



JULIANE PEREIRA
DE SOUZA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES
HUMANAS ENVOLVIDAS EM
PROCESSOS IMUNES**

Relatório de Estágio do Mestrado em
Engenharia Biológica e Química

ORIENTADOR

Professora Doutora Marta Campos Justino

SUPERVISORES

Doutor Gonçalo Campos Justino

Mestre Pedro da Conceição Rosado

Julho de 2021

JULIANE PEREIRA
DE SOUZA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE
PROTEÍNAS RECOMBINANTES
HUMANAS ENVOLVIDAS EM
PROCESSOS IMUNES**

JÚRI

Presidente: Professora Doutora Maria de Lurdes de Figueiredo Gameiro, ESTBarreiro/IPS

Supervisor: Doutor José Gonçalo Deira Duarte de Campos Justino, Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

Vogal: Professora Doutora Marília Clemente Velez Mateus, Departamento de Bioengenharia, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa

Julho de 2021

Dedico esta tese
a minha mãe Mauricea Souza
e ao meu marido Jhonatas Oliveira,
sem eles este mestrado
não seria possível.

Perseverança não é uma corrida longa, são muitas corridas curtas, uma após a outra.

Walter Elliot

AGRADECIMENTOS

"A vida não pode existir em sociedade senão através de concessões recíprocas", é com esta frase de Samuel Johnson que início os agradecimentos.

Agradeço ao Doutor José Gonçalo Justino por ter-me recebido em seu laboratório de Centro de Química Estrutural no Instituto Superior Técnico (CQE/IST), assim como por ter sido meu supervisor de estágio. Tenho imensa gratidão pela Professora Matilde Marques (CQE/IST), por ter fornecido os recursos necessários para este estágio. Agradeço ao Mestre Pedro Rosado por ter sido meu supervisor, por ter-me fornecido todas as informações necessárias para a realização das experiências e por ter tido paciência de ensinar-me tudo do início ao fim do estágio. Sinto gratidão por cada membro presente no laboratório. Quando um ambiente de trabalho é agradável torna-se agradável trabalhar. Tenho muita gratidão também pela Escola Superior de Tecnologia do Barreiro, a minha orientadora da escola Professora Marta Justino, pelos professores sempre aptos a auxiliar no que fosse necessário, com especial carinho à Professora Fátima Serralha, pois diante de todas as dificuldades associadas à pandemia, ela soube se reinventar de uma maneira sem igual. Agradeço aos amigos feitos durante essa jornada, aqueles que choraram e riram comigo. Sou eternamente grata à minha mãe, Mauricea Souza e ao meu marido Jhonatas Oliveira, pois foram eles que sorriram com as minhas vitórias e foram meus pilares nos momentos de fraqueza. Agradeço a Deus por ser base da minha força. Martin Luther King disse "Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo". O final desse mestrado é apenas um degrau dessa jornada chamada vida.

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia através dos projetos UIDB/00100/2020, SAICTPAC/0019/2015 e PTDC/QUI-QAN/32242/2017.

RESUMO

A expressão de proteínas recombinantes, em escala laboratorial, tem sido uma das aplicações mais visíveis da biotecnologia. A expressão heteróloga de proteínas depende da tecnologia do DNA recombinante, que, por meio da manipulação do material genético, permite a obtenção de quase todas as proteínas nas quantidades desejadas.

Esta tese sobre clonagem e expressão de proteínas recombinantes humanas envolvidas em processos imunes apresenta o trabalho desenvolvido para clonar e expressar o Receptor 3 de Citotoxicidade Natural humano (NCR3), uma proteína de superfície expressa por células *Natural Killer*, um dos braços do sistema imunológico inato. Outro objetivo foi expressar também o ligante natural do NCR3, NCR3 Ligante 1 (NCR3LG1). Essas duas proteínas estão envolvidas na ativação da resposta inata do sistema imunológico contra proteínas tumorais que expressam NCR3LG1.

Uma estratégia tradicional de amplificação por PCR baseada em *primers* foi utilizada para amplificar as regiões a serem clonadas dos genes de interesse de plasmídeos comerciais e cloná-los no vetor pET28a(+) para a expressão controlada das proteínas, com *tag* His₆, por *lac* mediada pelo promotor T7 em células *Escherichia coli* BL21(DE3) Hi-Control™. O hNCR3 foi expresso com sucesso por indução com IPTG e foi recuperado dos corpúsculos de inclusão por purificação com *refolding* de proteína em coluna. O hNCR3LG1 foi expresso usando condições semelhantes, e foi recuperado do conteúdo celular por cromatografia de afinidade simples à base de níquel.

Verificou-se que as proteínas produzidas estabelecem um complexo de 1: 1 *in vitro*, conforme determinado por uma abordagem simples de eletroforese em gel nativo, mantendo assim a funcionalidade desejada.

Palavras-Chave: Sistema imunológico; NCR3 / NKp30; Clonagem; Expressão de proteína; Modelo bacteriano.

ABSTRACT

Recombinant protein expression, at a laboratory scale, has been one of the most visible applications of biotechnology. Protein heterologous expression depends on recombinant DNA technology, that, by manipulating the genetic material, allows obtaining almost any protein in the desired amounts.

This thesis on cloning and expression of human recombinant proteins involved in immune processes presents the work developed to clone and express the human Natural Cytotoxicity Receptor 3 (NCR3), a surface protein expressed by Natural Killer cells, one of the arms of the innate immune system. Another goal was also to express NCR3's natural ligand, NCR3 Ligand 1 (NCR3LG1). These two proteins are involved in activating the immune system innate response against NCR3LG1-expressing tumoral proteins.

A traditional primer-based PCR amplification strategy was employed to amplify the regions to be cloned of the genes of interest from commercial plasmids and clone them into the pET28a(+) vector for T7 promoter-mediated *lac*-controlled expression of His₆ tag-fused proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) Hi-Control™ cells. hNCR3 was successfully expressed by IPTG-induction and was recovered from purification bodies by on column-protein refolding. hNCR3LG1 was expressed using similar conditions and was recovered from cell contents by nickel-based simple affinity chromatography.

The produced proteins were found to establish a 1:1 complex *in vitro*, as determined by a simple native gel electrophoresis approach, thus retaining the desired functionality.

KEYWORDS: Immune system; NCR3/NKp30; Cloning; Protein expression; Bacterial model.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sistema imune	1
1.1.1. Componentes do sistema imune	1
1.1.2. Resposta adquirida	2
1.1.3. Resposta inata	3
1.1.4. Mecanismos de sinalização celular	4
1.2. Proteínas envolvidas na resposta inata mediada pelas células NK.....	6
1.3. Tecnologia de ADN recombinante.....	7
1.3.1. Clonagem molecular	8
1.3.2. Reação em cadeia da polimerase	8
1.3.3. Expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	9
1.3.4. Purificação de proteínas	11
1.4. Objetivos	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1. Estratégia de clonagem	13
2.2. Estirpes utilizadas	16
2.3. Protocolos genéricos	16

2.3.1.	Preparação das células competentes	16
2.3.2.	Transformação das células competentes <i>Escherichia coli</i> DH5α	17
2.3.3.	Extração dos plasmídeos a partir de <i>E. coli</i> DH5α	17
2.3.4.	Purificação de ADN a partir do gel de agarose.....	17
2.3.5.	Quantificação de ADN	17
2.3.6.	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	17
2.3.7.	Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida em condições nativas	18
2.3.8.	Quantificação de proteína pelo método de Bradford	18
2.4.	Amplificação do ADN codificante	19
2.4.1.	Análise por eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de PCR	20
2.4.2.	Digestão dupla dos produtos de PCR.....	21
2.5.	Ligação plasmídeo- <i>Insert</i>	22
2.5.1.	Extração dos Plasmídeos pET-28(a)+	22
2.5.2.	Digestão dos plasmídeos pET-28(a)+	22
2.5.3.	Ligação do ADN ao plasmídeo pET-28(a)+	23
2.6.	PCR de colônias.....	24
2.7.	Transformação da <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hi-Control.....	25
2.8.	Sobre-expressão das proteínas recombinantes hNCR3 e hNCR3LG1.....	25
2.8.1.	Indução com IPTG e autoindução.....	25
2.8.2.	Lise celular.....	26
2.8.3.	Lise dos corpúsculos de inclusão.....	26
2.8.4.	Purificação por cromatografia de afinidade de metal imobilizado	27
2.8.5.	Purificação por cromatografia de afinidade de metal imobilizado com <i>refolding</i> . 27	
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
3.1.	Amplificação do ADN	29

3.1.1.	Otimização de temperatura de hibridização	29
3.1.2.	PCR de amplificação do ADN	31
3.1.3.	Isolamento e quantificação de ADN do gel de agarose	32
3.1.4.	Quantificação do plasmídeo pET-28(a)+	33
3.1.5.	Quantificação de ADN após digestão enzimática	34
3.2.	Transformação dos produtos de ligação em <i>Escherichia coli</i> DH5 α	34
3.3.	PCR de colônias	35
3.4.	Expressão de proteínas – estabelecimento de condições experimentais	38
3.5.	Expressão de proteínas	41
3.5.1.	Análise por SDS-PAGE da expressão em meio de autoindução	46
3.6.	Purificação a partir de corpúsculos de inclusão com <i>refolding</i> em coluna	48
3.7.	Quantificação de proteínas	49
3.8.	Interação do receptor hNCR3 com o ligante hNCR3LG1	50
4.	CONCLUSÕES	53
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
6.	ANEXOS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representação de células do sistema imune [2].	2
Figura 2: Indução dos mecanismos da resposta inflamatória.	3
Figura 3: Células NK e reconhecimento de células tumorais.	5
Figura 4: Interação entre o ligante da célula alvo e o receptor da célula NK com desencadeamento da resposta imune.	6
Figura 5: A interface de ligação hNCR3 – hNCR3LG1.	7
Figura 6 - Reação em Cadeia de Polimerase representada em três etapas.	9
Figura 7 - Plasmídeo de expressão pET28a(+) [32].	10
Figura 8 - Esquema de indução do sistema pET.	10
Figura 9 - A região a expressar encontra-se sublinhada.	14
Figura 10 - A <i>tag</i> de hexahistidina é apresentada a vermelho e o local de proteólise pela trombina a azul.	14
Figura 11 - A região a expressar encontra-se sublinhada.	15
Figura 12 - A <i>tag</i> de hexahistidina é apresentada a vermelho e o local de proteólise pela trombina a azul.	15
Figura 13 – Análise dos produtos de PCR de otimização de temperatura para amplificação dos genes <i>hncr3</i> e <i>hncr3lg1</i> , eletroforese em gel de agarose (1% m/v).	30
Figura 14 - Análise dos produtos de PCR de amplificação dos genes <i>hncr3</i> e <i>hncr3lg1</i> por eletroforese em gel de agarose (1% m/v).	31
Figura 15 - Produto da PCR da amplificação do ADN <i>hncr3lg1</i> (plasmídeo comercial).	32
Figura 16 – Resultado do crescimento <i>overnight</i> de <i>E. coli</i> DH5 α transformada com os produtos de ligação.	36
Figura 17 - Análise dos produtos de PCR de amplificação dos genes <i>hncr3</i> e <i>hncr3lg1</i> .	37

Figura 18 – Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da expressão da proteína hNCR3 induzida com IPTG.	39
Figura 19 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3 não induzida com IPTG.	39
Figura 20 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da expressão da proteína hNCR3LG1 induzida com IPTG.	40
Figura 21 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3LG1 não induzida com IPTG.	40
Figura 22 - Cromatograma da proteína hNCR3 com absorvância a 280 nm.....	41
Figura 23 - Cromatograma proteína hNCR3LG1 com absorvância a 280 nm.....	42
Figura 24 - Proteína hNCR3LG1 após a purificação com imidazol em fluxo em escada.	43
Figura 25 - Proteína hNCR3LG1 após a purificação com imidazol em fluxo em escada.	43
Figura 26 - Proteína hNCR3 após a purificação com imidazol em fluxo em escada.....	44
Figura 27 - Proteína hNCR3 após a purificação com imidazol em fluxo em escada..	44
Figura 28 – Gel após concentração das proteínas..	45
Figura 29 - Amostra da proteína hNCR3 após a autoindução e purificação com imidazol.. .	47
Figura 30 - Amostra da proteína hNCR3LG1 após a autoindução e purificação com imidazol	47
Figura 31 – Receptor hNCR3 induzido com IPTG.....	48
Figura 32 – Receptor hNCR3 induzido com IPTG após purificação com imidazol; esperado 14,9 kDa.....	49
Figura 33 – Interação entre o receptor hNCR3 e ligante hNCR3LG1; esperado 43,9 kDa... 51	
Figura A 1 - Mapa do plasmídeo pCMV3-NCR3 [57].....	61
Figura A 2 - Mapa do plasmídeo pET28a(+)-Hs_NCR3 [58].....	62
Figura A 3 - Mapa do plasmídeo pCMV3-NCR3LG1 [59].....	63
Figura A 4 - Mapa do plasmídeo pET28a(+)-Hs_NCR3LG1 [60].....	64

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação das sequências codificantes a partir dos plasmídeos originais.....	14
Tabela 2 – Misturas reacionais preparadas para reações de PCR.....	20
Tabela 3 – Volumes utilizados nas digestões enzimáticas de <i>hncr3</i> e <i>hncr3lg1</i>	21
Tabela 4 - Reações de digestão do plasmídeo pET-28 ^a (+) para as ligações a realizar	22
Tabela 5 – Preparação das reações de ligação.....	23
Tabela 6 - <i>Master Mix</i> da PCR das colônias	24
Tabela 7 - Densidade ótica das amostras	26
Tabela 8 - Quantificação do ADN recuperado dos géis de agarose	33
Tabela 9 - Quantificação do plasmídeo pET28a(+) extraído	33
Tabela 10 – Quantificação dos produtos obtidos após as digestões com as enzimas de restrições	34
Tabela 11 - Quantificação dos plasmídeos com os ADN de interesse isolados a partir de <i>E. coli</i> DH5 α transformada.....	38
Tabela 12 - Quantificação das proteínas.....	50
Tabela 13 – Misturas preparadas para incubação do receptor hNCR3 com o ligante hNCR3LG1 para estudo de interação. Proporção 1:1 (receptor: ligante) equivale a 0,15 mg/mL de receptor para 1,01 mg/mL de ligante.....	51

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
FD	Fator diluição
FW	<i>Forward</i>
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
LB	Luria Bertani
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NCR3	<i>Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3</i>
NCR3LG1	<i>Natural Killer Cell Cytotoxicity Receptor 3 Ligand 1</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OD	Densidade ótica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RPM	Rotações por minuto
RV	<i>Reverse</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth with Catabolites repression</i>
TCR	Receptor de linfócito
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidades formadoras de colónia

1. INTRODUÇÃO

1.1. SISTEMA IMUNE

O estudo da imunologia é recente, sendo a sua origem atribuída, por alguns autores, a Edward Jenner que em 1776 verificou a proteção induzida pelo vírus da varíola bovina contra a varíola humana - este processo foi nomeado de vacinação [1]. O sistema imune, responsável pela resposta do organismo a agentes patogênicos, é constituído por células, tecidos, órgãos especializados e por moléculas utilizadas para eliminação de agentes patogênicos e de células tumorais, tendo a finalidade de manter a homeostasia do organismo [1] [2]. Estas células e moléculas destroem ou inativam o agente patogênico e, por este motivo, são essenciais para garantir a defesa do corpo contra infecções ou a transformação pró-carcinogênica de células [3].

1.1.1. COMPONENTES DO SISTEMA IMUNE

As estruturas envolvidas na resposta imunológica incluem:

- Antígeno: consiste em qualquer molécula que o sistema imune consiga identificar como estranho, provocando uma resposta imunológica [4];
- Anticorpo: também denominadas de imunoglobulinas, são proteínas produzidas por linfócitos B e que se ligam fortemente ao antígeno; cada anticorpo é específico para um determinado antígeno [4];
- Células do sistema imune: os leucócitos que incluem os neutrófilos, os eosinófilos, os basófilos, os monócitos, as células dendríticas, os linfócitos T, os linfócitos B e as células *Natural Killer* (NK), como demonstrado na Figura 1 [2];
- Órgãos linfoides: os órgãos responsáveis pela produção, crescimento e maturação de linfócitos e outras células do sistema imune. Estes órgãos correspondem à medula óssea, ao timo, as amígdalas, à placa de Peyer (tecidos ovalados e densos localizados na membrana do intestino), aos vasos linfáticos, aos nodos linfáticos, ao apêndice e ao baço, entre outros [2] [3].

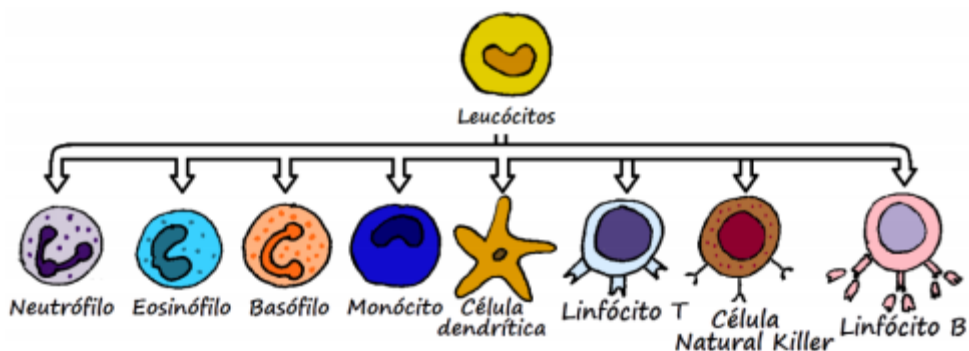


Figura 1: Representação de células do sistema imune [2].

A comunicação entre as várias componentes do sistema imune é feita através de mediadores de inflamação, moléculas de baixo peso molecular que constituem uma rede organizada de comunicação e de amplificação de respostas biológicas (celulares e moleculares) e que têm como base o fenômeno inflamatório. Para a indução deste fenômeno podem contribuir inúmeros mecanismos, sistematizados em dois grandes grupos: os associados à resposta adquirida e os associados à resposta inata, esquematizadas na Figura 2. A resposta inata é obtida através de células como macrófagos, as células NK, os neutrófilos e as células endoteliais. As funções destas células são: a fagocitose (processo pelo qual uma célula usa sua membrana plasmática para englobar partículas grandes), a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a apresentação de antígenos e a produção de citocinas, eicosanóides e quimiocinas, entre outros. A ativação do sistema complemento, com conseqüente recrutamento de leucócitos e eventual lise celular de células anormais, é um dos resultados da ativação da resposta inata [5].

Por outro lado, a resposta adquirida é obtida através de linfócitos T com glicoproteínas $CD8^+$ e $CD4^+$, os linfócitos T $CD4^+$ produzem citocinas dos tipos Th1 (*T helper 1*) e Th2 (*T helper 2*), e os linfócitos B que produzem imunoglobulinas, que são anticorpos dos tipos IgE e IgG₁. Estes fatores são responsáveis pela lise celular, opsonização (revestimento do agente patogênico, de modo a facilitar a fagocitose), ativação do sistema complemento, destruição de parasitas. A ativação desregulada do sistema imune pode ter efeitos colaterais como, por exemplo, o desencadeamento de doenças autoimunes, como asma e alergias, em que o sistema imune ataca células do próprio organismo [5].

1.1.2. RESPOSTA ADQUIRIDA

A resposta adquirida (adaptativa ou específica) é obtida ao longo da vida, não estando presente desde o nascimento. Esta imunidade é ativada após contato inicial com diferentes agentes invasores. O sistema imune adaptativo gera uma memória imunológica específica para cada agente externo, o que confere proteção contra novas infecções com o mesmo antígeno. As células participantes na resposta adquirida são os linfócitos T e os linfócitos B, que reconhecem os antígenos através de regiões polipeptídicas, denominadas epítopos, responsáveis por se ligarem aos receptores de superfície celular dos linfócitos. A vacinação é um processo de manipulação da resposta imune adquirida. Este tipo de imunidade pode perdurar durante toda a vida ou apenas por um período de tempo [6] [7].

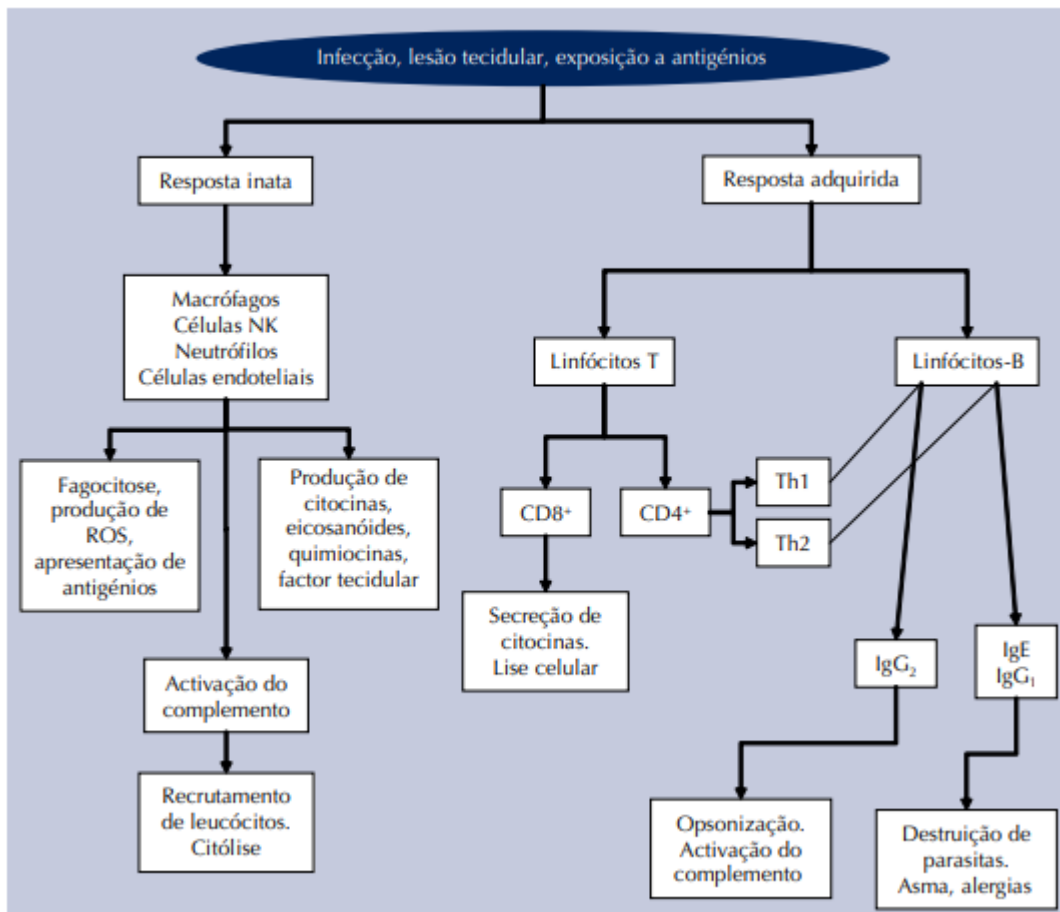


Figura 2: Indução dos mecanismos da resposta inflamatória. A resposta inata é obtida através de células como os macrófagos, as células NK, os neutrófilos e as células endoteliais. Estas células são responsáveis por realizar a fagocitose, a produção de ROS, a apresentação de antígenos, a produção de citocinas, eicosanóides, quimiocinas, entre outros. Após a indução destes mecanismos, acontece a ativação do sistema complemento e eventual lise celular das células alvos. A resposta adquirida é obtida através de Linfócitos T, que possuem glicoproteínas CD8⁺ e CD4⁺, linfócitos T com a glicoproteína CD8⁺ são responsáveis pelo desencadeamento da secreção de citocinas e pela lise celular, enquanto os linfócitos T com a glicoproteína CD4⁺ são responsáveis pelo desencadeamento de citocinas dos tipos Th1 e Th2, que em conjunto da ação dos linfócitos B e produção de imunoglobulinas, vão ativar a opsonização, e destruição de parasitas e ou desencadear doenças autoimunes, como asma e alergias [5].

1.1.3. RESPOSTA INATA

A resposta inata consiste na resposta rápida e inalterada, ou seja, estereotipada por ser preconcebida, a um determinado número de estímulos. É caracterizada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, produzidas por todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores. As principais células envolvidas na imunidade inata são os macrófagos, os neutrófilos, as células dendríticas e as células *Natural Killer* (NK). Os principais mecanismos na imunidade inata são a fagocitose, a liberação de mediadores inflamatórios, a ativação de proteínas do sistema do complemento, bem como a síntese de proteínas plasmáticas, também chamadas proteínas de fase aguda (APPs), como citocinas e quimiocinas. A resposta imune inata pode ser ativada por padrões moleculares associados a patógenos, que consistem em moléculas como lipopolissacarídeos, resíduos de manose e ácido teicoico, comumente encontrados

na superfície dos microrganismos. Estas moléculas interagem com diferentes receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões, sendo da família dos receptores *Toll-like* (*Toll like receptor*, TLR). Esta interação é semelhante à complementaridade entre antígeno e anticorpo ou antígeno e receptor de linfócitos T (*T cell receptor*, TCR), mas no caso da imunidade inata não há diversificação dos receptores, nem capacidade de adaptação para a geração de novos receptores ou reconhecimento de novos padrões moleculares que não aqueles já programados no código genético [8].

1.1.4. MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

As células NK são maiores do que os linfócitos T e B, apresentam citoplasma granular e marcadores de superfície CD16 (também conhecido como FcγRIIIa) e CD56 (molécula de adesão celular neural - NCAM). O mecanismo de ação destas células é rápido, podendo levar poucas horas desde o reconhecimento do antígeno até a função citotóxica mediada pela secreção de citocinas, perforinas, granzimas, interferon γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF- α). As células NK apresentam diversos receptores de superfície responsáveis pela identificação de agentes infecciosos e de células transformadas. A participação nesse processo de moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC-I), em especial as moléculas do sistema do antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen*, HLA), foi fundamental para o entendimento da função das células NK [9].

No genoma dos mamíferos, mais especificamente no genoma humano, a região que tem maior variabilidade conhecida forma o MHC, que contém um grande número de diferentes *loci* que codificam genes funcionais. Esses genes pertencem ao sistema HLA e codificam as principais moléculas encarregadas da apresentação do antígeno na superfície das células [10]. O MHC é formado por proteínas apresentadoras de antígenos essenciais para a discriminação das células normais, alteradas e não próprias, através da regulação da atividade da célula NK via interações com os receptores. As moléculas de MHC são divididas em duas classes: classe I e classe II. As células NK são capazes de identificar células malignas ou células infectadas por vírus através da sua expressão reduzida de moléculas MHC classe I, referindo ao *loss of self*, ou hipótese do *missing-self*, também reconhecida como “perda da expressão do próprio”. Essa hipótese sugere que células NK induzem a apoptose de células que não expressam MHC de classe I na sua superfície [11].

As células NK expressam uma grande variedade de receptores que permitem detectar as células-alvo, enquanto poupam as células normais, incluindo receptores de inibição, de ativação, de adesão e de citocinas. A integração da resposta desses receptores e dos sinais recebidos pelas células determinam se uma célula NK se tornará ou não ativa. As células NK são tolerantes às células saudáveis, pois a “força” dos sinais de ativação é amortecida pela ativação dos receptores inibitórios. Quando as células do organismo estão com uma atividade anormal elas deixam de apresentar em sua superfície ligantes do sistema do complemento; quando um receptor inibidor de uma célula NK não interage com o ligante que normalmente seria expresso por uma célula normal, as células NK desencadeiam uma resposta imunológica que leva à eliminação das células anormais, devida a ação de citotoxicidade ou por via indireta através da produção de citocinas como IFN- γ . Esta ativação ou inibição das células NK está apresentada na Figura 3 [12].

As células NK apresentam receptores de superfície denominados *killer immunoglobulin-like receptor* (KIR), da família das imunoglobulinas, que estão divididos em grupos funcionais de inibidores, responsáveis por evitarem a lise de células normais, e de ativadores, que causam a lise das células alvo. Os receptores inibidores reconhecem o HLA de classe I prevenindo o ataque das células NK contra células normais. Por outro lado, quando o receptor ativador é ativado os receptores KIR inibidores não reconhecem as células-alvo. A capacidade de atacar as próprias células que não possuem expressão do HLA-I é conhecida como a *missing self-recognition*, mencionada anteriormente [13].

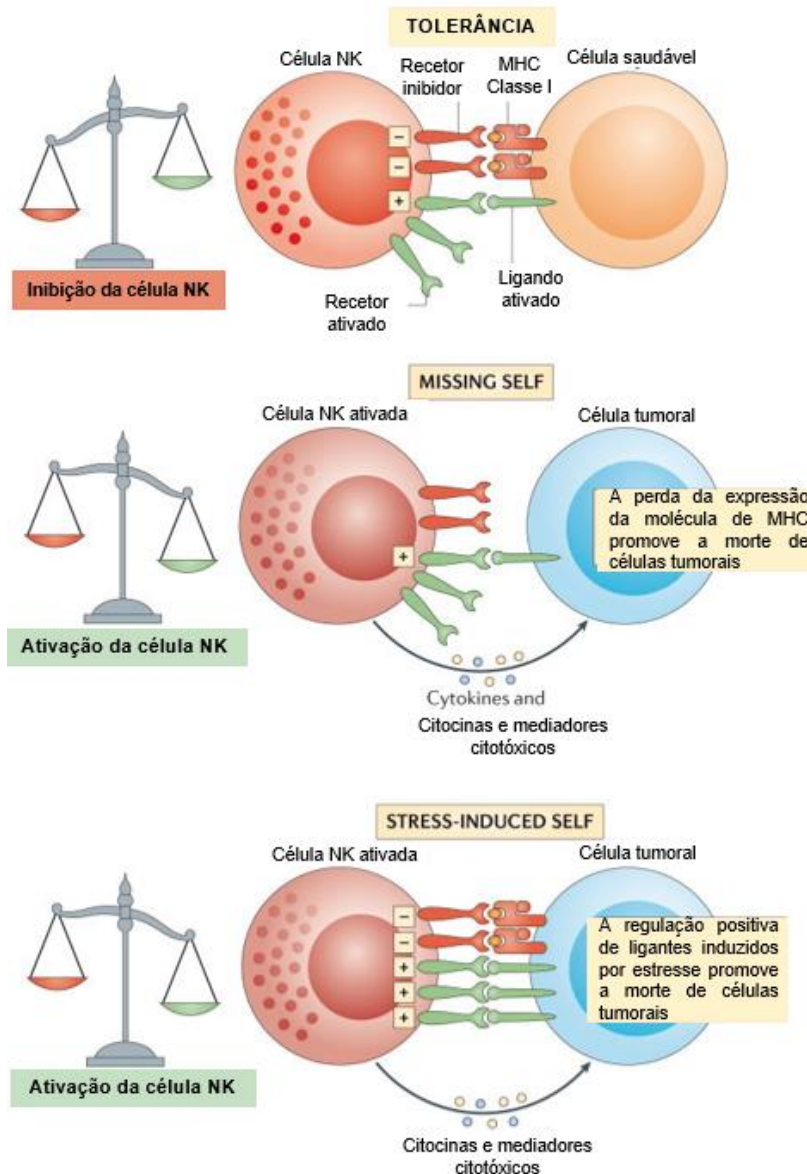


Figura 3: Células NK e reconhecimento de células tumorais. A célula NK é inibida na presença de todos ligantes (MHC-I) na superfície da célula alvo. A célula NK é ativada em duas situações: ausência de ligantes de superfície na célula alvo, caracterizando o *missing self* e quando existe muita interação entre os receptores da célula NK e os ligantes da célula alvo, caracterizando o *stress-induced self* [12].

1.2. PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INATA MEDIADA PELAS CÉLULAS NK

As vias intracelulares de sinalização envolvidas no desencadear da resposta citolítica mediada pelas células NK têm início com a interação entre um ligante membranar da célula alvo e um receptor extracelular da célula NK, demonstrado na Figura 4. Esta interação, específica leva à transmissão de sinais intracelulares nas células NK, que culmina na liberação de citocinas e enzimas pró-citolíticas, como perforinas e interleucinas, como referido anteriormente [14].

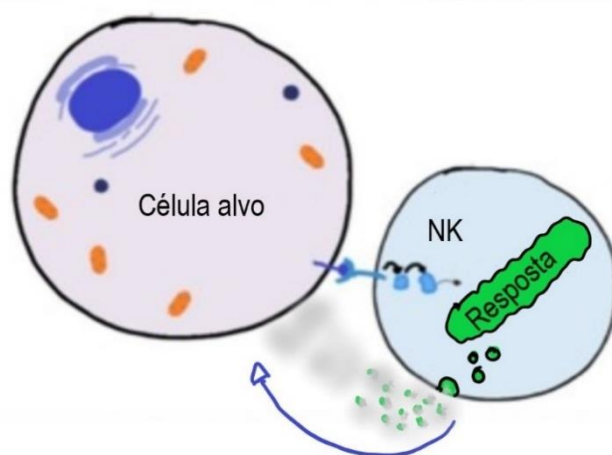


Figura 4: Interação entre o ligante da célula alvo e o receptor da célula NK com desencadeamento da resposta imune.

A descoberta da ativação de receptores de células NK, incluindo os receptores naturais de citotoxicidade (*natural cytotoxicity receptor*, NCR), revelaram que além de um sinal inibidor ausente, os sinais de ativação também são necessários para o desencadeamento da resposta das células NK e para a lise das células alvo [15].

A família NCR inclui as proteínas NCR4 (NCR1 ou CD335), NKp44 (NCR2 ou CD336), NKp30 (NCR3 e CD337) e Nkp80. Em humanos, o receptor NCR4 é codificado no sistema HLA, enquanto NKp44 e NKp30 são codificados na região de classe III do locus MHC. Estes receptores ativadores são glicoproteínas transmembranares do tipo I, compreendendo um (NKp44 e NKp30) ou dois (NKp46) domínios extracelulares do tipo imunoglobulinas. Recentemente, foi demonstrado que o NKp30 se liga ao fator nuclear BAT3 e à proteína B7-H6 da superfície de células tumorais [15] [16].

O receptor hNCR3 é uma glicoproteína transmembranar tipo I composta por um único domínio extracelular do tipo imunoglobulina ligada por uma parte transmembranar ao domínio citoplasmático [15]. O *hncr3* é um dos NCRs expressos principalmente na superfície das células NK, e tem como alvo as células infectadas por vírus, células transformadas e células dendríticas imaturas. A proteína hNCR3 reconhece o antígeno tumoral *hncr3lg1*, antígeno não expresso normalmente e encontrado apenas em células tumorais, marcando-as como alvos para a ação citotóxica das células NK [17].

O receptor hNCR3 é uma proteína com estrutura quarternária, formada por dimerização. Cada cadeia polipeptídica é constituída por 201 aminoácidos, e tem uma massa molecular de 21,6 kDa, sendo responsável pela ligação do hNCR3LG1 [18] [19].

Um dos ligante naturais do receptor hNCR3 é o ligante hNCR3LG1, também conhecido como B7-H6. Como outros membros da mesma família, o domínio extracelular do ligante hNCR3LG1 é composto por um domínio tipo distal V da membrana e um domínio tipo C proximal da membrana [15]. O ligante NCR3LG1 que desencadeia a ativação de células NK através da ativação do receptor hNCR3, é uma estrutura monomérica com 476 aminoácidos e uma massa molecular de 50,8 kDa [20] [21] [22].

No complexo receptor- ligante, 12 resíduos do receptor hNCR3 estabelecem contatos com 11 resíduos do ligante hNCR3LG1 por meio de interações predominantemente hidrofóbicas, sem moléculas de água ligadas na interface (Figura 5) [15].

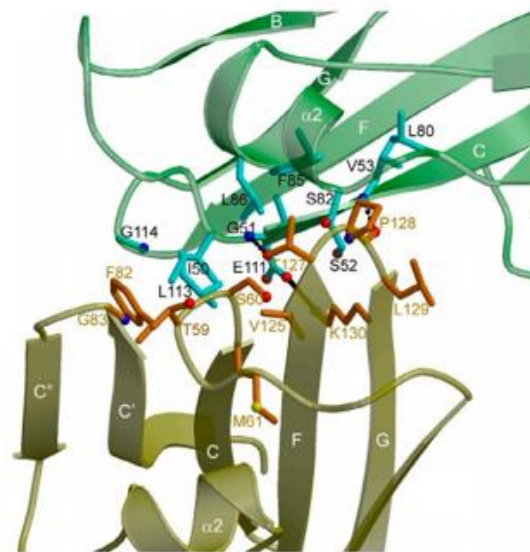


Figura 5: A interface de ligação hNCR3 – hNCR3LG1. A interação entre as duas proteínas envolve os resíduos em ciano do receptor hNCR3 e os resíduos em laranja do ligante hNCR3LG1 [15].

1.3. TECNOLOGIA DE ADN RECOMBINANTE

As técnicas de engenharia genética começaram a ser definidas no início dos anos 70, com o desenvolvimento do conhecimento sobre o ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN). A engenharia genética ou tecnologia de ADN recombinante consiste num conjunto de técnicas que permitem aos cientistas identificar, isolar, multiplicar e expressar genes de quaisquer organismos. A possibilidade de realizar modificações genéticas nos organismos resultou da colaboração íntima e constante entra a ciência básica e a ciência aplicada. As técnicas de ADN recombinante baseiam-se nas propriedades do ADN, formado por duas cadeias de desoxirribonucleotídeos, complementares e com orientação oposta. O ADN é estável em meio alcalino, devido ao fato das bases nitrogenadas serem constituídas por anéis levemente alcalinos, que contém nitrogênio. O ADN pode ser desnaturado e regenerado, pode ser sintetizado quimicamente e, para além

dessas características, as propriedades são universais, ou seja, não diferem de um organismo para outro [23] [24] [25].

1.3.1. CLONAGEM MOLECULAR

O primeiro experimento de clonagem de ADN foi feito em 1972 por um grupo chefiado por Paul Berg, que veio a receber o prêmio Nobel em 1980. A clonagem é um processo de fazer várias cópias idênticas de um fragmento específico de ADN. A tecnologia de ADN recombinante foi definida com a utilização de vetores de clonagem, em geral. Plasmídeos e genomas virais, e com a utilização de enzimas de restrição, que permitem cortar o ADN em locais bem definidos, isolando-se assim fragmentos de ácido nucleico passíveis de serem introduzidos num dado vetor. Os plasmídeos são moléculas circulares de ADN e que apresentam os genes necessários para se replicarem independentemente da replicação do ADN genómico. Enquanto os cromossomas são moléculas grandes com toda a informação necessária para os processos biológicos normais, os plasmídeos são menores e apresentam um número reduzido de genes úteis em situações específicas, como genes de resistência a antibióticos. A manipulação genética compreende quatro fases: escolha do gene a ser utilizado, corte deste fragmento, transferência e inserção no organismo hospedeiro e, finalmente, seleção das células que possuem o clone alvo [25] [26].

1.3.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Para amplificar a sequência de interesse são realizadas reações em cadeia de polimerase (PCR). A técnica da PCR foi desenvolvida nos anos 80, e baseia-se no processo de replicação do ADN que ocorre *in vivo*, envolvendo três etapas (Figura 6). A primeira etapa consiste na desnaturação, onde o ADN que contém a sequência a ser amplificada é desnaturado por aquecimento durante aproximadamente 30 s. A segunda etapa consiste no *annealing* ou hibridização, emparelhamento de um par de oligonucleotídeos (*primers*) que delimitam a região do ADN a ser amplificada. Esta etapa ocorre numa temperatura mais atenuada, que pode variar dos 50^o-68 °C, dependendo da sequência dos *primers*. A última etapa consiste na extensão ou polimerização, onde uma ADN polimerase adiciona as bases complementares, formando uma nova fita e então tem-se novamente a duplicação da fita de ADN. Este processo acontece a uma temperatura média de 72 °C, porém esta temperatura depende da polimerase utilizada. O ciclo inteiro é então reiniciado. Na prática, a amplificação efetiva do ADN requer de 20 a 40 ciclos de reação, dependendo da polimerase, com os produtos de cada ciclo a servir como ADN molde para o próximo ciclo [27] [28].

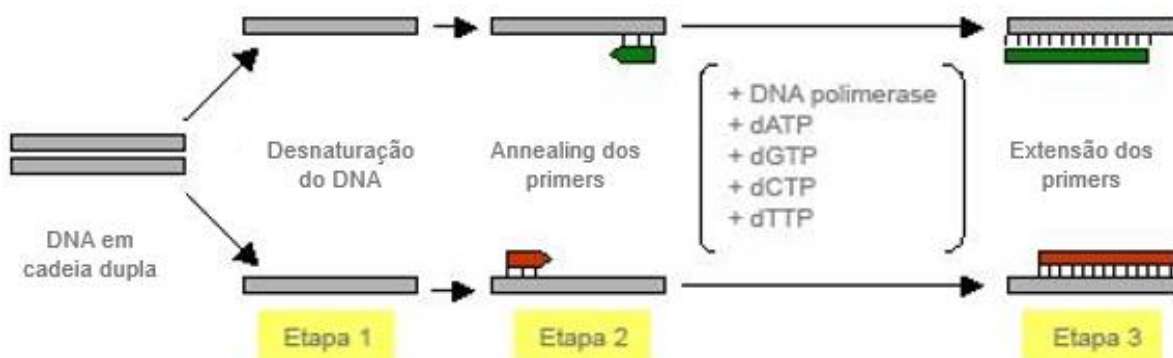


Figura 6 - Reação em Cadeia de Polimerase representada em três etapas: desnaturação – onde é dada a abertura das fitas de ADN; *annealing* – etapa que ocorre o emparelhamento dos *primers*; extensão das cadeias – são feitas novas fitas de ADN a partir das fitas molde [29].

1.3.3. EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM *ESCHERICHIA COLI*

O objetivo de uma expressão heteróloga é produzir grande quantidade de uma proteína recombinante [30]. O sistema de expressão adequado depende da proteína a ser produzida. É necessária percepção do dogma central da biologia molecular para a produção de proteínas recombinantes, uma vez que este compreende os três processos principais que a célula utiliza para que a informação genética seja expressa: replicação, transcrição e tradução. Um plasmídeo de expressão contém um promotor forte e um local de clonagem múltipla, além da origem de replicação, da sequência que confere resistência e locais de corte por enzimas de restrição [31].

Os plasmídeos da família pET, como apresentado na Figura 7, são utilizados para expressar proteínas recorrendo à T7 ARN polimerase, e para isso só funcionam em estirpes que expressam esta polimerase. A T7 ARN polimerase é altamente específica e apenas transcreve ADN a jusante de uma região denominada T7 promotora, e apenas até encontrar uma região T7 terminadora; estas duas regiões não são mais do que pequenas sequências de ADN onde a polimerase liga e desliga da cadeia molde. O *operon lac* (conjunto de genes) é semelhante ao utilizado pelas estirpes selvagens de *Escherichia coli*, sendo então reprimido pelo repressor *lacI* na ausência de indutor (lactose ou isopropiltiogalactosídeo, IPTG) e induzido em sua presença. Neste sistema, a indução da proteína de interesse é indireta. A T7 ARN polimerase se liga em sua região promotora que está presente no plasmídeo pET, e então, o gene de interesse é transcrito e a seguir, a proteína é expressa. A indução da expressão é apresentada na Figura 8 [31].

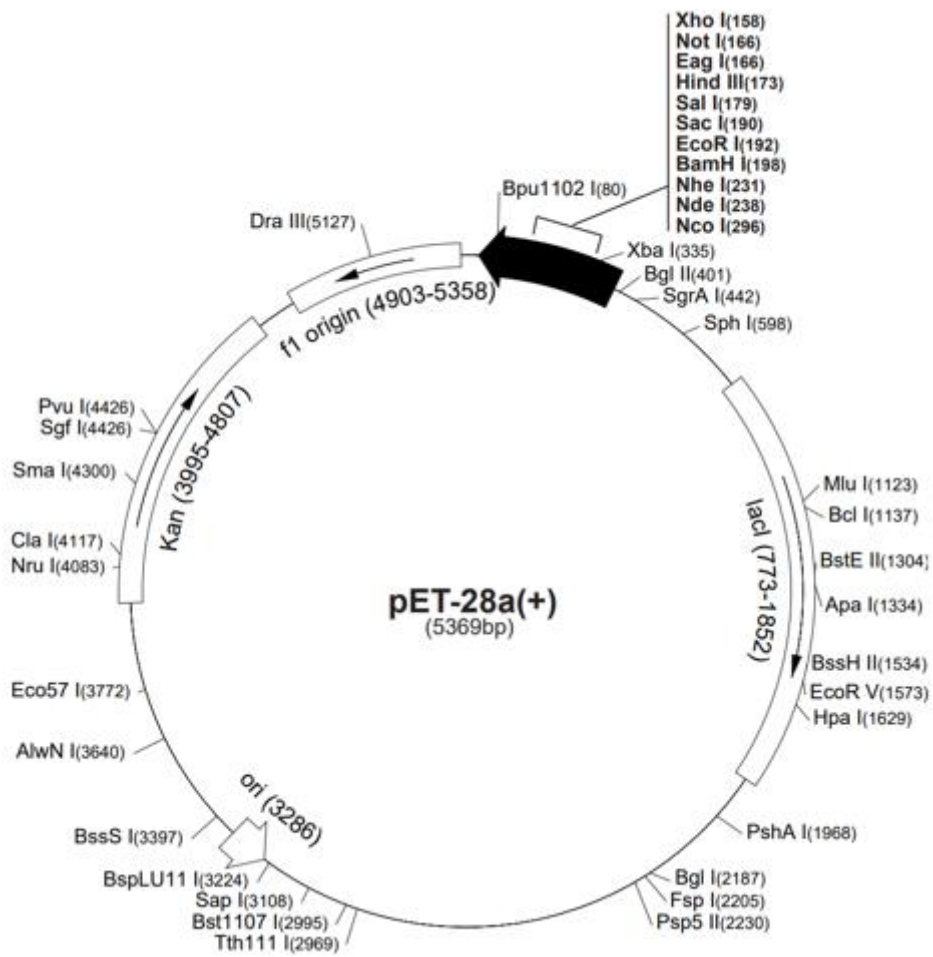


Figura 7 - Plasmídeo de expressão pET28a(+) [32].

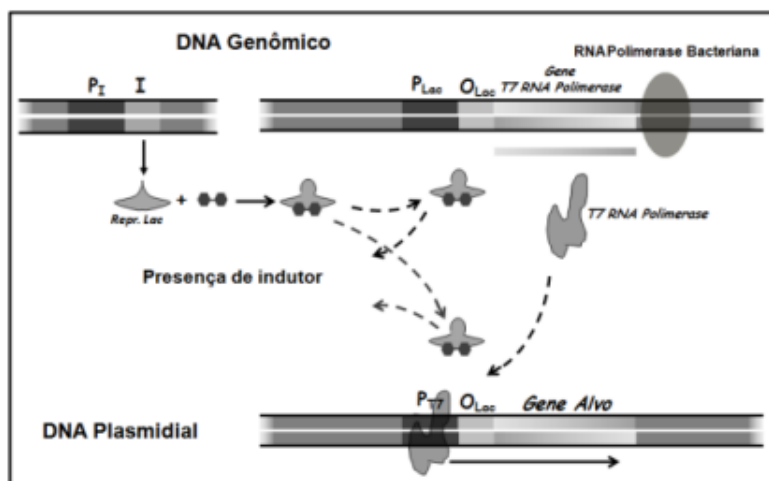


Figura 8 - Esquema de indução do sistema pET. Na presença de indutor, o repressor não se liga ao ADN genômico e a T7 ARN polimerase é expressa. Esta então se liga em seu promotor presente no ADN do plasmídeo expressando assim a proteína [31].

O critério de seleção do sistema de expressão depende de alguns fatores tais como: aplicação do produto, custo, velocidade de produção, rendimento, funcionalidade e qualidade da proteína recombinante. Entre as possibilidades de sistemas de expressão estão células dos mamíferos, células de insetos, células vegetais, leveduras e bactérias, sendo este último o sistema mais utilizado, com principal destaque para a *Escherichia coli*, uma bactéria bacilar Gram-negativa. Existem diversas vantagens relacionadas a sua utilização tais como: fácil cultivo em larga escala; meio de cultura simples e de baixo custo; espécie bem caracterizada e facilidade de manipulação genética; baixo risco de contaminação viral ou por prions, e poder-se obter altos níveis da expressão. A principal desvantagem relacionada com a utilização de *E. coli* é devido incapacidade de realizar corretamente as modificações pós-traducionais, especialmente a glicosilação, necessárias para conferir atividade biológica a muitas proteínas. Além das vantagens e desvantagens, a *E. coli* também possui algumas limitações como a produção de proteínas heterólogas intracelulares, sendo que há necessidade de estágios de processamento adicionais para romper as células e remover os debris celulares, maiores gastos com a purificação da proteína de interesse, e por fim existe também a formação de agregados insolúveis de proteínas heterólogas parcialmente enoveladas, os chamados corpúsculo de inclusão [33].

1.3.4. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas possuem diferentes propriedades, que podem ser utilizadas como base para diferentes formas de purificação. A purificação de proteínas pode ser feita por uma série de etapas e técnicas que devem obedecer uma sequência lógica, isto porque durante as etapas de purificação podem ocorrer perdas de amostra e com isso diminuir o rendimento. É necessário saber o máximo de informações sobre as propriedades da proteína a ser purificada e dos possíveis contaminantes. A purificação consiste numa combinação de técnicas que exploram as diferentes propriedades da proteína alvo para isolá-la das demais. Após a etapa de purificação pode ser feito uma eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS de modo a avaliar a pureza [34].

Em 1974 Everson e Parker demonstraram que íons metálicos presentes em metaloproteínas são os principais responsáveis pela adsorção dessas em resinas contendo quelantes imobilizados, eles então exploraram esta afinidade na separação deste tipo de proteínas. Esta técnica popularizou-se com o trabalho publicado por Porath e colaboradores em 1975, quando os autores introduziram o termo cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (*immobilized metal-ion affinity chromatography*, IMAC) [35]. A técnica IMAC baseia-se na afinidade diferencial que íons metálicos imobilizados numa matriz sólida apresentam por certos grupos expostos na superfície de uma molécula em solução. Esta afinidade resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre um íon metálico quelatado e certos resíduos de aminoácidos, tais como os grupos imidazol das cadeias laterais de resíduos de histidina, que doam elétrons para os íons metálicos, ou seja, atua como base de Lewis. O agente quelante é acoplado a uma matriz sólida por meio de ligações covalentes. O íon metálico, por sua vez, é imobilizado ao agente quelante por ligações de coordenação formadas entre o íon metálico e átomos de azoto, oxigênio ou enxofre presentes na estrutura do agente quelante. As proteínas e outros solutos introduzidos na fase móvel são adsorvidos principalmente pela formação de ligações de coordenação com sítios remanescentes dos íons metálicos quelatados. As moléculas

adsorvidas podem ser eluídas por competição com outras espécies com maior afinidade para o metal (por exemplo, com imidazol) [36].

Uma cromatografia consiste numa técnica de separação de misturas, baseada na passagem desta mistura através de duas fases, uma estacionária (fixa) e outra móvel. A separação depende da diferença de interação dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária. Numa IMAC capacidade de interação com metais é avaliada através da cromatografia de afinidade com metal imobilizado, esta técnica tem vantagens em ter elevada sensibilidade, resolução e capacidade de purificação [37].

Diversos plasmídeos codificam para histidina, para a expressão e produção de proteínas recombinantes, isto torna a IMAC uma escolha atraente e versátil para purificação rápida e confiável de proteínas. O pequeno tamanho da sequência de histidina significa que, em muitos casos, ela pode permanecer associada à proteína alvo sem interferência na sua função pretendida, evitando a necessidade de quaisquer etapas de remoção potencialmente complicada desta sequência [38].

1.4. OBJETIVOS

O presente estudo teve como finalidade realizar a clonagem e expressão de proteínas recombinantes humanas envolvidas em processos imunes, nomeadamente clonar os domínios extracelulares do receptor hNCR3 e do ligante hNCR3LG1 em plasmídeos de expressão; obter estirpes de *Escherichia coli* de expressão das duas proteínas; realizar a expressão das proteínas através da indução com IPTG e de autoindução; e otimizar o processo de purificação das proteínas de interesse. Para além disso, foi também feito um ensaio que mostrou que as duas proteínas expressas se associaram, de modo a mostrar que se manteve a sua atividade biológica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A experiência do estágio foi desenvolvida com base neste procedimento experimental. Os métodos foram separados em vários tópicos com o objetivo de obter melhor organização do trabalho realizado.

2.1. ESTRATÉGIA DE CLONAGEM

A clonagem da isoforma 1 do receptor hNCR3 foi efetuada a partir do plasmídeo pCMV3-*hncr3*, que contém a sequência codificante completa do gene humano (SinoBiological, referência HG10480-UT, mapa no anexo 1).

Amplificou-se a região do gene correspondente ao domínio ectoplasmático da proteína, responsável pela união do ligante, constituída pelos resíduos de aminoácidos 18 a 130 (UniProtKB ID O14931, Figura 9). Verificou-se que esta região não apresenta nenhum peptídeo de sinalização, utilizando o SignalP-5.0 [39]. Para a amplificação foram usados os *primers hncr3-FW* e *hncr3-RV* (Tabela 1), onde foram inseridas as sequências de restrição das enzimas *NdeI* e *HindIII*, respectivamente, de modo a permitir a posterior inserção do produto de PCR digerido no MCS (*multiple cloning site*) do pET28a(+), o plasmídeo de expressão escolhido. Foram escolhidas estas duas enzimas de restrição por não serem capazes de digerir o ADN da sequência a amplificar. Estes *primers* permitiram a amplificação das sequências a serem clonadas.

Foi inserido um códon stop na região 3' da sequência codificante a expressar de modo a impedir a expressão de um *tag His₆* nesta região, que está envolvida no reconhecimento de substrato. Assim, o produto final da expressão (Figura 10) terá apenas a *tag His₆* N-terminal. Foi também inserida a sequência para a inclusão de um local de corte pela trombina (LVPR||GS, em que || representa o local de hidrólise), de modo a ser possível obter um produto de expressão o mais semelhante possível ao domínio ectoplasmático da proteína, se necessário.

A região que codifica o ligante hNCR3LG1 foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pGEM-T-*hncr3lg1* (SinoBiological, referência NM_001202439.2, mapa no anexo 2), que contém a região de codificação completa do gene humano. Em eucariotas, a região 1-24 da proteína é um sinal de peptídeo (Figura 11) [40], e em bactérias Gram-negativas a região 25-262 não tem peptídeos de sinalização, pelo que se optou por clonar e expressar a região 25-262, também com *tag* His₆ N-terminal. Foi também inserida a sequência para o local de corte pela trombina, de modo a ser possível obter um produto de expressão com massa molecular de 29,0 kDa. Assim, obteve-se um plasmídeo pET28a(+)-*hncr3lg1*, com a sequência para a região clonada no MCS com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. A clonagem correta pode ser obtida com os *primers* *hncr3lg1_FW* e *hncr3lg1_RV* (Tabela 1). O produto de expressão (Figura 12) tem uma massa molecular de 29,0 kDa, e, após digestão com a trombina, tem a massa molecular de 27,0 kDa.

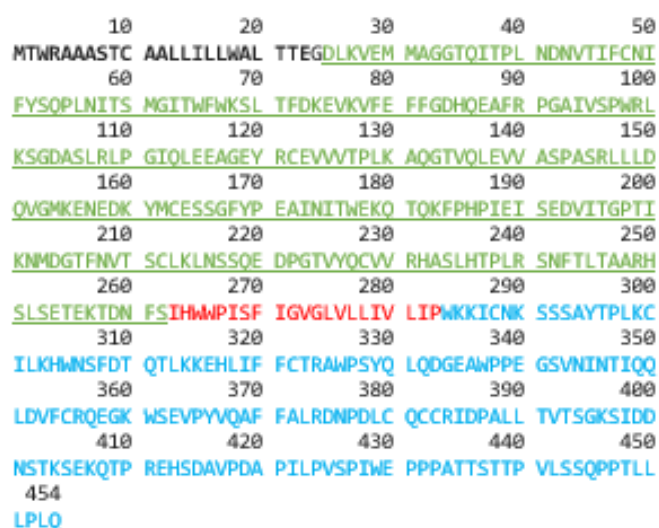


Figura 11 - A região do ligante a expressar encontra-se sublinhada. O péptido de sinalização da proteína encontra-se a negrito, a região extracelular a verde, a região transmembranar a vermelho e a região intracelular a azul [40].

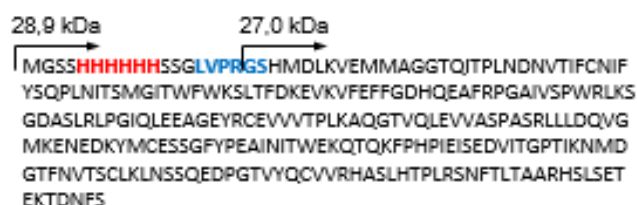


Figura 12 – Na sequência que codifica para o ligante a *tag* de hexahistidina é apresentada a vermelho e o local de proteólise pela trombina a azul. São apresentadas as massas molecular dos produtos de expressão original e após proteólise.

Os *primers* *hncr3lg1_FW* e *hncr3lg1_RV* foram desenhados com os respectivos locais de restrição para a *NdeI* para as sequências *forward* do *hncr3lg1* e *BamHI* para a sequência *reverse* do *hncr3lg1*, como apresentado na Tabela 1. Estes *primers* permitiram a amplificação das sequências a serem clonadas.

2.2. ESTIRPES UTILIZADAS

Neste trabalho utilizaram-se duas estirpes bacterianas, *E. coli* DH5 α para transformação e *E. coli* BL21(DE3) Hi-Control (NZYTech) para expressão das proteínas de interesse. As células de *E. coli* DH5 α foram projetadas pelo biólogo americano Douglas Hanaham para maximizar a eficiência da transformação. Esta estirpe é definida por mutações no ADN que auxiliam na inserção do plasmídeo [41]. As células competentes BL21(DE3) são células de *Escherichia coli* quimicamente competentes usadas para a expressão de proteínas de sistemas baseados em T7 ARN polimerase. Essas células são resistentes aos bacteriófagos líticos T1 e T5. A estirpe BL21(DE3) é deficiente em proteases lon e ompT, resultando em isolamento superior de proteínas recombinantes intactas. Esta estirpe utiliza o promotor T7 RNA para controlar a expressão da proteína [42].

2.3. PROTOCOLOS GENÉRICOS

Neste trabalho, alguns métodos foram repetidos, com o intuito de tornar a leitura mais dinâmica, optou-se por protocolos genéricos, para quando necessário serem mencionados ao longo do texto.

2.3.1. PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES

As células competentes *Escherichia coli* (DH5 α ou BL21(DE3)) foram preparadas de acordo com o método de transformação com cloreto de cálcio. A partir de um pré-inóculo foi feito um crescimento em LB de *E. coli* a 37 °C, 250 rpm, até uma OD_{600nm} de 0,5. O crescimento foi recolhido para microtubos, que foram mantidos em gelo durante 10 min. As células foram recolhidas por centrifugação a 16000 x g durante 5 min a 4 °C. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante. Lavou-se o *pellet* das células com 750,00 μ L da solução CaCl₂ 0,1 M, gelado. Incubou-se no gelo durante 1 hora. Após a incubação, centrifugou-se durante 5 min a 16000 x g. Descartou-se cuidadosamente o sobrenadante. As células foram ressuspendidas num volume final de 100,00 μ L de CaCl₂ 90% gelado com 10% de glicerol, e guardadas para posteriormente serem usadas [Protocolo Interno, Centro de Química Estrutural].

2.3.2. TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES *ESCHERICHIA COLI* DH5 α

Os produtos de ligação preparados foram transformados em *E. coli* (DH5 α ou BL21(DE3)) por choque térmico. O produto de cada reação de ligação foi misturado com 100,00 μ L de células competentes, agitando suavemente, e incubando em gelo durante 30 min. De seguida, as células foram incubadas durante 60 min, e novamente colocadas em gelo durante 2 min. Adicionou-se 900,00 μ L de meio SOC (NZYTech), e incubou-se durante 1 hora, a 250 rpm. As células foram depositadas por centrifugação a 5000 rpm durante 3 min, removeu-se 900,00 μ L de meio, e as células foram ressuspensas nos restantes 100,00 μ L. As células foram plaqueadas em placas de meio LA, suplementado com canamicina a 30 μ g/mL.

2.3.3. EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS A PARTIR DE *E. COLI* DH5 α

Para obter o plasmídeo pET-28(a)+, foi feito um crescimento de *Escherichia coli* DH5 α (Novagen Merck Millipore) transformadas com pET-28(a)+, em meio LB suplementado com canamicina a uma concentração de 30 μ g/mL. A extração do plasmídeo foi feita de acordo com o protocolo (ilustratm plasmidPrep Mini Spin Kit, Cytiva, UK).

2.3.4. PURIFICAÇÃO DE ADN A PARTIR DO GEL DE AGAROSE

Após a realização da eletroforese com os produtos obtidos da reação de PCR de amplificação do ADN, recortou-se as bandas alvos do gel de agarose e pesou-se quatro microtubos vazios de 1,500 mL com o objetivo de obter as massas das amostras. Após as amostras terem sido pesadas, realizou-se a purificação das amostras de ADN do gel de agarose de acordo com o protocolo Clean-Easy Agarose Purification Kit (Canvax AN0070).

2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE ADN

As amostras de ADN foram quantificadas com o equipamento *Nanodrop Spectrophotometer* (SPECTROstar Nano), o *software* utilizado para realizar as leituras foi o BMG Labtech, as amostras foram colocadas no *LVis Plate* com um volume de 2,00 μ L por poço, o controle das amostras foi feito com o *elution buffer* do *Clean-Easy Agarose Purification Kit* (Canvax AN0070).

2.3.6. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (SDS-PAGE)

A pureza das amostras obtidas foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) [Protocolo Interno, Centro de Química Estrutural].

Para o gel *stacking* (de concentração) utilizou-se 1,00 mL de acrilamida/bis-solução 40% (BIO-RAD), 2,52 mL de Tris-HCl 0,5 M com pH 6,8, 100,00 μ L de solução de SDS, 10,00 μ L de TEMED, 50,00 μ L de APS 10%, em 6,36 mL de água destilada.

Para o gel *resolving* (resolvente) utilizou-se 6,00 mL de acrilamida/bis-solução 40% (BIO-RAD), 5,00 mL de Tris-HCl 0,5 M com pH 8,8, 200,00 µL de solução de SDS, 10,00 µL de TEMED, 100,00 µL de APS 10%, em 8,70 mL de água destilada.

Após a corrida, o gel foi corado *overnight* com a solução *Comassie Blue*, constituído por 100,00 µL de *Brilliant Blue R-250*, 25,00 mL de metanol, 5,00 mL de ácido acético e 69,90 mL de água destilada. Descorou-se os géis com a solução de descoloração *destaining 1* (42,00 mL de metanol, 5,00 mL de ácido acético e 88 mL de água destilada) durante 30 min e com a solução de descoloração *destaining 2* (7,00 mL de metanol, 5,00 mL de ácido acético e 88,00 mL de água destilada) durante aproximadamente 16 horas.

2.3.7. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM CONDIÇÕES NATIVAS

Para avaliar a interação entre as proteínas, utilizou-se a abordagem de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas. Para que as proteínas não fossem desnaturadas, este gel não possuiu detergente [Protocolo Interno, Centro de Química Estrutural].

Para o gel *stacking* (de concentração) utilizou-se 0,40 mL de acrilamida/bis-solução 40% (BIO-RAD), 1,00 mL de Tris 2,5 M com pH 6,8, 5,00 µL de TEMED, 20,00 µL de APS 10%, em 2,6 mL de água destilada.

Para o gel *resolving* (resolvente) utilizou-se 3,75 mL de acrilamida/bis-solução 40% (BIO-RAD), 2,50 mL Tris 1,5 M, a pH 8,8, 10,00 µL de TEMED, 50,00 µL de APS 10%, em 3,75 mL de água destilada.

As amostras foram preparadas diretamente (não foram fervidas), utilizou-se 5,00 µL de *loading buffer* (sem SDS) e 20,00 µL de amostra para cada poço. Para o tampão de corrida utilizou-se o tampão de eletroforese constituído com glicina com concentração 0,192 M e Tris 0,025 M

2.3.8. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA PELO MÉTODO DE BRADFORD

A quantificação da proteína foi feita através do método de Bradford adaptado para placa de 96 poços. Resumidamente, cada amostra (5,00 µL) foi diluída com tampão bicarbonato (5,00 µL) e incubada com 200,00 µL de reagente de Bradford à temperatura ambiente durante 5 min, após o que se determinou a absorvância a 595 nm. De modo a garantir as leituras dentro da região de linearidade do método, para cada amostra foram feitas três diluições: 5,00 µL de amostra e 5,00 µL de tampão, como referido; 2,50 µL de amostra e 7,50 µL de tampão; 1,00 µL de amostra e 9,00 µL de tampão. Foi feita uma curva de calibração como padrão de albumina sérica bovina (BSA) com concentração de 1,00 mg/mL em tampão bicarbonato, que foi analisada de forma análoga as amostras [Protocolo Interno, Centro de Química Estrutural].

2.4. AMPLIFICAÇÃO DO ADN CODIFICANTE

Os plasmídeos com as regiões codificantes dos genes *hncr3* e *hncr3lg1*, adquiridos na forma liofilizada, foram inicialmente transformados em células *E. coli* DH5 α , seguiu-se o protocolo apresentado na seção 2.3.2.

Após o crescimento foi feita a extração e purificação, tendo-se obtido o plasmídeo pCMV3-*hncr3* (Sino Biological, Inc.) com uma concentração de 188,48 ng/ μ L (em 200,00 μ L) e o plasmídeo pGEM-T-*hncr3lg1* (Sino Biological, Inc.) com uma concentração de 9,80 ng/ μ L (em 200,00 μ L). No caso do pGEM-T-*hncr3lg1* obteve-se uma baixa concentração, então realizou-se uma nova amplificação, optando-se pelo plasmídeo do ligante hNCR3LG1 (Sino Biological, Inc.) que estava na concentração de 100,00 ng/ μ L, para a amplificação deste gene. Estes plasmídeos foram utilizados como *template* para amplificação da região a clonar, utilizando os *primers* apresentados na Tabela 1.

Para amplificação das sequências de ADN alvo, fizeram-se duas reações em cadeia de polimerase (PCR) de acordo com o protocolo da polimerase *Supreme NZYProof* (NZYTech, Portugal). A primeira reação em cadeia da polimerase foi realizada com gradiente de temperatura para as proteínas hNCR3 e hNCR3LG1, para otimizar a temperatura de *annealing*. Após a otimização mencionada, selecionou-se a temperatura ótima para a amplificação da sequência desejada e amplificaram-se novamente as sequências de ADN desejadas. Estes últimos ensaios da PCR foram realizados em maior quantidade, de modo a ser obtido uma maior quantidade de ADN alvo amplificado, na Tabela 2 são apresentadas as reações preparadas, num volume total de 12,50 μ L para a otimização e de 125,00 μ L para a posterior recolha do produto da PCR.

A amplificação a partir do plasmídeo pCMV3-*hncr3* foi feita com o seguinte programa de PCR – um passo inicial de desnaturação durante 4 min, seguido de 35 ciclos de amplificação, cada um com três passos: desnaturação durante 30 s, hibridização durante 30 s com um gradiente de temperatura, e extensão durante 15 s; foi feito um passo final de amplificação durante 10 min. No caso do plasmídeo pGEM-T-*hncr3lg1*, foi utilizado o mesmo programa de PCR com um tempo de extensão de 25 s. Os tempos de extensão foram escolhidos a partir da velocidade de amplificação da polimerase (30 s para amplificação de 1 kb), tendo em conta que as sequências a amplificar têm um comprimento de 378 bp (receptor *hncr3*) e de 748 bp (ligante *hncr3lg1*). Em ambas as situações, para a amplificação a temperatura de *annealing* foi de 60 °C.

Tabela 2 – Misturas reacionais preparadas para reações de PCR

Componentes	PCR de otimização		PCR de amplificação		Concentração inicial	Concentração final
	<i>hncr3</i>	<i>hncr3lg1</i>	<i>hncr3</i>	hCR3L G1		
	Volume (µL)		Volume (µL)			
Água de biologia molecular	7,87	7,87	78,75	32,75	-	-
Tampão de Reação 5x	2,50	2,50	25,00	25,00	-	1x
dNTPs 10 mM	0,25	0,25	2,50	2,50	-	0,2 mM
Primer FW 10 µM	0,63	0,63	6,25	6,25	-	0,5 mM
Primer RV 10 µM	0,63	0,63	6,25	6,25	-	0,5 mM
Template <i>ncr3</i>	0,50	-	5,00	-	188,48 ng/µL	7,5 ng/µL
Template <i>ncr3lg1</i>	-	5,10	-	51,00	100,00 ng/µL	41 ng/µL
Supreme NZYProof	0,12	0,12	1,25	1,25	-	0,025 U/µL
Volume total	12,50	12,50	125,00	125,00	-	-

2.4.1. ANÁLISE POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE PCR

Para analisar o resultado das reações de PCR, as misturas reacionais foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose. Para os produtos da PCR de otimização de temperatura, os volumes das amostras *hncr3* e *hncr3lg1* foram de 8,00 µL aos quais foram adicionados 2,00 µL de *loading buffer* (CSL-RUNSAFE, Cleaver Scientific, Ltd). Para os produtos da PCR de amplificação do ADN, os volumes das amostras *hncr3* e *hncr3lg1* foram de 125,00 µL aos quais foram adicionados 31,25 µL de *loading buffer*. Em todas as condições foram colocados o volume de 8,00 µL de marcador (NZYDNA Ladder III de tamanho 0,2 – 10 kb) aos quais foram adicionados com 2,00 µL de *loading buffer* nos poços com marcadores. Realizaram-se duas eletroforeses, uma para os produtos da PCR de otimização de temperatura e outra para os produtos da PCR de amplificação do ADN. As eletroforeses foram feitas em gel de agarose (*electrophoresis grade*, NZYTech) com concentração de 1%, preparada com tampão TAE (tris-acetato- ácido etilenodiamino tetra-acético, Tris-Acetato-

EDTA, pH 8,55 e concentração 1x). O gel foi corrido a 80 V durante 90 min. No final da eletroforese os resultados das amostras analisadas foram observados com o transiluminador.

2.4.2. DIGESTÃO DUPLA DOS PRODUTOS DE PCR

As limpezas dos produtos de PCR foram feitas de acordo com a seção 2.3.4. A quantificação das amostras foi realizada de acordo com a seção 2.3.5, então sucedeu-se a digestão de acordo com os protocolos das enzimas de digestão (*Fast Digest*, ThermoFisher Scientific), seguindo as instruções genéricas do fabricante. As reações foram preparadas como indicado na Tabela 3. Na digestão do *hncr3* fez-se uma incubação por quatro horas e a inativação foi feita durante 10 min. Na digestão do *hncr3lg1* fez-se uma incubação por uma hora, seguida de um passo de inativação durante 5 min. Todo o processo de digestão e inativação enzimática foi feito com recurso a um termobloco (Eppendorf ThermoMixer C).

Tabela 3 – Volumes utilizados nas digestões enzimáticas de *hncr3* e *hncr3lg1*

Componente	<i>hncr3</i>	<i>hncr3lg1</i>	Massa inicial	Massa final
	Volume (µL)	Volume (µL)	(µg)	(µg)
Água de biologia molecular	72,05	100,27	-	-
<i>Fast digest</i> Buffer 10x	15,00	15,00	-	-
Produto <i>hncr3</i>	51,95	-	2,31	0,05
Produto <i>hncr3lg1</i>	-	24,73	4,84	0,20
<i>Fast Digest</i> NdeI (10 U/µL)	6,00	5,00	-	-
<i>Fast Digest</i> HindIII (10 U/µL)	5,00	-	-	-
<i>Fast Digest</i> BamHI (10 U/µL)	-	5,00	-	-
Volume total	150,00	150,00	-	-
Digestão a 37 °C	4 h	1h	-	-
Inativação a 80 °C	5 min	10 min	-	-

2.5. LIGAÇÃO PLASMÍDEO-INSERT

2.5.1. EXTRAÇÃO DOS PLASMÍDEOS PET-28(A)+

As extrações dos plasmídeos foram realizadas de acordo com a seção 2.3.3. Os plasmídeos extraídos foram concentrados por vácuo (Concentrator plus/Vacufuge® plus, Eppendorf). As amostras resultantes foram ressuspensas em 30 µL de água para biologia molecular e posteriormente quantificadas de acordo com a seção 2.3.5.

2.5.2. DIGESTÃO DOS PLASMÍDEOS PET-28(a)+

Após a quantificação, fez-se a digestão de acordo com os protocolos das enzimas de digestão, utilizando dois conjuntos de enzimas de restrições, de forma análoga à seção 2.4.2. A reação foi feita de acordo a Tabela 4.

Tabela 4 - Reações de digestão do plasmídeo pET-28a(+) para as ligações a realizar

Componente	<i>hncr3</i>	<i>hncr3lg1</i>
	Volume (µL)	Volume (µL)
Água de biologia molecular	23,00	23,00
<i>Fast digest Buffer 10x</i>	4,00	4,00
Plasmídeo pET28a(+)	9,00	9,00
<i>Fast Digest NdeI (10 U/µL)</i>	2,00	2,00
<i>Fast Digest HindIII (10 U/µL)</i>	2,00	-
<i>Fast Digest BamHI (10 U/µL)</i>	-	2,00
Volume total	40,00	40,00
Digestão a 37 °C	4 h	1h
Inativação a 80 °C	5 min	10 min

Após a digestão, os plasmídeos foram purificados com o *Clean-Easy PCR Purification Kit Canvax*, de acordo com o protocolo do fabricante e quantificados, seções 2.3.4. e 2.3.5. respectivamente.

2.5.3. LIGAÇÃO DO ADN AO PLASMÍDEO PET-28(a)+

Após os produtos de PCR e os plasmídeos terem sido digeridos e quantificados, realizou-se a ligação dos ADN *hncr3* e ADN *hncr3lg1* ao plasmídeo pET-28(a)+ digerido com as enzimas *NdeI/HindIII* e *NdeI/BamHI*, respectivamente. Esta ligação foi feita utilizando a enzima T4 ADN Ligase (NZYTech) e seguiu-se o protocolo da enzima. Foram realizadas ligações com duas razões molares distintas de plasmídeo: de 1:5 e 1:10, de acordo com a Tabela 5. Cada reação foi preparada para um volume final de 20,00 µL. As reações foram incubadas 16 horas.

Tabela 5 – Preparação das reações de ligação

Proporção	<i>hncr3</i>		<i>hncr3lg1</i>	
	(1:5)	(1:10)	(1:5)	(1:10)
	Volume (µL)	Volume (µL)	Volume (µL)	Volume (µL)
Tampão 10x	2,00	2,00	2,00	2,00
pET-28(a)+ digerido com <i>NdeI/HindIII</i> (906,75 ng/µL)	2,60	2,60	-	-
pET-28(a)+ digerido com <i>NdeI/BamHI</i> (559,35 ng/µL)	-	-	2,00	2,00
<i>hncr3</i> digerido com <i>NdeI/HindIII</i> (786,45 ng/µL)	0,70	1,40	-	-
<i>hncr3lg1</i> digerido com <i>NdeI/BamHI</i> (738,45 ng/µL)	-	-	1,10	2,20
Água de biologia molecular	13,70	13,00	13,90	12,80
T4 ADN Ligase (5U/µL)	1,00	1,00	1,00	1,00
Volume Total	20,00	20,00	20,00	20,00

Após a ligação foram realizadas transformações em *E. coli* DH5 α utilizou-se 5,00 ng de cada plasmídeo ligado aos seus respectivos genes, as transformações foram realizadas de acordo com a seção 2.3.2. Para cada transformação foram feitos dois plaqueamentos, um de 25,00 μ L e outro com 75,00 μ L de inóculo. As placas foram incubadas a 37 °C durante 16 horas.

2.6. PCR DE COLÔNIAS

Após o crescimento, cada colônia foi repicada individualmente de modo a separar cada unidade formadora de colônia numa nova placa. Após estas colônias terem sido repicadas, a presença do plasmídeo com o tamanho correto foi avaliada por reações de PCR, utilizando os *primers* T7_promotor (5' [TAATACGACTCACTATAGGG] 3') e T7_terminador (5' [GCTAGTTATTGCTCAGCG] 3').

Repicou-se uma parte de cada colônia para 40,00 μ L de água para biologia molecular, homogeneizou-se em vórtex e ferveu-se durante 5 min. Transferiram-se as amostras para gelo e centrifugaram-se a 16000 x *g* durante 90 s. Foram utilizados 15,00 μ L de cada sobrenadante para a reação de PCR como *template*.

Preparou-se uma *master mix* para estas reações, conforme indicado na Tabela 6, de modo a adicionar 15,00 μ L de *master mix* a cada amostra, para reações de PCR num volume total de 30,00 μ L. Utilizou-se a ADN polimerase DFS-Taq (*Bioron Life Sciences*).

Tabela 6 - *Master Mix* da PCR das colônias

Componentes	Volume por amostra (μ L)
Tampão <i>Complete</i> NH ₄ 10x	3,00
dNTP 10 mM	0,60
<i>Primer</i> T7 promotor 100 μ M	0,06
<i>Primer</i> T7 terminador 100 μ M	0,06
Taq Polimerase DSF (U/ μ L)	0,30
<i>Template</i>	15,00
Água de biologia molecular	10,98
Volume total	30,00

Após ter sido feita a PCR das colônias, fez-se a separação por eletroforese dos produtos de reações de PCR, de modo a verificar a presença de bandas com o tamanho esperado. As colônias que apresentaram o tamanho correto do *insert* foram repicadas para meio líquido LB com canamicina com concentração 30 de $\mu\text{g}/\text{mL}$, e plaqueadas em meio LB com ágar e canamicina na mesma concentração anterior.

2.7. TRANSFORMAÇÃO DA *E. COLI*/BL21 (DE3) HI-CONTROL

Para transformação das células *E. coli* BL21(DE3) Hi-Control (Canvax) utilizou-se o protocolo de transformação por choque térmico descrito anteriormente (seção 2.3.2., onde a única alteração foi a quantidade de células utilizadas, 50,00 μL). Sendo assim foram adicionados 950,00 μL de meio SOC e posteriormente 5,00 ng de cada amostra de plasmídeo.

2.8. SOBRE-EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES HNCR3 E HNCR3LG1

Após as células terem sido transformadas e crescidas *over night*, fez-se um inóculo de 10,00 mL para cada *E. coli* BL21 DE3 transformada com *hncr3* e com *hncr3lg1*, suplementado com canamicina 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente realizou-se o inóculo de algumas células de cada tipo nos respectivos tubos. Os pré-inóculos foram incubados a 37 °C durante 16 horas. Este método foi realizado em duplicata para que fossem feitas a sobre-expressão de dois métodos.

2.8.1. INDUÇÃO COM IPTG E AUTOINDUÇÃO

Para a expressão das proteínas, foram feitos dois métodos de indução, numa primeira etapa com IPTG e numa segunda etapa foi realizada a autoindução de forma a avaliar se haveriam resultados distintos significativos que justificasse a escolha de um ou de outro método futuramente.

Numa primeira etapa realizou-se a indução com IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida), com concentração final de 0,5 mM e colocou-se para incubar a 37°C, 250 rpm, a incubação prosseguiu durante 6 horas.

Antes de ser realizada a indução com IPTG, após a indução num período de 4 horas e após o período de 6 horas foram retiradas amostras do crescimento de forma a avaliar a densidade ótica (OD) com o comprimento de onda a 600 nm, o intuito destas etapas foi garantir que o crescimento tivesse uma $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,6$ para garantir a quantidade mínima de células para que houvesse a expressão das proteínas. Após a incubação obteve-se os valores mencionados na Tabela 7. Após a recolha das amostras a cada período foi feita a centrifugação 16000 x g durante 1 minuto e depois armazenou-se os *pellets*.

Tabela 7 - Densidade ótica das amostras

	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hi-Control pET28a(+) <i>hncr3</i>	Controle <i>hncr3</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Hi-Control pET28a(+) <i>hncr3lg1</i>	Controle <i>hncr3lg1</i>
Tempo (horas)	Densidade ótica (OD)		Densidade ótica (OD)	
0	4,61	0,09	4,55	0,09
4	2,68	3,22	3,55	3,13
6	2,75	4,22	4,68	3,91

Numa segunda etapa, realizou-se a autoindução com glucose com concentração 0,50 g/L e α -lactose com concentração 2,00 g/L. O inóculo foi incubado durante 24 horas em agitação orbital a 230 rpm e 37 °C. Ao retirar o inóculo da incubação, foram feitas duas centrifugações a 4000 rpm durante o período de 20 min, descartou-se os sobrenadantes e armazenou-se os *pellets* em tubos *falcon* previamente pesados a -20 °C.

2.8.2. LISE CELULAR

Para a purificação das proteínas que estavam nos *pellets* armazenados, foi realizada a ressuspensão destes *pellets* com 5,00 mL de NZY *Bacterial Cell Lysis Buffer* por grama de *pellet* a cada *ependorf*, em temperatura ambiente, adicionou-se 2,00 μ L de lisozima numa concentração de 50 mg/mL, 2,00 μ L de DNase I numa concentração de 2 mg/mL a cada 1 mL de NZY *Bacterial Cell Lysis Buffer* adicionado e adicionou-se 40,00 μ L de inibidor de proteases sem EDTA 25x (Novagen) por cada 1,00 g de células. Incubou-se a suspensão celular com agitação orbital 230 rpm durante 20 min, então removeu-se os destroços das células insolúveis por centrifugação a 15000 x *g* durante 15 min a 4 °C. Após a centrifugação diluiu-se as amostras com tampão 20 mM NaH₂PO₄ suplementado com 0,5 M NaCl, a pH 7,4.

2.8.3. LISE DOS CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO

Após ser realizada a lise celular, observou-se que nos inóculos de *E. coli* BL21 DE3 Hi-Control com plasmídeo pET28a(+)-*hncr3* apareceram grânulos pretos, então optou-se por realizar a lise dos corpúsculos de inclusão. Após a preparação de um novo inóculo com o volume de 620,00 mL de cultura, foi realizada uma nova indução com IPTG, seguida de centrifugação. Os *pellets* foram ressuspensos em 6,20 mL de Tris-HCl 10 mM suplementado com 0,15 M NaCl, a pH 7,4. As suspensões foram transferidas para *ependorfs* e então realizou-se a sonicação durante 5 min, realizou-se a centrifugação a 20000 x *g*, durante 30 min numa temperatura de 10 °C, e então removeu-se o sobrenadante.

Os *pellets* foram ressuspensos em 1,50 mL de Tris-HCl 10mM suplementado com 0,15 M NaCl, a pH 7,4. Seguiu-se para uma nova sonicação alternada em vórtex, processo feito em duplicada, durante 5 min. Fez-se uma centrifugação a 20000 x *g* durante 10 min a 10 °C, novamente removeu-se o sobrenadante. Os *pellets* foram ressuspensos em 1,50 mL de Tris-HCl 10 mM suplementado com NaH₂PO₄ 0,1M suplementado com 8 M de ureia, a pH 8,0 e então incubados durante 2 horas em temperatura ambiente a 500 rpm (Thermomixer). Seguiu-se para uma nova centrifugação com as mesmas condições anteriores. Armazenou-se o sobrenadante.

2.8.4. PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DE METAL IMOBILIZADO

Para purificação fez-se uma cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC) com uma coluna revestida de níquel (HisTrap™ FF Crude, GE *Life Sciences*). A coluna foi previamente lavada com 5 volumes de água para biologia molecular e depois equilibrada com 5 volumes de tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 20 mM com NaCl 0,5 M, a pH 7,4). O sobrenadante oriundo da lise celular foi carregado na coluna e lavado com 2 volumes de tampão de lavagem. Para eluição da proteína aumentou-se a concentração de imidazol de 0 mM até 500 mM em gradiente descontínuo (0, 5, 10, 25, 50, 100, 250 e 500 mM). Após a recolha das frações fez-se um espectro das absorvâncias dos 220 nm aos 700 nm. A pureza das frações foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes.

2.8.5. PURIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE DE METAL IMOBILIZADO COM *REFOLDING*

A purificação do sobrenadante oriundo da lise dos corpúsculos de inclusão foi feita de forma semelhante ao tópico anterior, porém necessitou de uma etapa prévia devido ao fato da amostra estar em ureia, ou seja, desnaturada. De modo a promover o *refolding* da proteína na coluna, após carregar a amostra foi utilizado um gradiente decrescente de ureia (8 M, 6 M, 4 M, 3 M, 2 M, 1 M, 0 M) em tampão NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 0,5 M a pH 7,4 para remover toda a ureia. De seguida, foi feita a eluição de 10 volumes de coluna da proteína com imidazol na concentração de 500 mM. Registrou-se a absorvância das frações recolhidas a 280 nm. A pureza das frações foi avaliada por SDS-PAGE.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. AMPLIFICAÇÃO DO ADN

Foram realizadas duas reações em cadeia de polimerase para a amplificação de cada gene: a primeira foi realizada com intuito de obter a temperatura ótima de emparelhamentos dos *primers* com o template e a segunda para amplificação dos genes e obtenção do produto de PCR em quantidade suficiente para prosseguir a clonagem, com a temperatura ótima obtida previamente.

3.1.1. OTIMIZAÇÃO DE TEMPERATURA DE HIBRIDIZAÇÃO

De acordo com o mencionado na seção 2.2., após a realização da PCR de otimização dos ADN, foi feita uma eletroforese em gel de agarose para analisar os produtos da reação (Figura 13). A eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de ADN com relação ao tamanho. A matriz formada pela agarose atua como filtro molecular, cuja porosidade é inversamente proporcional à concentração do gel de agarose [43]. Nos poços de número 1 a 6, estavam os produtos da PCR de otimização de temperatura do *hncr3*, com as respectivas temperaturas 60 °C, 62 °C, 64 °C, 66 °C, 68 °C e 70 °C. Nos poços de número 7 a 12, estavam os produtos de PCR de otimização de temperatura do *hncr3lg1*, com as respectivas mesmas temperaturas, variação de 2°C dos 60 °C até 70 °C. Após a amplificação de PCR eram esperados os tamanhos de 348 bp para o ADN pCMV3-*hncr3* com os *primers* NCR3_FW_NdeI e NCR3_RV_HindIII, e o tamanho de 748 bp para o ADN pGEM-T-*hncr3lg1* com os *primers* NCR3LG1_FW_NdeI e NCR3_RV_BamHI.

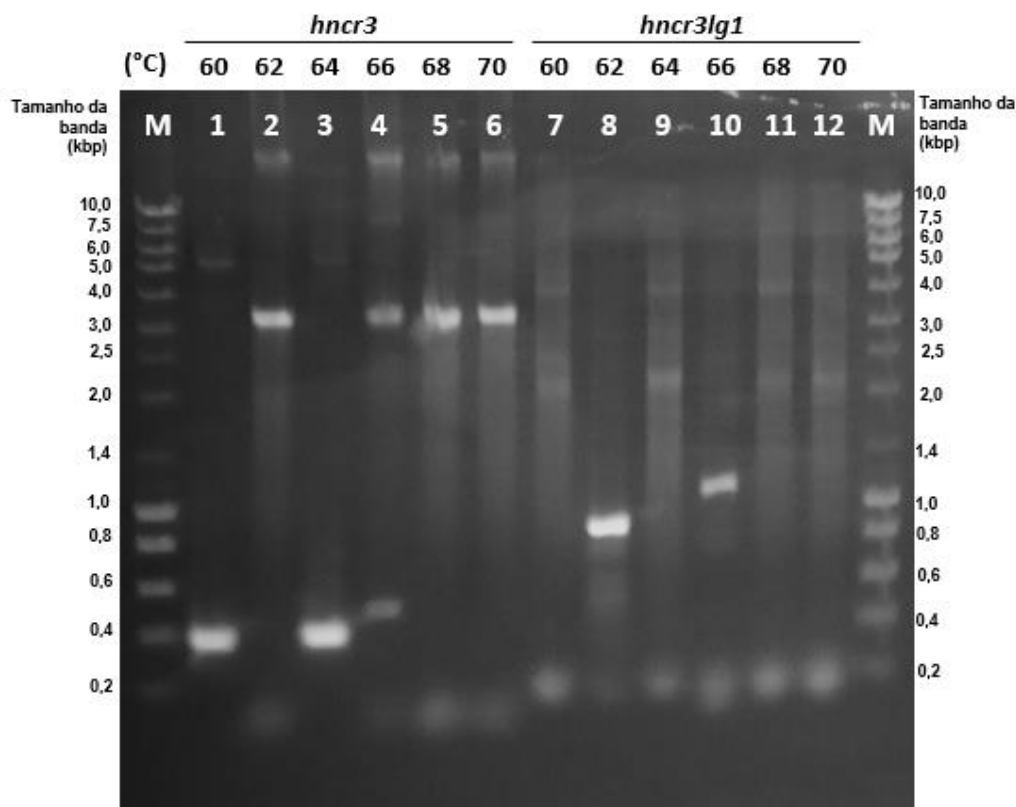


Figura 13 – Análise dos produtos de PCR de otimização de temperatura para amplificação dos genes *hncr3* e *hncr3lg1*, eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi feita durante 90 minutos. Foram utilizados os *primers* *hncr3_FW* e *hncr3_RV* para amplificação do *hncr3*, e *hncr3lg1_FW* e *hncr3lg1_RV* para amplificação de *hncr3lg1*. M – NZYDNA Ladder III; 1 – Amplificação PCR *hncr3*, 60 °C; 2 – Amplificação PCR *hncr3*, 62 °C; 3 – Amplificação PCR *hncr3*, 64 °C; 4 – Amplificação PCR *hncr3*, 66 °C; 5 – Amplificação PCR *hncr3*, 68 °C; 6 – Amplificação PCR *hncr3*, 70 °C; 7 – Amplificação PCR *hncr3lg1*, 60 °C; 8 – Amplificação PCR *hncr3lg1*, 62 °C; 9 – Amplificação PCR *hncr3lg1*, 64 °C; 10 – Amplificação PCR *hncr3lg1*, 66 °C; 11 – Amplificação PCR *hncr3lg1* (tamanho esperado 378 bp), 68 °C; 12 – Amplificação PCR *hncr3lg1* (tamanho esperado 748 bp), 70 °C.

Ao observar a Figura 13 percebeu-se que para o *hncr3* houve duas temperaturas próximas ao ideal, porém como no poço 1, a amostra chegou o mais próximo do valor esperado para este fragmento de ADN, a temperatura de 60 °C foi a usada para continuidade deste trabalho. Para o fragmento do *hncr3lg1*, a amostra do poço 8 foi a que chegou mais próxima do valor esperado, cuja temperatura correspondeu a 62 °C. O protocolo da enzima *Supreme NZYProof* DNA polimerase indica que a temperatura de *annealing* deve ser otimizada para cada temperatura de *melting* de cada *primer* e que tipicamente a temperatura ótima de *annealing* deve ser esta temperatura de *melting* subtraído de 5 °C [44]; os *primers* para amplificação do *hncr3* apresentam uma T_m média de 64,8 °C, e a temperatura ótima é de 60 °C, enquanto que para a amplificação do *hncr3lg1* os *primers* apresentam uma T_m média de 65,7 °C e a temperatura ótima é de 62 °C.

3.1.2. PCR DE AMPLIFICAÇÃO DO ADN

Após as temperaturas terem sido otimizadas, foi realizada uma PCR de amplificação dos ADN alvos (Figura 14). Ao observar a imagem percebeu-se que para o ADN pCMV3-*hncr3* obteve-se o tamanho esperado, mas o mesmo não ocorreu para a amostra do ADN pGEM-T-*hncr3lg1*. Então armazenou-se as amostras de ADN pCMV3-*hncr3* e descartou-se a outra amostra. Para a amplificação do ADN *hncr3lg1* utilizou-se o plasmídeo comercial que estava na concentração de 100,00 ng/μL, e calculou-se a temperatura de *melting* através do *Tm Calculator* [45], utilizando-se a T_m de 60 °C para a reação de PCR. O resultado obtido por eletroforese é apresentado na Figura 15. Com este ADN obteve-se o esperado então a amostra foi armazenada. A PCR foi originalmente descrita em 1985, desde então tem sido utilizada em vários campos da ciência por possuir alta especificidade e aplicabilidade, com muitos métodos descritos. A característica mais importante da PCR é a capacidade de amplificar exponencialmente cópias de ADN a partir de pouca quantidade de material genético [45].

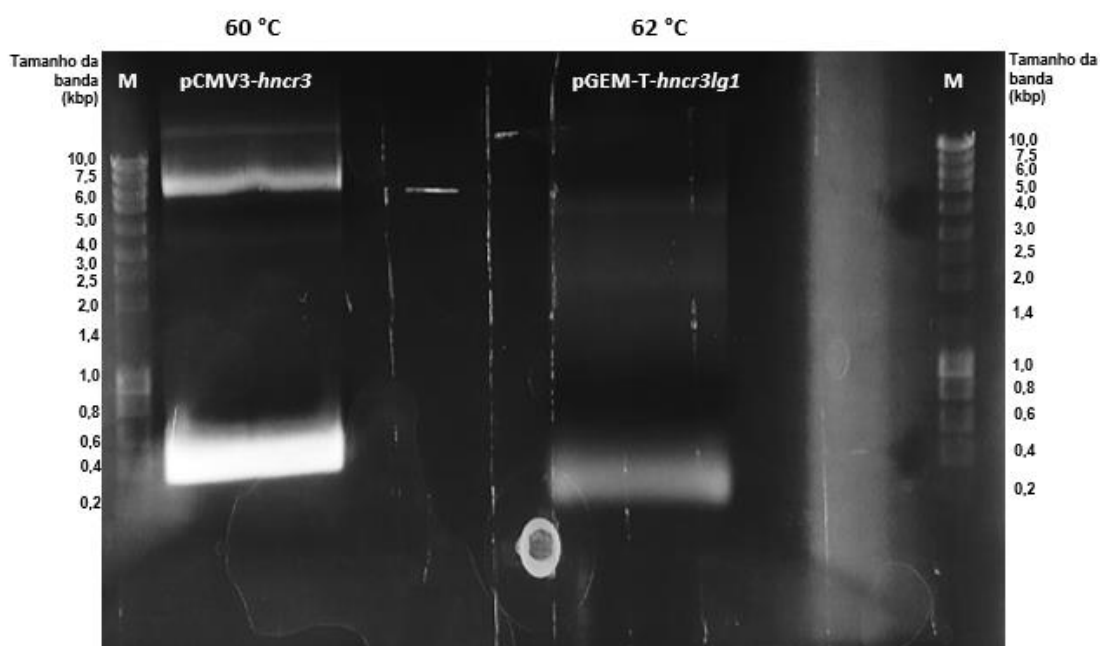


Figura 14 - Análise dos produtos de PCR de amplificação dos genes *hncr3* e *hncr3lg1* por eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi feita durante 90 minutos. Foram utilizados os *primers hncr3_FW* e *hncr3_RV* para amplificação do *hncr3*, e *hncr3lg1_FW* e *hncr3lg1_RV* para amplificação de *hncr3lg1*. M – NZYDNA Ladder III; 1 – Amplificação PCR *hncr3* (tamanho esperado 378 bp), 60 °C; 2 – Amplificação PCR *hncr3lg1* (tamanho esperado 748 bp), 62 °C.

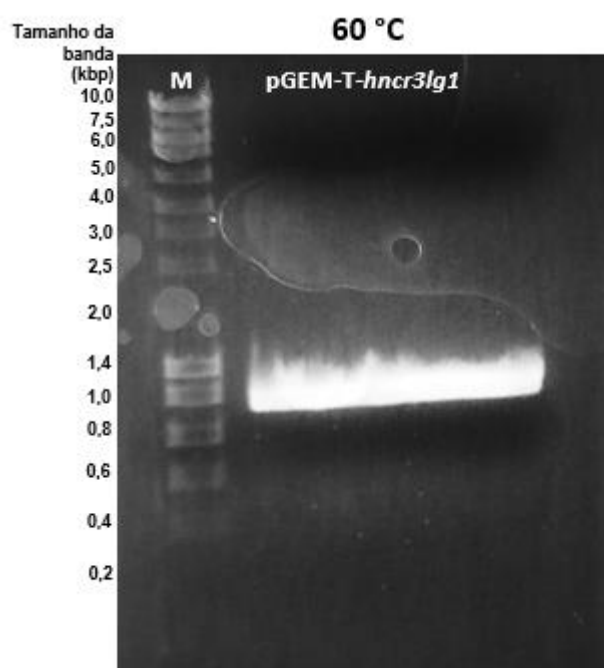


Figura 15 - Produto da PCR da amplificação do ADN *hnchr3lg1* (plasmídeo comercial). Eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi feita durante 90 minutos. Foram utilizados os *primers hnchr3lg1_FW* e *hnchr3lg1_RV* para amplificação de *hnchr3lg1*. Legenda: M – NZYDNA Ladder III; 1 – Amplificação PCR *hnchr3lg1* (tamanho esperado 748 bp), 60 °C.

3.1.3. ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE ADN DO GEL DE AGAROSE

Após a realização da eletroforese com os produtos obtidos da PCR de amplificação do ADN, realizou-se a purificação dos produtos desejados da PCR utilizando o kit Clean-Easy Agarose Purification Kit (Canvax). As amostras foram quantificadas. Os dados após a quantificação são apresentados na Tabela 8, após a quantificação, o ADN correspondente ao ligante foi mais de que o dobro comparado ao receptor. A razão de absorbância em 260 nm e 280 nm é usada para avaliar a pureza do ADN e do ARN. Uma proporção de aproximadamente 1,8 é geralmente aceita como “pura” para ADN; uma proporção de aproximadamente 2,0 é geralmente aceita como “pura” para ARN. Se a proporção for apreciavelmente mais baixa em qualquer dos casos, pode indicar a presença de proteína, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente perto do comprimento de 280 nm [46], em ambas as amostras existem contaminantes que possivelmente absorvem a 230 nm, e em ambas as amostras os valores são muito próximos ao indicado de ADN puro. A proporção 260/230 é uma medida secundária de pureza do ácido nucleico. Os valores esperados de 260/230 estão geralmente na faixa de 2,0 - 2,2. Quando aparecem valores menores, pode indicar a presença de contaminantes que absorvem a 230 nm.

Tabela 8 - Quantificação do ADN recuperado dos géis de agarose

Fragmento de ADN	Concentração (ng/μL)	Volume total (μL)	Massa (μg)	Ratio 260/230	Ratio 260/280
<i>hncr3</i>	19,25	120,00	2,31	0,55	1,86
<i>hncr3lg1</i>	40,34	120,00	4,84	0,81	1,81

3.1.4. QUANTIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO pET-28(a)+

A quantificação das amostras do plasmídeo pET-28(a)+ obtido por extração a partir de células *E. coli* DH5α foi feita de acordo com a seção 2.3.5, a única alteração foi o controle. Na quantificação do plasmídeo pET-28(a)+ utilizou-se água para PCR devido ao fato da água ter sido utilizada para ressuspender a amostra após a utilização do vaporizador. Através da Tabela 9, percebe-se que na segunda quantificação realizada obteve-se 4,17 μg de plasmídeo, enquanto na primeira quantificação obteve-se apenas 1,02 μg. Foram quantificadas duas amostras de plasmídeo, devido ao fato da primeira possuir pouca quantidade em massa. Os valores esperados na faixa 260/230 são muito abaixo, o que indica presença de contaminante, enquanto os valores 260/280 são próximos ao valor ideal para indicar ADN puro.

Tabela 9 - Quantificação do plasmídeo pET28a(+) extraído

Fragmento de ADN	Concentração (ng/μL)	Volume total (μL)	Massa (μg)	Ratio 260/230	Ratio 260/280
Amostra 1: pET-28(a)+	29,25	35,00	1,02	0,74	1,69
Amostra 2: pET-28(a)+	119,09	35,00	4,17	0,94	1,75

3.1.5. QUANTIFICAÇÃO DE ADN APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA

A quantificação foi feita de fórmula semelhante ao mencionado nos tópicos anteriores. Os valores obtidos após a digestão são apresentados na Tabela 10. Obteve-se maior quantidade de ligante digerido com as enzimas de restrição, assim como também se obteve maior quantidade de plasmídeo digerido com as mesmas enzimas utilizadas para digerir o ligante, *NdeI/BamHI*. Através do Ratio 260/260 dos ADN *hncr3lg1* digerido com as enzimas *NdeI/BamHI*, observou-se que a amostra estava possivelmente muito contaminada, porém apesar desta contaminação os valores observados através de 260/280 indicam que amostra estava pura para ADN, assim como todas as demais amostras expostas nesta tabela.

Tabela 10 – Quantificação dos produtos obtidos após as digestões com as enzimas de restrições

Fragmento de ADN	Concentração (ng/ μ L)	Volume total (μ L)	Massa (μ g)	Ratio 260/230	Ratio 260/280
<i>hncr3</i> digerido com <i>NdeI/HindIII</i>	26,22	30,00	0,78	0,45	1,90
<i>hncr3lg1</i> digerido com <i>NdeI/BamHI</i>	30,23	30,00	0,91	0,25	1,88
pET-28(a)+ digerido com <i>NdeI/HindIII</i>	18,65	30,00	0,56	0,52	1,89
pET-28(a)+ digerido com <i>NdeI/BamHI</i>	24,62	30,00	0,74	0,68	1,88

3.2. TRANSFORMAÇÃO DOS PRODUTOS DE LIGAÇÃO EM *ESCHERICHIA COLI* DH5 α

Utilizando o material genético obtido nos passos anteriores – plasmídeo linearizado e *inserts*, ambos digeridos com enzimas de restrição, de modo a apresentarem extremidades complementares -, foram feitas reações de ligação com as razões molares plasmídeo:insert 1:5 e 1:10.

Após a incubação a 37°C durante 16 horas, das oito placas de agar contendo antibiótico canamicina, obteve-se as células transformadas (Figura 16) é possível observar a quantidade de UFC (unidades formadoras de colônia) obtida por placa. Na placa número 2,

obteve-se muitas unidades formadoras de colônia, sendo assim, não foi possível contabilizar de maneira exata. Para executar com sucesso técnicas de genética molecular é essencial ter uma compreensão completa das propriedades das várias estirpes hospedeiras de *E. coli* comumente utilizadas para a propagação e manipulação do ADN recombinante [47]. Os procedimentos típicos de clonagem de ADN envolvem como última etapa a transformação do plasmídeo contruído, e é usual a utilização de *E. coli* DH5 α como células competentes, esta estirpe garante a estabilidade do clone. Foi demonstrado anteriormente que esta estirpe tem boa capacidade em recombinar fragmentos de ADN heterólogo *in vivo* [48].

3.3. PCR DE COLÔNIAS

Após ter sido feita a amplificação das amostras contendo os possíveis *inserts* inseridos no plasmídeo pET28a(+) realizou-se a eletroforese, isto foi feito com o objetivo de obter resultados de qual amostra possuía o fragmento de ADN no tamanho esperado. Como o PCR foi feito em relação aos plasmídeos, como já mencionado acima, esperava-se que os fragmentos tivessem uma banda de maior dimensão do que apenas os tamanhos equivalentes às proteínas, isto porque a PCR foi realizada em relação ao tamanho do T7 promotor inicial e T7 promotor final do respetivo vetor. Para o plasmídeo pET28a(+) contendo o ADN *hncr3* era esperado um fragmento de dimensão 614 bp, para o plasmídeo pET28a(+) contendo o ADN *hncr3lg1* a dimensão de 1007 bp, como já descrito na seção 2.7, relacionado a amplificação de colônias, os fragmentos acima da linha horizontal indicam, as amostras onde foram obtidas colônias com o clone alvo (Figura 17). Estudos anteriores demonstram a eficácia da PCR de colônia [48], devido ao fato deste método ser de alto rendimento e rápido para determinar a presença ou ausência do ADN inserido no plasmídeo, diretamente nas colônias bacterianas [49].

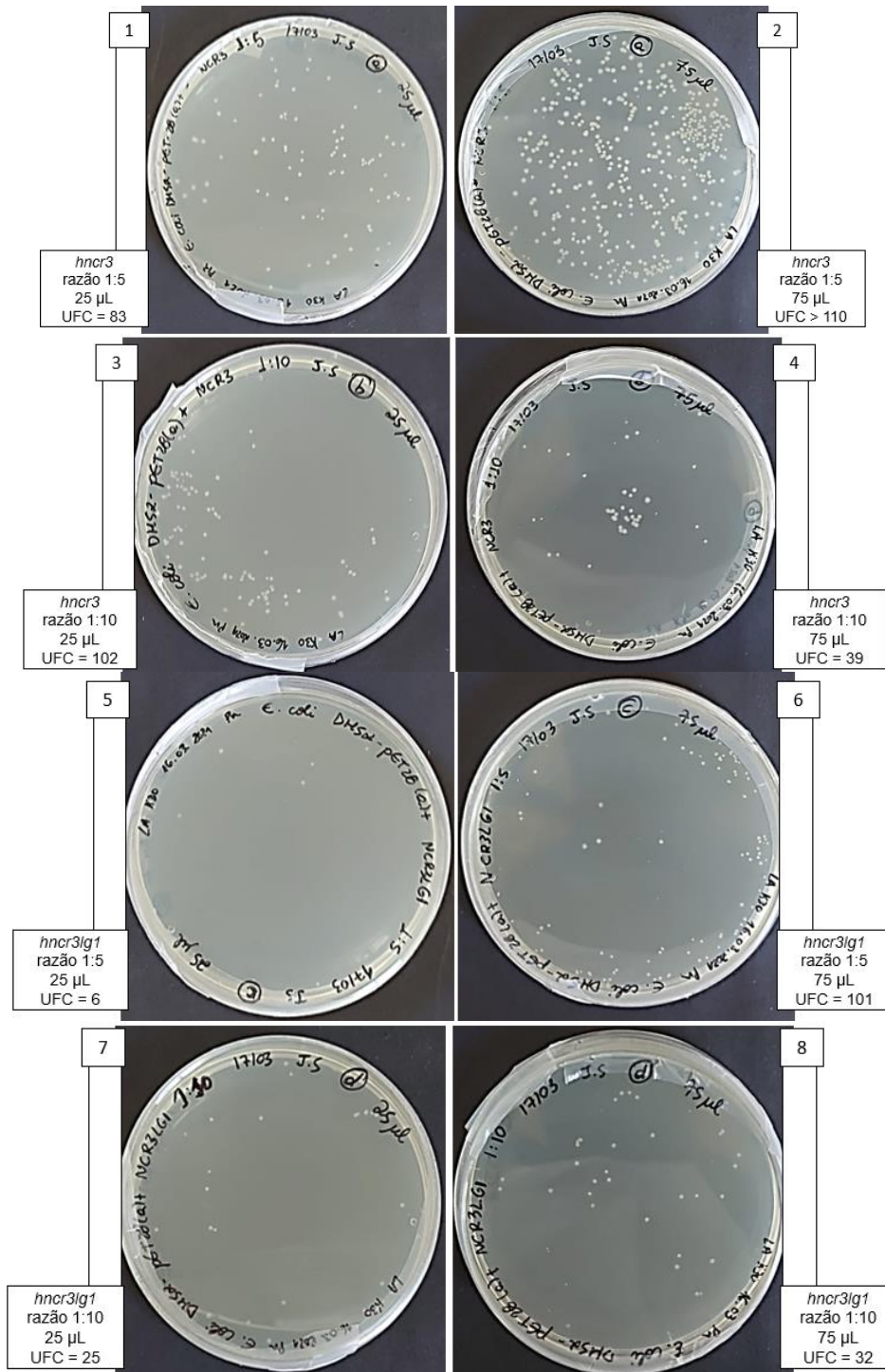


Figura 16 – Resultado do crescimento *overnight* de *E. coli* DH5α transformada com os produtos de ligação. As células *E. coli* DH5α foram transformadas com razões molares plasmídeo:*insert* indicada e plaqueadas em meio LB ágar com canamicina na concentração de 30 µg/mL e incubadas a 37 °C durante a noite. 1 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3* na razão 1:5 (inóculo: 25 ul); 2 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3* na razão 1:5 (inóculo: 75 ul); 3 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3* na razão 1:10 (inóculo: 25 ul); 4 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3* na razão 1:10 (inóculo: 75 ul); 5 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3lg1* na razão 1:5 (inóculo: 25 ul); 6 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3lg1* na razão 1:5 (inóculo: 75 ul); 7 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3lg1* na razão 1:10 (inóculo: 25 ul); 8 - *E. coli* DH5α transformada com o produto de ligação pET28a(+) com *hncr3lg1* na razão 1:10 (inóculo: 75 ul).

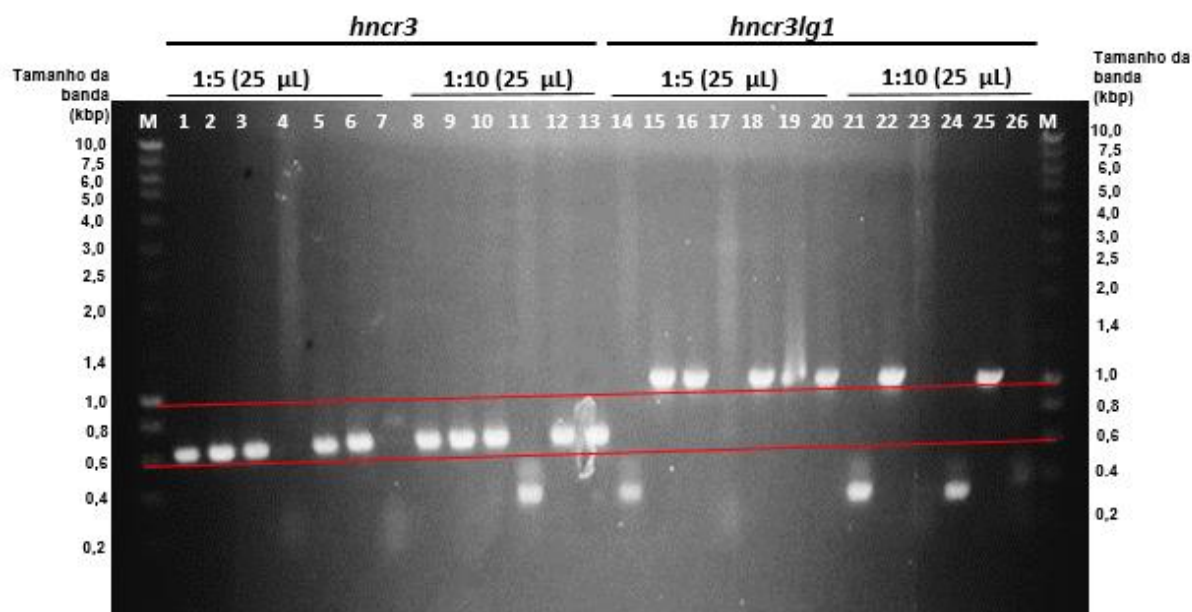


Figura 17 - Análise dos produtos de PCR de amplificação dos genes *hncr3* e *hncr3lg1*. Eletroforese em gel de agarose. A eletroforese foi feita durante 90 minutos. Foram utilizados o promotor e terminador T7. M – NZYDNA Ladder III; 1 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 1; 2 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 2; 3 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 3; 4 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 4; 5 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 5; 6 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 6; 7 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 7; 8 – *hncr3* 1:10 (25 μ L), Clone 1; 9 – *hncr3* 1:10 (25 μ L), Clone 2; 10 – *hncr3* 1:10 (25 μ L), Clone 3; 11 – *hncr3* 1:10 (25 μ L), Clone 4; 12 – *hncr3* 1:10 (25 μ L), Clone 5; 13 – *hncr3* 1:5 (25 μ L), Clone 6; 14 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 1; 15 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 2; 16 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 3; 17 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 4; 18 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 5; 19 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 6; 20 – *hncr3lg1* 1:5 (25 μ L), Clone 7; 21 – *hncr3lg1* 1:10 (25 μ L), Clone 1; 22 – *hncr3lg1* 1:10 (25 μ L), Clone 2; 23 – *hncr3lg1* 1:10 (25 μ L), Clone 3; 24 – *hncr3lg1* 1:10 (25 μ L), Clone 4; 25 – *hncr3lg1* 1:10 (25 μ L), Clone 5; 26 – *hncr3lg1* 1:10 (25 μ L), Clone 6.

A quantificação dos plasmídeos foi feita de forma semelhante ao mencionado nos tópicos anteriores referentes a esta metodologia, os resultados podem ser observados através da Tabela 11, após a quantificação obteve-se maior quantidade de plasmídeo com o *insert hncr3*. O ratio a 260/230 assim como em todas as outras quantificações realizadas, indicam contaminação, enquanto o ratio 260/280 indica pureza para ADN na amostra pET28a(+)-*hncr3* e possível contaminação de proteínas, fenol ou outros contaminantes na amostra pET28a(+)-*hncr3lg1*.

Tabela 11 - Quantificação dos plasmídeos com os ADN de interesse isolados a partir de *E. coli* DH5 α transformada

Fragmento de ADN	Concentração (ng/ μ L)	Volume total (μ L)	Massa (μ g)	Ratio 260/230	Ratio 260/280
pET-28(a)+ com <i>hncr3</i> (1:5)	7,37	100,00	0,74	0,73	1,73
pET-28(a)+ com <i>hncr3lg1</i> (1:5)	6,81	100,00	0,68	0,64	1,64

3.4. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS – ESTABELECIMENTO DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Após a confirmação da presença do *insert* nos plasmídeos, os plasmídeos foram transformados em *E. coli* BL21(DE3) Hi-Control de modo a expressar as proteínas de interesse.

Numa primeira abordagem, foram feitos crescimentos em meio LB com canamicina na concentração de 30 mg/mL com recurso à indução da expressão por adição de IPTG, para que fosse induzida a expressão das proteínas de interesse. Avaliou-se a expressão através da concentração de 0,5M e 1,0M de IPTG para obter melhores condições, para ambas as proteínas em estudo. O IPTG é um indutor químico utilizado largamente em pesquisa básica na indução de diferentes promotores [50].

Após a indução com IPTG das amostras, as células foram recolhidas inicialmente e ao tempo 4 e 6 horas as amostras totais (*pellet* recolhido de todo o crescimento) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacilamida em condições desnaturantes, com um gel resolvente de 12 %, com o objetivo de observar se foi obtido o correto delineamento experimental de modo a serem obtidas as proteínas de interesse. Além das amostras recolhidas aos tempos 0, 4 e 6 horas pós-indução, foram também recolhidas amostras ao mesmo tempo de crescimentos onde não foi induzida expressão.

As amostras totais (*pellet* recolhido de todo o crescimento) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacilamida em condições desnaturantes, com um gel resolvente de 12 %, com o objetivo de observar se foi obtido o correto delineamento experimental de modo a serem obtidas as proteínas de interesse. Foram analisadas amostras recolhidas aos tempos 0, 4 e 6 horas pós-indução, bem como amostras recolhidas ao mesmo tempo de crescimentos onde não foi induzida expressão.

Os géis correspondentes às amostras recolhidas de crescimentos para expressão do receptor hNCR3 são apresentados na Figura 18 (com indução de expressão) e na Figura 20 (sem indução de expressão). Na Figura 18 é possível observar uma linha tênue onde era esperado o fragmento correspondente ao tamanho 14,9 kDa da proteína hNCR3, mas não se pôde obter resultado conclusivo. Esta banda tênue não é observada no caso do crescimento controle (Figura 20).

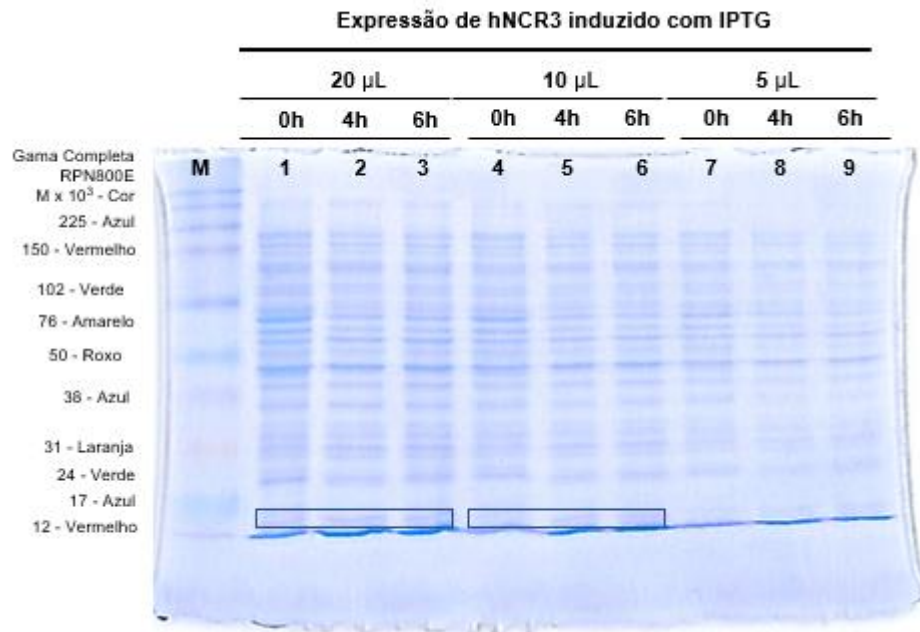


Figura 18 – Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da expressão da proteína hNCR3 induzida com IPTG. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 12 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; 1 - t = 0 horas com 20 μ l de amostra; 2 - t = 4 horas com 20 μ l de amostra; 3 - t = 6 horas com 20 μ l de amostra; 4 - t = 0 horas com 10 μ l de amostra; 5 - t = 4 horas com 10 μ l de amostra; 6 - t = 6 horas com 10 μ l de amostra; 7 - t = 0 horas com 5 μ l de amostra; 8 - t = 4 horas com 5 μ l de amostra; 9 - t = 6 horas com 5 μ l de amostra;

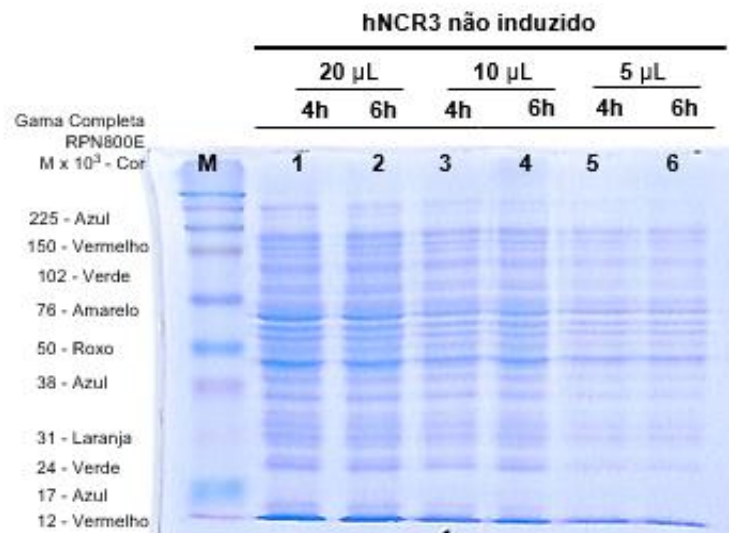


Figura 19 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3 não induzida com IPTG. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 12 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; 1 - t = 4 horas com 20 μ l de amostra; 2 - t = 6 horas com 20 μ l de amostra; 3 - t = 4 horas com 10 μ l de amostra; 4 - t = 6 horas com 10 μ l de amostra; 5 - t = 4 horas com 5 μ l de amostra; 6 - t = 6 horas com 5 μ l de amostra.

Para a expressão da proteína hNCR3LG1 foi seguida a mesma estratégia, analisando-se também a amostra total recolhida aos mesmo tempos a partir de crescimentos induzidos e de crescimentos controlo (não induzidos). No gel SDS-PAGE obtido com as amostras recolhidas dos crescimentos induzidos (Figura 20) é possível observar uma banda significativa correspondente ao tamanho 29,0 kDa esperado do fragmento da proteína hNCR3LG1 e que não surge no caso do crescimento não induzido (Figura 21).

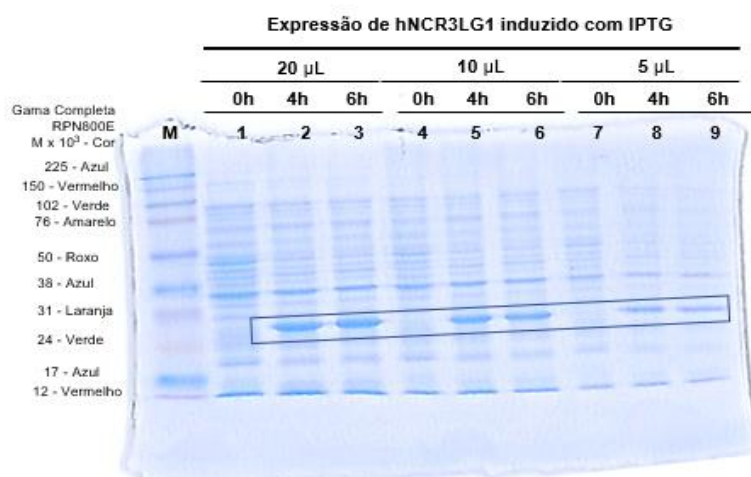


Figura 20 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da expressão da proteína hNCR3LG1 induzida com IPTG. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 12 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; ; 1 - t = 0 horas com 20 μ l de amostra; 2 - t = 4 horas com 20 μ l de amostra; 3 - t = 6 horas com 20 μ l de amostra; 4 - t = 0 horas com 10 μ l de amostra; 5 - T = 4 horas com 10 μ l de amostra; 6 - T = 6 horas com 5 μ l de amostra; 7 - T = 0 horas com 5 μ l de amostra; 8 - t = 4 horas com 5 μ l de amostra; 9 - T = 6 horas com 5 μ l de amostra.

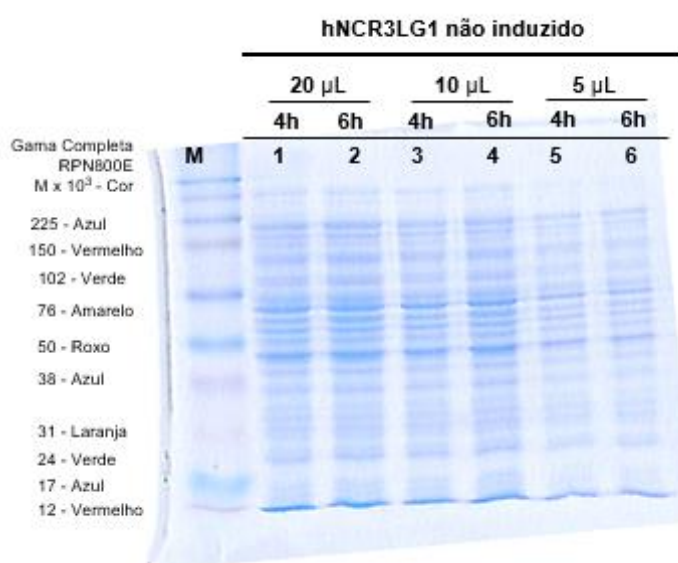


Figura 21 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3LG1 não induzida com IPTG. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 12 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; 1 - t = 4 horas com 20 μ l de amostra; 2 - t = 6 horas com 20 μ l de amostra; 3 - t = 4 horas com 10 μ l de amostra; 4 - t = 6 horas com 10 μ l de amostra; 5 - t = 4 horas com 5 μ l de amostra; 6 - t = 6 horas com 5 μ l de amostra.

Estudos anteriores relatam que a pureza final da proteína recombinante, após a realização da purificação na IMAC, pode ser otimizada controlando a razão da proteína recombinante ao tamanho da coluna. Contaminantes de baixa afinidade podem competir com um excesso relativo de proteínas marcadas com histidina, de forma a otimizar a purificação é benéfico determinar a quantidade da proteína alvo solúvel a ser carregada na coluna. Para maximizar a purificação deve-se carregar a coluna com um leve excesso sobre a capacidade de ligação prevista. Como a etapa de maximização de purificação não foi realizada, pôde-se perceber através das figuras deste tópico que em todos os géis, houve presença de outras proteínas para além das recombinantes na presença de imidazol [51]. É frequentemente relatado que proteínas transmembranares marcadas por histidina são mais problemáticas no que diz respeito a etapa de purificação através da cromatografia de afinidade de iões metálicos imobilizados, isto porque existe uma menor interação com a IMAC [52].

3.5. EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS

Com base nos resultados anteriores, foram feitos crescimentos em 600 mL em LB suplementado com canamicina 30 mg/mL, induzido com IPTG. Após a indução, as células foram recolhidas por centrifugação e lisadas, de acordo com o protocolo descrito em 2.5.1. O sobrenadante desta lise, contendo as proteínas solúveis, foi purificado por imidazol. Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 22 para a proteína hNCR3 e Figura 23 para a proteína hNCR3LG1

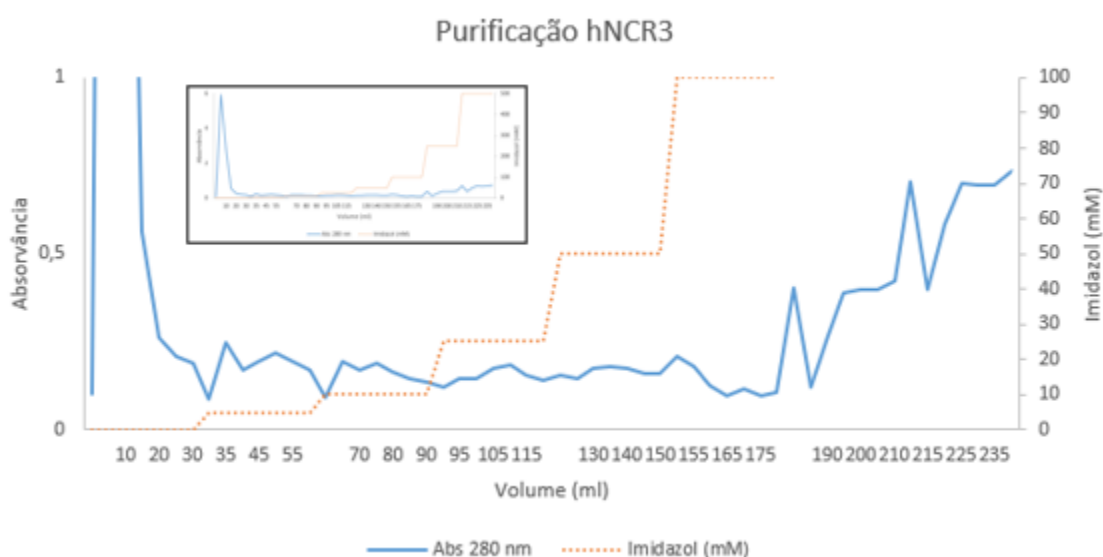


Figura 22 – Cromatograma com absorvância a 280 nm da proteína hNCR3 purificada em coluna de níquel e eluída em gradiente de concentração de 0 a 500 mM de imidazol.

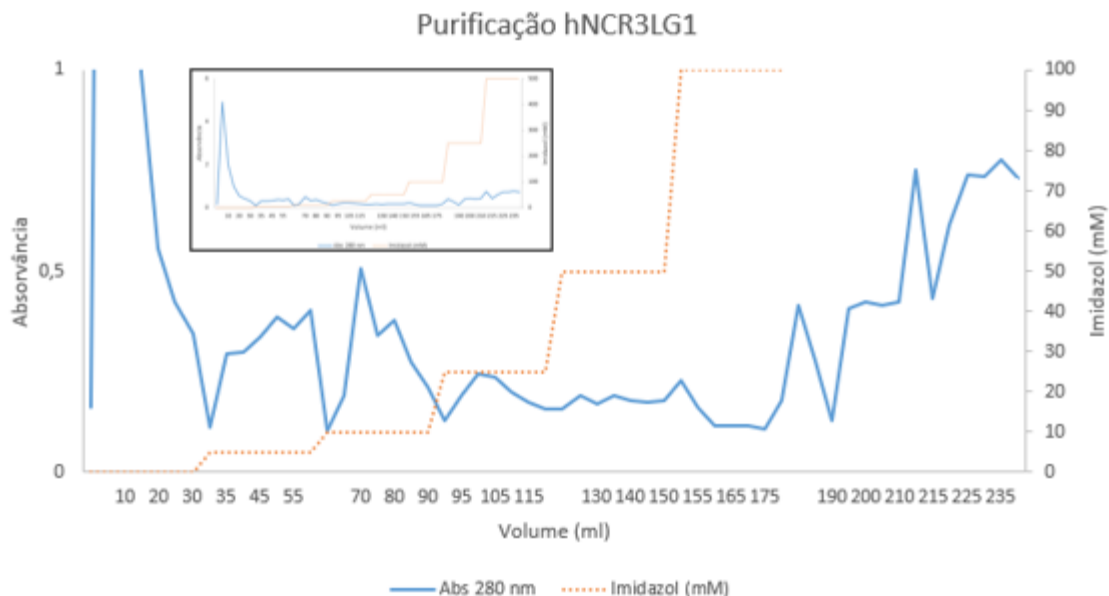


Figura 23 - Cromatograma com absorvância a 280 nm da proteína hNCR3LG1 purificada em coluna de níquel e eluída em gradiente de concentração de 0 a 500 mM de imidazol.

Como se pode observar, não se obteve picos significativos que indicassem maior incidência de nenhuma das proteínas nas frações recolhidas. Assim, analisou-se por SDS-PAGE algumas das frações recolhidas, de modo a identificar em quais estaria a proteína expressa.

Através da Figura 24 e Figura 25, foi possível observar que a proteína hNCR3LG1 teve maior eluição com a concentração de 10 mM e 25 mM de imidazol, através dos géis, observou-se que os fragmentos de tamanho esperado de 29,0 kDa foram obtidos nos poços 6, 7 e 8 do gel apresentado na Figura 24 e nos poços 2 e 3 do gel na Figura 25.

No caso da proteína hNCR3, verificou-se pelos géis de SDS-PAGE (Figura 26 e Figura 27) que foi eluída a 50 mM de imidazol – houve presença da banda esperada correspondente ao tamanho 14,9 kDa, ainda que de forma muito tênue.

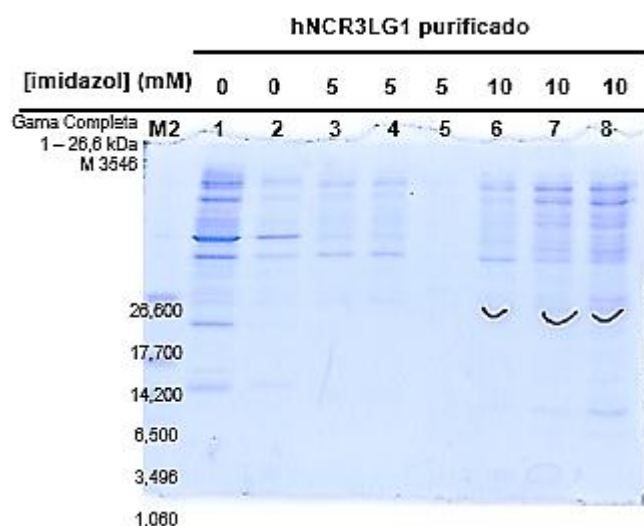


Figura 24 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3LG1 purificada. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 - purificação com 0 mM de Imidazol; 2 - purificação com 0 mM de Imidazol; 3 - purificação com 5 mM de Imidazol; 4 - purificação com 5 mM de Imidazol; 5 - purificação com 5 mM de Imidazol; 6 - purificação com 10 mM de Imidazol; 7 - purificação com 10 mM de Imidazol; 8 - purificação com 10 mM de Imidazol.

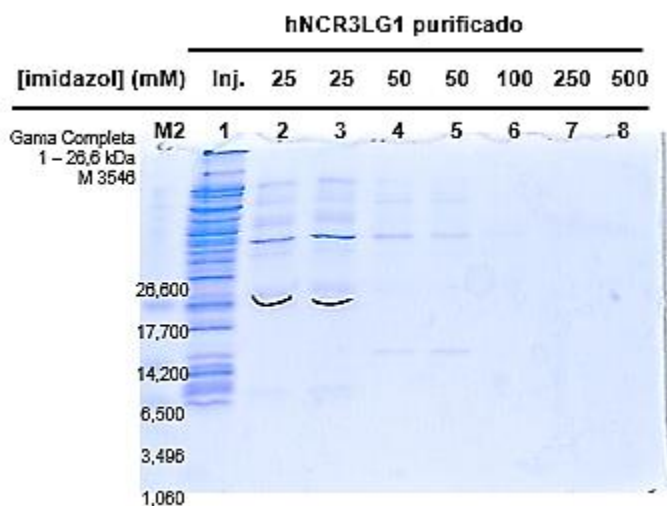


Figura 25 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3LG1 purificada. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 injeção da amostra na IMAC; 2 - purificação com 25 mM de Imidazol; 3 - purificação com 25 mM de Imidazol; 4 - purificação com 50 mM de Imidazol; 5 - purificação com 50 mM de Imidazol; 6 - purificação com 100 mM de Imidazol; 7 - purificação com 250 mM de Imidazol; 8 - purificação com 500 mM de Imidazol.

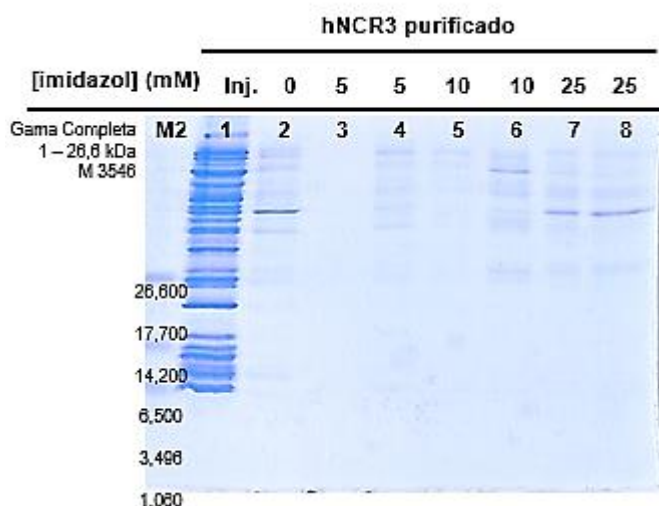


Figura 26 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3 purificada. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 - injeção da amostra na IMAC; 2 - purificação com 0 mM de Imidazol; 3 - purificação com 5 mM de Imidazol; 4 - purificação com 5 mM de Imidazol; 5 - purificação com 10 mM de Imidazol; 6 - purificação com 10 mM de Imidazol; 7 - purificação com 25 mM de Imidazol; 8 - purificação com 25 mM de Imidazol.

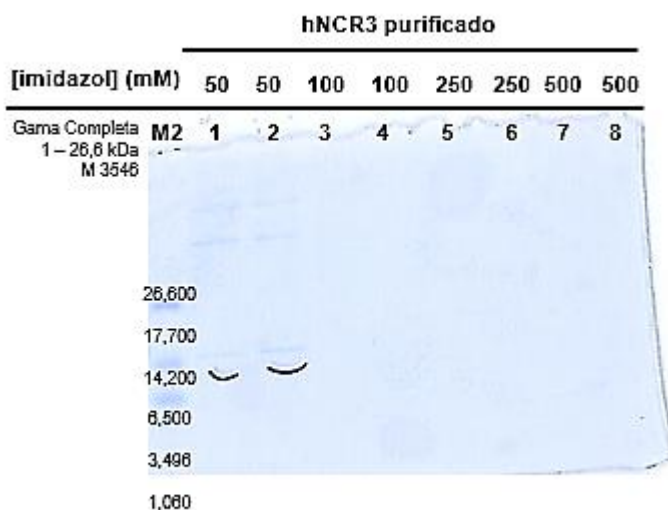


Figura 27 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) da proteína hNCR3 purificada. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 12 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 - purificação com 50 mM de Imidazol; 2 - purificação com 50 mM de Imidazol; 3 - purificação com 100 mM de Imidazol; 4 - purificação com 100 mM de Imidazol; 5 - purificação com 250 mM de Imidazol; 6 - purificação com 250 mM de Imidazol; 7 - purificação com 500 mM de Imidazol; 8 - purificação com 500 mM de Imidazol.

Após obtidos os resultados dos géis da purificação, as amostras da eluição de hNCR3LG1 a 10 mM foram reunidas num único tubo, da mesma maneira que as amostras onde a eluição foi dada numa concentração de 25 mM de imidazol; o mesmo foi realizado para as amostras de hNCR3, onde a eluição se deu numa concentração de 50 mM de imidazol. Foi então realizada a concentração das proteínas por centrifugação em filtro (amicon) como

mencionado anteriormente, e depois fez-se um gel SDS-PAGE de acrilamida com objetivo de confirmar a pureza das amostras.

Através da Figura 28 foi possível perceber que apenas no poço onde a proteína hNCR3LG1 foi eluída numa concentração de 25 mM de imidazol, obteve-se uma banda com o tamanho esperado da proteína, porém no poço 1 onde foi colocada a amostra eluída com uma concentração de 10 mM de imidazol, não apareceu a banda correspondente a proteína e para além disto, abaixo do corte de 10 kDa também apareceram fragmentos. Para a proteína hNCR3 onde a eluição havia sido dada numa concentração de 50 mM, não foi possível visualizar a banda esperada. Após a concentração das proteínas era previsto que as bandas aparecessem mais visíveis neste gel. Devido ao fato das proteínas serem hidrofóbicas pode-se justificar os resultados obtidos na Figura 28, por serem hidrofóbicas ou parcialmente hidrofóbicas, as proteínas podem aderir à membrana do tubo de centrifugação. A baixa recuperação da amostra no concentrado pôde dever-se a perdas por adsorção, sobre concentração ou passagem de amostra através da membrana. As perdas de adsorção dependem da concentração do soluto, da sua natureza hidrofóbica, da temperatura e do tempo de contato com as superfícies do dispositivo de filtração, da composição das amostras e do pH [53] [54].

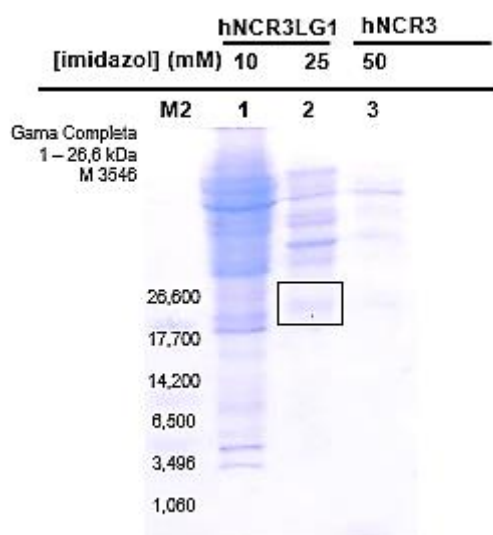


Figura 28 – Análise por eletroforese (SDS-PAGE) após concentração das proteínas hNCR3 e hNCR3LG1. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 – concentração das amostras purificadas com 10 mM de Imidazol da *hncr3lg1*; 2 – concentração das amostras purificadas com 25 mM de Imidazol da *hncr3lg1*; 3 – concentração das amostras purificadas com 50 mM de Imidazol da *hncr3*.

3.5.1. ANÁLISE POR SDS-PAGE DA EXPRESSÃO EM MEIO DE AUTOINDUÇÃO

De forma a avaliar se as células iriam expressar as proteínas de maneira mais significativa noutras condições, foi realizado o crescimento em meio de autoindução, suplementado com glucose e α -lactose. Neste meio, as células de *E. coli* crescem preferencialmente consumindo glucose como fonte de carbono. Quando a glucose esta totalmente consumida, começam a consumir lactose, o que leva ao levantar da repressão do operon *lac*, permitindo então a expressão dos genes sob controlo deste operon T7 [50]. A lactose pode ser uma alternativa ao IPTG na indução de diferentes proteínas recombinantes. A utilização de lactose como indutor é potencializada devido ao baixo custo agregado, além do fato da lactose não apresentar toxicidade às células e ainda servir como fonte de carbono, diferente do que ocorre com a utilização do IPTG [50].

A partir dos crescimentos feitos das duas estirpes em meio de autoindução recolheram-se as células e foram feitos dois géis de SDS-PAGE utilizando o *pellet* total, sendo um para cada proteína em estudo, no gel 1 foram colocadas as amostras da proteína hNCR3 (Figura 29), enquanto no gel 2 foram colocadas as amostras contendo a proteína hNCR3LG1 (Figura 30). Através da Figura 29 observou-se que após o segundo volume da coluna de níquel da IMAC com a concentração de 500 mM de imidazol, obteve-se uma banda com o tamanho do fragmento previsto para a proteína hNCR3 no poço 4, porém a banda aparece também na injeção da amostra correspondente ao poço 7 do gel SDS-PAGE, possivelmente a amostra pode ter sido injetada muito rapidamente, sendo provável que a proteína não tenha tido tempo suficiente para aderir a coluna. Como era esperado no poço de número 8 onde a amostra não foi purificada a banda também aparece, de forma muito semelhante ao poço da injeção. Através da Figura 30 após o terceiro volume da coluna de níquel da IMAC com a concentração de 500 mM de imidazol correspondente ao poço número 5, obteve-se a banda correspondente ao tamanho da proteína hNCR3LG1, e de forma semelhante ao gel 1, nos poços de injeção da amostra e da proteína não purificada, 7 e 8, respetivamente, também se obteve os fragmentos correspondentes ao tamanho da proteína, provavelmente pelo mesmo motivo descrito anteriormente.

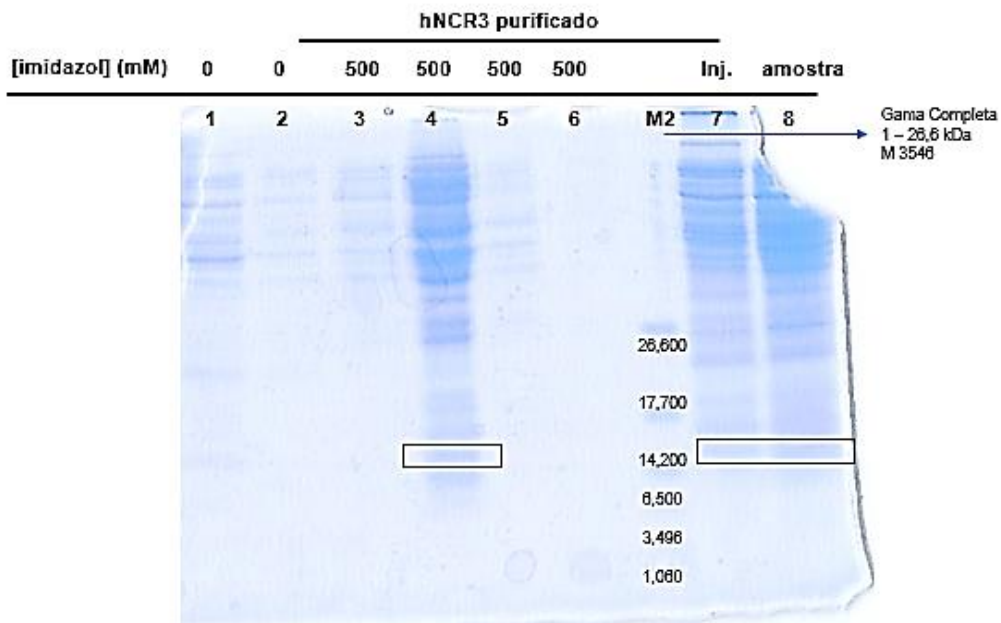


Figura 29 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) após autoindução e purificação da proteína hNCR3. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; 1 - purificação com 0 mM de Imidazol; 2 - purificação com 0 mM de Imidazol; 3 - purificação com 500 mM de Imidazol; 4 - purificação com 500 mM de Imidazol; 5 - purificação com 500 mM de Imidazol; 6 - purificação com 500 mM de Imidazol; M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 7 - injeção da amostra; 8 - amostra não purificada com imidazol.

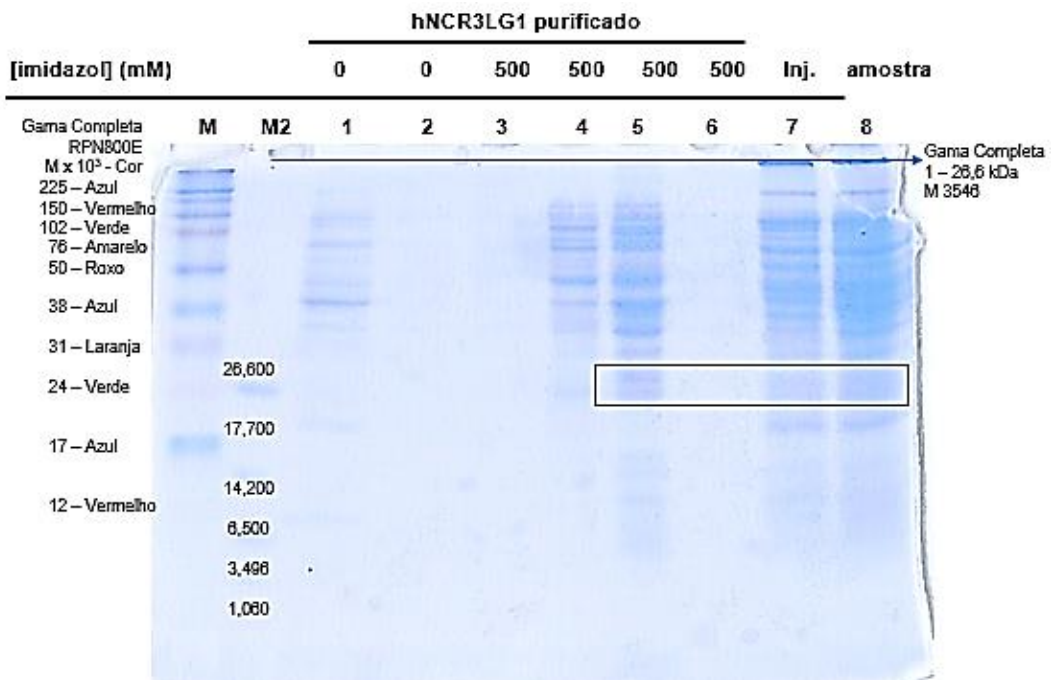


Figura 30 - Análise por eletroforese (SDS-PAGE) após autoindução e purificação da proteína hNCR3LG1. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 - purificação com 0 mM de Imidazol; 2 - purificação com 0 mM de Imidazol; 3 - purificação com 500 mM de Imidazol; 4 - purificação com 500 mM de Imidazol; 5 - purificação com 500 mM de Imidazol; 6 - purificação com 500 mM de Imidazol; 7 - injeção da amostra; 8 - amostra não purificada com imidazol.

3.6. PURIFICAÇÃO A PARTIR DE CORPÚSCULOS DE INCLUSÃO COM *REFOLDING* EM COLUNA

Para além das purificações apresentadas até aqui, foi também feita uma lise dos corpúsculos de inclusão, como mencionado na seção 2.5.2. Após a lise, devido ao fato da amostra estar em ureia, foi realizada a purificação por cromatografia de afinidade de metal imobilizado com *refolding*, mencionado na seção 2.5.4 deste trabalho.

De forma a analisar as amostras obtidas, sucedeu-se a realização de um gel 15%, devido ao fato desta proteína ser de menor dimensão. Através da Figura 31 observou-se que a proteína foi expressa, no poço 3 da injeção da amostra a proteína apareceu em grande quantidade com uma banda significativa, assim como nos poços 7 e 8 da eluição com imidazol com concentração 500 mM. Nos poços 4, 5 e 6 aparecem a banda referente à proteína de forma tênue devido ao fato destas amostras terem sido diluídas para que fossem injetadas na coluna. De forma a avaliar o resultado obtido após a lise das células, sucedeu-se ao um novo gel representado na Figura 32, em todos os poços, com exceção aos poços 3 e 4, a proteína aparece de forma significativa, sendo assim estava presente tanto no sobrenadante como nos *pellets* obtidos nas etapas de lise, assim como nas eluições realizadas com imidazol, nos poços 3 e 4 a proteína não estava presente, como era esperado, pois nestes poços foram colocados amostras oriundas da eluição do tampão lavagem com ureia na concentração de 8 M.

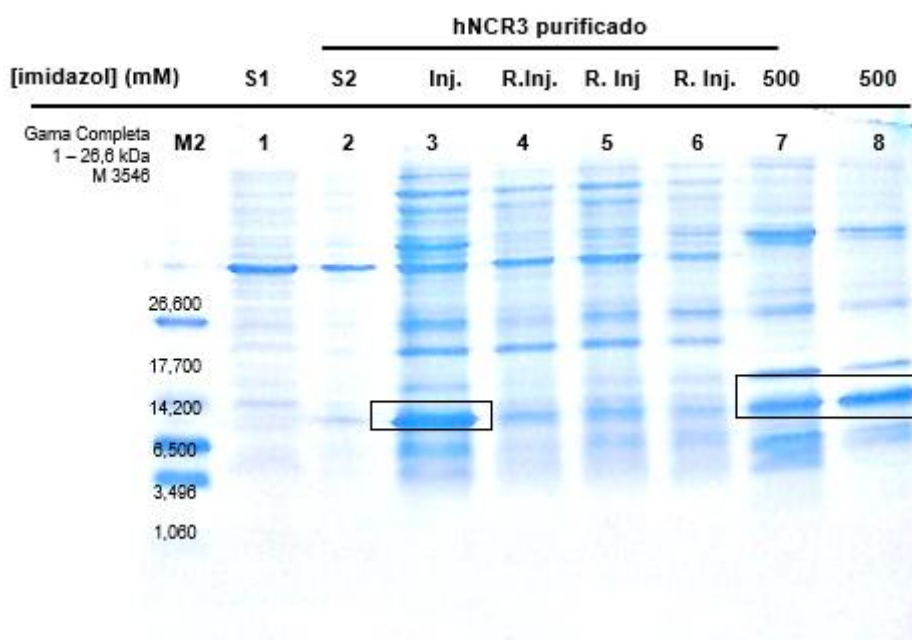


Figura 31 – Análise por eletroforese (SDS-PAGE) após purificação da proteína hNCR3. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 – sobrenadante 1; 2 – sobrenadante 2; 3 – injeção da amostra; 4 – recolha da injeção; 5 – recolha da injeção; 6 – recolha da injeção; 7 – purificação com 500 mM de Imidazol; 8 – purificação com 500 mM de Imidazol.

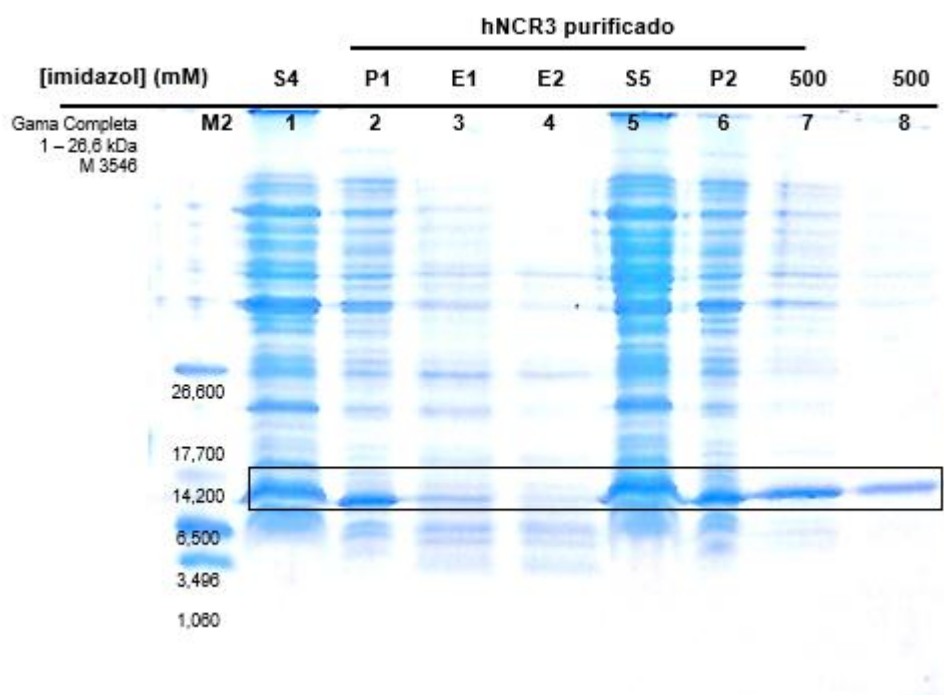


Figura 32 – Análise por eletroforese (SDS-PAGE) após purificação da proteína hNCR3. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 60 min. M2 - Ultra-Low Range Markers M 3546; 1 – sobrenadante 4 obtido através da lise das células; 2 – *pellet* 1; 3 – eluído 8M ureia; 4 – eluído 8M ureia; 5 – sobrenadante 5 obtido através da lise das células; 6 – *pellet* 2; 7 – purificação com 500 mM de Imidazol; 8 – purificação com 500 mM de Imidazol.

3.7. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O método de Bradford é uma técnica para determinação de proteínas totais que utiliza o corante de *Comassie brilliant blue* BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante e as moléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm, desta forma, após a reação do corante com a proteína, aparece uma coloração azulada [55]. Após a realização deste método obteve-se a curva cujo modelo linear explica 97% da variância da variável, o que torna o modelo explicativo.

A partir da equação da reta obtida, realizou-se a quantificação das proteínas hNCR3 e hNCR3LG1 apresentadas na Tabela 12, onde foi possível observar que para o receptor o fator de diluição 2 foi o único onde apresentou resultado significativo, enquanto para o ligante, a diluição de 2 e 4, apresentaram resultados significativos. Em ambas as proteínas, percebeu-se que quando as amostras estavam muito diluídas não se pode obter resultados conclusivos.

Tabela 12 - Quantificação das proteínas em diferentes diluições através do método de Bradford com padrão de BSA

Amostra	Diluição	Abs595 nm	Concentração	Concentração em relação à diluição (mg/mL)
<i>hncr3</i>	2	0,49	0,07	0,15
<i>hncr3</i>	4	0,40	-0,01	-0,02
<i>hncr3</i>	10	0,36	-0,05	-0,49
<i>hncr3lg1</i>	2	1,00	0,57	1,14
<i>hncr3lg1</i>	4	0,64	0,22	0,89
<i>hncr3lg1</i>	10	0,38	-0,03	-0,31

Estudos relatam que a quantificação através do método de Bradford é baseado na interação entre o corante e o grupo NH_3^+ das proteínas. Esta interação pareceu ser uma função da concentração de hidrogênio com ácido perclórico diluído e ácido clorídrico. Nem todas as proteínas têm a mesma proporção de grupos NH_4^+ e nem todos estes grupos reagem com o corante. Assim, a quantidade de coloração desenvolvida no ensaio do corante altera de acordo com a proteína utilizada [56].

3.8. INTERAÇÃO DO RECEPTOR hNCR3 COM O LIGANTE hNCR3LG1

Para avaliar a interação entre o receptor e o ligante, as duas proteínas foram misturadas e incubadas a 37 °C durante 30 e 60 min. Para verificar a sua associação, foi realizado um gel nativo, ou seja, gel sem a presença de SDS. O receptor hNCR3 havia sido previamente armazenado na concentração de 0,15 mg/mL, enquanto o ligante hNCR3LG1 estava na concentração de 1,01 mg/mL. Foram realizadas diferentes proporções de receptor com ligante, como apresentado na Tabela 13. Para que este estudo fosse observado, realizou-se o gel apresentado na Figura 33, o gel estudo foi feito em duplicata, onde dos poços 1 ao 4, foram colocadas as amostras de acordo com a proporção indicada na Tabela 13 com incubação de 30 min, e dos poços 5 ao 8, repetiu-se o estudo, porém com o tempo de incubação de 60 min.

Tabela 13 – Misturas preparadas para incubação do receptor hNCR3 com o ligante hNCR3LG1 para estudo de interação. Proporção 1:1 (receptor: ligante) equivale a 0,15 mg/mL de receptor para 1,01 mg/mL de ligante

Proporção (receptor: ligante)	hNCR3 (μ L)	hNCR3LG1 (μ L)
1:1	100,00	28,90
1:2	100,00	57,80
1:4	100,00	115,60
1:5	100,00	144,50

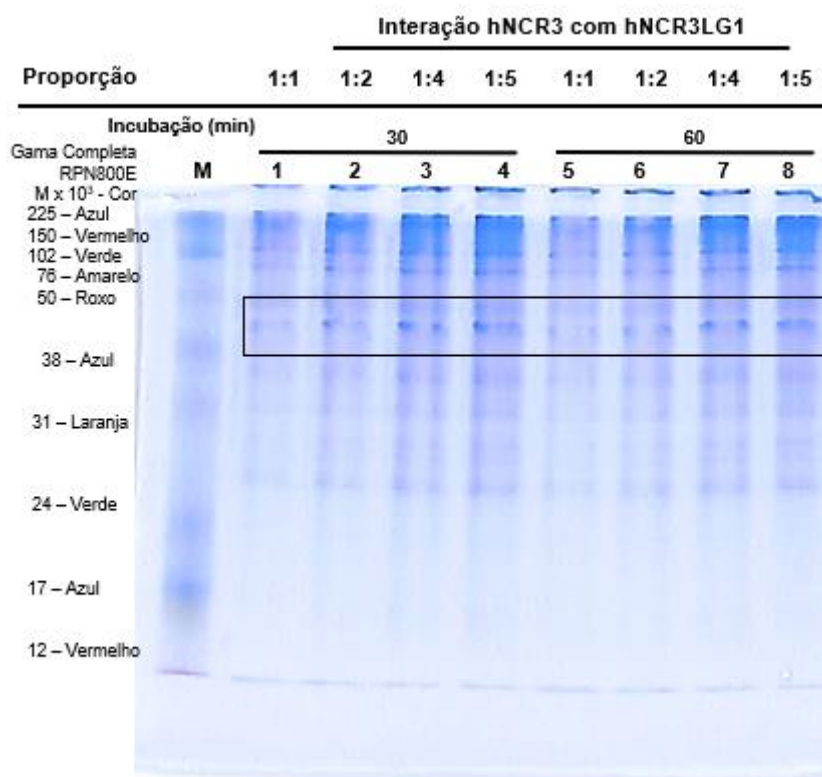


Figura 33 – Análise por eletroforese (gel nativo) após estudo de interação das proteínas. A eletroforese (gel de concentração de 4 % e gel resolvente de 15 %) foi corrida a 80 V durante 30 min e 120 V durante 150 min. M - Amersham ECL Rainbow Marker - Full range RPN800E; 1 – Interação na proporção de 1:1 do receptor com ligante após 30 min de incubação; 2 – Interação na proporção de 1:2 do receptor com ligante após 30 min de incubação; 3 –Interação na proporção de 1:4 do receptor com ligante após 30 min de incubação; 4 –Interação na proporção de 1:5 do receptor com ligante após 30 min de incubação; 5 –Interação na proporção de 1:1 do receptor com ligante após 60 min de incubação; 6 – Interação na proporção de 1:2 do receptor com ligante após 60 min de incubação; 7 – Interação na proporção de 1:4 do receptor com ligante após 60 min de incubação; 8 – Interação na proporção de 1:5 do receptor com ligante após 60 min de incubação.

Ao avaliar os resultados expressos na Figura 33, observou-se que em todos os poços apareceram a banda correspondente ao esperado, um fragmento com 43,9 kDa, desta forma, o tempo de incubação não foi fator significativo assim como a proporção. Ao aumentar a proporção de 1:4 em solução verificou-se que a banda correspondente ao complexo se tornou mais intenso.

4. CONCLUSÕES

Atualmente tem sido cada vez maior a necessidade de estudar proteínas relacionadas ao sistema imune. A tecnologia de ADN recombinante é recente, porém tem tido grandes avanços em ciências moleculares. Proteínas relacionadas ao sistema imune são fatores cruciais envolvidos em diversos tipos de doenças, tal como o câncer, por este motivo é necessário entender o mecanismo de ação destas proteínas para que sejam futuramente desenvolvidos mecanismos de prevenção, tratamento e/ou cura de doenças com grande incidência na população. Segundo estatísticas de câncer, esta é uma doença que tem uma alta taxa de mortalidade mundialmente.

Este trabalho teve como objetivo realizar a clonagem de proteínas envolvidas em processos imunes. Assim a clonagem foi efetuada para o receptor hNCR3 e para o ligante hNCR3LG1. As expressões das proteínas foram feitas com a utilização da bactéria *Escherichia coli*, através do método de indução com IPTG e autoindução, ambos os métodos foram eficazes, sendo assim, optou-se pela utilização sucessiva de indução com IPTG devido ao tempo de incubação ser inferior, apenas 6 horas, quando comparado com as 24 horas de autoindução. Na etapa de extração destas proteínas, concluiu-se que o receptor estava presente em corpúsculos de inclusão, enquanto o ligante estava presente no citoplasma bacteriano. Desta forma, para o *hncr3* foi necessário realizar a lise dos corpúsculos seguida da lise das células e purificação com *refolding* das proteínas, no entanto para o *hncr3lg1* foi necessário apenas realizar a lise das células e purificação geral, para obtenção das proteínas purificadas.

De modo geral os resultados foram satisfatórios, os métodos utilizados foram eficientes para que fossem obtidos resultados significativos para ambas as proteínas estudadas.

Estudos futuros como espectrometria de massa podem ser realizados de modo a confirmar os resultados obtidos neste trabalho, posteriormente poderão ser empregues os resultados em estudo de farmacocinética para desenvolvimento de novos fármacos associados ao sistema imune.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Molinaro, L. Caputo e R. Amendoeira, Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde, Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz , 2013.
- [2] C. Lopes e F. Amaral, “Explorando o Sistema Imunológico,” PUC-Minas, Brasil, 2011.
- [3] V. S. Santos, “Sistema Imunológico Humano,” Biologia net, [Online]. Available: <https://www.biologianet.com/anatomia-fisiologia-animal/sistema-imunologico-humano.htm>. [Acedido em 21 03 2021].
- [4] P. J. Delves, “Considerações gerais sobre o sistema imunológico,” Manual MSD Versão Saúde para a Família, 04 2020. [Online]. Available: <https://www.msmanuals.com/pt-pt/casa/doen%C3%A7as-imunol%C3%B3gicas/biologia-do-sistema-imunol%C3%B3gico/considera%C3%A7%C3%B5es-gerais-sobre-o-sistema-imunol%C3%B3gico>. [Acedido em 21 03 2021].
- [5] A. M. Pinto e M. S. Rosa, “Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações,” Lidel, 09 2013. [Online]. Available: <https://www.uc.pt/en/fmuc/phdhs/Courses/pathologyinflammation/InflamacaoReviewAMP>. [Acedido em 21 03 2021].
- [6] S. Linhares, F. Gewandsznajder e H. Pacca, Biologia Hoje, Rio de Janeiro: Ática, 2016.
- [7] K. Murphy, P. Travers e M. Walport, Janeway's Immunobiology, New York: Garland Science, 2008.
- [8] W. M. Cruvinel , D. M. Júnior, J. A. P. Araújo, T. T. T. Catelan, A. W. S. Souza, N. P. Silva e L. E. C. Andrade, “Sistema Imunitário - Parte I,” *Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória*, pp. 50(4):434-61, 18 05 2010.
- [9] M. Jobim e L. F. J. Jobim, “Natural Killer cells and immune surveillance,” *Células natural*

killer e vigilância imunológica, 2008.

- [10] A. C. Goldberg e L. V. Rizzo, “Estrutura do MHC e função – apresentação de antígenos. Parte 1,” 2014 03 27. [Online]. Available: DOI: 10.1590/S1679-45082015RB3122. [Acedido em 22 04 2021].
- [11] M. A. Geller e J. S. Miller, “Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy,” pp. 3(12): 1445-1459, 12 2011.
- [12] E. Viver, S. Ugolini, D. Blaise, C. Chanabannon e L. Brossay, “Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer,” p. doi: 10.1038/nri3174, 22 03 2012.
- [13] P. H. SalimI, M. JobimII, M. BredemeierIII, J. A. B. ChiesIV, J. C. T. Breno, F. Jobim e R. M. Xavier, “Características de atividade das células natural killer em pacientes com esclerose sistêmica,” *Revista Brasileira de Reumatologia*, vol. 53, nº 1, 2013.
- [14] K. Academy, “Ligantes e Receptores,” [Online]. Available: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/cell-signaling/mechanisms-of-cell-signaling/a/signal-perception>. [Acedido em 2021 04 23].
- [15] Y. Li, Q. Wang e R. A. Mariuzza, “Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, nº 4, pp. 703-714, 2011.
- [16] A. Moretta, C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Moretta e L. Moretta, “Activating Receptors and Coreceptors Involved in Human Natural Killer Cell-Mediated Cytolysis,” *Rev. Immunol*, p. 19:197–223, 2001.
- [17] P. V. Garapati, “Reactome,” NCR3LG1 liga NCR3, 27 03 2015. [Online]. Available: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-5685602>. [Acedido em 23 04 2021].
- [18] SinoBiological, “Visão geral da proteína NKp30/NCR3: Sequência, Estrutura, Função e Interação proteica,” [Online]. Available: <https://www.sinobiological.com/resource/nkp30-ncr3/proteins>. [Acedido em 23 04 2021].
- [19] G. t. H. G. Database, “Gene NCR3 (codificação de proteínas),” [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NCR3>. [Acedido em 23 04 2021].
- [20] G. t. H. G. Database, “NCR3LG1 gene (protein coding),” [Online]. Available: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NCR3LG1&keywords=NCR3LG1#genomic_location. [Acedido em

23 04 2021].

- [21] B. a. a. E. experts, "NCR3LG1 Infographic Natural Cytotoxicity Triggering Receptor 3 Ligand 1," [Online]. Available: <https://www.bosterbio.com/bosterbio-gene-info-cards/NCR3LG1>. [Acedido em 23 04 2021].
- [22] S. Biological, "B7-H6 Protein, Human, Recombinant (hFC Tag)," [Online]. Available: <https://www.sinobiological.com/recombinant-proteins/human-b7-h6-16140-h02h>. [Acedido em 23 04 2021].
- [23] M. C. Quecine , "Tecnologia do DNA Recombinante e Clonagem," Departamento de Genética - Universidade de São Paulo, [Online]. Available: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1720661/course/section/530598/Aula%2011%20-%20Tecnologia%20do%20DNA%20recombinante.pdf>. [Acedido em 23 04 2021].
- [24] J. C. Borge, "Tecnologia do DNA Recombinante," Departamento de Química e Física Molecular - Universidade de São Paulo, [Online]. Available: http://graduacao.iqsc.usp.br/files/Aula07BioqII-Qui_TecDNARecomb.pdf. [Acedido em 23 04 2021].
- [25] J. A. N. Candeias, "A Engenharia Genética," *Revista Saúde Pública*, pp. 25(1): 3-10, 1991.
- [26] K. Academy, "Visão geral: Clonagem de DNA," [Online]. Available: <https://pt.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/overview-dna-cloning>. [Acedido em 23 04 2021].
- [27] Kasvi, "Conheça a técnica de PCR, suas aplicações e princípios," 19 01 2018. [Online]. Available: <https://kasvi.com.br/3-etapas-pcr/>. [Acedido em 23 04 2021].
- [28] I. Rachel, "Reação em cadeia de polimerase (PCR)," *Jornal UFG*, 21 08 2014. [Online]. Available: <https://jornal.ufg.br/n/30634-reacao-em-cadeia-da-polimerase-pcr>. [Acedido em 23 04 2021].
- [29] A. Bruce, A. Johnson, J. Lewis, K. Roberts, P. Walter e M. Raff, *Biologia Molecular da Celula* 5ª edição, ArtMed, 2011. pág 545.
- [30] U. d. Lisboa, "Clonagem de expressão," [Online]. Available: <http://bmg.fc.ul.pt/Disciplinas/Eng%20Genetica/aulas/Clonagem%20de%20expressao.pdf>. [Acedido em 23 04 2021].

- [31] C. A. Miyamoto, "Produção de Proteínas Recombinantes em Escherichia coli," [Online]. Available: <http://www.aems.edu.br/conexao/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/1/21.pdf>.
- [32] V. Database, "Plasmid: pET-28 a(+)," [Online]. Available: <https://www.addgene.org/vector-database/2565/>. [Acedido em 24 04 2021].
- [33] E. M. S. Russo, "Sistemas de Expressão," Universidade de São Paulo. [Online]. [Acedido em 24 04 2021].
- [34] J. C. Borges, "Purificação de Proteínas," Depto. de Química e Física Molecular, [Online]. Available: <http://graduacao.iqsc.usp.br/files/Aula05BioqI-PurProteinas.pdf>. [Acedido em 24 04 2021].
- [35] R. J. Everson e H. E. Parker, "Effect of Hydrogen Ion Concentration on the Determination of Lead by Solvent Extraction and Atomic Absorption Spectrophotometry," *Department of Biochemistry, Purdue University, West Lafayette*, nº Ind. 4 7907.
- [36] I. T. L. Bresolin, E. A. Miranda e S. M. A. Bueno, "Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas.," *Química Nova*, vol. 32, nº 5, pp. 1288 - 1296, 2009.
- [37] K. S. Françoso, "Purificação de proteínas recombinantes por cromatografia de troca iônica," [Online]. Available: <https://pt.slideshare.net/KtiaSanchezFranoso/cromatografia-para-purificao-de-protenas>. [Acedido em 24 04 2021].
- [38] A. Charlton e M. Zachariou, "Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography of Histidine-Tagged Fusion Proteins," *Springer Protocols*, 2008.
- [39] J. J. A. Armenteros, . K. D. Tsirigos, C. K. Sønderby, T. N. Petersen, O. Winther, S. Brunak, G. Heijne e H. Nielsen, "SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks," *Nat Biotechnol*, vol. 37, p. 420–423, 2019.
- [40] Uniprot, "Natural cytotoxicity triggering receptor 3 ligand 1," [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q68D85>. [Acedido em 20 05 2021].
- [41] "DH5-Alpha Cell," Wikipedia, [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/DH5-Alpha_Cell. [Acedido em 05 06 2021].
- [42] "BL21(DE3)," NZYTech, [Online]. Available: <https://www.nzytech.com/products->

- services/molecular-biology/competent-cells-media/competent-cells/expression-strains/mb006/. [Acedido em 2021 06 05].
- [43] V. D. Magalhães, J. C. Ferreira, C. Barelli e A. L. C. Darini, “Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia - uma revisão técnica,” *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, vol. 64, nº 2, 2005.
- [44] NZYtech, “Supreme NZYProof DNA polymerase,” [Online]. Available: https://www.nzytech.com/wp-content/uploads/2019/04/mb283_pb_v1902.pdf. [Acedido em 24 04 2021].
- [45] R. A. Mesquita, E. K. Anzai, R. N. Oliveira e F. D. Nunes, “Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR,” *Pesquisa Odontológica Brasileira*, vol. 15, nº 4, 2001.
- [46] NanoDrop, “260/280 and 260/230 Ratios NanoDrop ND-1000 and ND-8000 8 samples Spectrophotometers,” TECHNICAL SUPPORT BULLETIN, [Online]. Available: https://bio.davidson.edu/projects/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf. [Acedido em 2021 05 26].
- [47] N. Casali, *E. coli Plasmid Vectors. Methods in Molecular Biology*, Humana Press, 2003.
- [48] M. Kostylev, A. E. Otwell, R. E. Richardson e Y. Suzuki, “Cloning Should be Simple: Escherichia coli DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies,” *Plos One*, p. 10(9): e0137466, 2015.
- [49] T. Chauhan, “Genetic Education,” 20 03 2019. [Online]. Available: <http://geneticeducation.co.in/what-is-colony-pcr/>. [Acedido em 25 04 2021].
- [50] G. Tomazetto, “Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de jaburetox-2Ec em Escherichia coli BL21 utilizando lactose como indutor,” 04 2006.
- [51] S. Gräslund, P. Nordlund e et al, “Protein production and purification,” *Nat Methods Structural Genomics Consortium*, vol. 5, nº <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.202>, p. 135–146, 2008.
- [52] Merck, “Purification of Membrane Proteins,” [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/purifying-challenging-proteins/purification-his-tagged-proteins.html>. [Acedido em 26 04 2021].
- [53] Merck, “merckmillipore,” [Online]. [Acedido em 26 04 2021].

- [54] Vivaproducts, "Technical data and operating instructions Vivaspin® 6 and 20 ml," [Online]. Available: <https://www.vivaproducts.com/downloads/vivaspin-6-20-operating-instructions.pdf>. [Acedido em 26 04 2021].
- [55] D. A. M. Zaia, C. T. B. Zaia e J. Lichtig, "Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes," *Química Nova*, p. 6, 1998.
- [56] A. C. P. Miwa, "Comparação e avaliação dos métodos colorimétricos utilizados para determinação de proteínas em lagoas de estabilização.," São Carlos, 2003.
- [57] Benchling, "pCMV3-NCR3 (6664 bp)", [Online]. Available: https://benchling.com/goncalo-justino/f/lib_Gycjilwm-z_july/seq_5ww70SmE-pcmv3-ncr3/. [Acedido em 29 06 2021].
- [58] Benchling, "pET28a(+)-Hs_NCR3 (5665 bp)", [Online]. Available: https://benchling.com/goncalo-justino/f/lib_Gycjilwm-z_july/seq_5ww70SmE-pcmv3-ncr3/. [Acedido em 29 06 2021].
- [59] Benchling, "pCMV3-NCR3LG1 (7423 bp)", [Online]. Available: https://benchling.com/goncalo-justino/f/lib_Gycjilwm-z_july/seq_HN7mr4E6-pcmv3-ncr3lg1/. [Acedido em 29 06 2021].
- [60] Benchling, "pET28a(+)-Hs_NCR3LG1 (6058 bp)", [Online]. Available: https://benchling.com/goncalo-justino/f/lib_Gycjilwm-z_july/seq_MsRfeLlp-pet28a-hs-ncr3lg1/. [Acedido em 29 06 2021].

6. ANEXOS

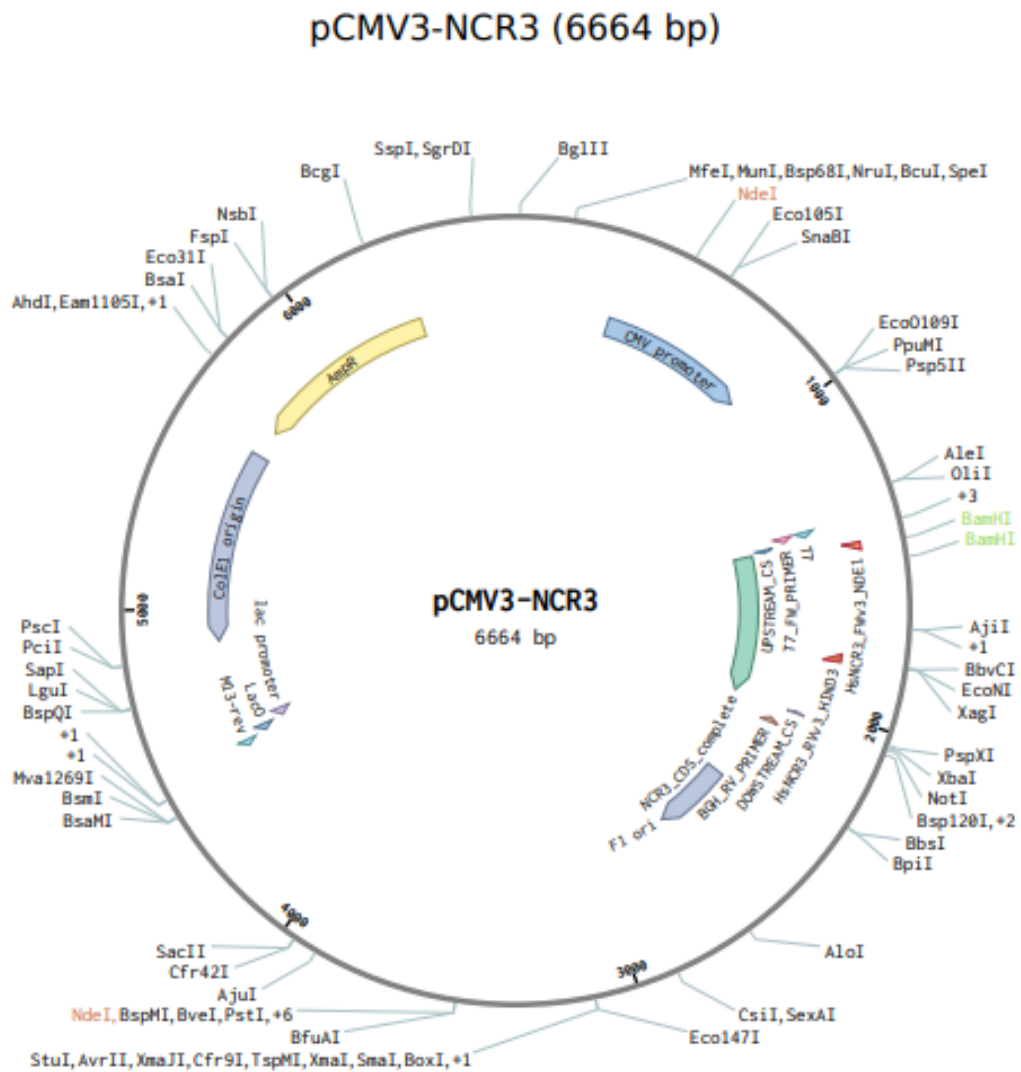


Figura A 1 - Mapa do plasmídeo pCMV3-NCR3 [57].

pET28a(+)-Hs_ncr3lg1 (6058 bp)

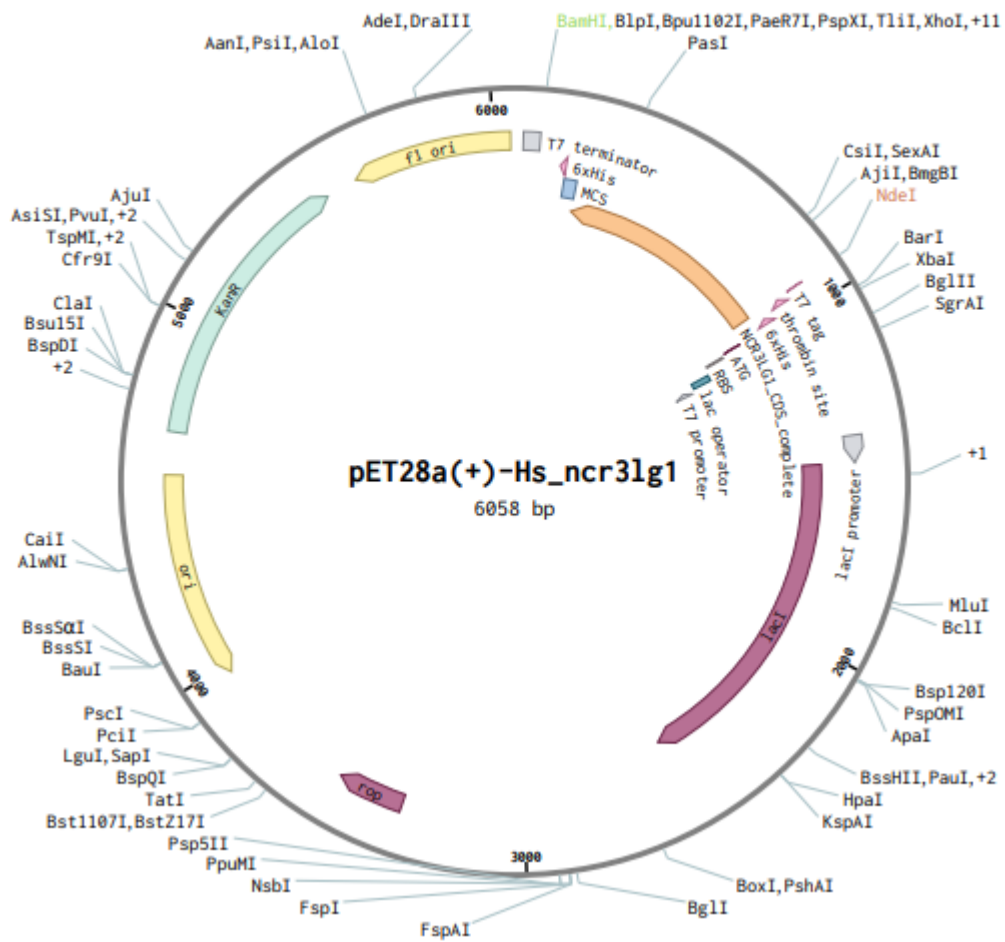


Figura A 4 - Mapa do plasmídeo pET28a(+)-Hs_NCR3LG1 [60].

