estiver a ser oxidada, veremos um aumento progressivo da razão entre esses dois picos (500nm/420nm) ao longo do tempo até atingir um limite de 100% oxidada. Esse limite será atingido mais rápido ou mais lentamente consoante a concentração das proteínas que catalisam essa reacção.

3.5.1. Via da PDI/Ero1 usando HyPer como substrato

O estudo desta via requer a realização de espectros de fluorescência da proteína HyPer com as enzimas catalíticas em estudo, usando o programa Origin Pro para análise dos dados.

Primeiro foi necessário estabelecer os parâmetros iniciais, para tal, foram feitos pré ensaios para definir o tempo de medição e a abertura das slits para não saturar o fotomultiplicador.

Foi então defenido que seriam feitos ensaios de 120 ciclos com 10 segundos entre cada leitura e que para ensaios de HyPer cujas concentrações variassem entre 0,1 μ M e 7 μ M se usaria os *low concentration settings*, com *slits* de 3 milímetros. Para as concentrações que variassem entre 10 μ M e 16 μ M de HyPer seriam usados os *high concentration settings*, com *slits* de 2 mm. Porém mais tarde foi notado que cada leitura estava a demorar cerca de 30 segundos e não 10 segundos como defenido, continuou-se com estes parâmetros mas no tratamento de resultados foi usado intervalos de 30 segundos em vez de 10 segundos.

A intensidade de fluorescência é representada pela razão entre os picos de emissão a 420nm e 500nm, reflectindo assim a oxidação da HyPer.

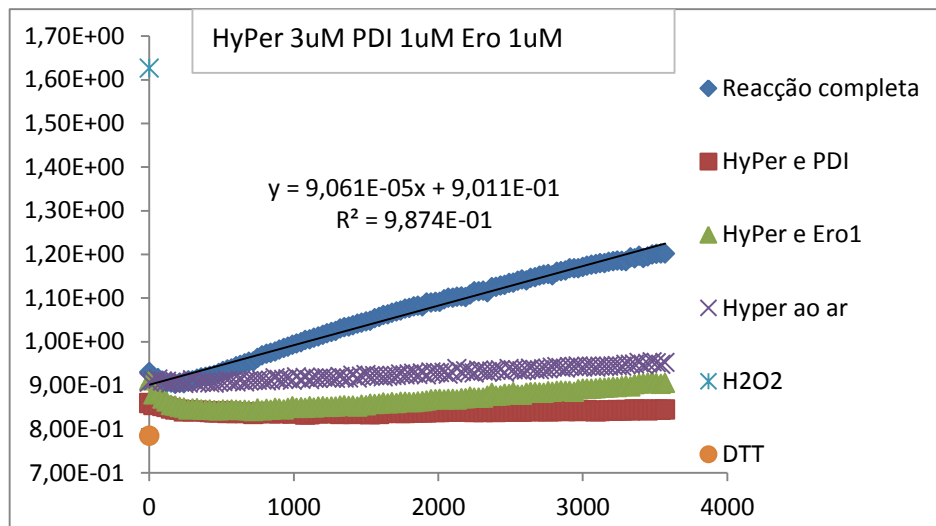


Figura 3.19 Exemplo de um gráfico de um ensaio com 3µM HyPer, 1µM Ero1, 1µM PDI da via da PDI/Ero1. Reacção completa (azul), reacção com HyPer e PDI (vermelho), reacção com HyPer e Ero1 (verde), reacção da HyPer ao ar (púrpura) e limites com H₂O₂ (azul claro) e DTT (laranja).

Como podemos ver na figura 3.19, na reacção completa podemos observar um aumento gradual da razão da fluorescência da HyPer, o que leva a concluir que está a ocorrer oxidação da mesma pela acção das enzimas PDI e Ero1 presentes no meio. Este aumento da razão das fluorescências não ocorre quando estas enzimas são adicionadas isoladamente, embora na reacção com HyPer e Ero1 exista uma certa oxidação. Esta, no entanto, é desprezável quando comparada com a reacção completa.

A oxidação do meio no controlo ao ar é desprezável visto a reacção estar a ser realizada num sistema fechado.

Para ser possível comparar a velocidade de reacção de cada ensaio e de cada via, considerou-se os primeiros pontos da reacção completa que obedeciam a uma tendência linear, e foi calculado o declive dessa linha de tendência. O valor do declive é a velocidade da reacção para essa reacção em s⁻¹.

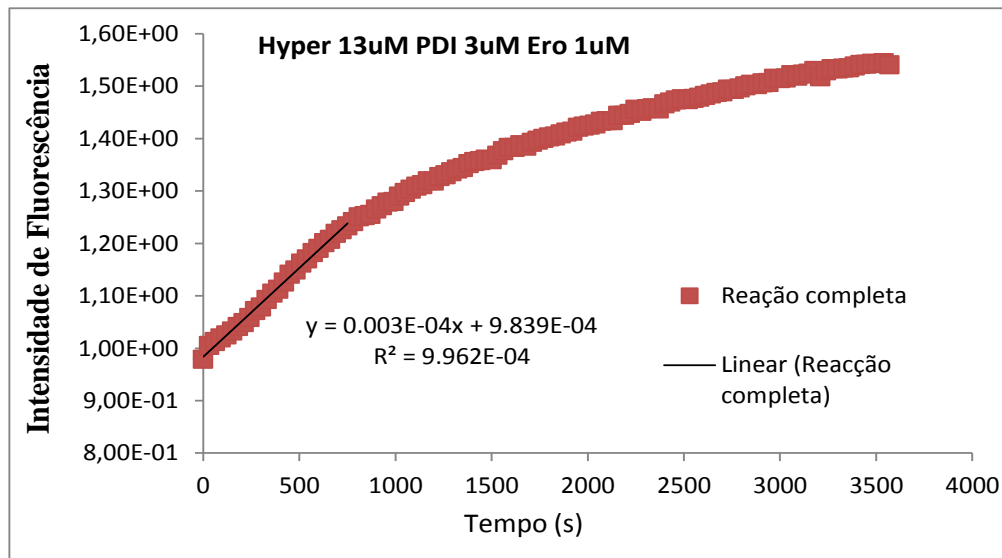


Figura 3.20 Exemplo de um gráfico de um ensaio da via PDI/Ero1. Reação completa (vermelho); a recta de regressão linear (Linha preta) foi feita considerando os primeiros pontos que mostravam uma tendência linear. A intensidade de fluorescência representa a razão entre as fluorescências a 420nm e 500nm.

Como podemos observar na figura 3.20, se considerássemos todos os pontos, a velocidade de oxidação seria menor, devido ao facto de ao longo do tempo, as proteínas e o meio de reação está cada vez mais oxidado, tendendo assim para um limite de oxidação.

O que nos interessa medir é a velocidade da reação inicial, quando a concentração da proteína substrato é aproximadamente igual à adicionada.

Tabela 3.10 Valores das velocidades de oxidação da HyPer para diferentes concentrações dos catalizadores Ero1 e PDI.

Concentração de Hyper (μM)	Velocidade de oxidação (s ⁻¹)				
	Ero1 1 μM			PDI 1 μM	
	PDI 1 μM	PDI 3 μM	PDI 5 μM	Ero1 3 μM	Ero1 5 μM
0,1	8,31E-05	6,64E-05	5,56E-04	-	7,51E-05
0,5	1,07E-04	1,91E-04	9,12E-04	2,49E-04	8,36E-05
1	1,20E-04	2,38E-04	9,46E-04	4,78E-04	1,18E-04
3	9,06E-05	1,08E-04	9,04E-04	1,01E-04	1,03E-04
5	4,13E-05	8,98E-05	5,39E-04	4,71E-05	5,80E-05
7	6,79E-05	2,57E-05	7,10E-04	2,57E-05	4,27E-05
10	5,15E-05	5,94E-05	2,95E-04	7,42E-05	7,79E-05
13	1,30E-05	3,39E-04	0,00E+00	6,67E-05	3,74E-05
16	2,31E-05	0,00E+00	0,00E+00	-	2,78E-05

Em quase todas as situações a velocidade de oxidação mantém-se ou diminui progressivamente com maiores concentrações de substrato, indicando assim que esta reação é inibida pelo substrato.

Com base nos valores da velocidade de oxidação, foi possível fazer os ‘fits’ ao traçar uma recta de regressão não linear com o auxílio do software GraphPad Prism considerando uma cinética de inibição pelo substrato com a seguinte equação:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K'_s}}$$

Figura 3.21 Derivação da equação de Michaelis-Menten para uma cinética de inibição de substrato

A velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) representa a velocidade de reação a concentrações saturadas de substrato.

Constante de Michaelis-Menten (K_M) é a concentração de substrato para a qual a a velocidade de reação é metade da velocidade máxima.

$K'S$ é a constante de dissociação do complexo enzima-substrato.

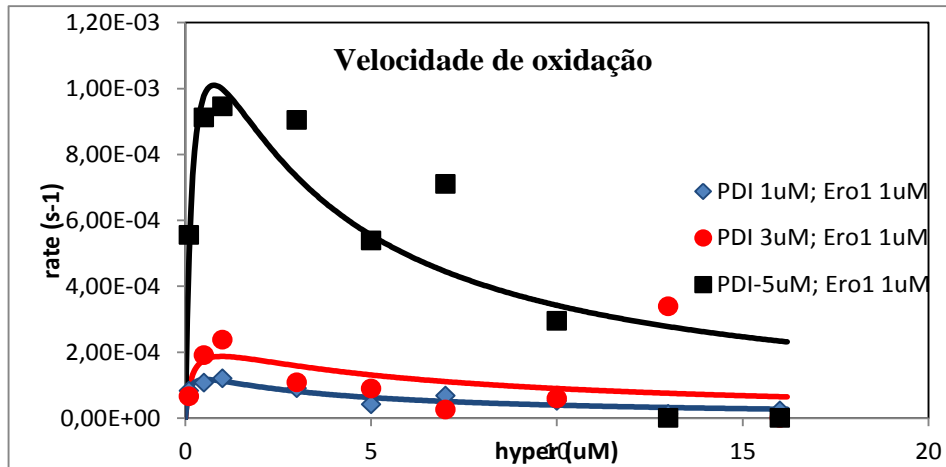


Figura 3.22 Gráfico dos 'fits' para a via da PDI/Ero1, comparando as velocidades de oxidação com o aumento da enzima PDI.

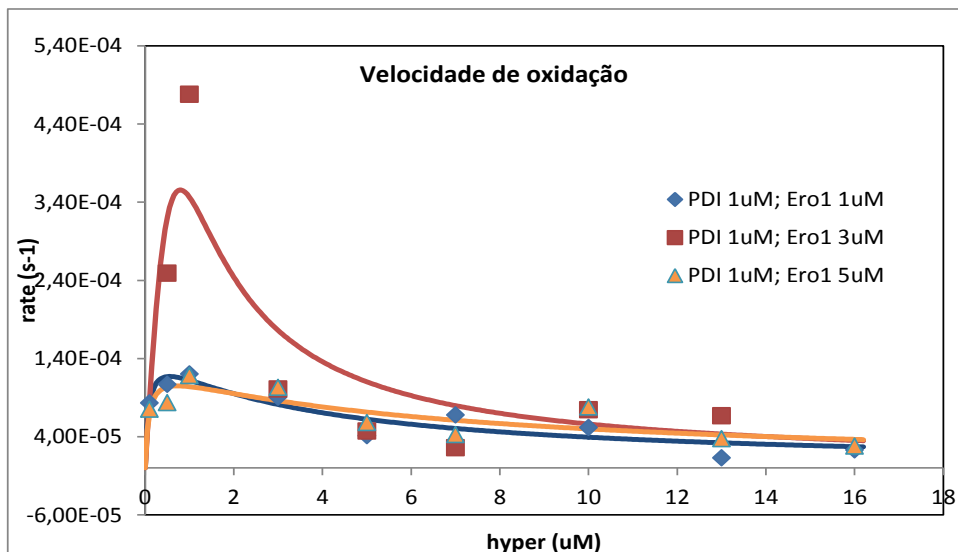


Figura 3.23 Gráfico dos 'fits' para a via da PDI/Ero1, comparando as velocidades de oxidação com o aumento da enzima Ero1.

Ao analisar as figuras 3.22 e 3.23, podemos de facto notar que há uma diferença mais significativa na velocidade da reação quando se aumenta a concentração de PDI do que no caso do aumento da Ero1, indicando que a oxidação da HyPer pela PDI é o passo limitante da velocidade da reação. A velocidade da reação ainda aumenta com o aumento da concentração da PDI de 3 μ M para 5 μ M e já não aumenta quando a concentração de Ero1 aumenta de 3 μ M para 5 μ M, pelo contrário até diminui

Tabela 3.11 Constantes cinéticas dos ‘fits’ considerando inibição pelo substrato

Constantes cinéticas	Ero1 1 μ M			PDI 1 μ M	
	PDI 1 μ M	PDI 3 μ M	PDI 5 μ M	Ero1 3 μ M	Ero1 5 μ M
KM (μ M)	8,92E-02	3,16	0,209	4,60	8,30E-02
K'S (μ M)	3,41	0,22	2,826	0,132	6,345
Vmáx (s^{-1})	1,55E-04	1,92E-3	1,56E-03	4,97E-3	1,29E-04

Tal como mencionado anteriormente, estas rectas de regressão não linear são compatíveis com um comportamento típico de inibição do substrato, existindo um aumento da velocidade de reação até certo ponto, após o qual, o aumento da concentração de substrato provoca uma diminuição da velocidade de reação. Interessante também é o facto de o aumento da concentração de Ero1 diminuir também a velocidade de oxidação., O aumento da concentração de PDI provoca um aumento dos valores de velocidade de oxidação de cerca de uma ordem de grandeza maiores que o aumento da concentração de Ero1.

3.5.2. roGFP como substrato

Usando a mesma abordagem anterior, foi necessário estabelecer os parâmetros iniciais para os ensaios usando a roGFP como substrato. Para tal foram realizados pré-ensaios e definiu-se que seriam realizados ensaios de 90 ciclos com 15 segundos entre cada leitura, com uma abertura de slits de 4 mm para concentrações de roGFP de 0,1 μM e 0,5 μM , definidos como os *low concentration settings*.

Para as concentrações de 1 μM a 10 μM foi usado uma abertura de slits de 2 milímetros, ensaios de 100 ciclos com 30 segundos entre cada leitura, estas definições foram as denominadas *high concentration settings*.

Os picos medidos foram os de 400nm e 492nm, usando o valor destes para fazer o ratio entre eles.

No tratamento dos resultados foi decidido subtrair o valor da velocidade de oxidação da roGFP ao ar ao valor da velocidade de oxidação da reação normal, de modo a desprezar a oxidação natural da roGFP ao ar.

Tabela 3.12 Valores das velocidades de oxidação para diferentes concentrações de roGFP na reação completa e ao ar.

roGFP (μM)	Velocidade de oxidação (reação) (s^{-1})	Velocidade de oxidação (ar) (s^{-1})	Velocidade de oxidação final (s^{-1})
0,1	2,19E-04	7,12E-05	1,48E-04
0,5	2,41E-04	7,50E-05	1,66E-04
1	1,05E-03	3,18E-04	7,30E-04
3	3,96E-04	1,13E-04	2,83E-04
5	6,73E-04	1,54E-04	5,19E-04
7	1,11E-03	1,51E-04	9,56E-04
10	4,09E-04	1,30E-04	5,39E-04

Tabela 3.13 Valores das constantes cinéticas da via da PDI/PRDX4 usando roGFP como sensor.

roGFP (μM)	Velocidade de oxidação (reação) (s^{-1})	Velocidade de oxidação (ar) (s^{-1})	Velocidade de oxidação final (s^{-1})
0,1	7,18E-04	2,69E-04	4,49E-04
0,5	4,19E-04	2,70E-04	1,49E-04
1	5,39E-04	1,93E-04	3,46E-04
3	3,61E-03	5,33E-04	3,07E-03
5	1,08E-03	3,59E-04	7,22E-04
7	8,28E-04	1,70E-04	6,58E-04
10	8,13E-04	5,00E-05	7,63E-04

Procedeu-se ao mesmo método para fazer os ‘fits’ destas vias com o software GraphPad Prism.

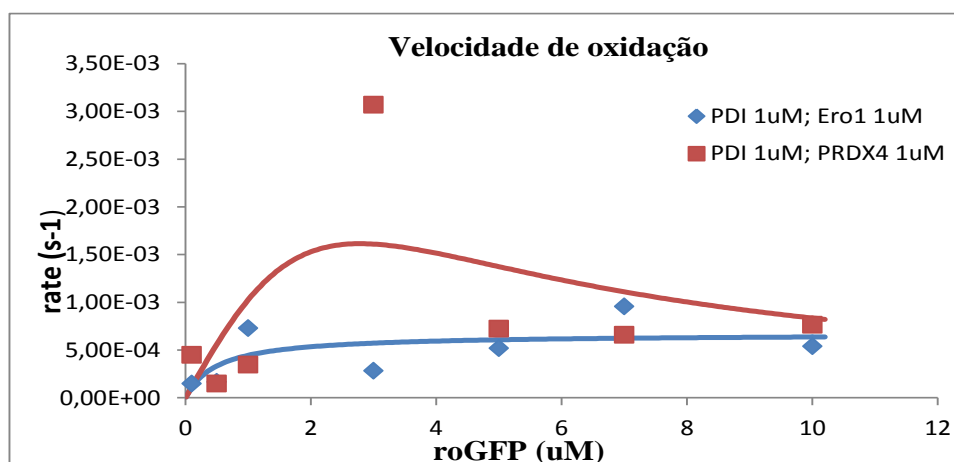


Figura 3.24 Gráfico dos ‘fits’ para a via da PDI/Ero1 e PDI/PRDX4 usando roGFP como sensor.

Tabela 3.14 Constantes cinéticas dos ‘fits’ para as vias usando a roGFP.

Constantes cinéticas	PDI 1 μ M; Ero1 1 μ M	PDI 1 μ M; PRDX4 1 μ M
KM (μ M)	5,03E-01	6762
K'S (μ M)	3,10E+15	1,15E-03
Vmáx (s^{-1})	6,69E-04	7,832

Com a análise destes dados, é possível notar que a via da PDI/Ero1, sobre as condições definidas, não aparenta apresentar inibição pelo substrato.

Por outro lado, a via da PDI/PRDX4 apresenta a curva de regressão não linear típica de uma inibição pelo substrato.

Será necessário realizar mais ensaios com diferentes concentrações de enzima e obter replicados em cada via para determinar com clareza qual das duas vias é a que desempenha um papel mais importante.

4. Conclusões

O estudo das duas vias enzimáticas envolvidas no folding oxidativo permitiu observar que em todos os casos ocorre oxidação da proteína fluorescente quando estão presentes todas as enzimas necessárias para a reação ocorrer..

Podemos ver, na via da PDI/Ero1 usando HyPer como sensor, que com o aumento da concentração da PDI há uma diferença maior na velocidade de reação do que no aumento da concentração de Ero1. Isto dá fortes indícios que a PDI desempenha um papel limitante da velocidade da reação nesta via oxidativa.

Embora não exista dados suficientes para comparar as cinéticas das vias que usam HyPer como sensor com as vias que usam a roGFP, no futuro, era importante repetir os ensaios da via da PDI/Ero1 usando a roGFP para ser possível responder à questão de qual destas vias desempenha um papel mais importante nas reações redox que ocorrem no retículo endoplasmático.

5. Bibliografia

[1] J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, "Theory of protein folding, Current Opinion in Structural Biology", vol.14, 1ª edição, pp. 70-75, 2004

[2] R.H. Austin "Unit 9: Biophysics." Annenberg Learner.
[Online] Available at: <http://www.learner.org>. [Acedido em Agosto 2014]

[3] W. A., Thomasson. "Unraveling the Mystery of Protein Folding." pp 2-5 Web, 2013

[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, Membranes and Organelles, pp. 1-12, 2011.

[5] Chaudhuri, T. K. and Paul, S. (2006), "Protein-misfolding diseases and chaperone-based therapeutic approaches." FEBS Journal, 273: 1331–1349.

[6] M. B. Metzger, "Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum and Cytosol", USA: ProQuest LLC, 2009.

[7] 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.

[8] D. P. Clark e N. J. Pazdernik, "Biotechnology: Applying the Genetic Revolution." Academic Press, 2009.

[9] 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.

[10] F. Hatahet and L.W. Ruddock. "Antioxidants & Redox Signaling., 11(11): 2807-2850, 2009

[11] C. W. Gruber, M. Č. B. Heras, J. L. Martin, D. J. Craik, "Protein disulfide isomerase: the structure of oxidative folding." Trends in Biochemical Sciences, vol. 31, 8ª edição, pp. 455-464, 2006.

[12] B. P. Tu. J. S Weissman, "The FAD- and O₂-Dependent Reaction Cycle of Ero1-Mediated Oxidative Protein Folding in the Endoplasmic Reticulum" Molecular Cell, vol. 10, 5ª edição, pp. 983-994, 2002.

[13]Carolyn S. Sevier, Chris A. Kaiser, “Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*” - *Molecular Cell Research*, vol. 1783, 4ª edição, pp. 549-556, 2008.

[14]Alison R Frand, Chris A Kaiser, “Ero1p Oxidizes Protein Disulfide Isomerase in a Pathway for Disulfide Bond Formation in the Endoplasmic Reticulum.” *Molecular Cell*, vol. 4, 4ª edição, , pp. 469-477, 1999

[15] Flavia M.M. Paula, Sandra M. Ferreira, Antonio C. Boschero, Kleber L.A. Souza, “Modulation of the peroxiredoxin system by cytokines in insulin-producing RINm5F cells: Down-regulation of PRDX6 increases susceptibility of beta cells to oxidative stress.” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 374, edição 1–2, pp. 56-64, 2013.

[16]J. Buchner e L. Moroder, “Oxidative Folding of Peptides and Proteins.” RSC Publishing, pp. 179-213, 2009.

[17]G. Ren e J. C. A. Bardwell, “Engineered Pathways for Correct Disulfide Bond Oxidation.” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 14, pp. 2399-2412, 2011.

[18] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts e P. Walter, “Molecular Biology of the Cell”, New York, 2002.

[19] R. J. Y. Chang e S. Ventura, “Folding Of Disulfide Proteins.” Springer, 2011.

[20] M. J. Feige e L. M. Hendershot, “Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis.” *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 23(2), n.º Cell Regulation, pp. 1-9, 2010.

[21] L. A. Holliman, “Going for fold in Asilomar.” Vol. 3, Nº9, pp. 41–42, 45-46, 2000.

[22] K. Inaba, “Structural basis of protein disulfide bond generation.” *Genes to Cells*, vol. 15, pp. 935-943, 2010.

[23] E. Zito, E. P. Melo, Y. Yang, A. Wahlander, T. A. Neubert e D. Ron, “Oxidative Protein Folding by an Redox Endoplasmic Reticulum-Localized Peroxiredoxin.” *Molecular Cell* , vol. 40, pp. 787-797, 2010.

[24] K. W. Walker e H. F. Gilbert, “Effect of 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.

[25] 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.

[26] S. F. Betz, "Disulfide Bonds and the Stability of Globular Proteins." *Protein Science*, vol. 2, pp. 1551-1558, 1993.

[27] 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.

[28] J.-F. Collet, *Redox Biology*, Brussels.

[29] R. E. Dalbey e G. Heijne, *Protein* London: Academic Press, 2002.

[30] C. S. Sevier and C. A. Kaiser "Formation and transfer of disulphide bonds in living cells." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, pp. 836-847, 2002

[31] R. E. Dalbey e G. Heijne, "Protein Targeting, Transport & Translocation." London: Academic Press, 2002.

[32] 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.

[33] 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.

[34] 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.

[35] 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.

[36] J. Fujii e Y. Ikeda, "Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein." *Redox Report*, vol. 7, 2002.

[37] 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.

[38] Stryer, Lubert. "The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes." *Biochemistry*. 5ª edição. New York: W.H. Freeman, 2002.

[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

[40] Choi H, Kim S, Mukhopadhyay P, Cho S, Woo J, Storz G, Ryu S. "Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor". *Cell*. 2001; 105 (1):103-13

[41] Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ "Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators.". *J Biol Chem* 279 (13): 13044–53, 2004.

[42] Ostergaard, H., Henriksen, A., Hansen, F. G., and Winther, J. R. "Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein." *EMBO J.* 20, 5853-5862, 2001.

[43] Palmer AE, Qin Y, Park JG, and McCombs JE. "Design and application of genetically encoded biosensors." *Trends Biotechnol* Mar; 29(3) 144-52, 2011.

