



Daniela Penas da Silva

Licenciatura em Bioquímica

Estudo do Efeito de Radiação Ionizante em Metaloproteínas que ligam DNA

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Professor Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista
Arguente: Prof. Doutora Isabel Cristina da Costa Garcia Timóteo
Vogal: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2011

Daniela Penas da Silva

Licenciatura em Bioquímica

**Estudo do Efeito de Radiação Ionizante em
Metaloproteínas que ligam DNA**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia

Orientador: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira
Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Professor Auxiliar, FCT-UNL

Setembro 2011

“Copyright”

Estudo do Efeito de Radiação Ionizante em Metaloproteínas que ligam DNA

Daniela Penas da Silva

Faculdade de Ciências e Tecnologia/Universidade Nova de Lisboa

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus orientadores, Professora Alice Pereira e Professor Pedro Tavares, a oportunidade e a confiança que depositaram em mim para a realização desta dissertação de mestrado. Quero agradecer todo o apoio, estimulação, ajuda e disponibilidade, não só deste último ano como aquando a realização do projecto de licenciatura. Estou muito grata pela amizade, bons conselhos e ajuda prestada, sem a qual não era possível a elaboração desta dissertação. Pelo meu crescimento científico e pessoal, e por tudo, quero expressar o meu agradecimento. Muito obrigado!

Quero também agradecer o acolhimento que tive no grupo de investigação, onde tive a oportunidade de conhecer pessoas extraordinárias e onde me foram partilhadas muitas experiências e conhecimentos, nomeadamente em relação a proteínas que interagem com DNA e sua caracterização por espectroscopia de Mössbauer.

Seguidamente quero agradecer ao Filipe Folgosa, não só pela sua paciência e preciosa ajuda ao longo deste projecto, mas principalmente pela amizade, disponibilidade e bons conselhos. Obrigado!

À Cristina Cordas, Cristina Timóteo, Joana Wilton e Magda Reis por toda a ajuda, amizade e companheirismo. À Susana Ramos, Rui Almeida, Ana Pina, Inês Graça e Leonor Morgado pelo apoio, pelo interesse e pelo convívio. Obrigado a todos por me terem proporcionado um ano extraordinário e por contribuírem para a pessoa que sou hoje.

Aos meus amigos mais próximos e família pelo apoio demonstrado e presença desde sempre. Em especial à minha Mãe, ao meu Pai, ao meu Irmão e aos meus Tios por me terem proporcionado a realização deste ciclo. Obrigado!

E por último, mas importante, ao Fábio por toda a paciência, ajuda e dedicação demonstrada ao longo destes anos. Obrigado!

RESUMO

A integridade do DNA na célula está sob constante ameaça de agentes nocivos de origem endógena e exógena. As lesões provocadas no DNA, já bem conhecidas, podem levar à modificação das bases do DNA ou podem causar alterações químicas devido à formação de espécies reactivas de oxigénio. Consequentemente as células desenvolveram sistemas sofisticados de reparação do DNA que corrigem a grande maioria das lesões.

O tipo de interacção/efeito pela radiação UV ou espécies reactivas de oxigénio em proteínas que interagem com o DNA, tais como as proteínas da família dos *zinc finger*, não é bem conhecido.

O objectivo principal deste trabalho é avaliar o efeito da radiação em proteínas com o domínio *zinc finger* clássico/C₂H₂, envolvidos na reparação do DNA, utilizando a proteína GAGA-DBD para o estudo, uma vez que esta possui apenas um domínio. Deste modo, produziu-se a proteína GAGA-DBD em *Escherichia coli* de uma forma solúvel, com rendimento de 6,5 mg/L de cultura. A proteína recombinante foi caracterizada bioquímica e espectroscopicamente, tendo-se determinado um coeficiente de extinção molar a 280 nm igual a 1060 M⁻¹cm⁻¹ e a constante de dissociação de 1,33x10⁻⁴ M para o complexo GAGA-DBD-Fe, determinada por espectroscopia de Mössbauer.

Na presença de zinco, a proteína GAGA-DBD tem uma elevada afinidade para o DNA em cadeia dupla, pensando-se que o ião Zn adopta uma função estrutural. No entanto após 5 minutos de exposição à radiação UV a proteína é degradada e deixa de proteger a cadeia de DNA. Por outro lado, na presença de ferro a proteína GAGA-DBD também interacciona com o DNA, mas os resultados obtidos parecem indicar a ocorrência de dois processos concorrentes. Por um lado a ligação ao DNA e consequente protecção à radiação ionizante, por outro a degradação do DNA livre via reacções de Fenton, devido à presença de oxigénio molecular.

ABSTRACT

The integrity of DNA in the cell is under constant threat from damaging agents of endogenous or exogenous origin. The well-known DNA damage can lead to modification of DNA bases or can cause chemical changes caused by formation of reactive oxygen species. As a consequence, cells have developed sophisticated DNA repair systems that covers most of the lesions inflicted, highly conserved from prokaryotes to eukaryotes.

The type of interaction/effect caused by UV radiation or reactive oxygen species in proteins that interact with DNA, such as *zinc fingers*, is still unclear.

The main objective of this study is to evaluate the effect of ionizing radiation on proteins with the classic/C₂H₂ zinc finger domain, using GAGA-DBD as the protein model, since it has only one zinc finger domain. Thus, GAGA-DBD was produced in *Escherichia coli* in a soluble form, with a yield of 6,5 mg/L of culture. The recombinant protein was characterized at the biochemical and spectroscopic levels. A molar extinction coefficient at 280 nm equal to 1060 M⁻¹cm⁻¹ was determined and the dissociation constant for the complex GAGA-DBD-Fe was 1,33x10⁻⁴ M, determined by Mössbauer.

In the presence of zinc, GAGA-DBD protein has a high affinity to double strand DNA, due to structural role of the metal ion. UV radiation exposure of the metal loaded protein leads to its degradation and no longer protection of the DNA chain. On the other hand, in the presence of iron, GAGA-DBD also interacts with DNA, but the results seem to indicate two concomitant events. In one way the protein-metal complex binds DNA resulting in its protection, but at the same time, free DNA is degraded by Fenton reactions, due to the presence of molecular oxygen.

ÍNDICE

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1.1 Factores de Transcrição	1
1.2 Metaloproteínas	2
1.3 <i>Zinc Finger</i>	3
1.4 Interação do motivo <i>zinc finger</i> clássico/C ₂ H ₂ com DNA	11
1.5 Domínios <i>zinc finger</i> em enzimas que reparam o DNA	14
1.6 Aplicação terapêutica de <i>zinc fingers</i>	15

Capítulo 2

OBJECTIVOS	17
------------	----

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e sobre-expressão do gene <i>GAGA-DBD</i>	21
3.2 Purificação da proteína <i>GAGA-DBD</i>	22
3.3 Quantificação proteica	23
3.4 Reconstituição do centro metálico	23
3.5 Quantificação de iões metálicos	26
3.6 Caracterização do centro metálico	26
3.7 Ensaio de retardamento da mobilidade electroforética (<i>mobility shift-assay</i>)	27
3.8 Exposição à radiação ionizante	30

3.9	Descrições gerais	
3.9.1	Electroforese em gel de agarose para análise do DNA	31
3.9.2	Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	31
3.9.3	Electroforese em gel <i>NuPAGE 4-12% BisTris</i>	34
3.9.4	Isolamento de DNA plasmídico	34
3.9.5	Quantificação do DNA plasmídico isolado	34
3.9.6	Reacção de hidrólise dos vectores e purificação dos produtos resultantes da hidrólise	35
3.9.7	Reacção de ligação do gene <i>GAGA-DBD</i> ao vector de sobre-expressão pET-21c	36
3.9.8	Transformação de células competentes <i>E. coli</i> NZY5 α	37
3.9.9	Transformação de células <i>E. coli</i> BL21(DE3)	38

Capítulo 4

RESULTADOS

4.1	Clonagem do gene <i>GAGA-DBD</i>	39
4.2	Sobre-expressão do gene <i>GAGA-DBD</i>	43
4.3	Purificação da proteína <i>GAGA-DBD</i>	48
4.4	Quantificação da proteína <i>GAGA-DBD</i>	49
4.5	Reconstituição do centro metálico	52
4.6	Quantificação de iões metálicos	54
4.7	Caracterização do centro metálico	55
4.8	Ensaio de retardamento da mobilidade electroforética (<i>mobility shift assay</i>)	61
4.9	Exposição à radiação	64

Capítulo 5

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	67
------------------------------	----

Capítulo 6

BIBLIOGRAFIA	73
---------------------	----

Capítulo 7

ANEXOS

7.1 Mapa de restrição do gene <i>GAGA-DBD</i>	77
7.2 Mapa do vector de sobre-expressão pET-21c, <i>Novagen</i>	77
7.3 Marcadores de pesos moleculares	
7.3.1 Marcador de pesos moleculares <i>NZYDNA Ladder III</i> da <i>NZYTech</i>	78
7.3.2 Marcador de pesos moleculares <i>Hyper Ladder II</i> da <i>Bioline</i>	78
7.3.3 Marcador de pesos moleculares <i>Hyper Ladder V</i> da <i>Bioline</i>	79
7.3.4 Marcador de massas moleculares <i>Low Molecular Weight</i> da <i>NZYTech</i>	79
7.3.5 Marcador de massas moleculares pré-corado <i>SeeBlue</i> da <i>Invitrogen</i>	80
7.4 <i>Design</i> dos oligonucleótidos <i>forward</i> e <i>reverse</i>	81
7.5 Sequenciação e tradução do DNA	
7.5.1 Alinhamento das sequências obtidas do vector pET-21c– <i>GAGA-DBD</i> com a sequência do gene <i>GAGA-DBD</i>	82
7.5.2 <i>Reading frames</i> possíveis do gene <i>GAGA-DBD</i> no vector de sobre-expressão pET-21c– <i>GAGA-DBD_2</i> e pET-21c– <i>GAGA-DBD_8</i>	84
7.6 Isolamento de DNA plasmídico	85
7.7 Quantificação de íons metálicos	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Figura 1.1 Ângulos ideais em diferentes geometrias de coordenação do átomo de zinco (2).	2
Figura 1.2 Estruturas dos sítios de ligação ao DNA dos centros de zinco nos domínios de factores de transcrição.	3
Figura 1.3 Estrutura do <i>zinc finger</i> clássico/ C_2H_2 .	5
Figura 1.4 Estrutura <i>Gag knuckle</i> .	6
Figura 1.5 Estrutura <i>treble clef finger</i> .	7
Figura 1.6 Estrutura do grupo <i>zinc ribbon</i> .	8
Figura 1.7 Estrutura do grupo Zn_2/C_6 - <i>like finger</i> .	8
Figura 1.8 Estrutura do grupo <i>TAZ</i> .	9
Figura 1.9 Estrutura do grupo de pequenos <i>loops</i> de ligação ao átomo de zinco.	10
Figura 1.10 Estrutura do centro metálico em metalotioninas.	11
Figura 1.11 Interação de <i>zinc fingers</i> da proteína Zif268 com a cavidade maior da dupla hélice do DNA.	12
Figura 1.12 Contactos entre o <i>zinc finger</i> e as bases da cadeia de DNA pelos <i>fingers</i> clássicos e <i>fingers</i> não-standard (19).	13

Capítulo 2

OBJECTIVOS

Figura 2.1 Alinhamento das estruturas primárias dos domínios <i>zinc finger</i> de proteínas da família <i>zinc finger</i> clássico/ C_2H_2 .	18
Figura 2.2 Interação da proteína GAGA-DBD com a cavidade maior da dupla hélice do DNA.	19

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 3.1 Recta calibração típica do ferro padrão usada para determinar a concentração da solução mãe de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. 26

Capítulo 4

RESULTADOS

Figura 4.1 Verificação da Midiprep dos vectores pET-21c e pMA-GAGA-DBD. 39

Figura 4.2 Monitorização da reacção de hidrólise dos vectores com as enzimas de restrição *Nde* I e *Eco*R I. 40

Figura 4.3 Purificação dos fragmentos hidrolisados. 41

Figura 4.4 Vector de sobre-expressão pET-21c-GAGA-DBD. 42

Figura 4.5 Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína GAGA-DBD deduzidas das sequências de nucleótidos de dois pDNAs. 43

Figura 4.6 Verificação da sobre-expressão da proteína GAGA-DBD. 44

Figura 4.7 Verificação dos testes de sobre-expressão da proteína GAGA-DBD em meio LB/Ampicilina. Determinação das condições de indução. 45

Figura 4.8 Verificação dos testes de sobre-expressão da proteína GAGA-DBD em meio LB/Ampicilina. Estudo do efeito da concentração do indutor. 46

Figura 4.9 Perfil de expressão da proteína GAGA-DBD avaliado por SDS-PAGE (4-12% acrilamida). 47

Figura 4.10 Perfil de eluição da coluna Resource S para purificação da proteína GAGA-DBD. 48

Figura 4.11 Análise do passo cromatográfico em coluna Resource S por SDS-PAGE. 49

Figura 4.12 Rectas de calibração para o método colorimétrico do BCA. Estudo do efeito da composição em aminoácidos e do tampão. 50

Figura 4.13 Espectro de UV/Vísivel da proteína GAGA-DBD em tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA. 51

Figura 4.14 Proteína GAGA-DBD tal como purificada, controlo da reconstituição.	52
Figura 4.15 Proteína GAGA-DBD reconstituída com Fe(II), GAGA-DBD/Fe.	53
Figura 4.16 Proteína GAGA-DBD reconstituída com Zn(II), GAGA-DBD/Zn.	53
Figura 4.17 Proteína GAGA-DBD reconstituída com Co(II), GAGA-DBD/Co.	54
Figura 4.18 Espectros de Mössbauer sem campo aplicado a 150 K.	56
Figura 4.19 Espectros de Mössbauer sem campo aplicado a 5 K.	57
Figura 4.20 Espectros de Mössbauer com campo aplicado de 600 G a 5 K.	58
Figura 4.21 Espectros de Mössbauer sem campo aplicado a 150 K.	59
Figura 4.22 Espectros de Mössbauer com campo aplicado de 600 G a 5 K.	60
Figura 4.23 Verificação da formação de DNA em cadeia dupla usado nos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética.	61
Figura 4.24 Condições testadas para os ensaios de retardamento da mobilidade electroforética.	62
Figura 4.25 Ensaios de retardamento da mobilidade electroforética.	63
Figura 4.26 Efeito da radiação na ligação das proteínas GAGA-DBD ao DNA.	65

Capítulo 7

ANEXOS

Figura 7.1 Mapa do gene <i>GAGA-DBD</i> com enzimas de restrição utilizando o <i>software NEBcutter V2.0 (53)</i> .	77
Figura 7.2 Vector de sobre-expressão pET-21a-d (+), <i>Novagen (54)</i> .	77
Figura 7.3 Marcador de pesos moleculares <i>NZYDNA Ladder III</i> .	78
Figura 7.4 Marcador de pesos moleculares <i>Hyper Ladder II</i> .	78
Figura 7.5 Marcador de pesos moleculares <i>Hyper Ladder V</i> .	79
Figura 7.6 Marcador de massas moleculares <i>Low Molecular Weight (LMW)</i> .	79
Figura 7.7 Marcador de massas moleculares pré-corado <i>SeeBlue</i> .	80

Figura 7.8 Oligonucleótidos <i>forward</i> e <i>reverse</i> fornecidos pela <i>SATBVida</i> .	81
Figura 7.9 Rectas de calibração fornecidas pelo laboratório de análises <i>Atomic Emission Spectroscopy Service</i> , Departamento de química FCT/UNL.	87

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Tabela 1.1 Grupo de <i>zinc finger</i> e respectiva função/alvos de ligação.	4
---	---

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 3.1 Soluções e volumes utilizados no método colorimétrico para determinação de ferro.	25
---	----

Tabela 3.2 Condições experimentais utilizadas nos ensaios para determinar a temperatura e tempo de incubação óptimos.	28
--	----

Tabela 3.3 Ensaios de retardamento da mobilidade electroforética.	29
--	----

Tabela 3.4 Volumes necessários para a preparação de géis SDS-PAGE.	32
---	----

Tabela 3.5 Soluções <i>stock</i> para a preparação dos géis de poliacrilamida.	33
---	----

Tabela 3.6 Mistura da reacção de hidrólise dos vectores com a enzima <i>Nde I</i> .	35
--	----

Tabela 3.7 Reacção de ligação.	36
---------------------------------------	----

Tabela 3.8 Volumes de pDNA usados na transformação de células <i>E. coli</i> NZY5 α .	37
---	----

Tabela 3.9 Volumes usados na transformação de células <i>E. coli</i> BL21(DE3).	38
--	----

Capítulo 4

RESULTADOS

Tabela 4.1 Composição em amoniácidos aromáticos das proteínas padrão usadas na quantificação da proteína GAGA-DBD.	50
---	----

Tabela 4.2 Parâmetros de Mössbauer obtidos para a proteína GAGA-DBD na forma reduzida e oxidada.	61
---	----

ABREVIATURAS

BCA	Ácido bicinconínico
BER	Reparação por excisão da base danificada
dsDNA	DNA em cadeia dupla
Fpg	Formamidopirimidina-DNA glicosilase
GAGA-DBD	Domínio GAGA de ligação ao DNA
IAP	Inibidor de apoptose
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
NER	Reparação por excisão de nucleótidos danificados
O.D₆₀₀	Densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm
pb	Pares de bases
PDB	Banco de dados de proteínas
pDNA	DNA plasmídico
PSA	Persulfato de amónia
SCOP	Base de dados com a classificação estrutural de proteínas
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0,1% de SDS
TAZ	Adaptador transcricional <i>zinc finger</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1-,2-diaminometano
TFIIIA	Factor de transcrição IIIA
XPA	<i>Xeroderma pigmentosum group A complementing protein</i>
Zinc finger	Proteínas dedos de zinco
δ	Desvio isomérico (espectroscopia de Mössbauer)
ΔE_Q	Desdobramento de quadrupolo (espectroscopia de Mössbauer)

1 INTRODUÇÃO

As proteínas que se ligam ao DNA (ácido desoxirribonucleico) têm um papel importante nos sistemas biológicos. Entre outras funções, estas proteínas são responsáveis pela replicação do genoma, pela transcrição de genes activos e pela reparação de DNA danificado (1).

Uma das maiores e diversas classes de proteínas que se ligam ao DNA são os factores de transcrição que regulam a expressão génica, sendo responsáveis pela regulação do desenvolvimento celular, diferenciação e crescimento celular por ligação a sítios específicos do DNA (1).

1.1 Factores de Transcrição

Os factores de transcrição podem ser agrupados por famílias através da comparação das sequências de aminoácidos e dos motivos de estrutura secundária envolvidos no reconhecimento do DNA. Uma dada família deve ter, para além do enrolamento do motivo conservado que caracteriza a família, um mecanismo de acoplamento e um conjunto de contactos conservados. Algumas das famílias bem estabelecidas são proteínas do tipo *helix-turn-helix*, homeodomínios, proteínas *zinc finger*, receptores esteróides, proteínas *zipper* de leucina, proteínas hélice-volta-hélice, motivos de folha β , e outras proteínas que usam zinco ou outro metal divalente para estabilizar a estrutura, como o motivo de resíduos de cisteína, o motivo "CCHC" e o motivo LIM (1).

Devido à diversidade de famílias existentes e à comparação dos padrões de reconhecimento, esta permitiu fazer algumas considerações, tais como: i) o reconhecimento específico do sítio de ligação envolver sempre um conjunto de contactos com as bases do DNA e o esqueleto de DNA; ii) a ocorrência de pontes de hidrogénio ser crítica para o reconhecimento (embora interacções hidrofóbicas possam ocorrer); iii) não existir uma correspondência simples, de um para um, entre os contactos efectuados entre as cadeias laterais da proteína e as bases do DNA; iv) a maioria das interacções com as bases ser efectuada na cavidade maior da dupla hélice do DNA, sendo que os contactos efectuados com purinas parecerem ser especialmente importantes; v) a maioria dos motivos conterem hélices α que se encaixam na cavidade maior da dupla hélice do DNA na forma B, (no entanto, existem exemplos de que as folhas β possam ter um papel importante em certas proteínas, sendo o contacto efectuado através deste motivo menos comum); e vi) geralmente serem necessários múltiplos domínios de ligação ao DNA para o reconhecimento específico do sítio de ligação (1).

1.2 Metaloproteínas

O zinco é um importante metal nos sistemas biológicos, uma vez que é um ácido de Lewis forte, forma um ião estável Zn^{2+} e consegue formar complexos com vários tipos de geometria de coordenação. Nas proteínas, os iões zinco desempenham um papel importante, na catálise e expressão génica. Além disso estabilizam a estrutura das proteínas e ácidos nucleicos, preservam a integridade de organelos subcelulares, participam nos processos de transporte e também possuem um papel importante nos processos virais e imunológicos (2, 3).

A partir da análise de estruturas cristalográficas de moléculas pequenas foi possível retirar informação útil quanto ao tipo de coordenação do átomo de zinco, da geometria e das interações estereoquímicas entre este e o ligando. Por exemplo, foram observados números de coordenação de 4, 5 e 6, assim como números de coordenação mais elevados, embora com menos frequência. Na Figura 1.1 está representada o tipo de geometria de coordenação e os respectivos ângulos de coordenação ideais, para os números de coordenação 4, 5 e 6 (2).

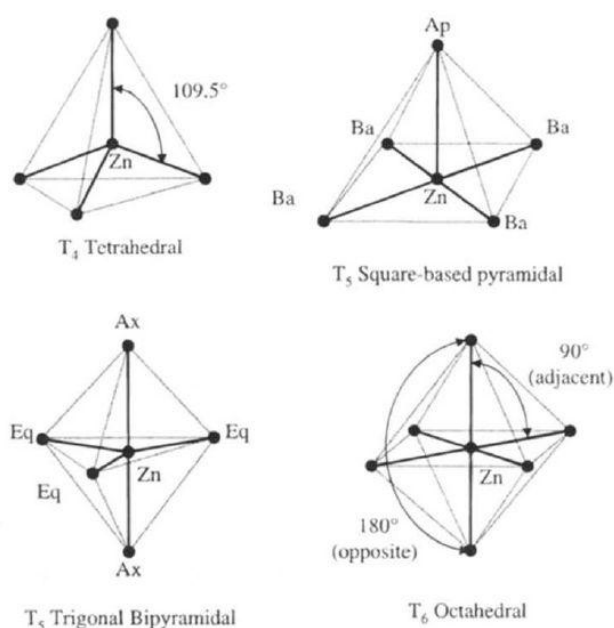


Figura 1.1 Ângulos ideais em diferentes geometrias de coordenação do átomo de zinco (2).

As proteínas com zinco constituem aproximadamente 10% do proteoma humano (4). De um modo geral, o átomo de zinco adota um arranjo tetraédrico, coordenado pelas cadeias laterais de resíduos de cisteína, histidina e ocasionalmente ácido aspártico ou ácido glutâmico. No domínio *zinc finger* de ligação ao DNA, o átomo de zinco tem um papel estrutural, estabilizando a estrutura terciária da proteína adequada para o estabelecimento das interações com os ácidos nucleicos (2).

Para além do motivo *zinc finger* foram reconhecidos outros dois motivos de proteínas de zinco que interactivam com DNA, denominados *zinc cluster* e *zinc twist* (5).

No motivo *zinc cluster* está incluído o factor de transcrição GAL4, que regula a expressão génica induzida pela presença de galactose. Contém um domínio ao qual se ligam dois átomos de zinco a seis resíduos de cisteínas num arranjo binuclear, com uma distância inter-metálica de aproximadamente 3,5 Å. No grupo dos motivos *zinc twist* está incluído o receptor glicocorticóide, em que cada átomo de zinco está ligado a quatro resíduos de cisteína, sendo a distância inter-atómica dos iões de zinco de aproximadamente 13 Å, mediada por uma hélice α que reconhece o sítio de ligação ao DNA. Na Figura 1.2 estão representadas esquematicamente as estruturas de cada motivo de proteínas de zinco que ligam DNA (5).

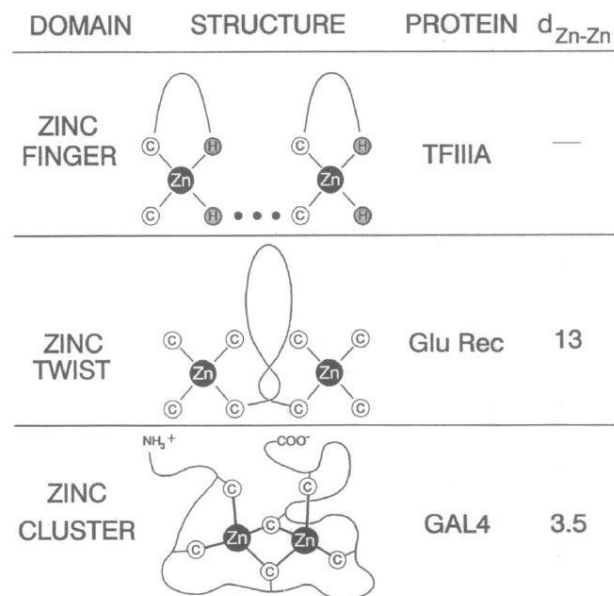


Figura 1.2 Estruturas dos sítios de ligação ao DNA dos centros de zinco nos domínios de factores de transcrição. A distância inter-atómica, d_{Zn-Zn} , é dada em Å (5).

1.3 Zinc Finger

O domínio de ligação *zinc finger* é provavelmente o domínio de proteínas intracelulares mais versátil. As proteínas que contêm motivos *zinc finger* formam uma das famílias estruturais mais dominantes em eucariontes, compreendendo aproximadamente 2% das proteínas codificadas pelo genoma humano. Os domínios *zinc finger* ligam um ou mais iões zinco, em que o ião metálico tem um papel estrutural, em vez de catalítico. São coordenados por ligandos de cisteína, histidina e ocasionalmente aspartato (6).

Uma das primeiras metaloproteínas de zinco descoberta foi o factor de transcrição IIIA (TFIIIA) de *Xenopus* (7), que controla a transcrição de um gene específico. Esta proteína foi descrita como um conjunto de aproximadamente 30 aminoácidos que se repetem ao longo da sequência do domínio, sendo este motivo designado por *zinc finger* (6). No entanto, o termo *zinc finger* foi alargado para pequenos domínios proteicos cuja estrutura é geralmente estabilizada pela formação de pontes dissulfureto, ou pela ligação do zinco que é sequestrado do solvente pelos resíduos de cisteína e histidina. A ligação do metal aumenta a estabilidade térmica e conformacional dos pequenos domínios, mas tipicamente não está envolvido na sua função (8). Alguns estudos sobre este domínio reportam que o *zinc finger* é um domínio estrutural independente, e que tal domínio se encontra *unfolded* na ausência do ião metálico e *folded* após adição de quantidades estequiométricas deste ou de outro metal (9).

O domínio *zinc finger* pode ser agrupado em grupos em função do tipo de enrolamento da cadeia polipeptídica (Tabela 1.1), tendo como base a conformação da cadeia e a estrutura secundária em torno do sítio de ligação do metal. Todos os domínios *zinc finger* que pertencem ao mesmo grupo possuem os ligandos do zinco no mesmo contexto estrutural. Na Tabela 1.1 estão apresentados os oito grupos representativos do domínio *zinc finger* (8).

Tabela 1.1 Grupo de *zinc finger* e respectiva função/alvos de ligação.

Tipo de enrolamento	Função/Alvos de ligação
<i>Zinc finger</i> clássico/C ₂ H ₂	DNA, Proteínas, RNA
<i>Gag knuckle</i>	RNA
<i>Treble clef finger</i>	DNA, Proteínas, RNA, Ubiquitina, Ésteres de forbol e diacilglicerol
<i>Zinc ribbon</i>	DNA, RNA
Zn ₂ /C ₆ -like <i>finger</i>	DNA
TAZ	Proteínas
Pequenos <i>loops</i> de ligação ao zinco	Não se conhece
Metalotioninas	Sequestrar metais

Grupo 1: *zinc finger* clássico/ C_2H_2

Domínios deste grupo são compostos por um β -*hairpin* seguido de uma hélice α , com o íon zinco coordenado por dois resíduos de cisteína do β -*hairpin* e dois de histidina da extremidade C-terminal da hélice α . A estrutura deste grupo é denominada de estrutura $\beta\beta\alpha$. No entanto, alguns *zinc finger* (especialmente o primeiro de vários *zinc finger* na mesma proteína a interagir com o DNA) requerem um elemento estrutural adicional para aumentar a estabilidade, e os dois ligandos de cisteína provêm da volta entre as folhas β do β -*hairpin* (*zinc knuckle*), cuja sequência consenso é CPXCG (8, 10, 11). Este grupo contém a família *finger* C_2H_2 e a família domínio IAP (inibidor de apoptose) (Figura 1.3), cuja função é interagir com DNA, proteínas e RNA (ácido ribonucleico) (6, 8, 10, 12).

A família *finger* C_2H_2 , tipicamente, é constituída pela repetição de uma sequência de aproximadamente 30 aminoácidos e interage com a cavidade maior da dupla hélice do DNA através do N-terminal da hélice α , sendo os resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos responsáveis pelos contactos específicos com 2 a 4 bases do DNA (6, 8). Aproximadamente metade das proteínas *finger* C_2H_2 com três ou mais *fingers* possuem a sequência TGEKP, altamente conservada (6, 12). Esta família inclui o factor de transcrição TFIIIA de *Xenopus*.

Na família do domínio IAP o átomo de zinco é coordenado por três resíduos de cisteína e um resíduo de histidina, adoptando uma estrutura similar à família *finger* C_2H_2 . Podendo, no entanto apresentar mais elementos estruturais para além da estrutura $\beta\beta\alpha$, como por exemplo, o baculovírus inibidor de apoptose que apresenta mais uma folha β e mais quatro pequenas hélices α . Além disso o comprimento da sequência entre os dois últimos ligandos ao átomo de zinco pode variar (8).

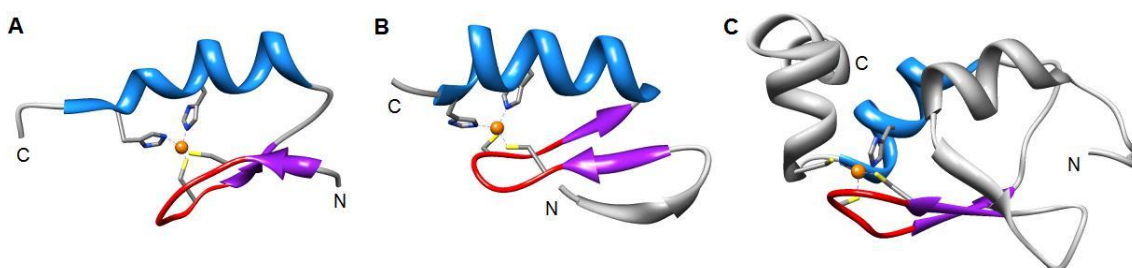


Figura 1.3 Estrutura do *zinc finger* clássico/ C_2H_2 . Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick*, hélice α de cor azul, β -*hairpin* de cor roxa, *zinc knuckle* de cor vermelha. (A) Estrutura da família *finger* C_2H_2 (1tf6; cadeia D, aminoácidos 133-162 do PDB); (B) Estrutura da família C_2H_2 (2drp; cadeia A, aminoácidos 103-135 do PDB), com a presença de uma folha β adicional no *zinc finger*; (C) Estrutura da família do domínio IAP (1g73; cadeia C, aminoácidos 296-330 do PDB), em que, o domínio possui uma folha β e quatro pequenas hélices α como elementos estruturais adicionais.

Grupo 2: *Gag knuckle*

As estruturas deste grupo são compostas por duas pequenas folhas β ligadas por uma volta (*zinc knuckle*) seguida de uma curta hélice α ou de um *loop* (Figura 1.4). Dois dos ligandos que coordenam o átomo de zinco provêm do *zinc knuckle* e os outros dois do *loop* ou de ambas as extremidades da hélice α curta. A estrutura assemelha-se à do grupo *finger* C_2H_2 , no entanto esta é mais pequena, contendo apenas cerca de 20 aminoácidos (8).

O grupo *Gag knuckle* contém *zinc finger* C_2HC a partir de proteínas *gag* retrovirais (nucleocapsídeos) e dele fazem parte a família *Gag knuckle* retroviral, a família *Gag knuckle* polimerase e a família *Gag knuckle* proteína σ_3 do capsídeo exterior do Reovírus (8).

A família *Gag knuckle* retroviral liga-se à cadeia simples de RNA e está envolvida no reconhecimento específico de sequências de RNA necessárias para o empacotamento viral (8). A família *Gag knuckle* polimerase inclui o *zinc finger* da subunidade A da RNA polimerase II, cuja função ainda é desconhecida, mas coloca-se a hipótese de poder estar envolvido na ligação ao RNA. No entanto, esta família contém um *loop* no lugar da curta hélice α . A família *Gag knuckle* proteína σ_3 do capsídeo exterior do Reovírus, tal como a família anterior, contém um *loop* após o *zinc knuckle* e possui a função de se ligar à dupla cadeia de RNA (8).

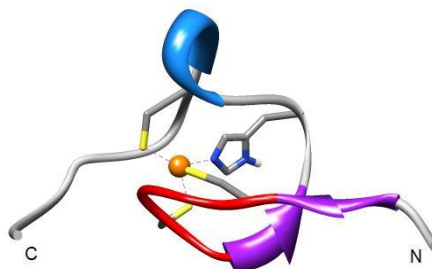


Figura 1.4 Estrutura *Gag knuckle*. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick*, hélice α de cor azul, β -*hairpin* de cor roxa, *zinc knuckle* de cor vermelha. Estrutura representativa da família *Gag knuckle* retroviral (1a1t; cadeia A, aminoácidos 33-55 do PDB).

Grupo 3: *treble clef finger*

O motivo *treble clef finger* é constituído por um β -*hairpin* no N-terminal e uma hélice α no C-terminal. Dois dos quatro ligandos que coordenam o átomo de zinco provêm do *zinc knuckle*, enquanto os outros dois ligandos provêm da primeira volta da região N-terminal da hélice α . Em muitos *treble clef finger*, um *loop* e um β -*hairpin* estão presentes entre o β -*hairpin* do N-terminal e a hélice α do C-terminal, podendo estes elementos estruturais variar em tamanho e comprimento (8, 13).

O motivo está presente em diversos grupos de proteínas que frequentemente não possuem uma semelhança sequencial e funcional. Análises anteriores revelaram que proteínas

classificadas em sete *folds* diferentes no SCOP (base de dados que classifica estruturalmente as proteínas, versão 1.53) contém o *treble clef finger* como um núcleo estrutural. As famílias principais deste grupo são a família *RING finger*, cuja função é interagir com proteínas (envolvida na ligação da ubiquitina), a família *nuclear receptor-like finger* que está envolvida na ligação a ácidos nucleicos, isto é, na transcrição e tradução, e a família *protein kinase cysteine-rich domain* que se liga a pequenos ligandos como ésteres de forbol e diacilglicerol, importantes moléculas na transdução de sinal (6, 8, 13). As estruturas deste grupo estão representadas na Figura 1.5.

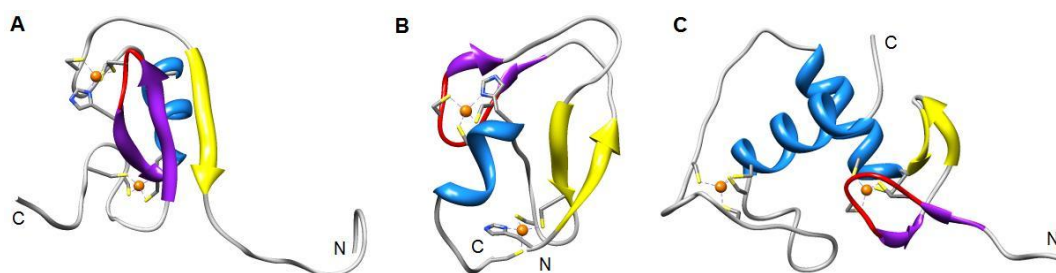


Figura 1.5 Estrutura *treble clef finger*. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick*, hélice α de cor azul, β -*hairpin* de cor roxa, *zinc knuckle* de cor vermelha. Folhas β adicionais de cor amarela. (A) Estrutura representativa da família *RING finger* (1chc; cadeia A do PDB); (B) Estrutura representativa da família *protein kinase cysteine-rich domain* (1ptq; cadeia A, aminoácidos 231-280 do PDB); (C) Estrutura representativa da família *nuclear receptor-like finger* (1hcq; cadeia A do PDB).

Grupo 4: *zinc ribbon*

Neste grupo, os ligandos do ião zinco provêm dos dois *zinc knuckle*, isto é, o núcleo da estrutura é composta por dois β -*hairpin* formando dois sítios de ligação ao zinco estruturalmente semelhantes. O β -*hairpin* primário está situado no N-terminal do domínio, com as folhas β , constituídas normalmente por 2 a 4 aminoácidos, enquanto o β -*hairpin* secundário está no C-terminal do domínio. Existe uma folha β adicional, característica, que forma pontes de hidrogénio com o β -*hairpin* secundário, formando assim três folhas β antiparalelas que podem ser constituídas por 4 a 10 aminoácidos, Figura 1.6 (8).

Os *zinc ribbon* estão presentes em diversos grupos de proteínas, mas normalmente apresentam uma semelhança na sequência muito limitada, que é principalmente restrita para os ligandos do metal. Devido a esta variabilidade de sequências a classificação deste grupo em famílias é complicado e requer mais dados quanto às relações evolucionárias (8). Deste modo apenas será abordada a família mais conhecida que é o *zinc ribbon* clássico.

A família *zinc ribbon* clássico inclui domínios de proteínas envolvidas na maquinaria do processo de transcrição e tradução, tais como factores de transcrição, primases, RNA

polimerases, topoisomerases e proteínas ribossomais. É também caracterizada pelo longo β -hairpin secundário (8).

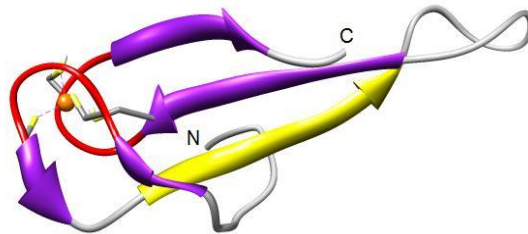


Figura 1.6 Estrutura do grupo *zinc ribbon*. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick*, β -hairpin de cor roxa, *zinc knuckle* de cor vermelha. Folha β adicional de cor amarela. (1tfi; cadeia A do PDB).

Grupo 5: Zn_2/C_6 -like finger

Neste domínio, os ligandos que coordenam o átomo de zinco provêm, dois, da hélice α no N-terminal e os outros dois do *loop* (8).

Este grupo contém duas famílias, a família Zn_2/C_6 *finger*, cuja região N-terminal em muitos reguladores da transcrição formam um centro binuclear de zinco estando os dois átomos de zinco coordenados por seis resíduos de cisteína (11), semelhante ao referido, anteriormente, no capítulo 1.2 e a família de factores de transcrição de resposta ao cobre que contém apenas o primeiro átomo de zinco do centro binuclear da família anterior (8).

Na Figura 1.7 está representada a estrutura deste grupo de Zn_2/C_6 -like finger.

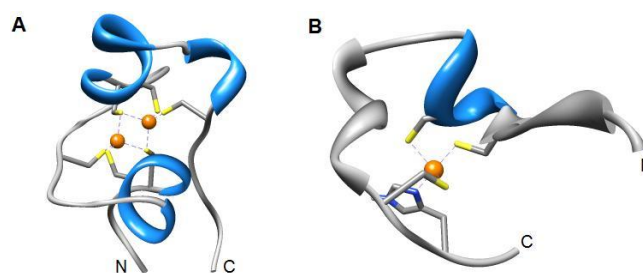


Figura 1.7 Estrutura do grupo Zn_2/C_6 -like finger. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick* e hélice α de cor azul. (A) Estrutura representativa da família Zn_2/C_6 *finger* (2hap;cadeia C, aminoácidos 61-98 do PDB); (B) Estrutura representativa da família de factores de transcrição de resposta ao cobre (1co4; cadeia A, aminoácidos 6-26 do PDB).

Grupo 6: TAZ

O grupo *TAZ* (*Transcription Adaptor putative zinc finger*) é caracterizado pelo facto dos ligandos que coordenam o átomo de zinco estarem localizados na extremidade das hélices α . Este grupo integra três famílias, o domínio *TAZ1* e *TAZ2* do co-activador transcricional CBP (proteína adaptadora de ligação transcricional-CREB), o domínio de ligação ao átomo de zinco da subunidade γ da DNA polimerase III, e o domínio N-terminal da HIV-1 integrase. A principal função deste grupo é mediar a interacção com proteínas (8).

A família do domínio *TAZ* do co-activador transcricional CBP coordena três átomos de zinco, formando uma estrutura triangular, onde cada átomo de zinco está na região do *loop* entre duas hélices α antiparalelas e é coordenado por um resíduo de histidina e três resíduos de cisteína (6, 10, 12).

A família do domínio de ligação ao átomo de zinco da subunidade γ da DNA polimerase III, possui quatro resíduos de cisteína a coordenarem o átomo de zinco, em que três são provenientes de duas hélices α e a outra do *loop* entre as hélices (8). Enquanto a família do domínio N-terminal da HIV-1 integrase é constituído por quatro hélices α , duas das quais formam o motivo *helix-turn-helix*, e o átomo de zinco é coordenado por dois resíduos de histidina da segunda hélice α e por dois resíduos de cisteína da quarta hélice α (8).

Na Figura 1.8 está representada a estrutura de cada uma das famílias.

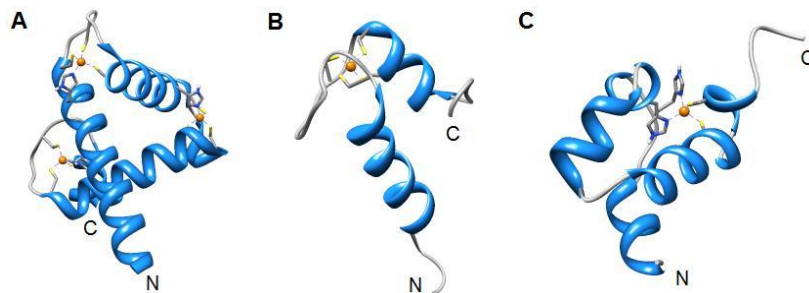


Figura 1.8 Estrutura do grupo *TAZ*. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick* e hélice α de cor azul. **(A)** Estrutura da família do domínio *TAZ* do co-activador transcricional CBP (1f81; cadeia A do PDB); **(B)** Estrutura da família do domínio de ligação ao átomo de zinco da subunidade γ da DNA polimerase III (1jr3; cadeia A, aminoácidos 46-89 do PDB); **(C)** Estrutura da família do domínio N-terminal do HIV-1 integrase (1wjb; cadeia A, aminoácidos 1-48 do PDB).

Grupo 7: pequenos *loops* de ligação ao zinco

Este grupo de domínios contém pequenos *loops* que são estabilizados pelo átomo de zinco, em que pelo menos três dos ligandos estão muito próximos uns dos outros na sequência do domínio. Em algumas proteínas o quarto ligando provém de um motivo secundário que fica longe dos outros ligandos na sequência (8).

Na Figura 1.9 está representada a estrutura deste grupo de pequenos *loops* de ligação ao zinco.

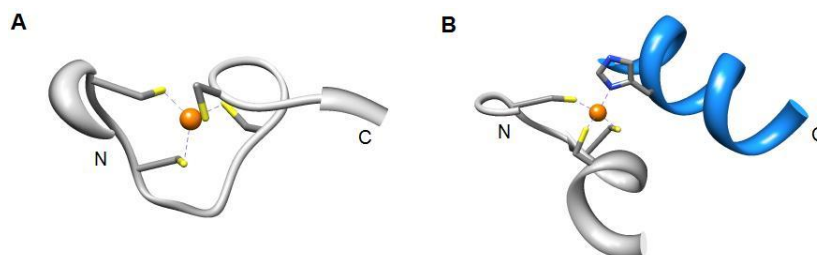


Figura 1.9 Estrutura do grupo de pequenos *loops* de ligação ao átomo de zinco. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick* e hélice α de cor azul. **(A)** Estrutura do grupo em que os ligandos estão próximos uns dos outros (1i3q; cadeia C, aminoácidos 84-97 do PDB); **(B)** Estrutura do grupo em que um dos ligandos se encontra num motivo secundário longe na sequência dos restantes ligandos (1enu; cadeia A, aminoácidos 316-325 e 344-352 do PDB).

Grupo 8: metalotioninas

O grupo de metalotioninas é composto por *loops* ricos em resíduos de cisteína que ligam uma variedade de metais, sendo que a cadeia da proteína forma um envolto em torno do metal (Figura 1.10). A função biológica das metalotioninas não está bem definida, no entanto sabe-se que sequestram o excesso de iões metálicos do meio celular, possivelmente para proteger a célula da sua toxicidade (8).

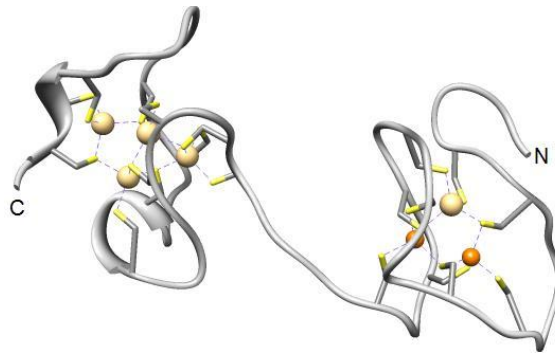


Figura 1.10 Estrutura do centro metálico em metalotioninas. Os ligandos que coordenam os metais (átomo de zinco de cor laranja e átomo de cádmio de cor amarela) estão representados por *stick*. (4mt2; cadeia A do PDB).

Dos grupos apresentados, apenas será abordado o primeiro grupo, *zinc finger* clássico/ C_2H_2 , uma vez que este domínio foi um dos primeiros a ser descoberto, estar muito bem caracterizado e interagir com o DNA.

1.4 Interação do motivo *zinc finger* clássico/ C_2H_2 com DNA

A interação de proteínas que possuem vários domínios *zinc finger* C_2H_2 com o DNA, normalmente envolve 3 a 4 destes domínios. O factor de transcrição Zif268 (também denominado por EGR-1, *Early growth response protein 1*), cuja interação com o DNA é bem conhecida e serve de modelo para outras proteínas, interage com o DNA através de 3 domínios *zinc finger*, que se enrolam em torno da dupla hélice e formam contactos com as bases do DNA através do N-terminal da hélice α (14).

Após estudos bioquímicos e estruturais deste grupo de *zinc finger* verificou-se que cada *zinc finger* da proteína pode interagir com 3 a 5 bases da cavidade maior da dupla hélice do DNA, assim como estabelecer contactos não específicos ao nível da cavidade menor (15). No primeiro caso, a interação é mediada pelos aminoácidos nas posições -1, 2, 3 e 6, relativamente ao início da hélice α (Figura 1.11) (16). Os aminoácidos na posição -1, 3 e 6 podem variar entre os *zinc finger* da mesma proteína, mas são altamente conservados entre os *zinc finger* equivalentes de proteínas homólogas de espécies diferentes (15).

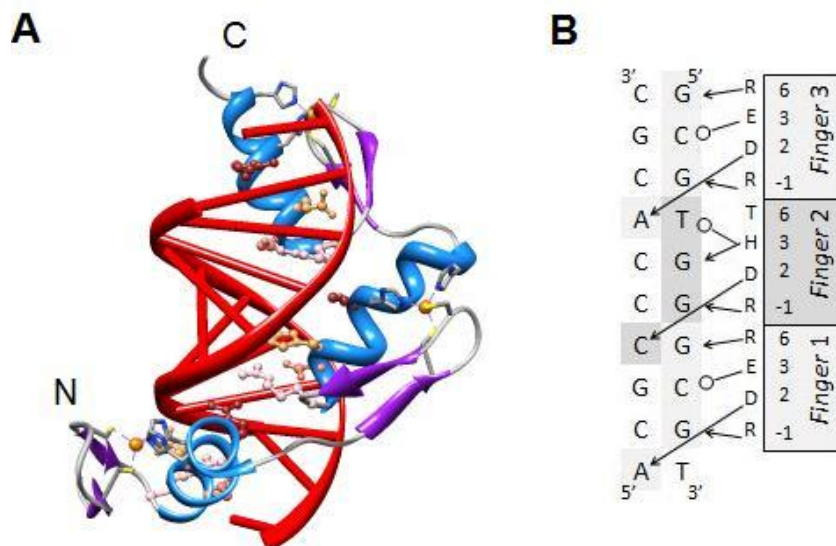


Figura 1.11 Interação de *zinc fingers* da proteína Zif268 com a cavidade maior da dupla hélice do DNA. **(A)** Os aminoácidos que interactivam com o DNA estão representados a *ball-and-stick*, aminoácido -1 (cor rosa), 2 (cor salmão), 3 (cor castanho arenoso) e 6 (cor castanha), respectivamente com início no N-terminal da hélice α . Cadeia dupla de DNA de cor vermelha, hélice α de cor azul, β -*haipin* de cor roxa. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick*. (1ZAA do PDB); **(B)** Contactos entre os aminoácidos das posições -1, 2, 3 e 6 com as respectivas bases da dupla cadeia de DNA. As setas representam contactos por pontes de hidrogénio e círculos abertos representam interações hidrofóbicas.

A proteína Zif268 utilizada como modelo, conforme referido anteriormente, interactiva com a sequência 5'-GCG-3' da cadeia codificante do DNA através dos *zinc finger* um e três e dos aminoácidos arginina (R) (posição -1), glutamato (E) (posição 3) e arginina (posição 6). Estabelece ainda interações com a sequência 5'-TGG-3', através do *zinc finger* dois e dos aminoácidos arginina (posição -1) e histidina (H) (posição 3). O resíduo de aspartato (D), na posição 2, contacta com uma citosina ou adenina da cadeia anticodificante (17), como representado na Figura 1.11 **(B)**. A afinidade desta proteína para a ligação ao DNA diminui pela seguinte ordem: *finger 2* > *finger 3* > *finger 1* (18).

Embora as estruturas conhecidas revelem ocorrência de contactos com bases específicas da dupla cadeia de DNA pelas posições -1, 2, 3 e 6, existem outros padrões alternativos de aminoácidos envolvidos na interação com as bases de DNA devido às variações que ocorrem no *docking* do *zinc finger*. Deste modo existem dois conjuntos, os *fingers* clássicos que têm o mesmo padrão de contacto com as bases como a proteína Zif268, e os *fingers* não-standards que possuem um padrão de contacto diferente da proteína zif268, uma vez que as posições -1 e 2 podem fazer contactos com ambas as cadeias de DNA (19), como representado na Figura 1.12.

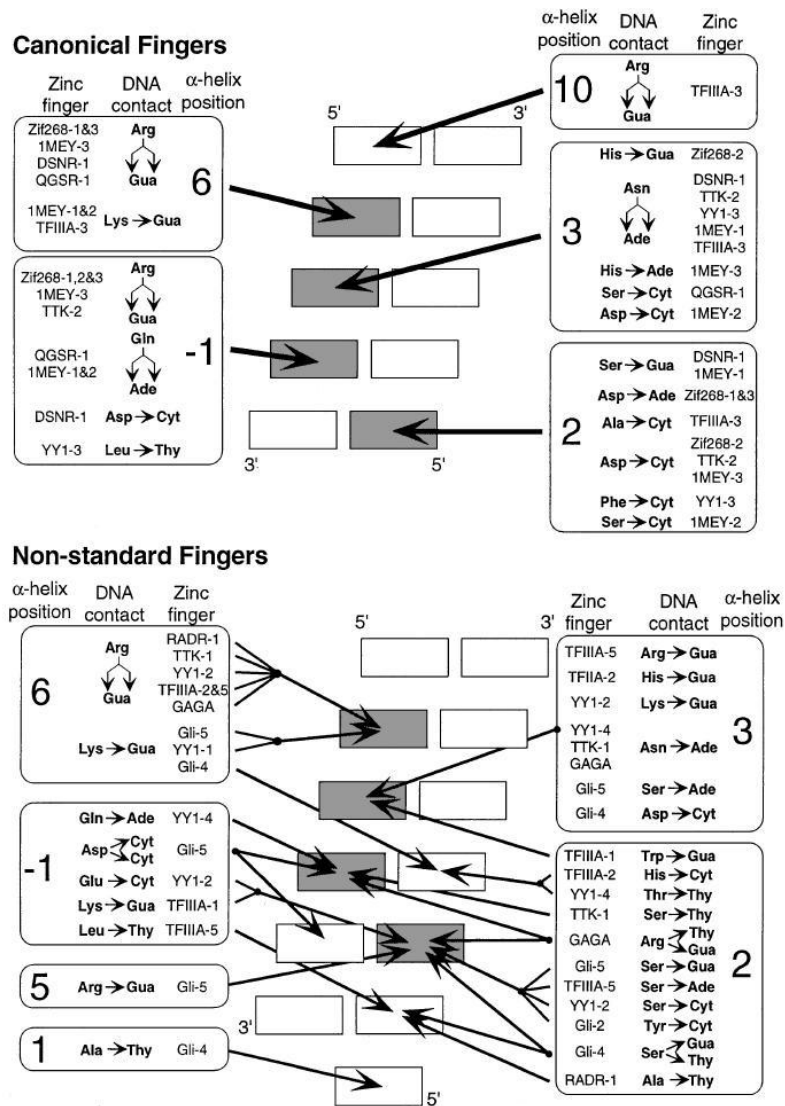


Figura 1.12 Contactos entre o *zinc finger* e as bases da cadeia de DNA pelos *fingers* clássicos e *fingers* não-standard (19).

Contactos através dos grupos fosfato da cadeia de DNA também podem contribuir para o aumento da afinidade do *zinc finger* para o DNA, embora ainda não se saiba se este tipo de interações contribui para a determinação de uma sequência específica (15, 19). A maioria dos contactos é estabelecida com a cadeia codificante do DNA, sendo os contactos mais conservados os efectuados pela histidina na posição 7 da hélice α , provavelmente devido ao facto deste resíduo estar envolvido na coordenação do átomo de zinco e deste modo colocar o núcleo do *zinc finger* mais próximo da dupla cadeia de DNA (19).

Por último, a sequência TGEKP correspondente ao espaçamento entre *zinc fingers* na mesma proteína é altamente conservada, como referido anteriormente, e tem um papel estrutural, uma vez que o resíduo de glutamato é importante na estabilização de interações entre os domínios *zinc finger*, o resíduo de lisina forma contactos directos ou indirectos, através

de moléculas de água, com os grupos fosfato da cadeia codificante de DNA e o resíduo de prolina, provavelmente, intensifica a ligação entre o espaçamento e a folha β seguinte (19).

1.5 Domínios *zinc finger* em enzimas que reparam o DNA

Tal como mencionado anteriormente, a integridade do DNA na célula está sob constante ameaça de agentes nocivos de origem exógena, como radiação UV, químicos e toxinas biológicas, e de origem endógena, como agentes resultantes do metabolismo celular, resultando em lesões oxidativas no DNA (20, 21). Lesões oxidativas no DNA não reparadas podem provocar morte celular, mutagénese, carcinogénese e envelhecimento celular (21).

De modo a evitar este tipo de lesões várias vias de reparação de DNA operam continuamente, tais como a reparação por excisão de nucleotídeos (NER), a reparação por excisão da base (BER), a quebra da cadeia e a reparação de bases complementares (*mismatch*) (22).

A via NER, normalmente, repara lesões volumosas como dímeros de timina causados pela radiação UV, enquanto a via BER repara modificações nas bases heterocíclicas resultantes da oxidação, desaminação ou alquilação (20).

Várias proteínas codificadas por proto-oncogenes e genes repressores de tumor contêm o domínio *zinc finger*, como por exemplo, a proteína XPA (*Xeroderma Pigmentosum group A complementing protein*) que reconhece lesões no DNA pela via NER, e a proteína Fpg (Formamidopirimidina-DNA glicosilase) que reconhece lesões no DNA pela via BER (22).

As proteínas envolvidas nas vias de reparação podem ser inibidas por diversos factores como o stress oxidativo e nitrosativo. O stress oxidativo tem tendência para inibir proteínas *zinc finger* irreversivelmente, enquanto o stress nitrosativo pode inibir as proteínas de uma forma moderada na ausência de oxidantes e é representado por reacções de (trans)nitrosilação. Por outro lado, o stress oxidativo-nitrosativo caracterizado por dadores de NO na presença de oxigénio resulta na inibição irreversível destas proteínas (22).

Para além dos factores mencionados, também os metais classificados carcinogénicos, níquel (Ni(II)), cádmio (Cd(II)), cobalto (Co(II)), arsénio (As(III)/As(V)), cobre (Cu(II)) e chumbo (Pb(II)) podem inibir as proteínas *zinc finger*, por substituição do átomo de zinco e, por consequência, alteração da geometria do átomo de coordenação, assim como alteração da estrutura secundária do domínio (22).

As proteínas Fpg e XPA contêm o átomo de zinco do domínio *zinc finger* coordenado por quatro resíduos de cisteína. A primeira proteína liga-se à dupla hélice do DNA e é uma proteína

multifuncional. Apresenta actividade catalítica de DNA glicosilase, AP liase e dioxirribosofodiesterase (21). A segunda proteína participa no reconhecimento da lesão e tem como principal função o recrutamento de várias proteínas funcionais para o local da lesão. Estudos revelaram que na via NER os metais Cd(II) e Ni(II) diminuem o reconhecimento da proteína para a lesão, o metal Co(II) inibe os passos de polimerização no processo de reparação, e que os três metais reduzem a frequência dos processos de incisão (23).

1.6 Aplicação terapêutica de *zinc fingers*

O *design* de domínios proteicos capazes de reconhecer qualquer sequência de DNA é um objectivo importante para a biologia molecular, mais precisamente para a terapia genética. Os domínios de ligação ao DNA com maior potencial para esta aplicação, são os *zinc finger* clássicos C_2H_2 devido à sua estrutura compacta $\beta\beta\alpha$ por coordenação ao átomo de zinco, podendo as proteínas *zinc finger* conter mais do que um domínio *zinc finger* (24-26).

O sistema *phage display* é um método para a produção de proteínas *zinc finger* capazes de interagir especificamente com várias sequências de DNA. A proteína Zif268 tem sido a mais utilizada na aplicação deste método, uma vez que a sua interacção com o DNA é bem conhecida. Neste método os três *zinc finger* da proteína são expressos na superfície de um fago filamentoso, sendo seguidamente geradas bibliotecas do fago Zif por alteração aleatória dos quatro aminoácidos que parecem ser importantes para o reconhecimento da ligação ao DNA pelo *zinc finger* (posições -1, 2, 3 e 6 da hélice α) (27, 28). Métodos de selecção por afinidade são posteriormente aplicados de modo a escolher o melhor fago para o reconhecimento das bases alteradas na sequência de DNA. A selecção da nova proteína pode ser efectuada em três passos: i) O primeiro *zinc finger*, que reconhece a porção 3' da sequência de DNA é seleccionado por *phage display*, mantendo os outros dois *zinc finger wild-type*; ii) O segundo *zinc finger*, que reconhece o meio da sequência alvo é seleccionado por *phage display* e adicionado ao *zinc finger* anterior, mantendo-se apenas o terceiro *zinc finger wild-type*; e iii) O único *zinc finger wild type* é descartado, uma vez que é seleccionado o terceiro *zinc finger*, que reconhece a porção 5' da sequência alvo, por *phage display* e adicionado aos anteriores (28).

2 OBJECTIVOS

Como anteriormente mencionado o DNA está continuamente a sofrer lesões, quer ambientais, quer endógenas. As lesões já bem conhecidas podem ser lesões directas (que levam à modificação das bases do DNA) ou indirectas através da formação de espécies reactivas de oxigénio que irão causar alterações químicas nas bases do DNA. No entanto, ainda não é bem conhecido o tipo de interacção/efeito por parte da radiação UV ou das espécies reactivas de oxigénio em proteínas que interagem com o DNA, como endonucleases, glicosilases ou *zinc fingers*.

Estas proteínas assumem um papel importante nos mecanismos de reparação do DNA, sendo portanto, necessário perceber a sua capacidade de resistir aos efeitos da radiação ionizante. Este tipo de conhecimento também é importante, tanto para profissionais que possam estar expostos à radiação, tanto para as metodologias de tratamento por radioterapia, como no caso do cancro.

Deste modo, o objectivo principal deste trabalho é perceber o efeito da radiação ionizante em metaloproteínas, mais concretamente em proteínas com domínio *zinc finger*. Estas proteínas são importantes uma vez que possuem uma elevada afinidade para o DNA, como factores de transcrição e como vias de reparação de lesões no DNA. A proteína com o domínio *zinc finger* escolhida para o estudo teve como critérios pertencer à família *zinc finger* clássico/C₂H₂, uma vez que é a família mais bem caracterizada, e ser de origem eucarionte. Além de obedecer a estes critérios foi necessário realizar uma pesquisa sobre proteínas pertencentes a este grupo de modo a perceber a relação domínios *zinc finger*/proteína. O estudo foi efectuado para a proteína Zif268, a proteína TFIIIA, a proteína *zinc finger* Gfi-1, a proteína repressora de transcrição YY1, o factor de transcrição SW15, a proteína Tramtrack (isoforma β) e o factor de transcrição GAGA. A comparação das estruturas primárias destas proteínas está evidenciada na Figura 2.1. Com base na comparação efectuada, a proteína escolhida para iniciar o estudo foi o factor de transcrição GAGA, uma vez que esta proteína possui um único domínio *zinc finger*, possibilitando um maior controlo do sistema.

O factor de transcrição GAGA de *Drosophila melanogaster* é codificado por um gene da família do *Trithorax* (*Trithorax-like gene*). Esta proteína é necessária para a normal expressão de múltiplos genes, incluindo os homeóticos, actuando como um remodelador na configuração da cromatina local. Os genes alvos deste factor de transcrição são genes *heat shock* (*hsp60* e *hsp70*), histona h3/h4, genes homeóticos e genes constitutivos (29, 30).

A proteína GAGA liga-se a sequências ricas em GA (motivos sequenciais (GA)_n), sendo que o tamanho da repetição pode variar. A proteína compreende três domínios: um domínio N-terminal POZ/PTB que interage com proteínas, um domínio central que interage com o DNA (GAGA-DBD, domínio GAGA de ligação ao DNA), e um domínio C-terminal rico em poliglutamina (29, 30).

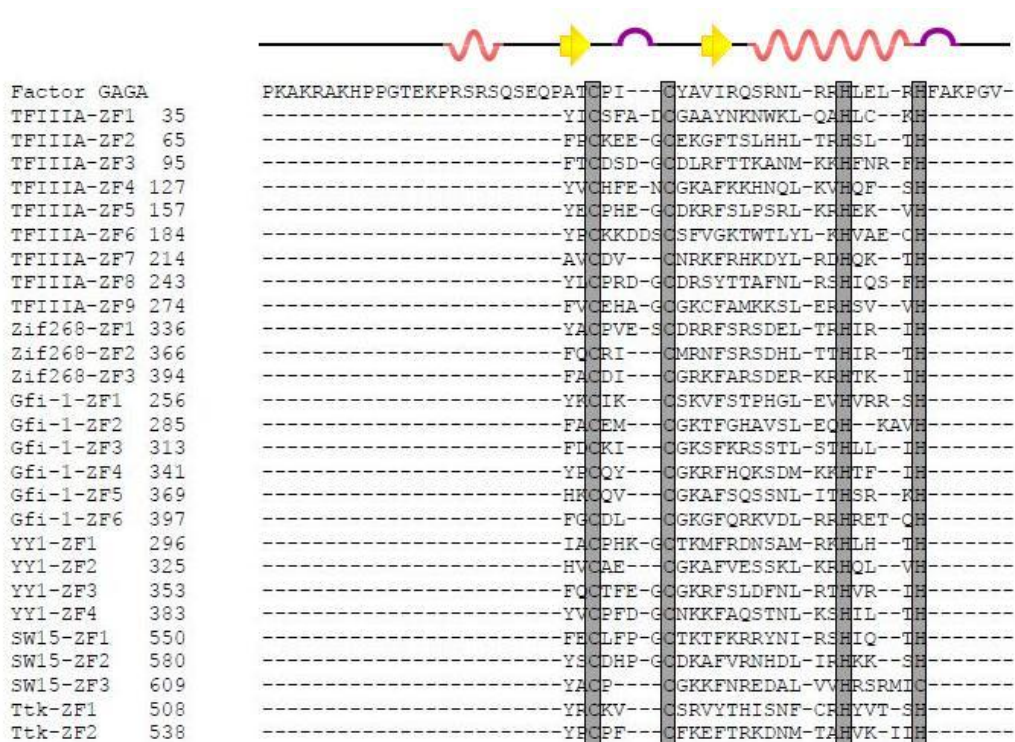


Figura 2.1 Alinhamento das estruturas primárias dos domínios *zinc finger* de proteínas da família *zinc finger* clássico/C₂H₂. O alinhamento foi efectuado pelo software *ClustalW* (31). Os aminoácidos conservados para a ligação do átomo de zinco estão assinalados por caixas a cinzento. A estrutura secundária deste domínio está representada no topo do alinhamento, estando as folhas β representadas a amarelo, a hélice α representada a rosa e o *loop* representado a roxo.

O domínio GAGA-DBD que compreende os aminoácidos 319-372 possui duas regiões altamente básicas imediatamente antes do domínio *zinc finger*, no entanto estudos revelam que a sua presença ou ausência não influenciam a ligação ao DNA (29).

De um modo geral, domínios desta família de *zinc finger* C₂H₂ possuem no β-*hairpin* e na hélice α aminoácidos hidrofóbicos conservados, tipicamente tirosina, fenilalanina e leucina. Estudos nesta proteína revelaram que o aminoácido leucina na posição 4 da hélice α é importante para o enrolamento do domínio e aparentemente influencia a ligação ao DNA (32), assim como a alanina na posição 1 da primeira folha β é importante para a ligação específica ao DNA (33).

Por último, a ligação da proteína GAGA-DBD ao DNA é efectuada conforme o padrão não-standard, isto é, a ligação é efectuada principalmente pelos aminoácidos nas posições 2, 3 e 6 da hélice α com a sequência guanina, adenina e guanina da cadeia codificante do DNA, respectivamente (29). O complexo proteína GAGA-DBD–DNA está representada na Figura 2.2.

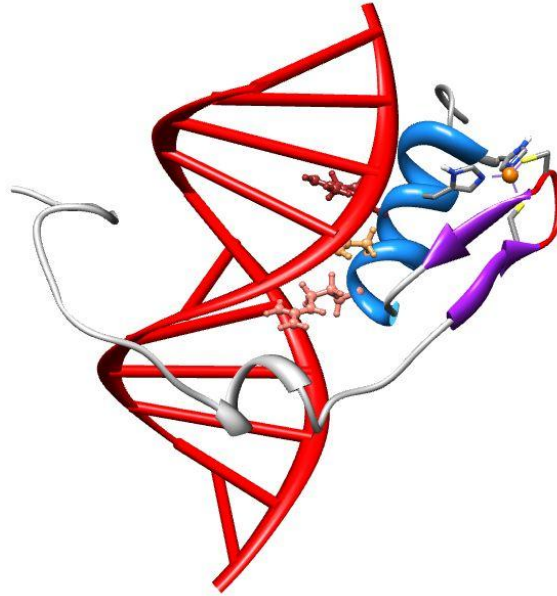


Figura 2.2 Interação da proteína GAGA-DBD com a cavidade maior da dupla hélice do DNA. Os aminoácidos que interactivam com o DNA estão representados por *ball-and-stick*, aminoácido 2 (arginina, cor salmão), 3 (asparagina, cor castanho arenoso) e 6 (arginina, cor castanha), respectivamente, com início no N-terminal da hélice α . Cadeia dupla de DNA de cor vermelha, hélice α de cor azul, β -hairpin de cor roxa. Os ligandos que coordenam o átomo de zinco (cor de laranja) estão representados por *stick*. (1YUI do PDB).

Para atingir o objectivo principal deste trabalho delineou-se um plano de trabalho, que engloba diferentes fases:

- 1) Construção de um sistema de sobreprodução heteróloga da proteína GAGA-DBD em *Escherichia (E.) coli* numa forma solúvel e homogénea. Para que o sistema de estudo fosse estruturalmente menos complexo, optou-se por trabalhar apenas com este domínio da proteína GAGA, que é codificado por um gene com 162 pb;
- 2) Caracterização bioquímica (quantificação, determinação do conteúdo em metais) e espectroscópica da proteína recombinante por aplicação das espectroscopias de UV/Visível e Mössbauer;
- 3) Estudar o efeito da radiação ionizante na ligação da proteína ao DNA;
- 4) Reconstituição do centro metálico da proteína recombinante com diferentes metais, de modo a avaliar o efeito do metal na afinidade das metaloproteínas para o DNA e na protecção deste quando exposto a radiação UV.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem e sobre-expressão do gene *GAGA-DBD*

O gene *GAGA-DBD* foi sintetizado pela *GeneArt (Invitrogen)* num vector pMA com resistência à ampicilina (vector pMA–*GAGA-DBD*), contendo os sítios específicos de reconhecimento das enzimas de restrição *Nde* I e *EcoR* I usadas na clonagem do gene, uma vez que estas enzimas não hidrolisam o gene pretendido (Anexo 7.1). Utilizaram-se, deste modo as enzimas de restrição *Nde* I (10 U/μl, *GE Healthcare*) e *EcoR* I (15 U/μl, *GE Healthcare*) para proceder à construção do vector de sobre-expressão pET-21c–*GAGA-DBD* (mapa do vector pET-21c, *Novagen*, no Anexo 7.2 e do vector pET-21c–*GAGA-DBD* na Figura 4.4 (Secção 4.1)). A reacção de ligação do gene *GAGA-DBD* ao vector pET-21c linearizado foi efectuada conforme o Kit *T4 DNA ligase*, fornecido pela *NZYTech* (Secção 3.9.7).

De seguida, 100 μl de células *E. coli* NZY5α (*NZYTech*) quimicamente competentes foram transformadas com 5 μl do produto da reacção de ligação. Das colónias obtidas, 9 foram escolhidas para isolar o DNA plasmídico (pDNA), usando o Kit *E.Z.N.A Plasmid Mini Kit I (Omega)*. A sequência de nucleótidos do gene *GAGA-DBD* que codifica para a proteína em estudo foi confirmada por sequenciação de 20 μl de pDNA.

Das 9 colónias escolhidas anteriormente, apenas uma colónia foi utilizada para testar a sobre-expressão do gene *GAGA-DBD*. Assim, 30 μl de células *E. coli* BL21(DE3) (*NZYTech*) quimicamente competentes foram transformadas com 2 μl de pDNA. Foi seleccionada uma colónia isolada para a inoculação de 5 ml de meio de cultura LB (*NZYTech*) contendo 100 μg/ml de Ampicilina (*NZYTech*). Após a incubação com agitação de 200 rpm (incubadora I10-O+ACOP.E, *OVAM*) durante cerca de 8 horas a 37 °C, a suspensão bacteriana foi diluída para 100 ml (1:100) no mesmo meio de cultura, e mantida com a mesma agitação e temperatura durante a noite. A cultura bacteriana foi novamente diluída para 1 l (1:100) no mesmo meio de cultura e mantida com a mesma agitação e temperatura até atingir a densidade óptica, ao comprimento de onda de 600 nm ($O.D_{600}$), de aproximadamente 1,6. Neste momento, a expressão da proteína *GAGA-DBD* foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG (*Sigma-Aldrich*). Após um período de incubação de 3 horas, com uma agitação de 200 rpm a 37 °C, o sedimento bacteriano foi obtido por centrifugação a 11325 xg (centrífuga *Avanti J-26 XPI, Beckman*) durante 15 minutos a 4 °C, e ressuspenso em tampão 50 mM Tris-HCl pH=7,6, 5 mM de EDTA (*Fluka*), 5 mM de benzamidina com hidrocloreto (*AppliChem*), 5 mM de DTT (*Sigma-Aldrich*).

A lise celular foi efectuada por 4 ciclos de congelação com azoto líquido/descongelação, na presença de um cristal de DNase I (*Roche*) e posterior passagem numa *French Press (Cell Press, Thermo Electric Corporation)*. A suspensão obtida foi mantida a 4 °C durante 30 minutos e centrifugada a 10397 xg (centrífuga *Sigma 3-18 K, Sartorius*), durante 10 minutos a 4 °C. O

sobrenadante obtido, correspondente à fracção solúvel, foi ultracentrifugado a 150 000 xg (ultracentrífuga *Optima LE-80 K* com rotor 70Ti), durante 1 hora a 4 °C. O sobrenadante obtido desta última centrifugação, correspondente à fracção solúvel, é utilizado para a purificação da proteína GAGA-DBD.

3.2 Purificação da proteína GAGA-DBD

A proteína GAGA-DBD recombinante produzida em *E. coli* foi purificada por cromatografia de permuta iónica, usando uma coluna cromatográfica catiónica, Resource S de 6 ml (*GE Healthcare*) no sistema de purificação, *AKTA Prime Plus* (*GE Healthcare*).

Antes de ser aplicado na coluna, o extracto bruto foi dialisado, numa fita de diálise Spectra/Por3 (*SpectrumLabs*) com MWCO de 3,5 kDa, durante a noite contra 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6 (*Panreac-Scharlau*), 5 mM DTT, 5 mM EDTA. De seguida foi centrifugada a 10 000 xg (centrífuga *Sigma 3-18 K*, *Sartorius*), durante 10 minutos a 4 °C, e filtrada com um filtro de 0,45 µm (Membrana polietersulfona, *VWR*).

Antes de iniciar a purificação a coluna foi lavada com 30 ml de água Milli-Q, com o caudal de 3 ml/min e pressão de 0,7 MPa (sendo estas condições mantidas durante a purificação), e foi previamente equilibrada com tampão A (20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA).

Depois do extracto bruto ter sido aplicado na coluna foi efectuado o passo de lavagem com tampão A de modo a eliminar as proteínas não adsorvidas à resina. A eluição da proteína foi efectuada por aplicação de um gradiente linear de 0-100% de tampão B (20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 M NaCl (*Sigma-Aldrich*)) durante 30 minutos e com fraccionamento de 2 ml.

As fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE usando géis *NuPAGE 4-12% BisTris* (*Invitrogen*) a 200 V durante 35 minutos, para determinar quais as fracções que continham a proteína GAGA-DBD. Como referência utilizou-se o marcador de massas moleculares pré-corado *SeeBlue* (*Invitrogen*) (massas moleculares do marcador apresentadas no Anexo 7.3.5).

Depois de juntas as fracções contendo a proteína GAGA-DBD, dialisou-se em tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA e concentrou-se numa célula de ultrafiltração do tipo *Vivaspin* de 20 ml (*Sartorius Stedim Biotech*) por centrifugação a 7500 xg a 4 °C.

3.3 Quantificação proteica

A concentração da proteína GAGA-DBD foi determinada colorimetricamente pelo método do Ácido Bicinconínico (BCA) (34). Para tal usou-se o Kit *Bicinchoninic Acid Assay* fornecido pela *Sigma-Aldrich* e BSA (1 mg/ml, *Sigma-Aldrich*) como proteína padrão. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Neste método a proteína padrão sofre várias diluições num volume de 100 µl, de modo a obter-se concentrações entre 0 a 1 mg/ml. De seguida adicionam-se 2 ml de reagente e deixa-se incubar a 37 °C durante 30 minutos. Após a incubação deixa-se arrefecer à temperatura ambiente e lê-se a absorvância a 562 nm (no espectrofotómetro *Evolution 300 BB, Thermo SCIENTIFIC*), usando cuvetes com o comprimento óptico de 1 cm.

As amostras são usadas do mesmo modo que os padrões.

Método BCA em microplacas

O método de BCA em microplacas foi utilizado para quantificar as proteínas GAGA-DBD/Zn (proteína GAGA-DBD reconstituída com zinco) e GAGA-DBD (que não foi reconstituída e usada como controlo), após o passo de reconstituição.

Este método é idêntico ao mencionado anteriormente, excepto nos volumes utilizados para a realização do mesmo. A proteína padrão sofre várias diluições para um volume de 25 µl, de modo a obter-se concentrações de 0 a 1 mg/ml, de seguida adicionam-se 200 µl de reagente e deixa-se a incubar a 37 °C durante 30 minutos. A absorvância a 562 nm é lida no espectrofotómetro *Infinite F-Tecan*.

3.4 Reconstituição do centro metálico

A reconstituição da proteína foi efectuada anaerobiamente na câmara de luvas (*mBraun*) com o objectivo de incorporar os metais Fe(II), Zn(II) e Co(II) no centro metálico da proteína. O processo de reconstituição foi monitorizado por espectroscopia de UV/Visível, num espectrofotómetro *diode array TIDAS (J&M)* com o auxílio de fibras ópticas. As cuvetes utilizadas possuem um percurso óptico de 1 cm e os espectros traçados entre os comprimentos de onda de 200 nm e 800 nm.

Antes de iniciar a reconstituição da proteína foi necessário trocar o tampão da mesma. A proteína foi aplicada numa coluna cromatográfica de filtração em gel *Hitrap Desalting* de 5 ml

da *GE Healthcare*, usando tampão 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl na eluição e seguindo as instruções fornecidas (35).

Inicialmente determinou-se a concentração da proteína nas quatro cuvets (uma cuvete de controlo, à qual não foi adicionada metal, e uma cuvete para a reconstituição com cada um dos metais). A concentração foi determinada pela absorvância a 280 nm, cujo coeficiente de extinção molar a 280 nm ($\epsilon_{280\text{nm}}$) é igual a $1060 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (determinado experimentalmente). De seguida adicionou-se o metal numa razão molar 1:3 relativamente à proteína, deixou-se a incubar durante 15 min e adquiriu-se o espectro de absorção. Repetiu-se o processo mais três vezes, até o metal estar na razão molar 4:3 relativamente à proteína. Retirou-se a proteína da câmara de luvas deixando-a oxidar ao ar e traçou-se o espectro de absorção no espectrofotómetro *Evolution 300 BB, Thermo SCIENTIFIC*.

O excesso de metal foi removido por passagem na coluna *Hitrap Desalting*, descrita anteriormente, usando tampão 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl. Determinou-se a concentração da proteína pelo método de BCA em microplacas.

As soluções de metais utilizadas para a reconstituição foram $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pH=3 (*Sigma-Aldrich*), ZnCl_2 (*Sigma-Aldrich*) e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (*Riedel*). As soluções mãe de ZnCl_2 e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ têm uma concentração de 99,96 mM e 10 mM, respectivamente. A solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pH=3 foi preparada por forma a ter a concentração de 100 mM, no entanto a solução é quantificada com base no método colorimétrico descrito nas referências (36) e (37). Neste método é usado um ligando bidentado que irá complexar o ião ferroso em solução, formando um complexo estável com uma cor intensa vermelho-alaranjado, cujo $\epsilon_{510 \text{ nm}}$ é igual a $11,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Na Tabela 3.1 são apresentadas as soluções e volumes utilizados no método colorimétrico usado na determinação do ferro.

Tabela 3.1 Soluções e volumes utilizados no método colorimétrico para determinação de ferro.

Reagente	Tubos					
	Volumes (ml)					
	0	1	2	3	4	5
Ferro padrão, 0,01 mg/ml (FeCl ₂ ·4H ₂ O, <i>Fluka</i>)	0	0,2	0,4	0,8	1,2	1,5
H ₂ O	2,5	2,3	2,1	1,7	1,3	1,0
Misturar (vortex)						
10% cloreto de hidroxilamina (<i>Sigma-Aldrich</i>)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Misturar (vortex)						
0,3% 1,10-fenantrolina (<i>Panreac</i>)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Misturar (vortex), esperar 10 minutos						
H ₂ O	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Ler a absorvância a 510 nm						

A amostra da solução de ferro foi usada do mesmo modo que o padrão, como indicado na Tabela 3.1. Tanto para a amostra como para o padrão foram efectuados triplicados, e a recta padrão típica deste método está representada na Figura 3.1.

Deste modo, determinou-se que a solução mãe de FeCl₂·4H₂O a pH=3 tem uma concentração igual a 95,52 mM.

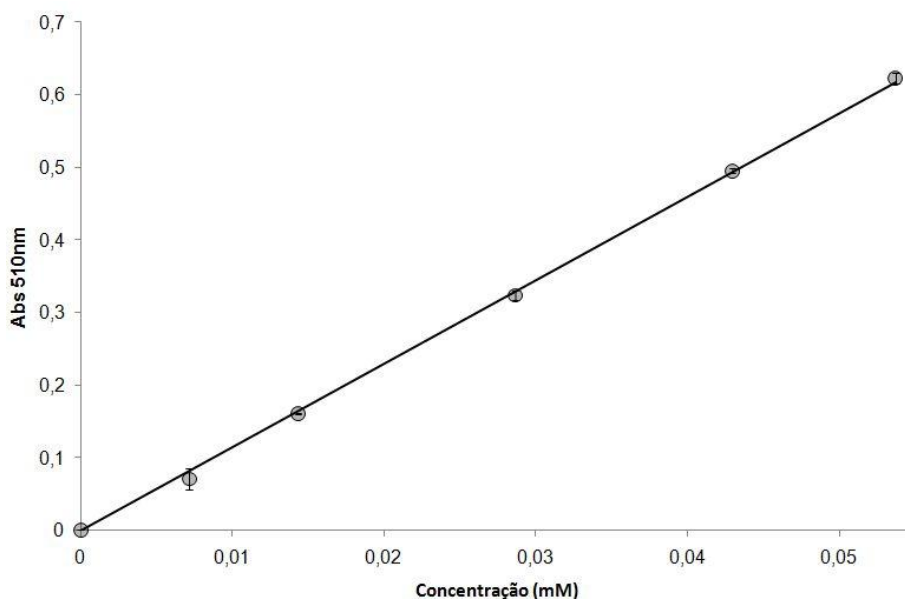


Figura 3.1 Recta de calibração típica do ferro padrão usada para determinar a concentração da solução mãe de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A equação da recta é a seguinte: $\text{Abs} = 11,497 \times [\text{Fe}]$, com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9993$.

3.5 Quantificação de iões metálicos

A quantificação dos iões metálicos endógenos presentes nas diferentes preparações de proteína GAGA-DBD (não reconstituída), GAGA-DBD/Zn (proteína reconstituída com zinco), GAGA-DBD/Fe (proteína reconstituída com ferro) e GAGA-DBD/Co (proteína reconstituída com cobalto), foi efectuada no Laboratório de Análises *Atomic Emission Spectroscopy Service* do Requitme/Departamento de Química FCT/UNL.

3.6 Caracterização do centro metálico

Após reconstituição da proteína GAGA-DBD com ferro ^{57}Fe , de acordo com o descrito na Secção 3.4, o centro metálico da proteína foi caracterizado por espectroscopia de Mössbauer usando o espectrofotómetro de campo baixo (600 G) que opera numa geometria de transmissão num modo de aceleração constante. A velocidade zero do espectro de Mössbauer refere-se ao centroide do espectro de uma folha de ferro metálico adquirido à temperatura ambiente. O espectrómetro está equipado com um crióstato de circuito fechado *Janis Closed Cycle He gas Refrigerator* que permite a recolha de espectros entre 4,5 K e 325 K. A análise dos espectros de Mössbauer foi efectuada usando o programa *WMOSS 2.51* (SEE co.)

Cada amostra de proteína a ser estudada por esta técnica tem um volume máximo de 500 µl e a concentração mínima de 1 mM. Assim, relativamente ao descrito na Secção 3.4, a proteína, reconstituída com uma razão equimolar de ^{57}Fe , foi dialisada contra tampão 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl num *Float-A-Lyzer* de 500 µl com *MWCO* de 3,5 kDa da *SpectrumLabs* e transferida para uma cuvette de Mössbauer em condições anaeróbias antes de ser congelada com azoto líquido. Em paralelo preparou-se uma amostra controlo de ^{57}Fe em tampão 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl.

Cada uma das amostras foi colocada no espectrómetro de Mössbauer e analisadas em condições de aquisição diferentes (temperatura, campo aplicado). De seguida oxidaram-se aerobiamente ambas as amostras e repetiu-se a análise nas mesmas condições.

3.7 Ensaios de retardamento da mobilidade electroforética (*mobility shift-assay*)

Estes ensaios são geralmente usados para estudar a interacção de proteínas com ácidos nucleicos. A formação do complexo proteína-ácido nucleico reflecte-se num retardamento da mobilidade electroforética.

Para realizar os ensaios de retardamento da mobilidade electroforética utilizaram-se os oligonucleótidos 5'- AAA CCC GAG AGA GTA CGA AC-3' (oligonucleótido *forward*) e seu complementar 5'- GTT CGT ACT CTC TCG GGT TT-3' (oligonucleótido *reverse*), que contêm a sequência específica para as proteínas GAGA (ver Anexo 7.4).

Para produzir o fragmento de DNA em cadeia dupla fez-se uma reacção de hibridação dos oligonucleótidos em tubo de 1,5 ml por incubação de 5 nmol de oligonucleótido *forward* (50 µl), 5 nmol de oligonucleótido *reverse* (50 µl) e 100 µl de tampão de hibridação (10 mM Tris pH=7,6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA), o tubo foi inserido num bloco de aquecimento que permaneceu a 94,8 °C durante 2 minutos. De seguida tirou-se o bloco do banho e esperou-se que a temperatura baixasse para 30 °C (38). O DNA em dupla cadeia (dsDNA) resultante da hibridação é guardado em gelo ou a 4 °C, se não for logo utilizado.

Nos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética a proteína é incubada com o dsDNA e em paralelo é efectuado o controlo negativo (dsDNA sem proteína). Os ensaios foram efectuados em tampão de ligação (20 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM KCl (*Sigma-Aldrich*), 6,25 mM MgCl₂ (*Sigma-Aldrich*), 5% glicerol (*Sigma-Aldrich*)). Os ensaios foram adaptados da referência (30).

Inicialmente foi testado o tempo de incubação e temperatura necessários para ocorrer a reacção de ligação da proteína ao dsDNA (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Condições experimentais utilizadas nos ensaios para determinar a temperatura e tempo de incubação ótimos.

Ensaio	Condições testadas	Observações
2,88 µl (80,93 pmol) GAGA-DBD/Zn 0,25 µl (8,25 pmol) dsDNA 3,87 µl Tampão de ligação	37 °C durante 30 min; Temperatura ambiente durante 30 min e 1 h	Razão molar proteína:dsDNA ≈ 10
5,85 µl (80,73 pmol) GAGA-DBD 0,25 µl (8,25 pmol) dsDNA 0,9 µl Tampão de ligação	Temperatura ambiente durante 1 h	Razão molar proteína:dsDNA ≈ 10
2,88 µl (80,93 pmol) GAGA-DBD/Zn 0,15 µl (14,99 nmol) Zn(II) 0,25 µl (8,25 pmol) dsDNA 3,72 µl Tampão de ligação	Temperatura ambiente durante 30 min e 1 h	Razão molar proteína:dsDNA ≈ 10 Razão Zn(II):proteína ≈ 185
Controlo negativo		
0,25 µl (8,25 pmol) dsDNA + 6,75 µl Tampão de ligação		

Depois de testadas as condições de ligação da proteína GAGA-DBD ao DNA, os ensaios de retardamento da mobilidade electroforética foram realizados à temperatura ambiente com tempo de incubação de 1 hora, com a proteína GAGA-DBD/Zn, a proteína GAGA-DBD, o dsDNA, na presença dos iões Zn(II) e Fe(II), de acordo com a Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Ensaios de retardamento da mobilidade electroforética. Ensaios realizados para o volume de 5 μ l, durante 1 hora à temperatura ambiente.

	Ensaio	Observações
Adição Zn(II)	0,12 μ l (3,37 pmol) GAGA-DBD/Zn 0,1 μ l (999,6 pmol) Zn(II) 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 4,66 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 1 Razão Zn(II)/proteína \approx 300
	0,29 μ l (8,15 pmol) GAGA-DBD/Zn 0,15 μ l (1,5 nmol) Zn(II) 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 4,44 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 2 Razão Zn(II)/proteína \approx 185
	1,44 μ l (40,46 pmol) GAGA-DBD/Zn 0,76 μ l (7,6 nmol) Zn(II) 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 2,68 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 10 Razão Zn(II)/proteína \approx 185
	0,23 μ l (3,17 pmol) GAGA-DBD 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 4,65 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 1
	0,59 μ l (8,14 pmol) GAGA-DBD 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 4,29 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 2
	2,93 μ l (40,43 pmol) GAGA-DBD 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 1,95 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 10
Adição Fe(II)	0,23 μ l (3,17 pmol) GAGA-DBD 0,12 μ l (1,19 nmol) Fe(II) 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 4,53 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 1 Razão Fe(II)/proteína \approx 375
	0,59 μ l (8,14 pmol) GAGA-DBD 0,18 μ l (1,78 nmol) Fe(II) 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 4,11 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 2 Razão Fe(II)/proteína \approx 220
	2,93 μ l (40,43 pmol) GAGA-DBD 0,9 μ l (8,9 nmol) Fe(II) 0,12 μ l (3,96 pmol) dsDNA 1,05 μ l Tampão de ligação	Razão molar proteína:dsDNA \approx 10 Razão Fe(II)/proteína \approx 220

A verificação da hibridação dos oligonucleótidos (formação do dsDNA) e dos testes de ligação da proteína ao DNA foi realizada por electroforese em gel de agarose 3,5% em TBE (89 mM Tris-borato pH=8,0 (*Panreac*), 2 mM EDTA).

A verificação dos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética foi realizada no sistema *E-Gel® CloneWell™* (*Invitrogen*) (39), usando géis de agarose *CloneWell* 2% com *SYBR Safe* (*Invitrogen*).

3.8 Exposição à radiação ionizante

Após a verificação da interacção da proteína GAGA-DBD com o dsDNA, estudou-se o efeito da radiação nessa interacção. Deste modo analisou-se a amostra reconstituída com Zn e a amostra que não foi reconstituída usando-se 3,37 pmol de proteína GAGA-DBD/Zn para 999,6 pmol de Zn(II), e 40,4 pmol de proteína GAGA-DBD para 40 pmol de Fe(II), respectivamente.

Para além destas duas amostras foram expostas à radiação UV uma amostra de controlo negativo (dsDNA) e duas amostras de proteína, GAGA-DBD/Zn e GAGA-DBD.

Os ensaios de exposição à radiação ionizante foram efectuados numa caixa feita pelo laboratório, equipada com uma lâmpada *UVC Philips TUV PL-L 55W/4P HF*, de 55 Watt. As amostras foram expostas em cuvetes transparentes à luz UV (UV-Cuvette micro, *Brand*) mantidas em gelo. A quantidade de irradiação ($\mu\text{W}/\text{cm}^2$) aplicada a cada amostra foi monitorizada por um foto-radiómetro HD2102.2 (*Delta Ohm*) com uma sonda LP471UVC (*Delta Ohm*) e convertido em dose (J) pela multiplicação da área exposta e pelo tempo total de exposição.

As 5 amostras foram expostas à radiação UV durante 5, 15 e 60 minutos, correspondendo às doses de 0,78 J, 2,34 J e 9,37 J, respectivamente. Após a exposição à radiação verificou-se o efeito desta por electroforese em gel de agarose pelo sistema *E-Gel CloneWell* (*Invitrogen*), usando géis de agarose *CloneWell* 2% com *SYBR Safe* (*Invitrogen*) e por electroforese em gel *NuPAGE 4-12% BisTris* (*Invitrogen*) a 200 V durante 35 minutos.

3.9 Descrições gerais

3.9.1 Electroforese em gel de agarose para análise do DNA

A electroforese em gel de agarose para análise do DNA foi utilizada para verificação da hidrólise do vector pMA–GAGA-DBD e do vector de sobre-expressão pET-21c, aquando da construção do vector de produção da proteína GAGA-DBD. Foi também usada para monitorização de todas as preparações de DNA plasmídico produzidas.

Deste modo, a electroforese para análise do DNA foi feita usando um gel de agarose de 0,8% em tampão TAE (40 mM Tris-acetato (*Panreac – Sigma-Aldrich*) pH=8,0, 1 mM EDTA). O gel de agarose prepara-se dissolvendo uma suspensão de agarose (*NZYTEch*) numa solução tampão TAE e deixando solidificar num suporte apropriado, colocando previamente um pente para formação dos poços de aplicação de amostras. O gel é colocado numa tina de electroforese e imerso em tampão TAE. As amostras de DNA previamente preparadas com tampão de amostra (adiciona-se 3 µl de tampão a 5 µl de amostra) são aplicadas nos poços do gel e, com a aplicação de um campo eléctrico a agarose actua como uma peneira, deixando passar mais facilmente as moléculas de menor peso molecular. As moléculas do mesmo tamanho migram conjuntamente e formam bandas. A electroforese é efectuada a 80 V durante cerca de 1 hora e 30 minutos. Depois de realizada a electroforese é necessário corar o gel de agarose para visualização das bandas quando este é colocado sobre um transiluminador. O gel foi corado com uma solução de *SYBR Safe (Invitrogen)*.

3.9.2 Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A electroforese para verificação da produção da proteína GAGA-DBD nos testes de sobre-expressão é feita usando um gel de poliacrilamida a 15%, em condições desnaturantes na presença de 0,1% de SDS (SDS-PAGE). A electroforese é efectuada com base na técnica descrita por Laemmli (40).

A polimerização do gel é realizada de acordo com o protocolo fornecido pela *Biorad* usando os volumes descritos na Tabela 3.4. Antes de se aplicar as amostras no gel é necessário adicionar o tampão de amostras (normalmente são adicionados 5 µl de tampão de amostras a cada amostra, mas no caso dos testes de sobre-expressão são adicionados 50 µl) e fervê-las durante 2 minutos (no caso dos testes de sobre-expressão mante-las a 60 °C durante a aplicação no gel). A electroforese é efectuada a 120 V durante cerca de 1 hora. Depois de realizada a electroforese o gel é corado com uma solução de Azul de Comassie durante 30 minutos e descorado com a solução descorante (Tabela 3.5).

Tabela 3.4 Volumes necessários para a preparação de géis SDS-PAGE.

Soluções	Gel de Concentração		Gel de Resolução					
	Volume (ml)		Volume (ml)					
% Acrilamida	5	20	17,5	15	12,5	10	7,5	5
Solução I	—	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
Solução II	0,45	—	—	—	—	—	—	—
Solução III	0,3	3,33	2,92	2,5	2,08	1,67	1,33	1,25
SDS 10%	0,018	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
H ₂ O	0,94	0,84	1,24	1,66	2,10	2,51	2,85	2,93
PSA 10% (µl)	13,5	38	38	38	38	38	38	38
TEMED (µl)	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

Tabela 3.5 Soluções stock para a preparação dos géis de poliacrilamida.

Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Tampão do gel de separação (Solução I)	Tris Base 3 M (99,9% <i>Sigma Aldrich</i>) HCl conc. (37% <i>Sigma-Aldrich</i>) H ₂ O	36,3 g Até pH=8,8 Até 100 ml	pH=8,8 – 9,0 Diluir 1:2 antes de usar
Tampão do gel de concentração (Solução II)	Tris Base 0,5 M (99,9% <i>Sigma-Aldrich</i>) HCl conc. (37% <i>Sigma Aldrich</i>) H ₂ O	6,06 g Até pH=6,8 Até 100 ml	pH=6,6 – 6,8
Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8) (Solução III)	Acrilamida (<i>NZYTech</i>) Bisacrilamida (<i>NZYTech</i>) H ₂ O	30 g 0,8 g Até 100 ml	
SDS 10%	SDS (99% <i>Sigma-Aldrich</i>) H ₂ O	10 g Até 100 ml	
10% Persulfato de amónia	Persulfato de amónia (>98% <i>NZYTech</i>) H ₂ O	500 mg Até 5 ml	Preparar antes de cada utilização
Tampão de electroforese Tris-Glicina (tampão de corrida)	Tris Base 0,25 M (99,9% <i>Sigma-Aldrich</i>) Glicina 1,92 M (>99,7% <i>Riedel</i>) SDS (99% <i>Sigma-Aldrich</i>) H ₂ O	30,3 g 144,1 g 10 g Até 1000 ml	pH=8,3 Diluir 1:10 antes de utilizar
Tampão para as amostras de SDS-PAGE	Solução II SDS 10% β -mercaptoetanol (<i>Sigma-Aldrich</i>) Glicerol (<i>Sigma-Aldrich</i>) Azul bromofenol (<i>Riedel-de-Haën</i>)	5 ml 8 ml 1 ml 2 ml 4 ml	
Solução Corante Azul Coomassie R-250	Coomassie Blue R-250 (<i>Sigma-Aldrich</i>) Ácido acético glacial (100% <i>Sigma-Aldrich</i>) Metanol (<i>Sigma-Aldrich</i>) H ₂ O	1g 15 ml 90 ml Até 200 ml	
Solução descorante	Ácido acético glacial (100% <i>Sigma-Aldrich</i>) Metanol (<i>Sigma-Aldrich</i>) H ₂ O	75 ml 450 ml Até 1000 ml	

3.9.3 Electroforese em gel *NuPAGE 4-12% BisTris*

A electroforese em gel *NuPAGE 4-12% BisTris (Invitrogen)* (41) foi utilizada para verificação do isolamento e purificação da proteína e para verificação do efeito da exposição à radiação ionizante na proteína GAGA-DBD.

Os géis *NuPAGE* de *4-12% BisTris* são fornecidos pela *Invitrogen* e são utilizados na tina de electroforese *XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen)*. Antes de aplicar as amostras no gel é necessário adicionar o tampão de amostras (normalmente são adicionados entre 2 a 5 µl de tampão de amostras, igual à utilizada em SDS-PAGE, a cada amostra) e fervê-las durante 2 minutos. O tampão de electroforese utilizado é o *20x NuPAGE®MES (Invitrogen)*, que é diluído 1:20 antes de ser utilizado. A electroforese é efectuada a 200 V durante cerca de 35 minutos.

Depois de realizada a electroforese é necessário corar e descorar o gel, do mesmo modo da electroforese em gel de SDS-PAGE.

3.9.4 Isolamento de DNA plasmídico

O isolamento do DNA plasmídico pode ser efectuada por Midiprep, para obtenção de quantidades superiores, ou por Miniprep, para obtenção de menores quantidades.

A Midiprep e Miniprep foram efectuadas de acordo com os protocolos fornecidos pela *Omega*, descritos no Anexo 7.6.

3.9.5 Quantificação do DNA plasmídico isolado

A fórmula aplicada para estimar a concentração do pDNA tem como princípio a comparação da intensidade das bandas, ou seja, a concentração é determinada por comparação da intensidade da banda que se pretende quantificar com a intensidade das bandas de tamanho semelhante do marcador. A fórmula é a seguinte:

$$\frac{(\text{Banda de tamanho semelhante do marcador}) \text{ ng}}{\sum \text{Bandas do marcador ng}} \times \frac{V_{\text{padrão}} \mu\text{l}}{V_{\text{amostra}} \mu\text{l}} \times [\text{Marcador}] \text{ ng}/\mu\text{l}$$

3.9.6 Reacção de hidrólise dos vectores e purificação dos produtos resultantes da hidrólise

Para se proceder ao isolamento do gene *GAGA-DBD* primeiramente foi necessário isolar os DNA plasmídicos (o vector pMA–GAGA-DBD e o vector de sobre-expressão pET-21c) pelo Kit *E.Z.N.A Plasmid Midi (Omega)*. Para tal 50 ml de meio de cultura LB contendo 100 µg/ml de ampicilina e 100 ml do mesmo meio de cultura foram inoculados com uma colónia do vector pMA–GAGA-DBD e do vector pET-21c, respectivamente.

As preparações dos vectores hidrolisados foram verificadas por electroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE.

Com o intuito de se obter o vector de sobre-expressão pET-21c–GAGA-DBD foi necessário proceder ao isolamento do gene *GAGA-DBD* por hidrólise do plasmídeo pMA–GAGA-DBD e à sua purificação, assim como à linearização do vector de expressão. Para tal hidrolisou-se o pMA–GAGA-DBD com as mesmas enzimas de restrição que são utilizadas para hidrolisar o vector pET-21c. As enzimas de restrição específicas são a *Nde I* (10 U/µl) e *EcoR I* (15 U/µl, *GE Healthcare*).

A primeira reacção de hidrólise com a enzima *Nde I* foi efectuada num volume de 50 µl, cuja mistura da reacção está descrita na Tabela 3.6. Após realizada a mistura deixou-se a incubar durante 2 horas e 40 minutos a 37 °C, e efectuou-se a verificação da hidrólise com a primeira enzima de restrição. De seguida, adicionou-se 2 µl da enzima *EcoR I* e deixou-se incubar durante 2 horas a 37 °C, verificando-se novamente a hidrólise com a segunda enzima de restrição.

Tabela 3.6 Mistura da reacção de hidrólise dos vectores com a enzima *Nde I*.

	GAGA-DBD	pET-21c
pDNA	30 µl	30 µl
10x Tampão H	5 µl	5 µl
<i>Nde I</i>	2 µl	2 µl
dH ₂ O	13 µl	13 µl
Volume total	50 µl	

A purificação do gene *GAGA-DBD* isolado e do vector pET-21c linearizado foi efectuada usando o sistema *E-Gel® CloneWell™ Extraction System (Invitrogen)* (39). Este sistema consiste numa electroforese realizada numa cassette que contém um gel de agarose 0,8% com *SYBR Safe* que permite a visualização da migração das bandas através de luz azul. As bandas são recolhidas dos poços que a cassette contém para esse efeito. Depois de recolhidas é necessário verificar a purificação por electroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE para quantificação de cada fragmento.

3.9.7 Reacção de ligação do gene *GAGA-DBD* ao vector de sobre-expressão pET-21c

A ligação do gene *GAGA-DBD* duplamente hidrolisado e purificado ao vector de sobre-expressão pET-21c linearizado e puro é catalisada pela enzima T4 DNA ligase, segundo o Kit *T4 DNA ligase*, fornecido pela *NZYTech* (42).

Foram efectuadas duas reacções de ligação descritas na Tabela 3.7 e deixadas a incubar durante a noite a uma temperatura de 16 °C. De seguida células *E. coli* *NZY5α* (*NZYTech*) quimicamente competentes foram transformadas com o produto da reacção de ligação, segundo o protocolo fornecido pela *NZYTech* (Secção 3.9.8).

Tabela 3.7 Reacção de ligação.

	Reacção A	Reacção B
pET-21c linearizado	4 µl (20 ng)	8 µl (40 ng)
Gene <i>GAGA-DBD</i>	13 µl	9 µl
10x Tampão da reacção	2 µl	2 µl
T4 DNA ligase (1 U/µl)	1 µl	1 µl
Volume total	20 µl	

3.9.8 Transformação de células competentes *E. coli* NZY5 α

O protocolo da transformação foi fornecido pela *NZYTech* (43).

1. Descongelar as células em gelo;
2. Aliquotar as células em três tubos de 1,5 ml;
3. Adicionar o DNA desejado para a transformação a cada tubo conforme a Tabela 3.8 e agitar suavemente;

Tabela 3.8 Volumes de pDNA usados na transformação de células *E. coli* NZY5 α .

	Transformante	Controlo positivo	Controlo negativo
Plasmídeo	5 μ l	—	—
pUC 19	—	1 μ l	—

4. Incubar as reacções em gelo durante 30 minutos;
5. Realizar um choque térmico das células durante 30 segundos no banho a 42 °C;
6. Incubar as reacções em gelo durante 2 minutos;
7. Adicionar 900 μ l de meio LB a cada reacção e incubar a 225 rpm, durante 1 hora a 37 °C;
8. Plaquear três volumes diferentes das células transformadas (como 50, 100 e 200 μ l) em placas com meio de cultura LB-Agar contendo 100 μ g/ml de ampicilina. Para o controlo positivo e negativo plaquear apenas um volume, tal como 100 μ l;
9. Incubar durante a noite a 37 °C.

3.9.9 Transformação de células *E. coli* BL21(DE3)

O protocolo da transformação foi fornecido pela *NZYTech* (44).

1. Descongelar as células em gelo;
2. Aliquotar as células (30 µl) em três tubos de 1,5 ml;
3. Adicionar o DNA desejado para a transformação a cada tubo conforme a Tabela 3.9 e agitar suavemente;

Tabela 3.9 Volumes usados na transformação de células *E. coli* BL21(DE3).

	Transformante	Controlo positivo	Controlo negativo
pDNA	2 µl	—	—
pUC 19	—	1 µl	—

4. Incubar as reacções em gelo durante 30 minutos;
5. Realizar um choque térmico das células durante 40 segundos no banho a 42 °C;
6. Incubar as reacções em gelo durante 2 minutos;
7. Adicionar 900 µl de meio LB a cada reacção e incubar a 225 rpm, durante 1 hora a 37 °C;
8. Plaquear três volumes diferentes das células transformadas (como 50, 100 e 200 µl) em placas com meio de cultura LB-Agar contendo 100 µg/ml de ampicilina. Para o controlo positivo e negativo plaquear apenas um volume, tal como 100 µl;
9. Incubar durante a noite a 37 °C.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem do gene *GAGA-DBD*

O gene *GAGA-DBD* (com 162 pb) foi sintetizado pela *GeneArt* no vector pMA, com resistência à ampicilina. A utilização de genes sintéticos tem múltiplas vantagens, entre as quais a optimização da frequência de codões para expressão em *E. coli* e a rapidez do método. O gene estava compreendido entre os sítios específicos para as enzimas de restrição *Nde* I e *EcoR* I, de modo a poder-se utilizar estas duas enzimas de restrição para construir o vector de sobre expressão pET-21c–*GAGA-DBD*.

Todas as operações efectuadas na construção do vector de expressão foram monitorizadas por electroforese em gel de agarose 0,8% em TAE a 80 V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Com o intuito de se obter o vector pMA–*GAGA-DBD* e o vector de sobre-expressão pET-21c, células *E. coli* NZY5 α quimicamente competentes foram transformadas com o pDNA de cada vector, sendo depois realizada uma Midiprep para isolamento do pDNA, como mostra a Figura 4.1.

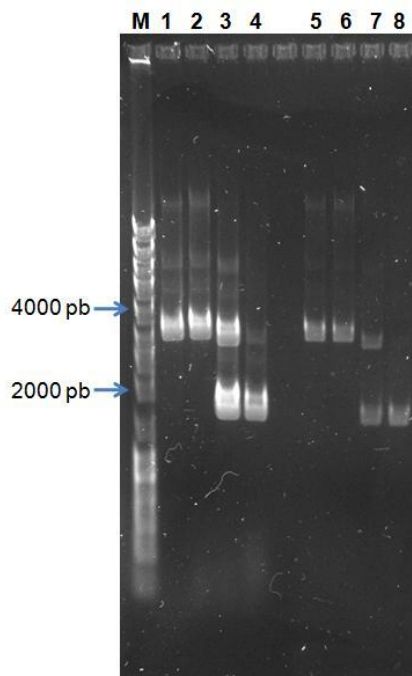


Figura 4.1 Verificação da Midiprep dos vectores pET-21c e pMA–*GAGA-DBD*. M—Marcador de pesos moleculares (*NZYDNA Ladder III*, *NZYTech* – ver Anexo 7.3.1); 1 e 2—Vector pET-21c concentrado; 3 e 4—Vector pMA–*GAGA-DBD* concentrado; 5 e 6—Vector pET-21c diluído; 7 e 8—Vector pMA–*GAGA-DBD* diluído. Foram aplicados 5 μ l de cada amostra.

Uma vez isolado o pDNA que contém o gene pretendido e o vector de sobre-expressão pET-21c, seguiu-se para as reacções de hidrólise sequenciais de ambos os vectores, usando duas enzimas de restrição.

A reacção de hidrólise foi efectuada como descrito na Secção 3.9.6. Sendo a primeira enzima de restrição específica utilizada a *Nde* I e a segunda enzima de restrição específica a *EcoR* I. A Figura 4.2 mostra a eficiência de cada reacção de hidrólise, uma vez que no final da segunda hidrólise obteve-se o gene *GAGA-DBD*, com cerca de 162 pb, e o vector pET-21c linearizado, com cerca de 5397 pb.

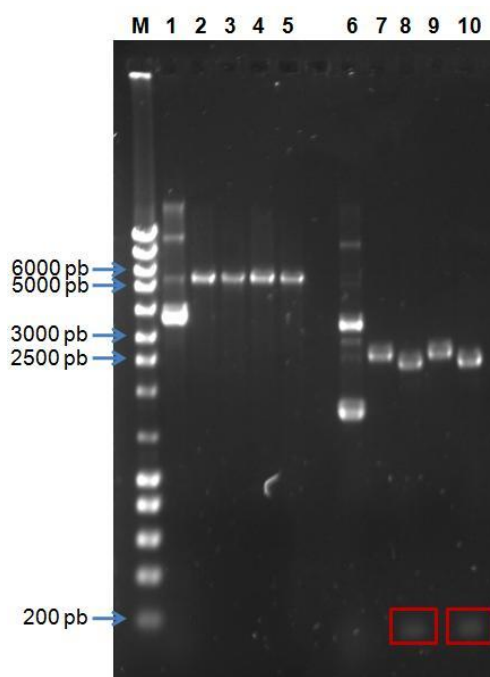


Figura 4.2 Monitorização da reacção de hidrólise dos vectores com as enzimas de restrição *Nde* I e *EcoR* I. M—Marcador de pesos moleculares (*NZYDNA Ladder III*, *NZYTech*); 1—Vector pET-21c; 2 e 4—Primeira hidrólise com a enzima de restrição *Nde* I do vector pET-21c; 3 e 5—Segunda hidrólise com a enzima de restrição *EcoR* I; 6—Vector pMA-GAGA-DBD; 7 e 9—Primeira hidrólise com a enzima de restrição *Nde* I do vector pMA-GAGA-DBD; 8 e 10—Segunda hidrólise com a enzima de restrição *EcoR* I do vector pMA-GAGA-DBD. Aplicaram-se 5 µl de cada amostra. Caixa vermelha indica a banda correspondente ao gene *GAGA-DBD*.

Após a obtenção dos fragmentos correspondentes ao gene *GAGA-DBD* e ao vector pET-21c linearizado é necessário purificar ambos, de modo a prosseguir com a reacção de ligação. A purificação foi efectuada usando o sistema *E-Gel® CloneWell™ Extraction System* (*Invitrogen*), como descrito na Secção 3.9.6. As amostras puras de cada componente foram recolhidas num único tubo.

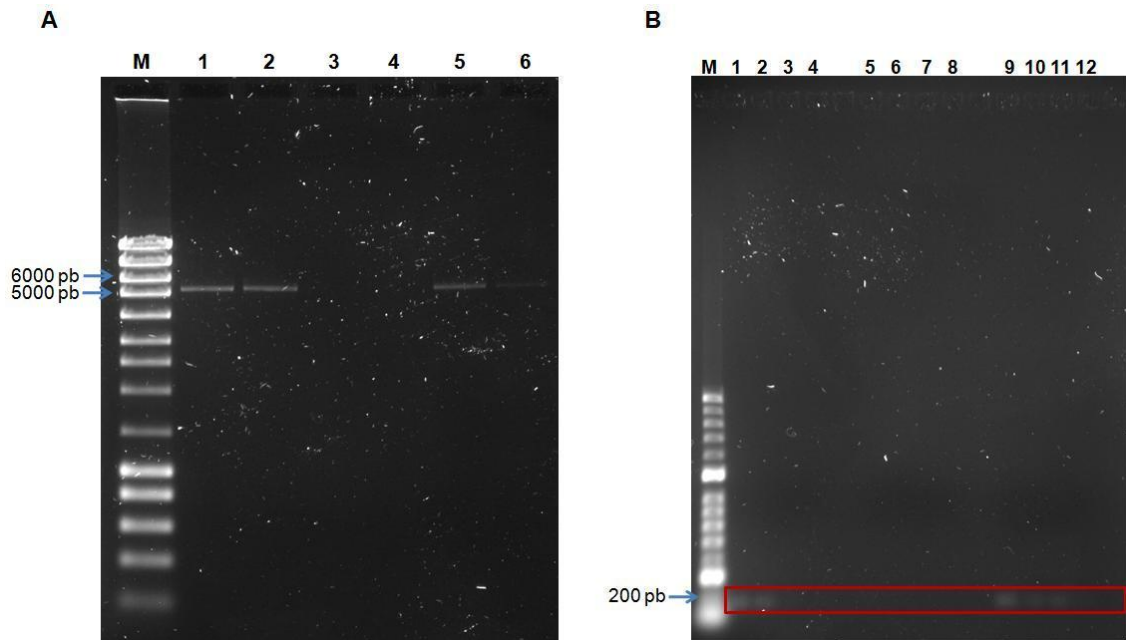


Figura 4.3 Purificação dos fragmentos hidrolisados. **A)** Verificação da purificação do vector pET-21c linearizado. M—Marcador de pesos moleculares (*NZYDNA Ladder III*, *NZYTech*); 1, 2, 5, 6—pET-21c duplamente hidrolisado puro, amostras mais concentradas; 3 e 4—pET-21c, amostras mais diluídas; **B)** Verificação do isolamento e purificação do gene *GAGA-DBD*. M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper ladder II*, *Bioline* – ver Anexo 7.3.2); 1-4 e 9-12—Gene *GAGA-DBD*, amostras mais concentradas; 5-8—Gene *GAGA-DBD*, amostras mais diluídas. Aplicaram-se 5 μ l de cada amostra. Caixa vermelha indica a banda correspondente ao gene *GAGA-DBD*.

Com base na intensidade das bandas observadas no gel da Figura 4.3 foi possível estimar uma concentração do vector pET-21c linearizado aproximadamente igual a 5 ng/ μ l. Não foi possível estimar a concentração do gene *GAGA-DBD* devido ao seu tamanho e à difusão da banda do marcador de peso molecular.

A ligação do gene que codifica para a proteína *GAGA-DBD* ao vector de sobre-expressão pET-21c linearizado foi efectuada segundo o protocolo fornecido pela *NZYTech* (Secção 3.9.7). Foram efectuadas duas reacções, a reacção A que contém 20 ng do vector linearizado e 13 μ l do gene *GAGA-DBD*, e a reacção B que contém 40 ng do vector linearizado e 9 μ l do gene *GAGA-DBD*. O mapa do vector de sobre-expressão pET-21c com o gene que codifica para a *GAGA-DBD* inserido está representado na Figura 4.4.

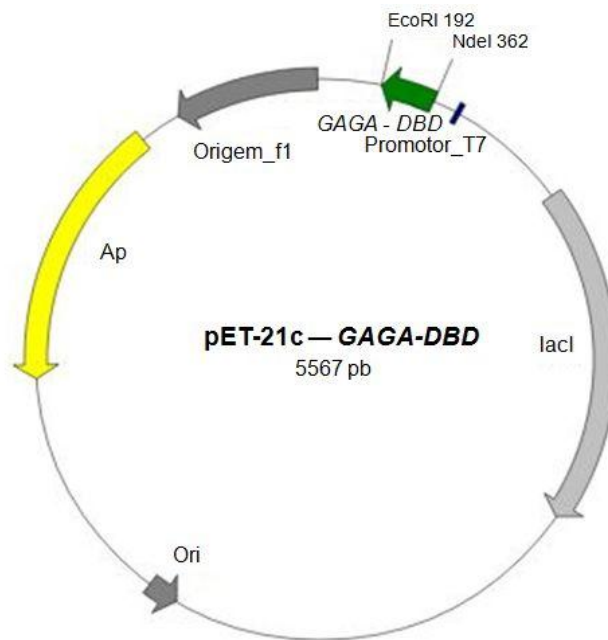


Figura 4.4 Vector de sobre-expressão pET-21c–GAGA-DBD.

A reacção de ligação foi usada para transformar células *E. coli* NZY5 α , quimicamente competentes, para propagação do vector pET-21c–GAGA-DBD. Após o crescimento em meio de cultura LB-Agar contendo 100 μ g/ml de ampicilina obtiveram-se 9 colónias.

A partir de uma colónia da placa da reacção de transformação fez-se uma mini-cultura para o isolamento de DNA pET-21c – GAGA-DBD. A sequência do gene foi confirmada por sequenciação na *Eurofins* (*Genomic Services* da *Eurofins*, Alemanha). O pDNA da preparação sequenciada foi usada para transformar células *E.coli* BL21(DE3) (*NZYTech*) quimicamente competentes para posteriores testes de sobre-expressão.

No Anexo 7.5.1 é possível consultar as sequências de nucleótidos da região que inclui o gene que codifica para a GAGA-DBD do vector pET-21c–GAGA-DBD.

Por tradução das sequências escolhidas usando a ferramenta *Translate* do *software* *ExPASy*, obtém-se três *reading frames* possíveis para a proteína (ver Anexo 7.5.2). Utilizando a *frame* correcta efectuou-se o alinhamento das sequências de aminoácidos deduzidas das sequências de nucleótidos, por forma a verificar a existência de mutações como está representado na Figura 4.5.

```

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      5         15         25         35         45
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  NFVSTPLSTP  EGD IHM PKAK  RAKHPPGTEK  PRSRSEQEQP  ATCPICYAVI
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  -FVSTPLSTP  EGD IHM PKAK  RAKHPPGTEK  PRSRSEQEQP  ATCPICYAVI

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      55         65         75         85         95
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  RQSRNLRRLH  ELRHFAKPGV  STPEFELRRQ  ACGRTRAPP  PPLRSGCSTP
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  RQSRNLRRLH  ELRHFAKPGV  STPEFELRRQ  ACGRTRAPP  PPLRSGCSTP

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      105        115        125        135        145
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  QSPKGSSTPV  GCCHRSTPAI  TSITPWGLST  PTGLEGFFAE  RRYNIRIGEW
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  QSPKGSSTPV  GCCHRSTPAI  TSITPWGLST  PTGLEGFFAE  RRYNIRIGEW

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      155        165        175        185        195
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  DAPCSGALSA  AGVVVTRSVT  ATLASALAPA  PFAFFPSFLA  TFAGFPRQAL
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  DAPCSGALSA  AGVVVTRSVT  ATLASALAPA  PFAFFPSFLA  TFAGFPRQAL

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      205        215        225        235        245
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  NRGLPLGFRF  SALRHLDPKK  LDSTPGDGSR  SGPSPTPTV  FRPLTLESTF
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  NRGLPLGFRF  SALRHLDPKK  LDSTPGDGSR  SGPSPTPTV  FRPLTLESTF

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      255        265        275        285        295
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  FNSGLLFQTG  TTLNPISVYS  FDLSTPGILP  ISAYWLKNEL  ISTPQKFNAN
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  FNSGLLFQTG  TTLNPISVYS  FDLSTPGILP  ISAYWLKNEL  ISTPQKFNAN

      .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
      305        315        325        335        345
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  FNKILTLTIS  TPVALFGEMC  AEPLFVYFSK  YIQICIRSST  PDNNPKCFN
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  FNKILTLTIS  TPWHFSGKCA  RNPYLFIFSK  YIQICIRSST  PDITLINA FN

      .....|.....| ..
      355
GAGA-DBD
pET21cGAGA-DBD_2_frame3  NIEKRVSTP  VF
pET21cGAGA-DBD_8_frame3  NIEKGE-----

```

Figura 4.5 Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína GAGA-DBD deduzidas das sequências de nucleótidos de dois pDNAs com a sequência de aminoácidos do gene *GAGA-DBD*. Alinhamento efectuado pelo software *ClustalW* (31).

4.2 Sobre-expressão do gene *GAGA-DBD*

Como dito anteriormente, células *E. coli* BL21(DE3), quimicamente competentes, foram transformadas com o pDNA pET-21c-GAGA-DBD e a partir destas células foram efectuados os testes de sobre-expressão do gene *GAGA-DBD*.

Para os testes de sobre-expressão foi necessário realizar um pré-inóculo (5 ml de meio de cultura contendo 100 µg/ml de Ampicilina) com uma colónia resultante da transformação, que ficou a incubar com uma agitação de 200 rpm durante a noite a 37 °C. Este pré-inóculo foi usado para incubar 100 ml de meios de cultura contendo 100 µg/ml de Ampicilina que cresceram a 37 °C com uma agitação de 200 rpm.

A produção da proteína GAGA-DBD foi verificada por electroforese em gel de SDS-PAGE a 15% em acrilamida, sabendo que a proteína tem uma massa molecular de 6186,1 Da (45).

Inicialmente testaram-se seis condições de sobre-expressão diferentes, em que se variou o meio de cultura e a concentração de indutor da expressão génica, o IPTG. Três culturas continham meio de cultura LB/Ampicilina (100 µg/ml) e foram induzidas a uma densidade óptica, $O.D_{600\text{ nm}}$, de 0,5 com 0,5 mM e 1 mM de IPTG (controlo da expressão com 0 mM IPTG). As restantes três culturas continham meio de cultura 2x YT/Ampicilina (100 µg/ml) e foram induzidas à mesma densidade óptica e com as mesmas concentrações de IPTG.

Foram recolhidas alíquotas antes da indução, três horas após a indução e após cerca de 16 h.

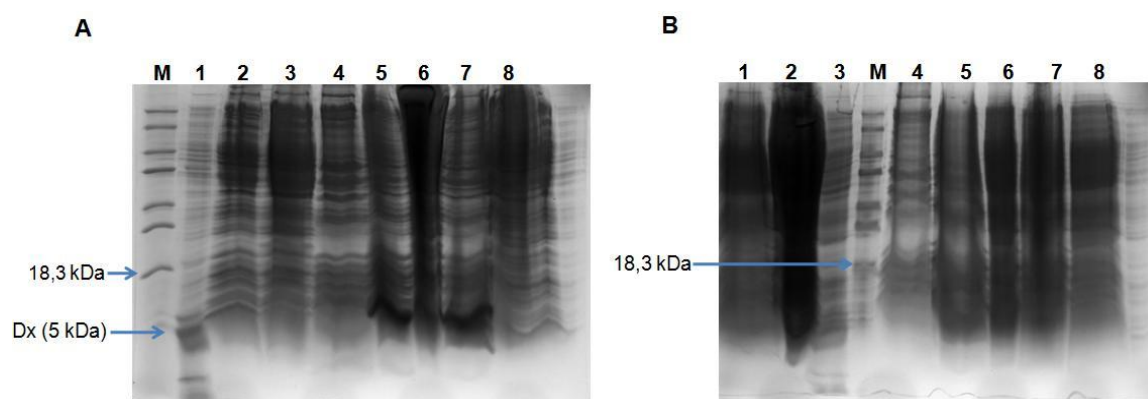


Figura 4.6 Verificação da sobre-expressão da proteína GAGA-DBD. Todas as culturas foram induzidas a uma $O.D_{600\text{ nm}}=0,5$. **A)** Culturas em meio LB/Ampicilina. As alíquotas 1 a 3 referem-se às amostras recolhidas nas culturas induzidas sem adição de IPTG, com 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente. M—Marcador de massas moleculares (*Low Molecular Weight, NZYTech* – ver Anexo 7.3.4), 10 µl; 1—Proteína Dx, cuja massa molecular é de 5 kDa, 10 µl; 2—Alíquota 1 após 3 h de indução, 20 µl; 3—Alíquota 1 após 16 h de indução, 20 µl; 4—Alíquota 2 antes de indução, 20 µl; 5—Alíquota 2 após 3 h de indução, 20 µl; 6—Alíquota 2 após 16 h de indução, 20 µl; 7—Alíquota 3 após 3 h de indução, 20 µl; 8—Alíquota 3 após 16 h de indução, 20 µl; **B)** Culturas em 2x YT/Ampicilina. As alíquotas 4 a 6 referem-se às amostras recolhidas nas culturas induzidas sem adição de IPTG, com 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente. 1—Alíquota 4 após 3 h de indução, 20 µl; 2—Alíquota 4 após 16 h de indução, 20 µl; 3—Proteína Dx, cuja massa molecular é de 5 kDa, 10 µl; M—Marcador de massas moleculares (*Low Molecular Weight, NZYTech*), 10 µl; 4—Alíquota 5 antes de indução, 20 µl; 5—Alíquota 5 após 3 h de indução, 20 µl; 6—Alíquota 5 após 16 h de indução, 20 µl; 7—Alíquota 6 após 3 h de indução, 20 µl; 8—Alíquota 6 após 16 h de indução, 20 µl.

Nos géis da Figura 4.6 está representado o resultado destes testes de sobre-expressão, onde é possível verificar que nos meios de cultura com meio LB/Ampicilina induzidos com 0,5 mM de IPTG e 1 mM de IPTG houve expressão da proteína GAGA-DBD, enquanto que em meio 2x YT/Ampicilina a produção de GAGA-DBD é muito baixa.

De seguida testou-se a densidade óptica aquando a indução com IPTG, para tal testaram-se duas culturas diferentes, uma em que se induziu com 0,5 mM de IPTG à densidade óptica de 0,5 e outra que se induziu com 0,5 mM de IPTG à densidade óptica de 1,5. Em ambas as culturas usou-se meio de cultura LB/Ampicilina (100 µg/ml). Foram recolhidas alíquotas antes de indução e 3 horas após a indução.

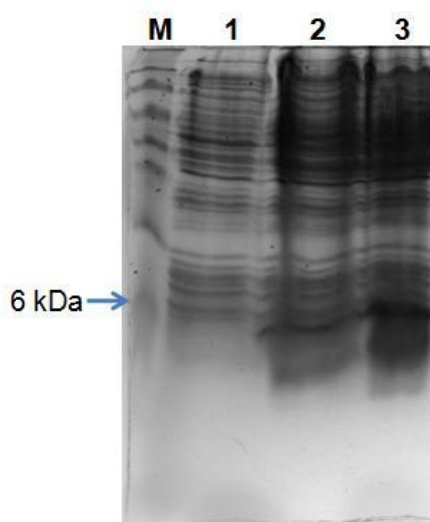


Figura 4.7 Verificação dos testes de sobre-expressão da proteína GAGA-DBD em meio LB/Ampicilina. Determinação das condições de indução. Alíquota 1 induzida com 0,5 mM de IPTG, $O.D_{600\text{ nm}}=0,5$; Alíquota 2 induzida com 0,5 mM de IPTG, $O.D_{600\text{ nm}}=1,5$. M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue*, *Invitrogen* – ver Anexo 7.3.5); 1—Alíquota 1 antes de indução; 2—Alíquota 1 após 3 h de indução; 3—Alíquota 2 após 3 h de indução. Aplicaram-se 15 µl de cada amostra.

A análise dos resultados representados na Figura 4.7 indicam-nos que a expressão da proteína GAGA-DBD é superior quando a indução é efectuada a uma densidade óptica mais elevada.

Por último, efectuaram-se novamente testes de sobre-expressão a baixa e alta densidade óptica aquando a indução e variando a concentração de IPTG utilizada para a indução. Deste modo, testaram-se oito culturas diferentes, sendo todos em meio LB/Ampicilina (100 µg/ml).

Das oito culturas, quatro culturas foram induzidas à densidade óptica de 0,5 com as concentrações de IPTG a variar entre 0 e 1 mM. As restantes quatro culturas foram induzidas à densidade óptica de 1,6 com as mesmas concentrações de IPTG.

Foram recolhidas alíquotas antes de indução, três horas após a indução e após cerca de 16 h.

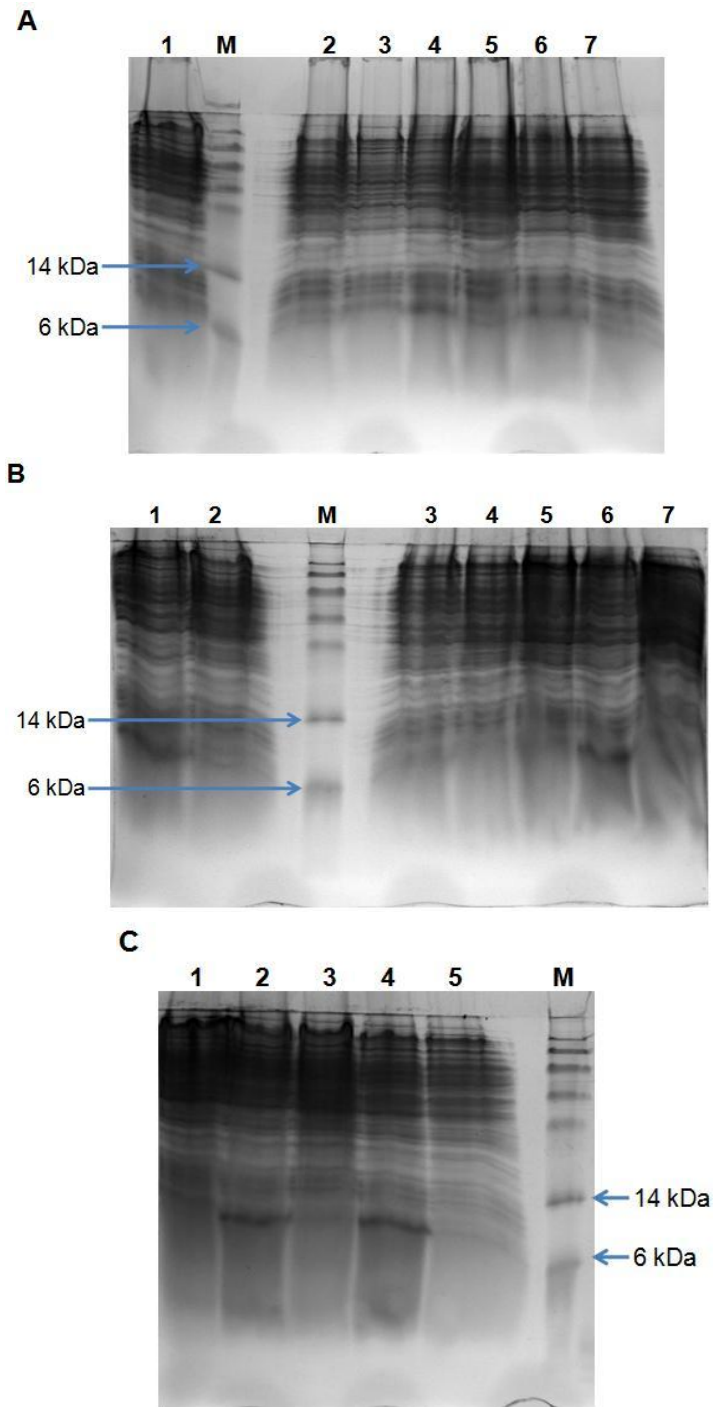


Figura 4.8 Verificação dos testes de sobre-expressão da proteína GAGA-DBD em meio LB/Ampicilina. Estudo do efeito da concentração do indutor. **A)** Indução a baixa densidade óptica. Aliquotas 1 a 3, indução com 0, 0,1 e 0,5 mM de IPTG, respectivamente. 1—Aliquota 1 após 3 h de indução; M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue, Invitrogen*); 2—Aliquota 1 após 16 h de indução; 3—Aliquota 2 antes de indução; 4—Aliquota 2 após 3 h de indução; 5—Aliquota 2 após 16 h de indução; 6—Aliquota 3 após 3 h de indução; 7—Aliquota 3 após 16 h de indução; **B)** Indução a baixa densidade óptica. Aliquota 4, indução com 1 mM IPTG; Indução a elevada densidade óptica. Aliquotas 5 e 6, indução com 0, 0,1 mM de IPTG. 1—Aliquota 4 após 3 h de indução; 2—Aliquota 4 após 16 h de indução; M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue, Invitrogen*); 3—Aliquota 5 após 3 h de indução; 4—Aliquota 5 após 16 h de indução; 5—Aliquota 6 antes de indução; 6—Aliquota 6 após 3 h de indução; 7—Aliquota 6 após 16 h de indução; **C)** Indução a elevada densidade óptica. Aliquotas 7 e 8, indução com 0,5 e 1 mM de IPTG. 1—Aliquota 7 antes de indução; 2—Aliquota 7 após 3 h de indução; 3—Aliquota 7 após 16 h de indução; 4—Aliquota 8 após 3 h de indução; 5—Aliquota 8 após 16 h de indução; M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue, Invitrogen*). Aplicaram-se 15 µl de cada amostra.

Com base nos géis representados na Figura 4.8, parece haver uma maior expressão da proteína GAGA-DBD quando esta é induzida a uma elevada densidade óptica e com uma concentração de IPTG de 1 mM.

Tendo em conta os resultados de todos os testes de sobre-expressão, a expressão da proteína GAGA-DBD foi efectuada em meio LB/Ampicilina (100 µg/ml), induzida quando a cultura atingiu uma densidade óptica a 600 nm de 1,6 com 1 mM de IPTG, a 37 °C e 200 rpm (Secção 3.1). Nestas condições obteve-se um rendimento celular de cerca de 6,5 g por litro de cultura (peso húmido).

Na Figura 4.9 está representada um perfil de produção da proteína GAGA-DBD. A análise da figura permite concluir que a proteína GAGA-DBD recombinante é expressa numa forma solúvel, tendo em conta que no sobrenadante da ultracentrifugação se pode observar uma banda mais intensa a cerca de 6 kDa.

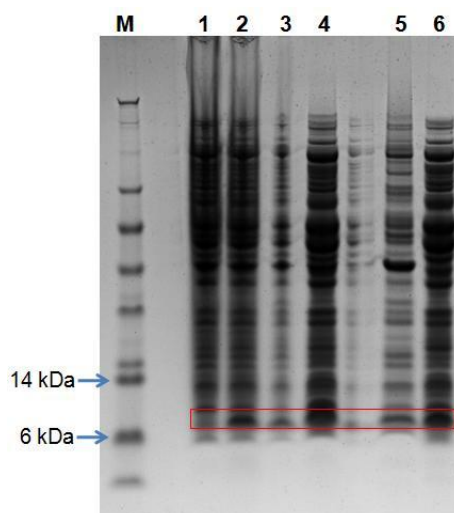


Figura 4.9 Perfil de produção da proteína GAGA-DBD avaliado por SDS-PAGE (4-12% acrilamida). M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue, Invitrogen*), 8 µl; 1—Conteúdo proteico da cultura celular antes da indução com IPTG; 2—Amostra da cultura celular após 3 h de indução; 3—Pellet da baixa centrifugação; 4—Sobrenadante da baixa centrifugação; 5—Pellet da ultracentrifugação; 6—Sobrenadante da ultracentrifugação. Aplicaram-se 8 µl de cada amostra. Caixa vermelha indica a banda correspondente à proteína GAGA-DBD.

4.3 Purificação da proteína GAGA-DBD

Tal como se pretendia, as condições de sobre-expressão estabelecidas permitem produzir a proteína GAGA-DBD numa forma solúvel.

O ponto isoeléctrico da proteína, determinado pela aplicação *ProtParam tool (ExPASy)* é igual a 11,29 (45). Como o tampão em que a proteína se encontra tem pH=7,6, a proteína possui uma carga positiva, o que permite realizar a purificação por cromatografia de permuta iónica, usando uma resina catiónica. Deste modo utilizou-se a coluna cromatográfica Resource S (6 ml da *GE Healthcare*) como descrito na Secção 3.2.

Na Figura 4.10 é apresentado um perfil de eluição da coluna cromatográfica Resource S usada na purificação da proteína GAGA-DBD por aplicação de um gradiente linear contínuo de tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 M NaCl.

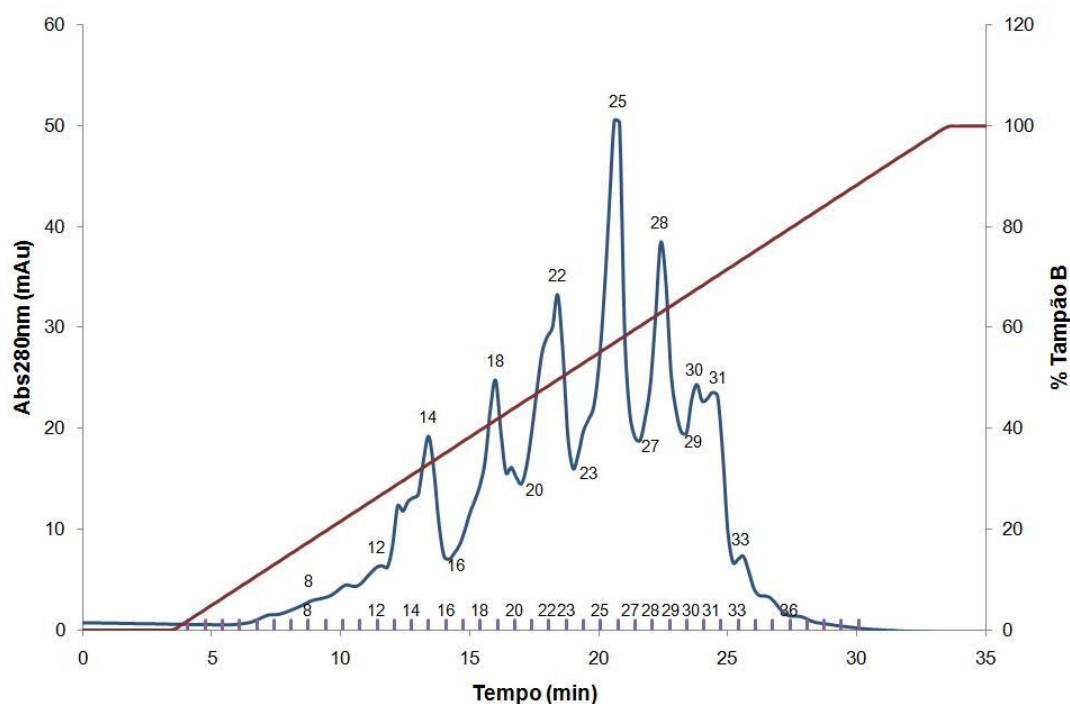


Figura 4.10 Perfil de eluição da coluna Resource S para purificação da proteína GAGA-DBD. — Abs 280 nm; — % Tampão B. As fracções recolhidas contêm 2 ml de proteína eluída. No topo de cada banda cromatográfica estão assinaladas as fracções que foram verificadas por electroforese em gel *NuPAGE 4-12% BisTris* (ver Figura 4.11).

Pela análise do cromatograma representado na Figura 4.10, verifica-se uma boa separação proteica. No entanto, é necessário verificar as fracções recolhidas por SDS-PAGE em gel *NuPAGE 4-12% BisTris* para identificar as fracções mais ricas na proteína em estudo.

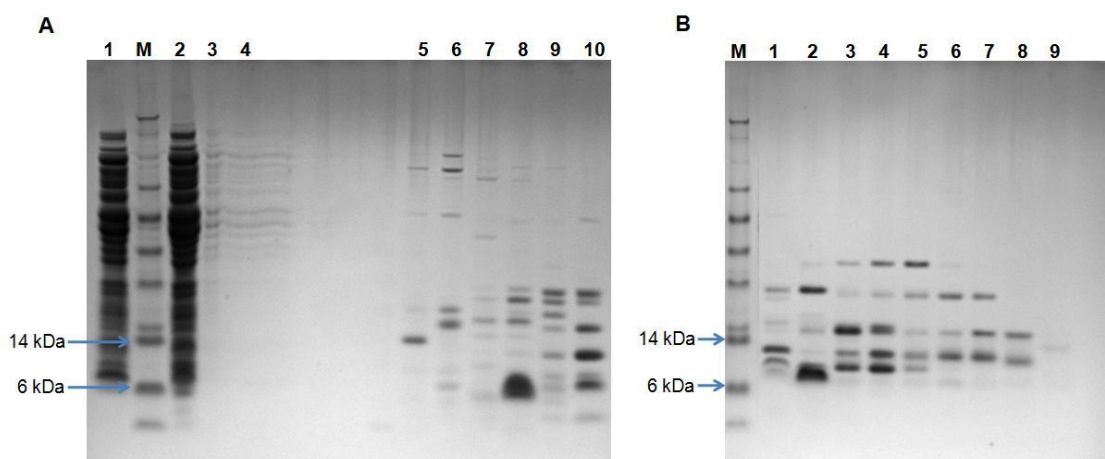


Figura 4.11 Análise do passo cromatográfico em coluna Resource S por SDS-PAGE. **A)** 1—Extracto bruto não dialisado; M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue*, *Invitrogen*); 2—Extracto bruto após diálise; 3—Lavagem da coluna com tampão A; 4—Fracção 8; 5—Fracção 12; 6—Fracção 14; 7—Fracção 16; 8—Fracção 18; 9—Fracção 20; 10—Fracção 22; **B)** M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue*, *Invitrogen*); 1—Fracção 23; 2—Fracção 25; 3—Fracção 27; 4—Fracção 28; 5—Fracção 29; 6—Fracção 30; 7—Fracção 31; 8—Fracção 33; 9—Fracção 36. Aplicaram-se 8 μ l de cada amostra.

Com base no cromatograma e na electroforese das Figuras 4.10 e 4.11 juntaram-se as fracções 17-19 e as fracções 24-26, sendo este conjunto de fracções eluídos com cerca de 37-43% e 53-58% de tampão B, respectivamente. As fracções foram dialisadas (contra tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA) e concentradas em *Vivaspin* de 20 ml (*Sartorius stedim Biotech*).

Pela análise dos espectros de UV/Visível das duas fracções obtidas elas parecem diferir apenas no estado de oxidação de alguns resíduos de cisteína. Desta forma, em todos os estudos efectuados utilizou-se a fracção eluída à volta de 55% de tampão B, por ser aquela que continha uma maior quantidade de proteína.

4.4 Quantificação da proteína GAGA-DBD

A proteína GAGA-DBD foi quantificada pelo método colorimétrico do BCA como descrito na Secção 3.3. No entanto, efectuaram-se algumas alterações ao método uma vez que o tampão da proteína contem DTT e EDTA, e estes podem interferir no método. Além disso, a proteína possui uma sequência de aminoácidos muito pequena, contendo apenas três aminoácidos aromáticos (uma tirosina e duas fenilalaninas), sendo que a tirosina contribui fortemente para a reacção de coloração inerente ao método.

Com o intuito de perceber a influência da composição em aminoácidos e do tampão no método, fizeram-se rectas de calibração com as proteínas BSA, rubredoxina (Rd) de *Desulfovibrio vulgaris* e desulforedoxina (Dx) de *Desulfovibrio gigas*. Na Tabela 4.1 é apresentado o conteúdo em aminoácidos aromáticos de cada proteína.

Tabela 4.1 Composição em aminoácidos aromáticos das proteínas padrão usadas na quantificação da proteína GAGA-DBD.

Proteína Padrão	Número total de aminoácidos	Composição em aminoácidos aromáticos
Dx <i>Desulfovibrio gigas</i>	36	Tirosina = 1
Rd <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	52	Tirosina = 3 Triptofano = 1 Fenilalanina = 2
BSA	105	Tirosina = 2 Triptofano = 3 Fenilalanina = 2

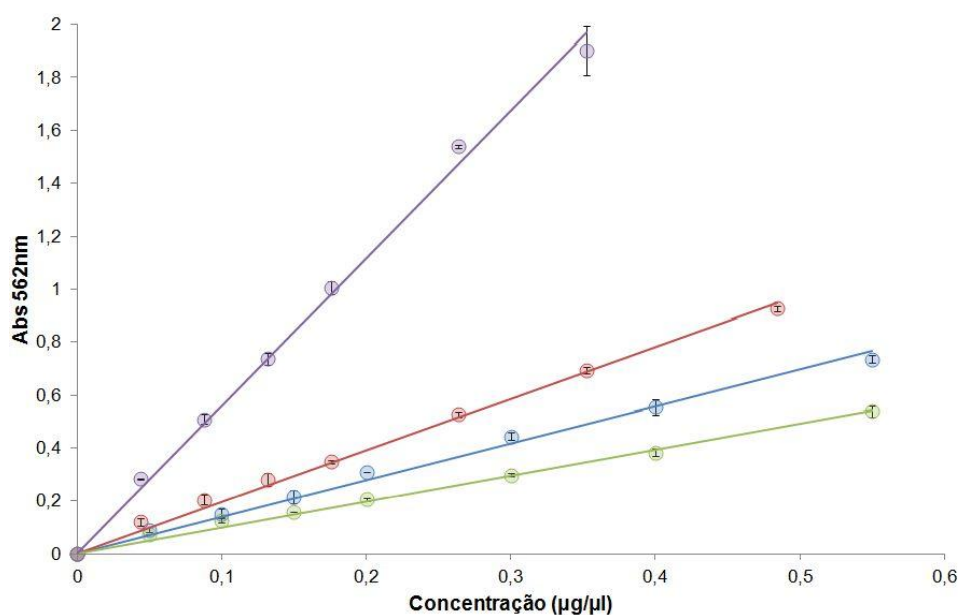


Figura 4.12 Rectas de calibração para o método colorimétrico do BCA. Estudo do efeito da composição em aminoácidos e do tampão. ● Dx diluída em água, $Abs=0,988 \times [Dx]$, $R^2=0,9919$; ● BSA diluída em água, $Abs=1,394 \times [BSA]$, $R^2=0,9928$; ● Rd diluída em água, $Abs=1,964 \times [Rd]$, $R^2=0,9949$; ● Rd diluída em tampão, $Abs=5,592 \times [Rd]$, $R^2=0,9962$.

Pela Figura 4.12 verifica-se que a composição em aminoácidos tem influência nesta técnica, uma vez que o método colorimétrico tem como princípio a interacção do ião Cu^{2+} com proteínas em meio alcalino, produzindo Cu^{1+} e formando um complexo com o BCA que absorve intensamente a 562 nm. Como mencionado anteriormente, a presença de resíduos de tirosina e triptofano favorecem a formação do complexo. Quando se comparam as rectas de calibração com proteínas padrão preparadas em água observa-se que, tal como esperado, quanto maior a percentagem de aminoácidos aromáticos, maior é o declive da recta – os declives das rectas variam na seguinte ordem: Dx (2,8% aminoácidos aromáticos) < BSA (6,7% aminoácidos aromáticos) < Rd (11,5% aminoácidos aromáticos).

A proteína Rd tem um tamanho idêntico ao da proteína GAGA-DBD, que possui 54 aminoácidos. Deste modo, a proteína Rd foi usada de seguida para testar o efeito do tampão na quantificação pelo método do BCA. Comparação das rectas usando Rd como padrão preparadas em água (—) e em tampão (—) mostra que na última o factor de proporcionalidade é superior ao da primeira, o que significa que o tampão interfere na técnica. Assim, a concentração de todas as preparações de proteína usadas foi estimada usando Rd diluída em tampão como padrão do método.

Também foi efectuado o espectro UV/Visível da proteína com o intuito de determinar o $\epsilon_{280 \text{ nm}}$, sendo este valor experimental igual a $1060 \pm 300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A Figura 4.13 representa o espectro obtido para a proteína GAGA-DBD.

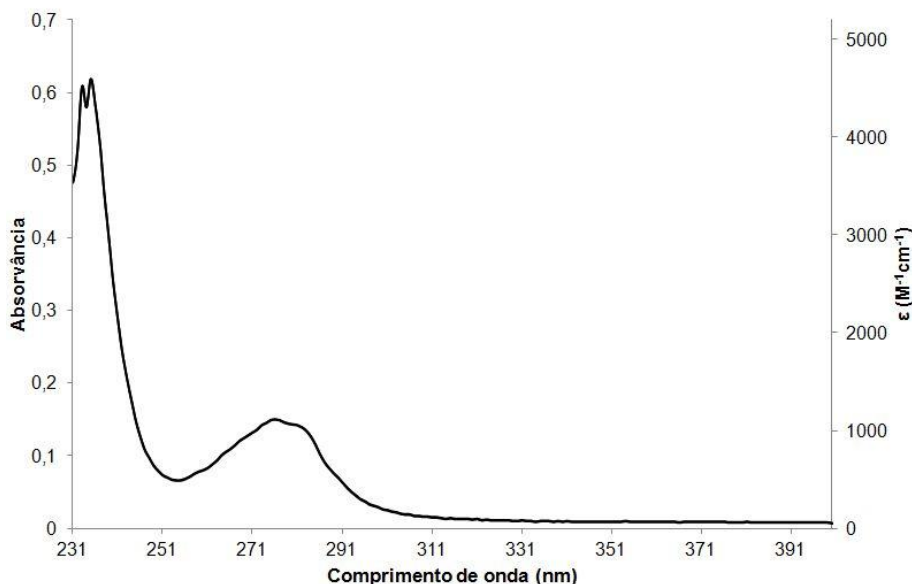


Figura 4.13 Espectro de UV/Visível da proteína GAGA-DBD em tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA. Linha de base traçada com o mesmo tampão da proteína.

4.5 Reconstituição do centro metálico

A proteína GAGA-DBD foi reconstituída com diferentes metais em tampão 10 mM Tris-HCl pH=8,0 contendo 50 mM NaCl e em ambiente anaeróbico, na câmara de luvas ($O_2 \leq 1$ ppm).

A reconstituição foi efectuada como descrito na Secção 3.4, com os iões metálicos divalentes Fe(II), Zn(II) e Co(II). A reconstituição foi efectuada por adições sucessivas do metal. Após a incubação final deixou-se a proteína oxidar ao ar para análise espectral neste estado de oxidação.

As Figuras 4.14 a 4.17 representam a cinética de reconstituição da proteína com os iões metálicos.

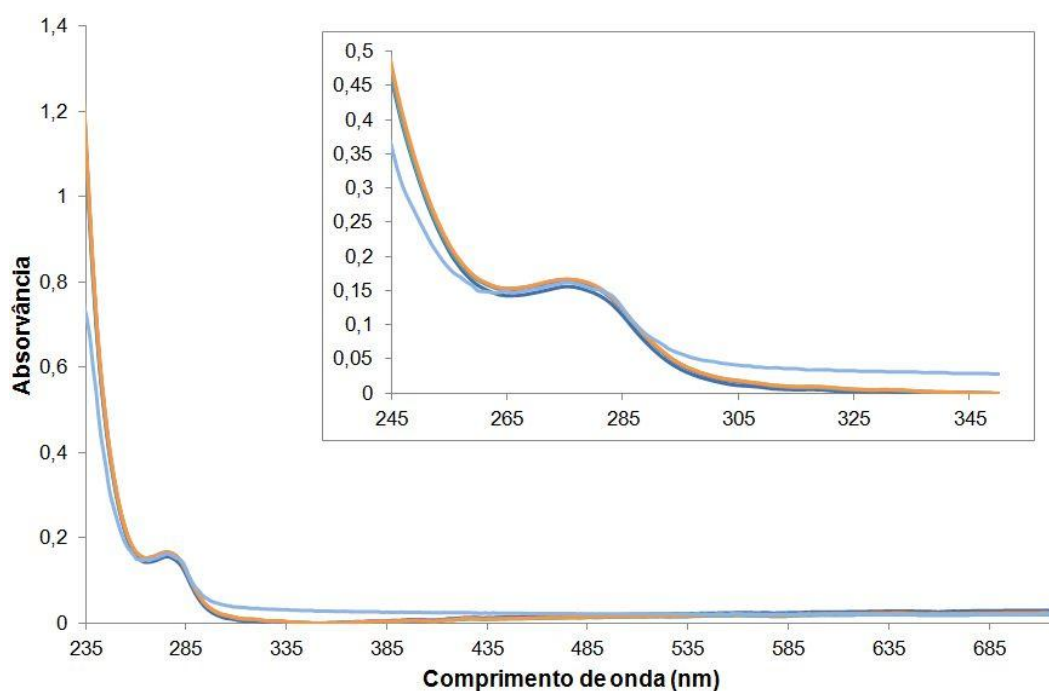


Figura 4.14 Proteína GAGA-DBD tal como purificada, controlo da reconstituição. — GAGA-DBD; — GAGA-DBD, 2:3 tampão/proteína (30 min); — GAGA-DBD, 3:3 tampão/proteína (45 min); — GAGA-DBD, 3:3 tampão/proteína (60 min); — GAGA-DBD, 4:3 tampão/proteína (75 min); — GAGA-DBD, oxidada.

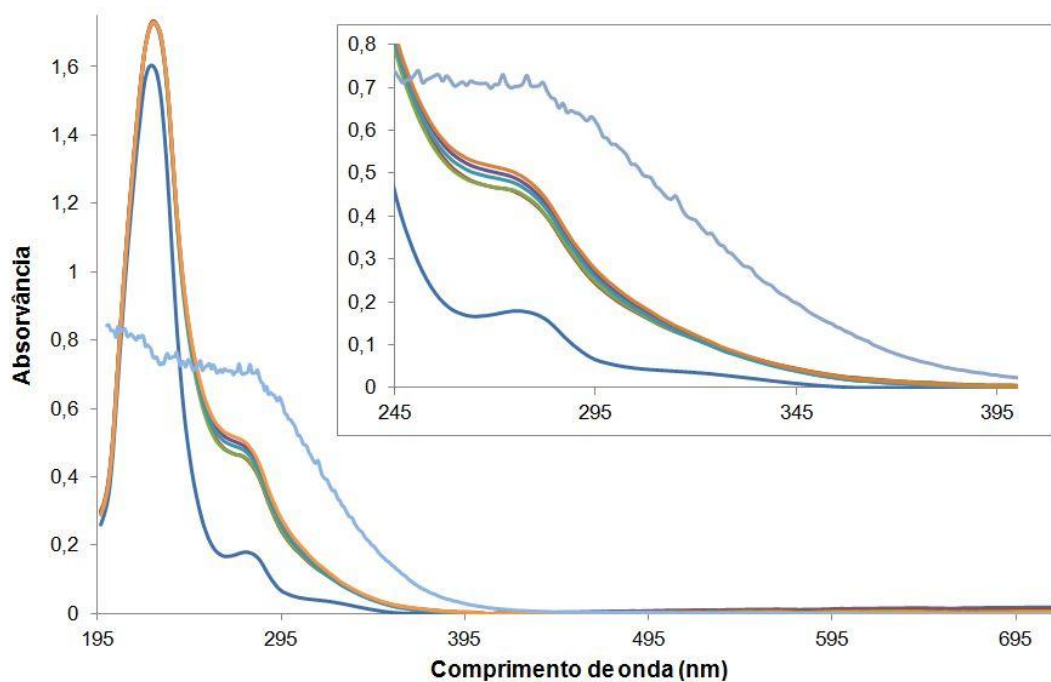


Figura 4.15 Proteína GAGA-DBD reconstituída com Fe(II), GAGA-DBD/Fe. — GAGA-DBD; — GAGA-DBD, 1:3 Fe(II)/proteína (15 min); — GAGA-DBD, 2:3 Fe(II)/proteína (30 min); — GAGA-DBD, 3:3 Fe(II)/proteína (45 min); — GAGA-DBD, 3:3 Fe(II)/proteína (60 min); — GAGA-DBD, 4:3 Fe(II)/proteína (75 min); — GAGA-DBD, 4:3 Fe(II)/proteína após oxidação aeróbia.

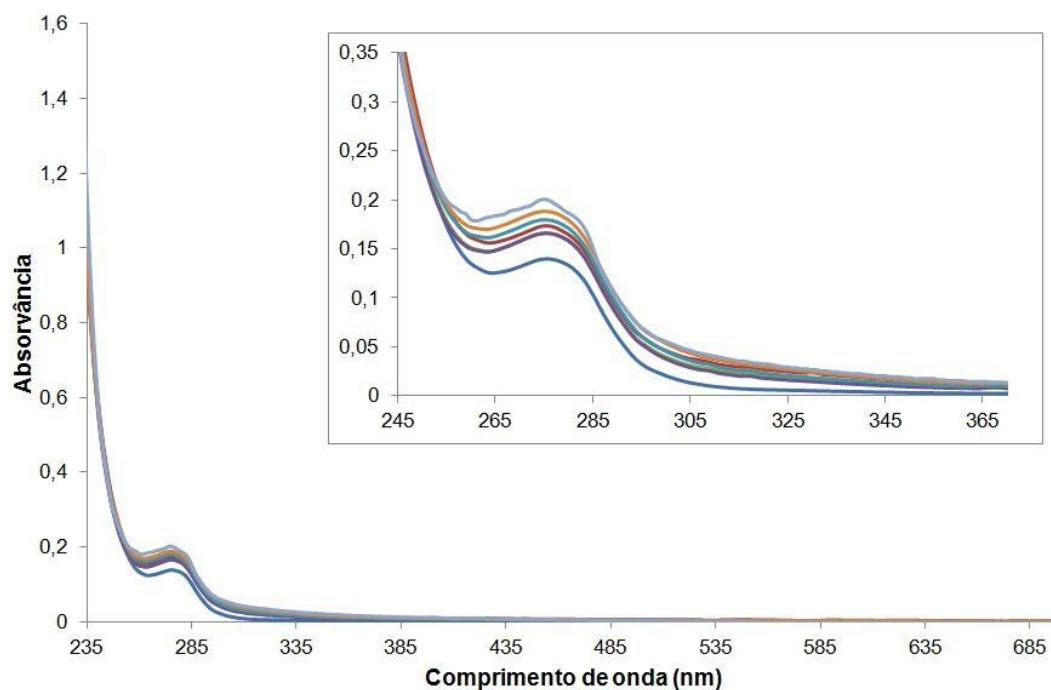


Figura 4.16 Proteína GAGA-DBD reconstituída com Zn(II), GAGA-DBD/Zn. — GAGA-DBD; — GAGA-DBD, 1:3 Zn(II)/proteína (15 min); — GAGA-DBD, 2:3 Zn(II)/proteína (30 min); — GAGA-DBD, 3:3 Zn(II)/proteína (45 min); — GAGA-DBD, 3:3 Zn(II)/proteína (60 min); — GAGA-DBD, 4:3 Zn(II)/proteína (75 min); — GAGA-DBD, 4:3 Zn(II)/proteína após oxidação aeróbia.

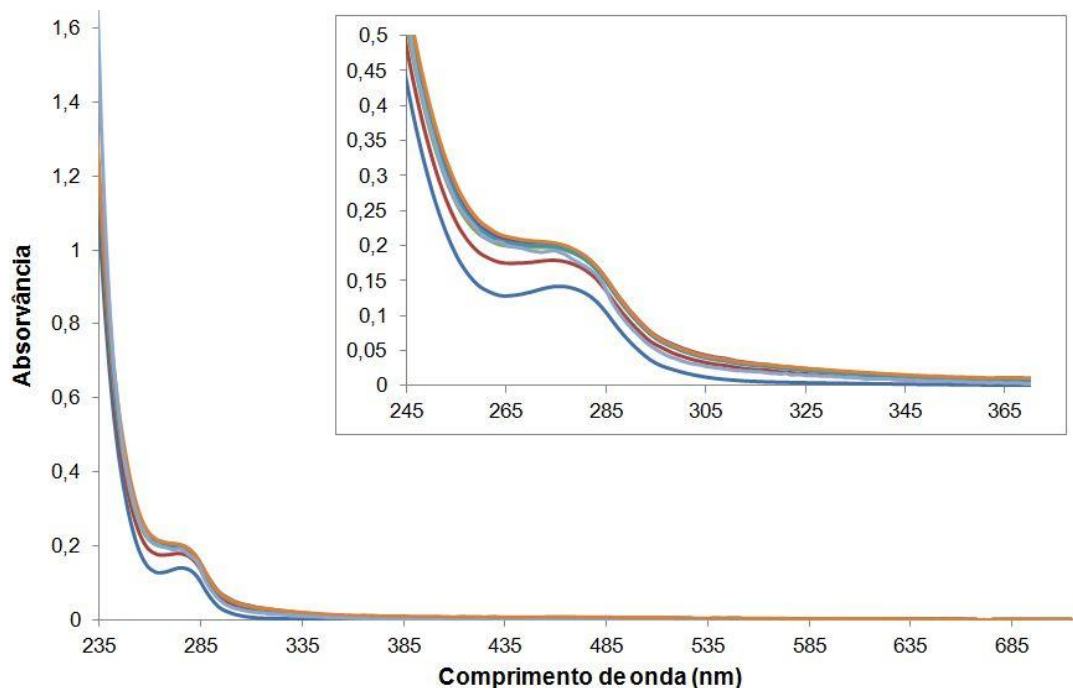


Figura 4.17 Proteína GAGA-DBD reconstituída com Co(II), GAGA-DBD/Co. — GAGA-DBD; — GAGA-DBD, 1:3 Co(II)/proteína (15 min); — GAGA-DBD, 2:3 Co(II)/proteína (30 min); — GAGA-DBD, 3:3 Co(II)/proteína (45 min); — GAGA-DBD, 3:3 Co(II)/proteína (60 min); — GAGA-DBD, 4:3 Co(II)/proteína (75 min); — GAGA-DBD, 4:3 Co(II)/proteína após oxidação aeróbia.

A avaliar pelas figuras a proteína reconstituíu o centro metálico, sendo a reconstituição mais evidente no caso do Fe(II) e do Zn(II). No entanto para verificar a reconstituição do centro é necessário retirar o excesso de metal que possa ter ficado em solução ou adventiciamente ligado à proteína, utilizando para tal uma coluna *Hitrap Desalting*.

4.6 Quantificação de iões metálicos

A quantificação de iões metálicos presentes na proteína GAGA-DBD foi efectuada pelo Laboratório de Análises *Atomic Emission Spectroscopy Service*, Requimte/Departamento de Química FCT/UNL.

Os resultados obtidos pelo laboratório revelaram que: i) a proteína GAGA-DBD/Zn continha 0,75 ppm de zinco, correspondente a uma reconstituição de cerca de 40%; ii) a proteína GAGA-DBD/Co continha 0,15 ppm de cobalto, isto é, cerca de 20% de reconstituição; e iii) não foi possível quantificar o ferro na proteína GAGA-DBD/Fe, porque este estava abaixo do limite de detecção do aparelho. No entanto os resultados obtidos da análise espectroscópica (por UV/Visível e por Mössbauer) (ver abaixo Secção 4.7) indicam que a

reconstituição com Fe(II) foi, pelo menos em parte, efectiva. Mais, as rectas de calibração usadas pelo Laboratório de Análises (ver Anexo 7.7) têm um elevado erro, o que contribuiu para a dificuldade de quantificação. As amostras reconstituídas, as proteínas GAGA-DBD e GAGA-DBD/Zn foram quantificadas pelo método de BCA em microplacas, descrito na Secção 3.3, uma vez que estas duas proteínas foram também utilizadas nos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética e exposição à radiação.

4.7 Caracterização do centro metálico

A proteína GAGA-DBD tem o seu centro metálico coordenado por duas cisteínas e duas histidinas. Para caracterizar este centro recorreu-se à espectroscopia de Mössbauer, e para tal reconstituiu-se a proteína com ferro 57 (^{57}Fe), de acordo com o descrito na Secção 3.4.

De modo a preparar a amostra para análise por esta técnica incubou-se 1,47 mM de proteína com 1,52 mM de ^{57}Fe durante 30 minutos, em paralelo foi realizado o controlo (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl, 1,52 mM ^{57}Fe).

As primeiras condições de aquisição efectuadas foram sem campo magnético aplicado a 5 K e 150 K e a campo aplicado de 600 G a 5 K, como demonstram as Figuras 4.18 a 4.20.

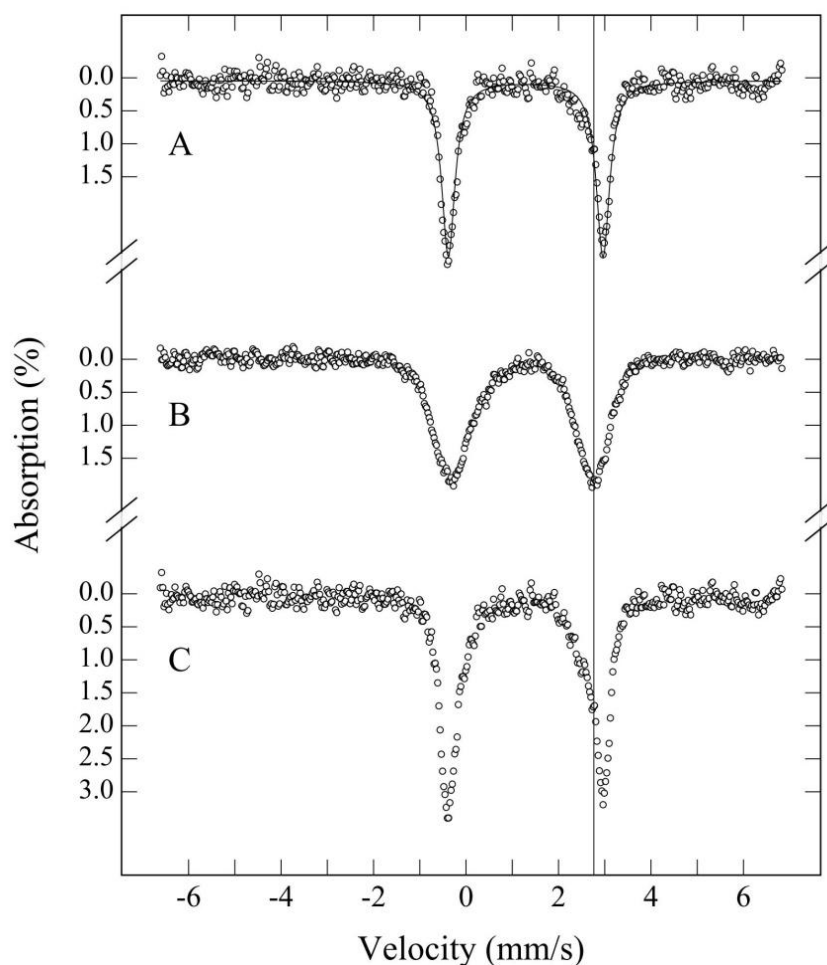


Figura 4.18 Espectros de Mössbauer sem campo aplicado a 150 K. **A)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe(II) obtido após a subtração de 27% do controlo. A linha sólida é a simulação de um dobleto de quadrupolo; **B)** Espectro do controlo; **C)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe(II).

Na Figura 4.18 estão representados os espectros das amostras de proteína incubada com ião ferroso (espectro **C**) e do controlo (espectro **B**), adquiridos a temperatura elevada (150 K) na ausência de campo magnético. Pode verificar-se pela posição das linhas de mais alta energia (assinalada com uma linha vertical) que no caso do espectro **C** existe mais do que uma espécie em solução. Após análise espectral atribuiu-se 27% da absorção total à espécie correspondente ao controlo ferroso na forma livre, sendo os restantes 73% atribuídos à proteína com ião ferroso no centro metálico, espectro **A** da Figura 4.18. Tendo em conta estas percentagens estimou-se a constante de dissociação (K_d) de $1,33 \times 10^{-4}$ M. Para além dos dobletos de quadrupolo atribuídos ao centro metálico da proteína GAGA-DBD e do ião ferroso em solução não se observam mais espécies nos espectros adquiridos.

A Figura 4.19 mostra os resultados para a aquisição a temperatura baixa (5 K) e na ausência de campo magnético aplicado. Os espectros obtidos estão de acordo com a análise acima descrita, obtendo-se neste caso os seguintes parâmetros para o dobleto de quadrupolo atribuído ao centro ferroso da proteína GAGA-DBD, ΔE_Q de 3,48 mm/s e δ de 1,34 mm/s.

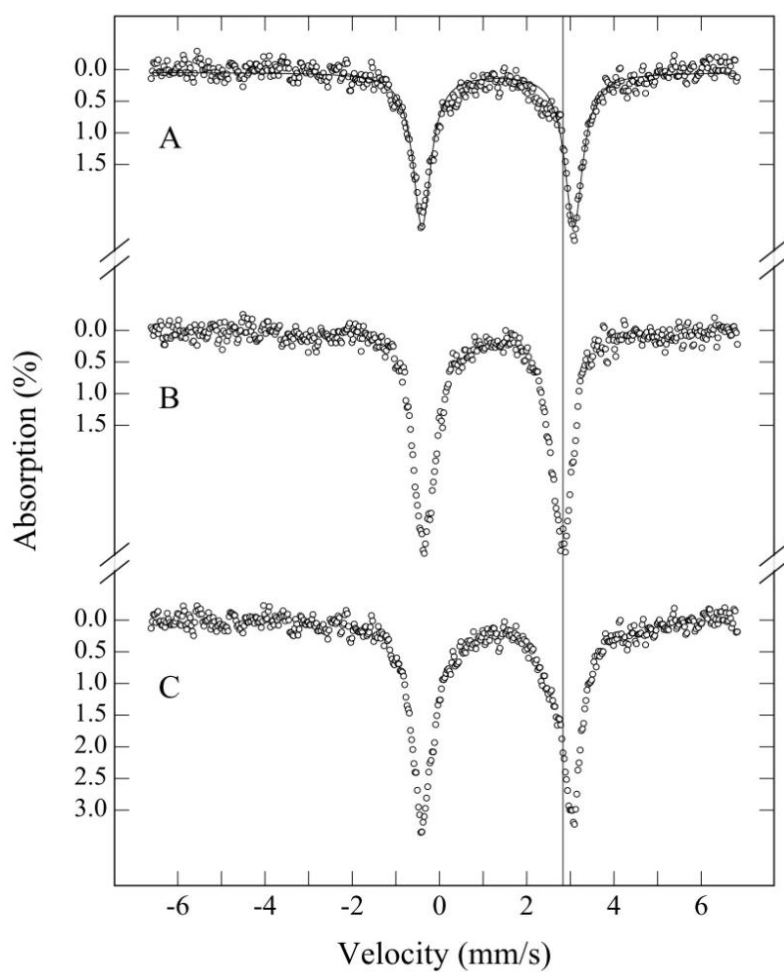


Figura 4.19 Espectros de Mössbauer sem campo aplicado a 5 K. **A)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe(II) obtido após a subtração de 27% do controle. A linha sólida é a simulação de um dobreto de quadrupolo; **B)** Espectro do controle; **C)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe(II).

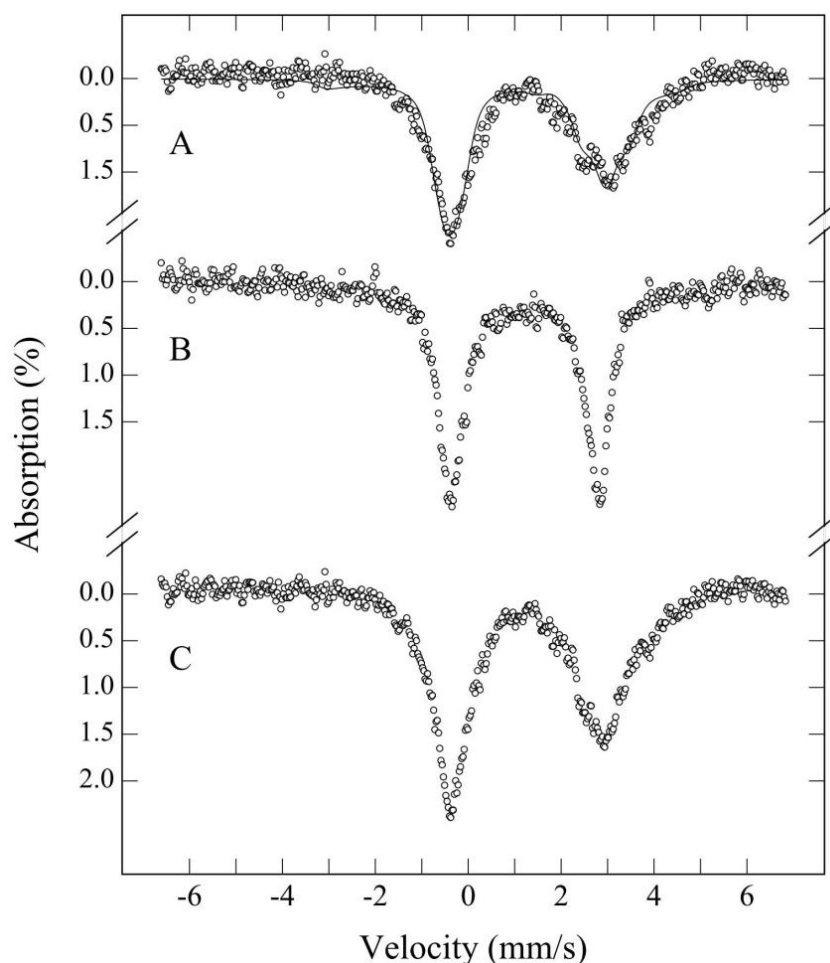


Figura 4.20 Espectros de Mössbauer com campo aplicado de 600 G a 5 K. **A)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe(II) obtido após a subtração de 27% do controlo. A linha sólida é simulada utilizando ΔE_Q e δ da Figura 4.19 para um sistema ferroso de spin alto ($S=2$) para o qual se assumiu um valor de $D=1,2 \text{ cm}^{-1}$, $E/D=0,2$, $\eta=3,0$ e constantes hiperfinas reportadas para este tipo de sistema; **B)** Espectro do controlo; **C)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe(II).

No espectro da Figura 4.20 estão representados os espectros obtidos nas mesmas condições experimentais da Figura 4.19, exceptuando o facto de se ter aplicado um campo magnético aplicado paralelamente à radiação γ e de magnitude 600 G. É notória a diferença na linha de mais alta energia do espectro **C** da Figura 4.20. Este alargamento não se verifica no espectro **B** (controlo) pelo que pode ser atribuído à espécie proveniente do centro metálico da proteína GAGA-DBD/Fe(II). Nas condições referidas, o alargamento da linha de mais alta energia é característico de sistemas paramagnéticos de spins inteiros. Para testar esta hipótese foi efectuada a subtração de 27% do espectro **B** ao espectro **C**, obtendo-se o espectro **A** correspondente ao centro metálico da proteína GAGA-DBD/Fe(II). A linha a sólido representada sobre o espectro corresponde a uma simulação de um sistema de spin com $S=2$, com parâmetros típicos de centros monoméricos, ferrosos e de spin alto. Como é visível a linha explica a forma espectral, estando em concordância com o tipo de centro esperado para a proteína GAGA-DBD.

As amostras, proteína e controlo, foram oxidadas durante 40 minutos em atmosfera de oxigénio, após que se repetiram as várias condições de aquisição. Os resultados são apresentados nas Figuras 4.21 e 4.22.

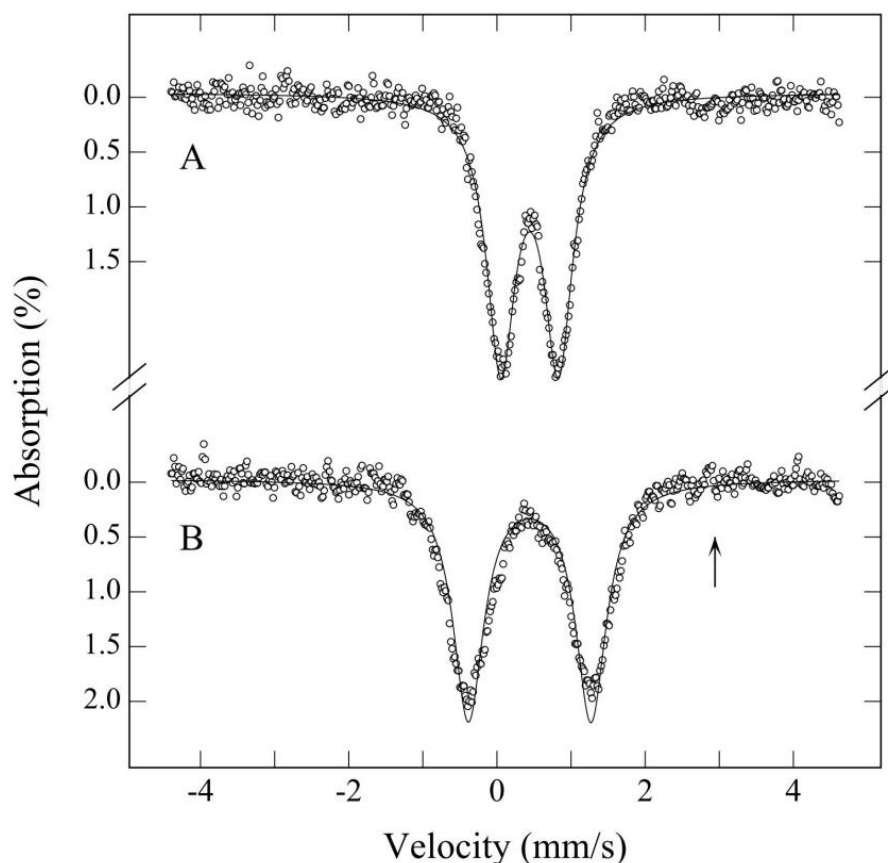


Figura 4.21 Espectros de Mössbauer sem campo aplicado a 150 K. **A)** Espectro do controlo; **B)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe oxidada. A linha sólida é a simulação de um doubleto de quadrupolo. A seta indica a posição da linha de alta energia das espécies ferrosas anteriormente observadas.

Como se pode verificar pela Figura 4.21 todas as espécies ferrosas detectadas anteriormente sofreram oxidação, pois não é possível observar qualquer absorção aos valores de energia para as espécies ferrosas, anteriormente descritas.

Nos espectros **A** e **B** da Figura 4.21 de destacar a diferença entre espécies férricas, pois a espécie coordenada pela proteína apresenta um doubleto de quadrupolo com um valor ΔE_Q médio de 1,65 mm/s substancialmente superior ao da espécie férrica presente no controlo (ΔE_Q de 0,78 mm/s). Tal facto permite-nos também saber que na amostra do espectro **B** não é possível existir mais do que 10% de ferro livre em solução. Esta diferença é uma diferença para as amostras ferrosas (onde foi atribuída uma percentagem de 27% de ferro livre em

solução) o que pode ser explicado pela mudança no estado de oxidação (e possível alteração do valor de K_d) e tempo de incubação adicional.

Na Figura 4.22 apresentam-se os espectros para a aquisição a baixa temperatura (5 K) e na presença de campo aplicado de magnitude 600 G. Contrariamente ao que se podia prever, o espectro **B** apresenta unicamente um dobleto de quadrupolo, em flagrante contraste com o espectro **A** onde se observa um espectro magnético com absorções entre -7 e 7 mm/s. O espectro **A** é típico de uma espécie de spin semi-inteiro e, tendo em conta os parâmetros obtidos para a mesma amostra a 150 K, pode ser interpretado como um proveniente de uma espécie monomérica de spin alto. No entanto, tal explicação não é aplicável ao espectro **B**. A interpretação mais plausível do espectro **B** é que estamos na presença de uma espécie férrica e diamagnética explicada pelo acoplamento antiferromagnético de dois ferros férricos de spin alto. Com base nesta interpretação propomos que após oxidação e incubação durante 40 minutos, a proteína GAGA-DBD/Fe(II) tenha dimerizado originando centros metálicos diférricos.

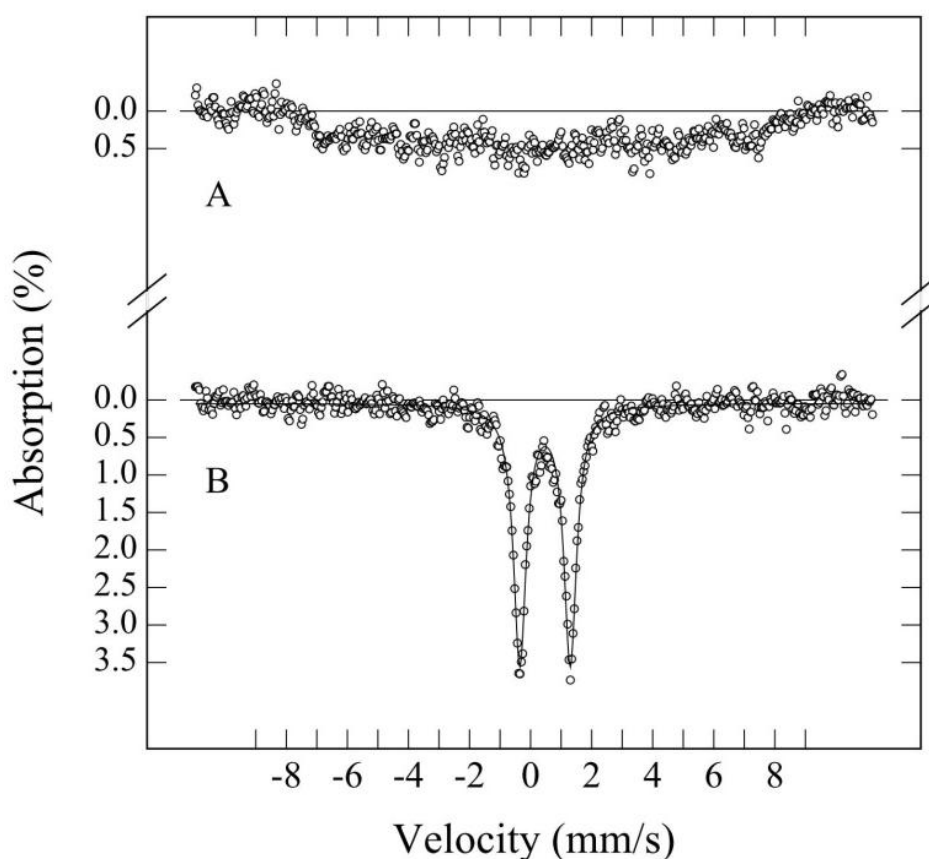


Figura 4.22 Espectros de Mössbauer com campo aplicado de 600 G a 5 K. **A)** Espectro do controlo; **B)** Espectro da proteína GAGA-DBD/Fe oxidada. A linha sólida é a simulação de um dobleto de quadrupolo com os parâmetros descritos no texto.

Tabela 4.2 Parâmetros de Mössbauer obtidos para a proteína GAGA-DBD na forma reduzida e oxidada. Parâmetros obtidos sem campo aplicado, a 150 K e 5 K.

Amostras	Parâmetros a 5 K		Parâmetros a 150 K	
	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)	ΔE_Q (mm/s)	δ (mm/s)
GAGA-DBD reduzida	3,48	1,34	3,34	1,29
GAGA-DBD oxidada	1,65	0,47	1,65	0,44

4.8 Ensaios de retardamento da mobilidade electroforética (*mobility shift assay*)

Antes de se efectuarem os ensaios de retardamento da mobilidade electroforética propriamente ditos, foi necessário hibridar os oligonucleótidos *forward* e *reverse*, por forma a obter-se DNA em cadeia dupla (dsDNA).

A reacção de hibridação está descrita na Secção 3.7, e na Figura 4.23 verifica-se a hibridação dos oligonucleótidos uma vez que a banda correspondente ao dsDNA apresenta uma menor mobilidade quando comparada com as formas em cadeia simples.



Figura 4.23 Verificação da formação de DNA em cadeia dupla usado nos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética. 1—dsDNA, 5 µl; M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper Ladder V*, *Bioline* – ver Anexo 7.3.3), 5 µl; 2—ssDNA *forward*, 5 µl; 3—ssDNA *reverse*, 5 µl.

Após a hibridação determinou-se a concentração do dsDNA pela absorvância a 260 nm, sabendo que a este comprimento de onda o DNA em dupla cadeia tem um $\epsilon_{260 \text{ nm}}$ de $50 (\text{ng}/\mu\text{l})^{-1} \text{cm}^{-1}$ (46). A concentração determinada foi de $405 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($33 \text{ pmol}/\mu\text{l}$).

De seguida realizaram-se ensaios de retardamento da mobilidade electroforética para se estabelecerem as condições (tempo de incubação e temperatura) da reacção de ligação da proteína ao dsDNA no tampão usado.

Desta forma deixou-se reagir a proteína com o dsDNA na razão molar de aproximadamente 10, durante 30 minutos e 1 hora a 37°C e à temperatura ambiente (21°C). Estas condições foram testadas para a proteína GAGA-DBD/Zn e para a proteína GAGA-DBD para inferir sobre o papel do metal na ligação do DNA.

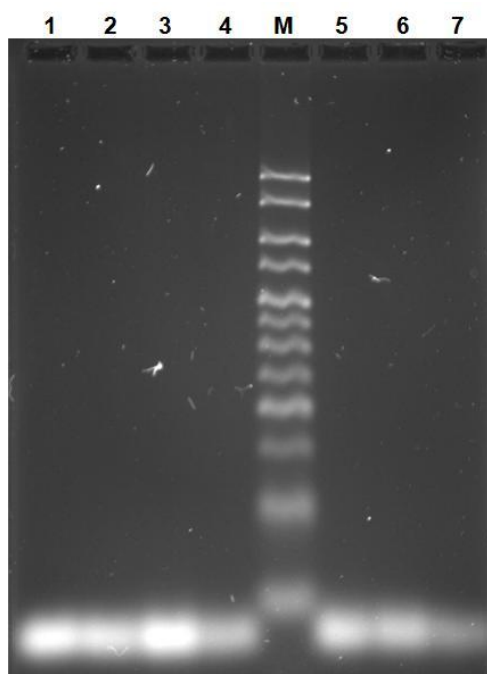


Figura 4.24 Condições testadas para os ensaios de retardamento da mobilidade electroforética. 1—GAGA-DBD/Zn com dsDNA a 37°C durante 30 min; 2—GAGA-DBD/Zn com dsDNA à temperatura ambiente durante 30 min; 3—GAGA-DBD/Zn com dsDNA à temperatura ambiente durante 1 h; 4—GAGA-DBD com dsDNA à temperatura ambiente durante 1 h; M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper Ladder V, Bioline*); 5—dsDNA; 6—GAGA-DBD/Zn com Zn(II) e dsDNA à temperatura ambiente durante 30 min; 7—GAGA-DBD/Zn com Zn(II) e dsDNA à temperatura ambiente durante 1 h. Aplicaram-se $7 \mu\text{l}$ de todas as amostras, à excepção do marcador em que se aplicaram $5 \mu\text{l}$.

A interacção da proteína GAGA-DBD com o DNA em dupla cadeia é verificada pela menor intensidade da banda correspondente ao DNA, quando comparada com o controlo negativo, isto é, com a banda do dsDNA na ausência de proteína.

Pela observação do gel da Figura 4.24 verifica-se que houve interação da proteína com o dsDNA, no ensaio em que a proteína e o dsDNA foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente, e no ensaio com as mesmas condições do anterior com a excepção de que se adicionou o ião Zn(II). Deste modo, foram realizados ensaios de retardamento da mobilidade electroforética à temperatura ambiente com tempo de incubação de 1 hora. Para estes ensaios usaram-se as proteínas GAGA-DBD/Zn, GAGA-DBD, o dsDNA, na presença dos iões Zn(II) e Fe(II), de acordo com o descrito na Secção 3.7.

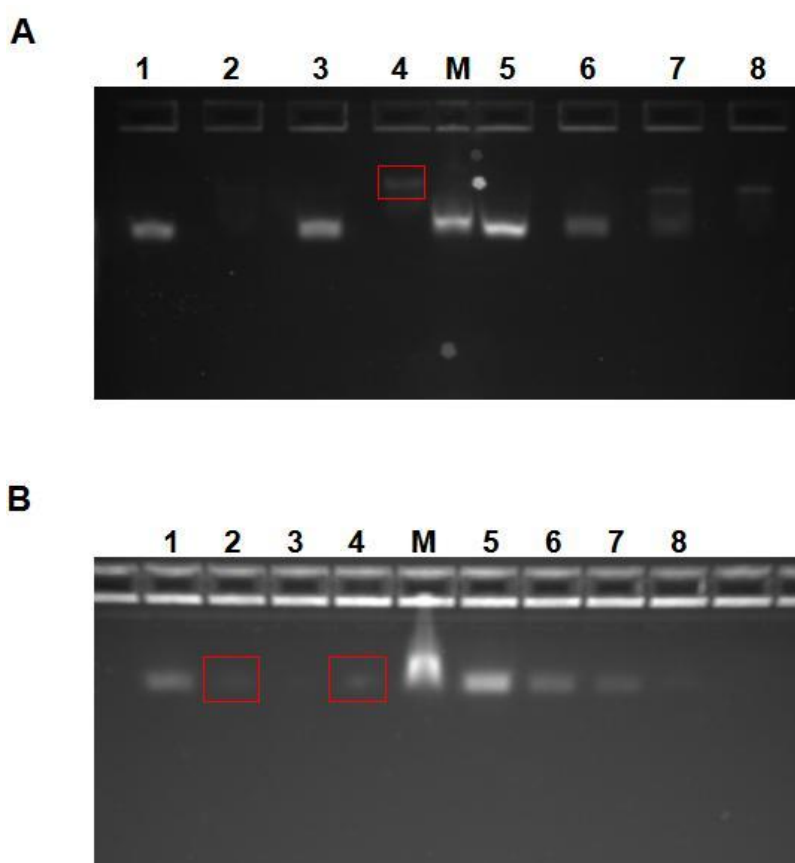


Figura 4.25 Ensaios de retardamento da mobilidade electroforética. **A)** Ensaios que incluem a adição do ião Zn(II). 1—dsDNA; 2—Razão GAGA-DBD/Zn:dsDNA \approx 1 e razão Zn(II):proteína \approx 300; 3—Razão GAGA-DBD/Zn:dsDNA \approx 2 e razão Zn(II):proteína \approx 185; 4—Razão GAGA-DBD/Zn:dsDNA \approx 10 e razão Zn(II):proteína \approx 185; M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper Ladder V, Bioline*); 5—dsDNA; 6—Razão GAGA-DBD:dsDNA \approx 1; 7—Razão GAGA-DBD:dsDNA \approx 2; 8—Razão GAGA-DBD:dsDNA \approx 10; **B)** Ensaios que incluem a adição do ião Fe(II). 1—dsDNA; 2—Razão GAGA-DBD/Fe:dsDNA \approx 1 e razão Fe(II):proteína \approx 375; 3—Razão GAGA-DBD/Fe:dsDNA \approx 2 e razão Fe(II):proteína \approx 220; 4—Razão GAGA-DBD/Fe:dsDNA \approx 10 e razão Fe(II):proteína \approx 220; M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper Ladder V, Bioline*); 5—dsDNA; 6—Razão GAGA-DBD:dsDNA \approx 1; 7—Razão GAGA-DBD:dsDNA \approx 2; 8—Razão GAGA-DBD:dsDNA \approx 10. Aplicaram-se 5 μ l de amostras. Caixas vermelhas destacam bandas cuja intensidade é muito ténue.

Na Figura 4.25 **A)** está representado o ensaio de retardamento da mobilidade electroforética para os ensaios que envolviam a proteína GAGA-DBD/Zn, à qual houve adição extra de ião Zn(II) (poços 2, 3 e 4) e comparação com a proteína GAGA-DBD (poços 6, 7 e 8).

Quanto à proteína GAGA-DBD/Zn verifica-se que ocorre maior interacção com o dsDNA (pela ausência/retardamento da banda) no ensaio cuja quantidade de proteína é idêntica à de dsDNA mas possui um grande excesso de zinco (excesso de cerca de 300 vezes). Relativamente aos ensaios em que se usou um excesso de zinco de ≈ 185 vezes, a interacção é maior para o ensaio que contém mais proteína, o que significa que quanto maior a razão proteína:DNA maior é a interacção. No entanto se houver um grande excesso de metal, a interacção será ainda maior, o que parece indicar que o Zn(II) favorece a formação do complexo proteína-DNA tendo, provavelmente, um papel estrutural.

Relativamente à proteína GAGA-DBD, conclui-se que quanto maior a quantidade de proteína em relação ao dsDNA, maior é a interacção, como enunciado anteriormente e está novamente demonstrado nos poços 7, 8 e 9 da Figura 4.25 **B**).

Nos ensaios em que se adicionou o ião Fe(II), Figura 4.25 **B**) (poços 2, 3 e 4) parecem revelar que a proteína tem uma maior afinidade para o Fe(II) do que para o Zn(II), devido ao total desaparecimento da banda de dsDNA. No entanto, esta observação poder-se-á dever, também, à degradação de DNA por reacções de Fenton devido ao elevado excesso de Fe(II) em condições aeróbias. Assim, dois processos poderão estar a competir neste ensaio. Por um lado a formação do complexo GAGA-DBD/Fe-DNA, que implica um retardamento da mobilidade no gel, e por outro a degradação química de DNA pelo sistema Fe(II)/O₂.

4.9 Exposição à radiação

Para efectuar a exposição da proteína à radiação UV, escolheram-se duas condições utilizadas nos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética: i) Razão GAGA-DBD/Zn:dsDNA ≈ 1 e excesso de Zn(II) de cerca de 300 vezes; ii) Razão GAGA-DBD:dsDNA ≈ 10 na presença de quantidades equimolares de Fe(II), neste caso optou-se por não se adicionar um excesso de ferro para reduzir a possibilidade de degradação química do DNA por reacções de Fenton. Em paralelo foram realizados os controlos necessários (dsDNA e as proteínas irradiadas isoladamente).

A exposição à radiação é efectuada como descrito na Secção 3.8, sendo depois verificada em gel de agarose, à excepção das proteínas controlo que são verificadas em gel NuPAGE 4-12% BisTris (Figura 4.26).

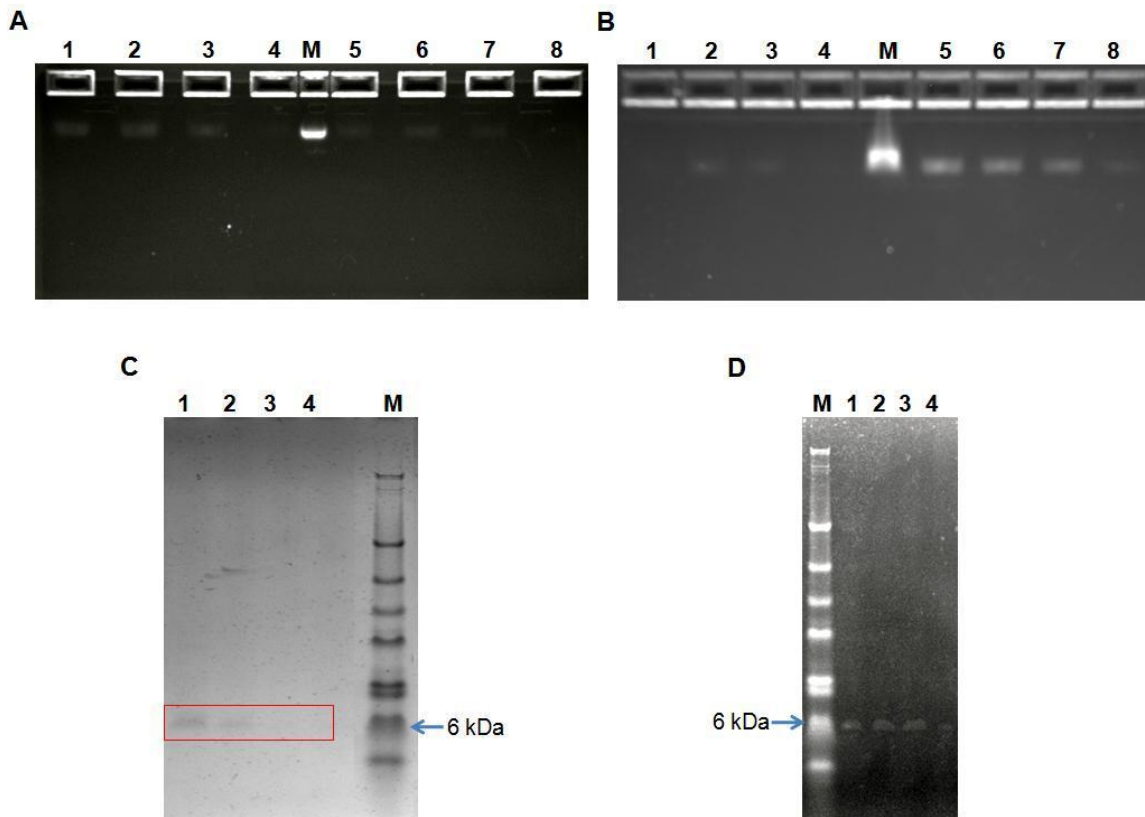


Figura 4.26 Efeito da radiação na ligação das proteínas GAGA-DBD ao DNA. **A)** Efeito da radiação na proteína GAGA-DBD/Zn com adição do íon Zn(II) e no controle dsDNA. 1—dsDNA, sem irradiação; 2—dsDNA, após 5 min de irradiação; 3—dsDNA, após 15 min de irradiação; 4—dsDNA, após 60 min de irradiação; M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper Ladder V, Bioline*); 5—GAGA-DBD/Zn com Zn(II), sem irradiação; 6—GAGA-DBD/Zn com Zn(II), após 5 min de irradiação; 7—GAGA-DBD/Zn com Zn(II), após 15 min de irradiação; 8—GAGA-DBD/Zn com Zn(II), após 60 min de irradiação; **B)** Efeito da radiação na proteína GAGA-DBD com adição do íon Fe(II) e no controle dsDNA. 1— GAGA-DBD com Fe(II), sem irradiação; 2—GAGA-DBD com Fe(II), após 5 min de irradiação; 3—GAGA-DBD com Fe(II), após 15 min de irradiação; 4— GAGA-DBD com Fe(II), após 60 min de irradiação; M—Marcador de pesos moleculares (*Hyper Ladder V, Bioline*); 5—dsDNA, sem irradiação; 6—dsDNA, após 5 min de irradiação; 7—dsDNA, após 15 min de irradiação; 8—dsDNA, após 60 min de irradiação; **C)** Efeito da radiação na proteína controle GAGA-DBD/Zn. 1—GAGA-DBD/Zn, sem irradiação; 2—GAGA-DBD/Zn, após 5 min de irradiação; 3—GAGA-DBD/Zn, após 15 min de irradiação; 4—GAGA-DBD/Zn, após 60 min de irradiação; M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue, Invitrogen*); **D)** Efeito da radiação na proteína controle GAGA-DBD. M—Marcador de massas moleculares (pré-corado *SeeBlue, Invitrogen*); 1—GAGA-DBD/Fe, sem irradiação; 2—GAGA-DBD/Fe, após 5 min de irradiação; 3—GAGA-DBD/Fe, após 15 min de irradiação; 4—GAGA-DBD/Fe, após 60 min de irradiação. Aplicaram-se 5 µl de amostras.

Pela Figura 4.26 **A)** verifica-se que a proteína GAGA-DBD/Zn perde a capacidade de interagir com o dsDNA provavelmente devido à sua própria degradação após 5 minutos de irradiação (Figura 4.26 **C)**). Uma vez não complexado à proteína o DNA sofre degradação pela radiação ionizante de modo idêntico ao controle. Na ausência de proteína, exposição do DNA à radiação UV tem como consequência a sua degradação, visível pela diminuição da intensidade da banda, com o aumento do tempo de exposição.

No caso do ensaio da proteína GAGA-DBD na presença de Fe(II) (Figura 4.26 **B)**), verifica-se a interação da proteína com o DNA, sendo a proteína degradada apenas após 60 minutos de irradiação (Figura 4.26 **D)**). No entanto ao final de 5 minutos de irradiação

verifica-se uma dissociação da proteína ao DNA e este a ser degradado em simultâneo, tal como no controlo do DNA (poços 5 a 8 na Figura 4.26 **B**).

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Com o objectivo de estudar o efeito da radiação ionizante no *zinc finger* clássico/C₂H₂, assim como a influência desse efeito na interacção da proteína ao DNA foi necessário criar um sistema de produção da proteína GAGA-DBD (codificada por um gene com 162 pb). A proteína GAGA-DBD apresenta uma massa molecular de 6186,1 g/mol e um pI de 11,29 (45).

Optou-se por se estudar a proteína eucarionte sobre-expressa heterologicamente em *E. coli*. Para a construção do vector de sobre-expressão pET21c-GAGA-DBD, o gene que codifica para a proteína em estudo foi primeiramente isolado do vector de clonagem pMA-GAGA-DBD e inserido no vector de expressão pET-21c usando técnicas de Biologia Molecular standard.

Assim, a produção da proteína GAGA-DBD foi realizada em células *E. coli* BL21(DE3), sendo efectuados os testes de sobre-expressão da proteína para determinar quais as melhores condições de produção da proteína de uma forma homogénea solúvel. Para tal foi estudado o efeito do tipo de meio de cultura (meio LB e 2x YT), a concentração de indutor (0, 0,1, 0,5 e 1 mM de IPTG) e a densidade óptica da cultura aquando da indução com IPTG (0,5 e 1,5). Pelos resultados dos géis obtidos verificou-se uma maior expressão do gene em meio de cultura LB, quando a concentração de indutor é de 1 mM e a densidade óptica aquando da indução é aproximadamente 1,5 (isto é, a indução ocorre a alta densidade óptica). Deste modo, a proteína GAGA-DBD foi produzida em 1 l de meio de cultura LB, Ampicilina (100 µg/ml), induzida com 1 mM de IPTG quando a densidade óptica a 600 nm era de 1,5. 3 h após a indução as células foram recolhidas, obtendo-se um rendimento celular de 6,45 g/L. De seguida prosseguiu-se com o isolamento e purificação da proteína.

Obteve-se a proteína na forma solúvel, no sobrenadante resultante da ultracentrifugação. O extracto bruto foi depois dialisado contra tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM EDTA, 5 mM DTT. A este pH a proteína encontra-se carregada positivamente podendo-se usar esta característica para a sua purificação por cromatografia de permuta iónica, utilizando uma coluna cromatográfica catiónica Resource S (6 ml da *GE Healthcare*).

No processo cromatográfico, a eluição foi efectuada por gradiente linear contínuo de 0 a 100% de tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 M NaCl, durante 30 min. As fracções recolhidas foram posteriormente verificadas por electroforese em gel *NuPAGE 4-12% BisTris*. Duas bandas cromatográficas, uma eluída entre 37% e 43% e outra eluída entre 53% e 58% de tampão continham predominantemente proteína com massa molecular aparente idêntica à da proteína em estudo. O espectro de UV/Visível das duas fracções era muito idêntico, o que nos levou a concluir que se tratava da proteína GAGA-DBD com os resíduos de cisteínas em diferentes estados de oxidação. Optou-se por se usar a segunda fracção por ser mais concentrada.

Como as proteínas foram eluídas pelo aumento da concentração de sal, foi necessário retirar o sal das fracções de proteínas, assim como concentrar as fracções pretendidas de modo a quantificar a proteína (e determinar o coeficiente de extinção molar a 280 nm). As fracções foram dialisadas e concentradas num *Vivaspin* de 20 ml em tampão 20 mM Fosfato de potássio pH=7,6, 5 mM DTT, 5 mM EDTA.

A quantificação da proteína foi realizada pelo método colorimétrico BCA, uma vez que este método monitoriza o ião cobre (Cu^{1+}), produzido pela reacção da proteína com o cobre (Cu^{2+}) alcalino, através da cor violeta produzida que é estável e aumenta proporcionalmente com a concentração de proteína (podendo depender da composição em tirosina e triptofano). Este método possui uma linearidade de 20 a 100 μg de proteína, no entanto o DTT e o EDTA podem ser interferentes neste método (34).

A proteína GAGA-DBD é uma proteína com a sequência de aminoácidos pequena (54 aminoácidos) e possui apenas um resíduo de tirosina. Para estudar o efeito da composição em aminoácidos e do tampão em que a proteína é estável, na quantificação pelo método do BCA, prepararam-se rectas de calibração usando três proteínas padrão (BSA, com 105 aminoácidos, Rd, com 52 aminoácidos e Dx com 36 aminoácidos). Em paralelo diluiu-se a proteína Rd, uma proteína com um tamanho aproximado ao da GAGA-DBD que contém três resíduos de tirosina e um triptofano, no mesmo tampão. Tal como esperado, o método mostrou ser dependente da composição em aminoácidos e interferência do tampão. Tendo em conta a semelhança a nível da estrutura primária entre a Rd e GAGA-DBD, a concentração desta foi estimada pela recta de calibração com a Rd diluída em tampão.

Através da concentração de proteína obtida determinou-se o coeficiente de extinção molar a 280 nm, sendo este de $1060 \pm 300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A proteína GAGA-DBD foi maioritariamente produzida na forma apo, visto que o seu centro ainda não foi reconstituído, e portanto não apresenta o enrolamento específico da família *zinc finger* clássico/ C_2H_2 .

A reconstituição da proteína foi efectuada em tampão 10 mM Tris-HCl pH=8,0, 50 mM NaCl em ambiente anaeróbio, para manter os resíduos de cisteína reduzidos de modo a estarem disponíveis para a ligação ao metal e impedir a formação de pontes dissulfureto.

A proteína GAGA-DBD utilizada como controlo não mostra alterações no seu espectro de UV/Visível durante todo o processo de reconstituição, excepto após a oxidação ao ar, em que se verifica oxidação dos resíduos de cisteínas.

Das reconstituições realizadas, a reconstituição com Fe(II) (proteína GAGA-DBD/Fe) é a que revela maior alteração no espectro de UV/Visível da proteína após a primeira adição do metal, podendo ser uma indicação da incorporação do metal, mas restantes adições de metal não implicaram mais modificações do espectro. Após a oxidação ao ar verifica-se uma

alteração no espectro da proteína, podendo-se observar absorção na região de 340 nm, sendo indicativo de transferências electrónicas d-d (47).

As reconstituições com os metais Zn(II) e Co(II) (proteínas GAGA-DBD/Zn e GAGA-DBD/Co, respectivamente) também demonstram alteração no espectro da proteína após a primeira adição de metal. No entanto, a alteração é menor quando comparada com o espectro da proteína GAGA-DBD/Fe. Em ambas as reconstituições após a oxidação ao ar não se verifica alteração no espectro da proteína.

Relativamente à proteína GAGA-DBD/Zn, a pequena alteração observada é indício de incorporação de zinco, mas como o zinco não absorve nesta gama de comprimento de onda não se verifica nenhuma absorção característica deste metal.

Quanto à reconstituição com cobalto, era esperado o aparecimento de uma banda entre 520 e 720 nm, correspondentes às transições electrónicas d-d tendo um máximo próximo dos 635 nm, assim como o aparecimento de um máximo de absorção na região entre 310 nm e 340 nm (48, 49). O facto de não se observar qualquer uma destas características, leva-nos que a proteína não deve ter incorporado o metal.

As proteínas reconstituídas e a utilizada como controlo foram enviadas para o Laboratório de Análises *Atomic Emission Spectroscopy Service*, de modo a quantificar os iões metálicos nas amostras. Os resultados não foram conclusivos, uma vez que o erro associado às quantificações foi muito elevado. Deste modo, quantificou-se as proteínas GAGA-DBD/Zn e GAGA-DBD pelo método do BCA em microplacas com o intuito de utilizá-las nos ensaios de retardamento da mobilidade electroforética nas reacções de ligação ao DNA.

O centro metálico da proteína reconstituída com o ião ferro foi caracterizado por espectroscopia de Mössbauer. Para tal reconstituiu-se 1,47 mM de proteína com 1,52 mM de ^{57}Fe , com incubação de 30 minutos, preparando-se em paralelo o controlo de ferro no tampão de trabalho. Estudou-se a proteína GAGA-DBD/Fe no estado reduzido (tal como preparada) e oxidada em condições aeróbias em diferentes condições de aquisição por forma a poder caracterizar melhor o centro metálico.

Pelos espectros obtidos para a proteína reduzida, verifica-se que o ferro adicionado está todo no estado ferroso e que 73% do ferro foi incorporado no centro metálico da proteína. Tendo em conta a quantidade de ferro que incorporou estimou-se que o Kd da proteína é de $1,33 \times 10^{-4}$ M. Além disso, o sistema possui características paramagnéticas, apresentando o ΔE_Q de 3,48 mm/s e δ de 1,34 mm/s, típicos de ferro ferroso predominantemente coordenado por azotos e/ou oxigénios (50).

Aquando a oxidação da proteína verificou-se o aparecimento de uma cor rosa, e pelos espectros obtidos pela espectroscopia de Mössbauer verifica-se que todo o ferro foi oxidado. Os espectros são característicos de espécies diamagnéticas, explicadas como o resultado da

dimerização de monómeros via o centro metálico. A presença de uma fracção menor de monómeros não é de excluir. A baixa temperatura e sem campo aplicado o espectro apresenta um ΔE_Q igual a 1,65 mm/s e δ de 0,47 mm/s, característico de ferro férrico coordenado por azotos e/ou oxigénios (50).

No entanto, não se pode retirar a hipótese de o ferro possuir na sua coordenação cisteínas, uma vez que o desvio isomérico da forma oxidada está entre o desvio isomérico da Rd (0,24 mm/s) (51), em que a esfera de coordenação é constituída por quatro cisteínas, e o desvio isomérico da Dfx (0,55 mm/s) (52), cujo centro de coordenação possui apenas uma cisteína.

Para se obter uma melhor caracterização do centro metálico seria necessário adquirir mais espectros de amostras preparadas com diferentes tempos de oxidação, assim como com diferentes razões Fe:GAGA-DBD, de modo a ter uma boa estimativa do Kd.

Os ensaios de retardamento da mobilidade electroforética foram efectuados na presença de zinco e ferro, visto não se ter obtido proteína totalmente reconstituída, e nestes variou-se a razão proteína/dsDNA e metal/proteína.

Primeiramente efectuaram-se ensaios com proteína GAGA-DBD não reconstituída, demonstrando-se que quanto maior for a razão proteína:dsDNA maior é a interacção com o DNA.

Relativamente aos ensaios da proteína GAGA-DBD/Zn na presença de diferentes quantidades de metal, na tentativa de maximizar a incorporação de metal e assim poder inferir o seu papel na ligação ao DNA. Nestes ensaios o resultado foi idêntico ao anterior, isto é, quanto maior a quantidade de proteína maior é a interacção. No entanto, a interacção é maior na presença de excesso de metal. Nestas condições a proteína estaria predominantemente reconstituída, com os sítios de ligação ao metal ocupados, adoptando uma estrutura tridimensional favorável à ligação ao DNA, tal como descrito na literatura para esta família de proteínas.

Por último testou-se a proteína GAGA-DBD com adição do metal ferro. À semelhança do ensaio anterior testou-se o efeito da concentração de proteína e de metal. Estes ensaios parecem revelar que a proteína tem maior afinidade para o Fe(II), devido ao total desaparecimento da banda de dsDNA, no entanto, esta observação poder-se-á dever-se, também, à degradação de DNA por reacções de Fenton devido ao elevado excesso molar de Fe(II) em condições aeróbias. Deste modo, a formação do complexo GAGA-DBD/Fe-DNA pode estar a competir com a degradação de DNA.

A exposição à radiação foi efectuada por dois ensaios, ensaio com a proteína GAGA-DBD/Zn (sendo a razão proteína:dsDNA de ≈ 1 e Zn:proteína de ≈ 300) e com a proteína GAGA-DBD/Fe (sendo a razão proteína:dsDNA de ≈ 10 e Fe:proteína de ≈ 1), ambos

os ensaios foram expostos à radiação durante 5, 15 e 60 minutos, tendo como controlos o dsDNA e a proteína.

No primeiro ensaio, com a proteína GAGA-DBD/Zn, verifica-se que a proteína começa a ser degradada após 5 minutos de exposição à radiação, o que significa que perde a capacidade de interagir com o dsDNA, desse modo não consegue protegê-lo e este acaba por ser degradado de modo idêntico ao controlo.

No segundo ensaio, com a proteína GAGA-DBD/Fe, verifica-se o início da degradação da proteína após 60 minutos de exposição à radiação, o que pode ser explicado pelo centro metálico possuir ferro e poder formar espécies binucleares, que podem impor um enrolamento diferente à proteína e protegê-la da irradiação, como sugerem os resultados obtidos por espectroscopia de Mössbauer. No entanto ao final de 5 minutos de irradiação verifica-se uma dissociação da proteína ao DNA, promovendo a degradação deste ao longo do tempo, podendo o fenómeno ser explicado pela degradação do DNA por reacções de Fenton.

6 BIBLIOGRAFIA

1. C. O. Pabo, R. T. Sauer, Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition, *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 1053-1095 (1992).
2. I. L. Alberts, K. Nadassy, S. J. Wodak, Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures, *Protein science* **7**, 1700-1716 (1998).
3. B. L. Vallee, D. S. Auld, Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteins, *Biochemistry* **29**, 5647-5659 (1990).
4. R. Wu, Z. Lu, Z. Cao, Y. Zhang, A Transferable Nonbonded Pairwise Force Field to Model Zinc Interactions in Metalloproteins, *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 433-443 (2011).
5. B. L. Vallee, J. E. Coleman, D. S. Auld, Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 999-1003 (1991).
6. J. M. Matthews, M. Sunde, Zinc Fingers-Folds for Many Occasions, *IUBMB Life* **54**, 351-355 (2002).
7. J. S. Hanas, D. J. Hazuda, D. F. Bogenhagen, F. Y. H. Wu, C.-W. Wu, Xenopus Transcription Factor A Requires Zinc for Binding to the 5 S RNA Gene, *The Journal of Biological Chemistry* **258**, 14120-14125 (1983).
8. S. S. Krishna, I. Majumdar, N. V. Grishin, Structural classification of zinc fingers: Survey and Summary, *Nucleic Acids Research* **31**, 532-550 (2003).
9. J. M. Berg, Zinc Finger Domains: Hypotheses and Current Knowledge, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**, 405-421 (1990).
10. R. Gamsjaeger, C. K. Liew, F. E. Loughlin, M. Crossley, J. P. Mackay, Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs, *TRENDS in Biochemical Sciences* **32**, 63-70 (2006).
11. A. Klug, J. W. R. Schwabe, Zinc fingers, *FASEB J.* **9**, 597-604 (1995).
12. J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity, *Current Opinion in Structural biology* **11**, 39-46 (2001).
13. N. V. Grishin, Treble clef finger-a functionally diverse zinc-binding structural motif, *Nucleic Acids Research* **29**, 1703-1714 (2001).
14. M. Elrod-Erickson, M. A. Rould, L. Nekludova, C. O. Pabo, Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions, *Structure* **4**, 1171-1180 (1996).
15. J. H. Laity, H. J. Dyson, P. E. Wright, DNA-induced alpha-Helix Capping in Conserved Linker Sequences is a Determinant of Binding Affinity in Cys(2)-His(2) Zinc Fingers, *J. Mol. Biol.* **295**, 719-727 (2000).
16. K. J. Brayer, D. J. Segal, Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains, *Cell Biochem Biophys* **50**, 111-131 (2008).
17. Y. Choo, A. Klug, Physical basis of a protein-DNA recognition code, *Current Opinion in Structural Biology* **7**, 117 - 125 (1997).

18. S. Iuchi, Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins, *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 625- 635 (2001).
19. S. A. Wolfe, L. Nekludova, C. O. Pabo, DNA Recognition by Cys 2 His 2 Zinc Finger Proteins, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **3**, 183–212 (1999).
20. O. D. Schärer, J. Jiricny, Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases, *BioEssays* **23**, 270-281 (2001).
21. G. W. Buchko, N. J. Hess, V. Bandaru, S. S. Wallace, M. A. Kennedy, Spectroscopic Studies of Zinc(II)- and Cobalt(II)-Associated Escherichia coli Formamidopyrimidine–DNA Glycosylase: Extended X-ray Absorption Fine Structure Evidence for a Metal-Binding Domain, *Biochemistry* **39**, 12441-12449 (2000).
22. A. Witkiewicz-Kucharczyk, W. Bal, Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis, *Toxicology Letters* **162**, 29-42 (2006).
23. W. Bal, T. Schwerdtle, A. Hartwig, Mechanism of Nickel Assault on the Zinc Finger of DNA Repair Protein XPA, *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 242-248 (2003).
24. H. Wu, W.-P. Yang, C. F. Barbas III, Building zinc fingers by selection: Toward a therapeutic application, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 344-348 (1995).
25. Y. Choo, M. Isalan, Advances in zinc finger engineering, *Current Opinion in Structural Biology* **10**, 411-416 (2000).
26. Y. Shiraishi, M. Imanishi, T. Morisaki, Y. Sugiura, Swapping of the beta-hairpin Region between Sp1 and GLI Zinc Fingers: Significant Role of the beta-hairpin Region in DNA Binding Properties of C₂H₂-type Zinc Finger Peptides, *Biochemistry* **44**, 2523-2528 (2005).
27. E. J. Rebar, C. O. Pabo, Zinc Finger Phage: Affinity Selection of Fingers with New DNA-Binding Specificities, *Science* **263**, 671-673 (1994).
28. H. A. Greisman, C. O. Pabo, A General Strategy for Selecting High-Affinity Zinc Finger Proteins for Diverse DNA Target Sites, *Science* **275**, 657-661 (1997).
29. J. G. Omichinski, P. V. Pedone, G. Felsenfeld, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, The solution structure of a specific GAGA factor-DNA complex reveals a modular binding mode, *Nature Structural Biology* **4**, 122-132 (1997).
30. P. V. Pedone et al., The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2822-2826 (1996).
31. R. Chenna et al., Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs, *Nucleic Acids Research* **31**, 3497-3500 (2003).
32. M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, M. Suzuki, Y. Sugiura, Effects of Bulkiness and Hydrophobicity of an Aliphatic Amino Acid in the Recognition Helix of the GAGA Zinc Finger on the Stability of the Hydrophobic Core and DNA Binding Affinity, *Biochemistry* **47**, 11717-11724 (2008).
33. M. Dhanasekaran, S. Negi, M. Imanishi, Y. Sugiura, DNA-Binding Ability of GAGA Zinc Finger Depends on the Nature of Amino Acids Present in the beta-Hairpin, *Biochemistry* **46**, 7506-7513 (2007).
34. P. Smith et al., Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* **150**, 76-85 (1985).

35. G. Healthcare, *HiTrap Desalting columns* G. Healthcare, Ed. (columns, Freiburg, Germany, 2007).
36. Determination of Iron with 1,10-Phenanthroline (available at <http://www.chem.utk.edu/~chem319/Experiments/exp10.pdf>).
37. K. M. Maloney, E. M. Quiazon, R. Indralingam, Measurement of Iron in Egg Yolk: An Instrumental Analysis Experiment Using Biochemical Principles, *Journal of Chemical Education* **85**, 399-400 (2008).
38. Protocol for Annealing Oligonucleotides (available at http://www.protocol-online.org/cgi-bin/prot/view_cache.cgi?ID=1282).
39. Invitrogen, *E-Gel® CloneWell Agarose Gels* Invitrogen, Ed. (Electrophoresis, Carlsbad, CA, 2007).
40. U. K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685 (1970).
41. Invitrogen, *XCell SureLock™ Mini-Cell* Invitrogen, Ed. (Electrophoresis, Carlsbad, CA, 2010).
42. NZYTech, *T4 DNA ligase* NZYTech, Ed. (Genes e enzymes, Lisboa, 2011).
43. NZYTech, *NZY5α Competent Cells* NZYTech, Ed. (Genes e enzymes, Lisboa, 2011).
44. NZYTech, *BL21(DE3) Competent Cells* NZYTech, Ed. (Genes e enzymes, Lisboa, 2011).
45. E. Gasteiger et al., in *The Proteomics Protocols Handbook*, (Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005), vol. 112, pp. 571-607.
46. J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual Vol. 3* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Third edit., 2001), pp. 2015-2016.
47. R. C. DiTargiani, S. J. Lee, S. Wassink, S. L. J. Michel, Functional characterization of iron-substituted tristetraprolin-2D (TTP-2D, NUP475-2D): RNA binding affinity and selectivity, *Biochemistry* **45**, 13641-13649 (2006).
48. A. D. Frankel, J. M. Berg, C. O. Pabo, Metal-dependent folding of a single zinc finger from transcription factor IIIA, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **84**, 4841-4845 (1987).
49. S. F. Michael, V. J. Kilfoil, M. H. Schmidt, B. T. Amann, J. M. Berg, Metal binding and folding properties of a minimalist Cys2His2 zinc finger peptide, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 4796-4800 (1992).
50. L. Q. Jr., *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry Spectroscopy and Magnetism* (University Science Books, Sausalito, CA, 2000), p. 291.
51. S. J. Yoo et al., Mössbauer, EPR, and MCD studies of the C9S and C42S variants of Clostridium pasteurianum rubredoxin and MDC studies of the wild-type protein, *JBIC* **5**, 475-487 (2000).
52. F. dos S. Folgosa, thesis, Universidade Nova de Lisboa (2008).
53. T. Vincze, J. Posfai, R. J. Roberts, NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes, *Nucleic Acids Research* **31**, 3688-3691 (2003).

54. Novagen, *pET-21a-d (+) Vectors* Novagen, Ed. (Enzymes, 2011).
55. Omega, *E.Z.N.A.®Plasmid Midi and Maxi Kit* Omega, Ed. (Plasmid, 2009).
56. Omega, *E.Z.N.A.®Plasmid Mini Kit I* Omega, Ed. (Plasmid, 2009).

7 Anexos

7.1 Mapa de restrição do gene *GAGA-DBD*

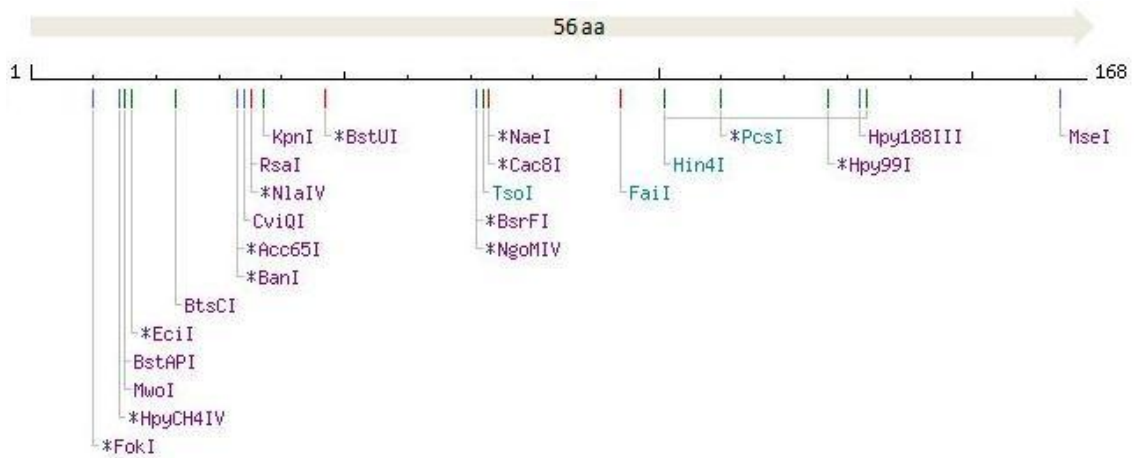


Figura 7.1 Mapa do gene *GAGA-DBD* com enzimas de restrição utilizando o software *NEBcutter V2.0* (53).

7.2 Mapa do vector de sobre-expressão pET-21c, *Novagen*

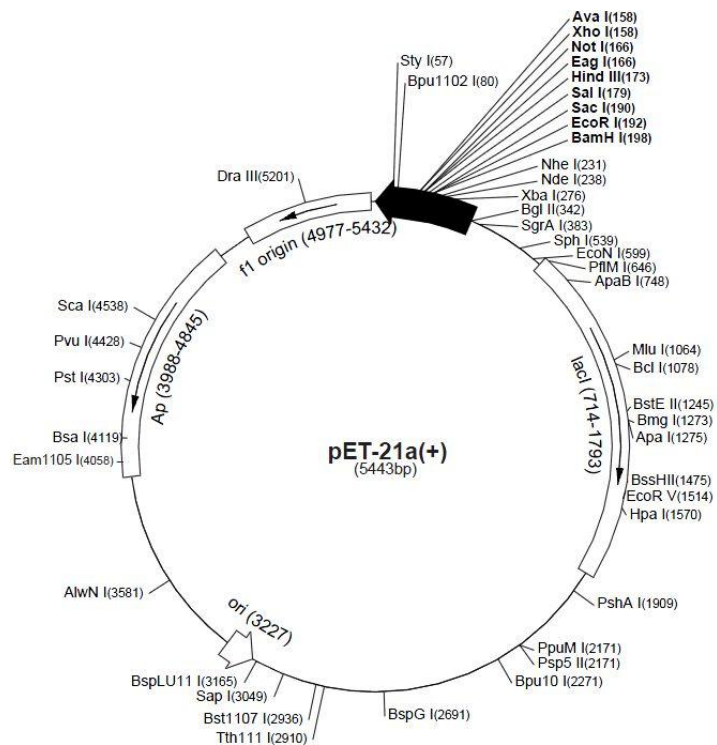


Figura 7.2 Vector de sobre-expressão pET-21a-d (+), *Novagen* (54).

7.3 Marcadores de pesos moleculares

7.3.1 Marcador de pesos moleculares *NZYDNA Ladder III* da *NZYTech*:

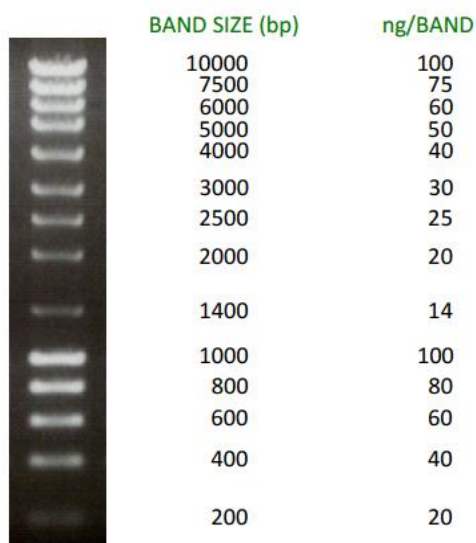


Figura 7.3 Marcador de pesos moleculares *NZYDNA Ladder III*. 5 μ l de *NZYDNA Ladder III* aplicados no gel 1% de agarose em tampão TAE 1x.

7.3.2 Marcador de pesos moleculares *Hyper Ladder II* da *Bioline*:

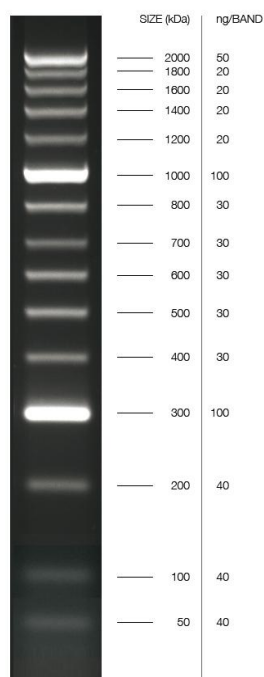


Figura 7.4 Marcador de pesos moleculares *Hyper Ladder II*. 5 μ l de *Hyper Ladder II* aplicados no gel 1,5% de agarose.

7.3.3 Marcador de pesos moleculares *Hyper Ladder V* da *Bioline*:

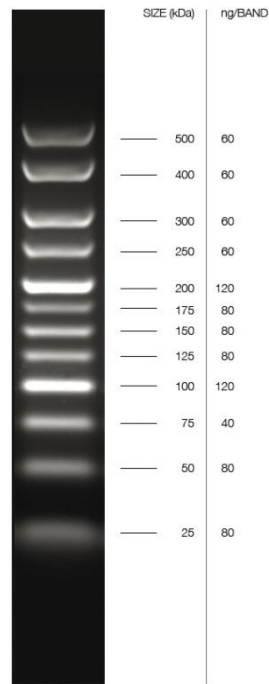


Figura 7.5 Marcador de pesos moleculares *Hyper Ladder V*. 5 μ l de *Hyper Ladder V* aplicados no gel 3,5% de agarose.

7.3.4 Marcador de massas moleculares *Low Molecular Weight* da *NZYTech*:

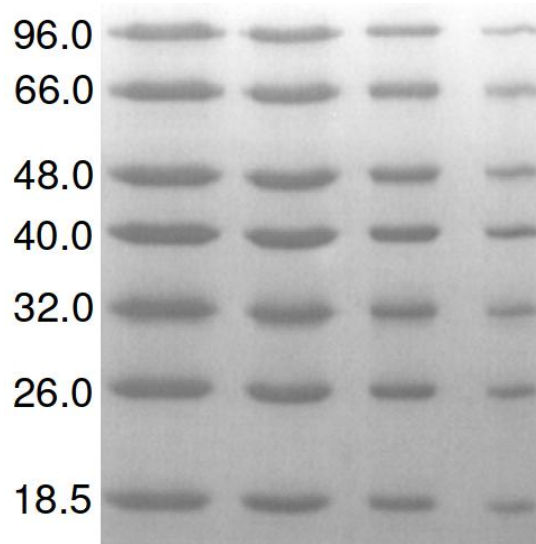


Figura 7.6 Marcador de massas moleculares *Low Molecular Weight* (LMW). 15, 10, 5 e 2,5 μ l de LMW aplicados no gel 14% em SDS-PAGE. Massas moleculares em kDa.

7.3.5 Marcador de massas moleculares pré-corado *SeeBlue* da *Invitrogen*:

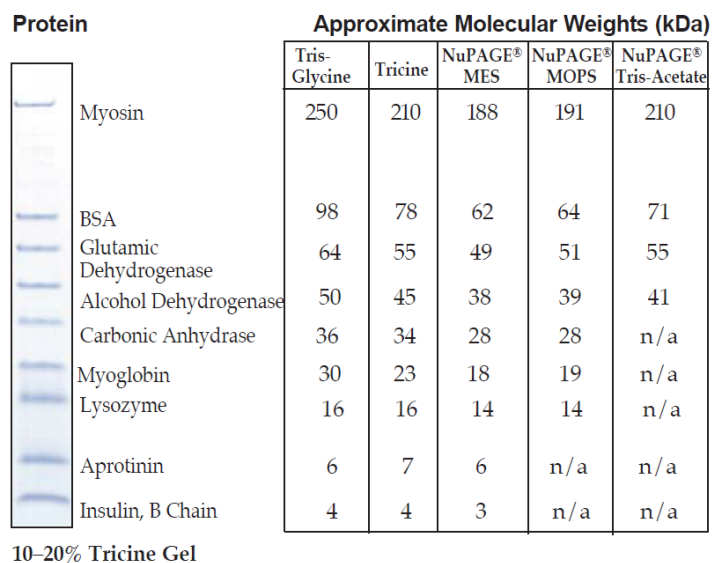


Figura 7.7 Marcador de massas moleculares pré-corado *SeeBlue*. Gel 10-20% de tricina. As bandas de proteína têm mobilidades diferentes nos vários sistemas tampão de SDS-PAGE.

7.4 Design dos oligonucleótidos *forward* e *reverse*


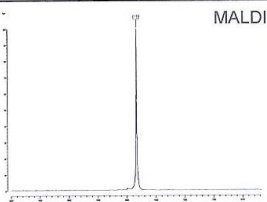
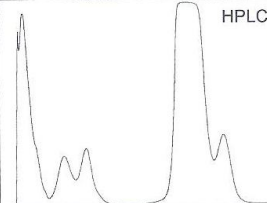

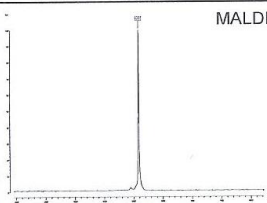
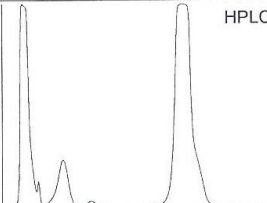
GAGA_fwd 00125756_1 DNA		 882149			
5'-aaa ccc gag aga gta cga ac-3'					
Scale Yield	S 8,4 OD 34,5 nmol 212,5 µg	Length 20 Tm 48 °C GC Content 50,00% A: 9,0 C: 5,0 G: 5,0 T: 1,0 Ext.Coeff.: 243800 MW Calc. 6154 g/mol MW Found 6159 g/mol	Purific. HPLC Getrocknet 5'-Mod.: - 3'-Mod: - Internal Mod.: -		
Vol.f.100pmol/µl 345 µl Conc. - pmol/µl Dissolved in - µl					
GAGA_rev 00125756_2 DNA		 882150			
5'-glt cgt act ctc tcg ggt tt-3'					
Scale Yield	S 4,0 OD 20,8 nmol 126,5 µg	Length 20 Tm 48 °C GC Content 50,00% A: 1,0 C: 5,0 G: 5,0 T: 9,0 Ext.Coeff.: 194200 MW Calc. 6082 g/mol MW Found 6085 g/mol	Purific. HPLC Getrocknet 5'-Mod.: - 3'-Mod: - Internal Mod.: -		
Vol.f.100pmol/µl 208 µl Conc. - pmol/µl Dissolved in - µl					

Figura 7.8 Oligonucleótidos *forward* e *reverse* fornecidos pela SATBVida.

7.5 Sequenciação e tradução do DNA

7.5.1 Alinhamento das sequências obtidas do vector pET-21c–GAGA-DBD com a sequência do gene *GAGA-DBD*

Alinhamento efectuado pelo *software ClustalW* (31).

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5       15      25      35      45
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  ATAAATTTGT TTAACCTTAA GAAGGAGATA TACATATGCC GAAAGCAAAA
pET21c_GAGA-DBD_8  ---ATTTTGT TTAACCTTAA GAAGGAGATA TACATATGCC GAAAGCAAAA

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      55      65      75      85      95
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  CGTGCAAAAC ATCCGCCGGG TACCGAAAAA CCGCGTAGCC GTAGCCAGAG
pET21c_GAGA-DBD_8  CGTGCAAAAC ATCCGCCGGG TACAGAAAAA CCGCGTAGCC GTAGCCAGAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      105     115     125     135     145
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  CGAACAGCCG GCAACCTGTC CGATTGTTA TGCAGTTATT CGTCAGAGCC
pET21c_GAGA-DBD_8  CGAACAGCCT GCAACCTGTC CGATTGTTA TGCAGTTATT CGTCAGAGCC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      155     165     175     185     195
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  GTAATCTGCG TCGTCATCTG GAACTGCGTC ATTTTGCAA ACCGGGTGTT
pET21c_GAGA-DBD_8  GTAATCTGCG TCGTCATCTG GAACTGCGTC ATTTTGCAA ACCGGGTGTT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      205     215     225     235     245
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  TAAGAATTCG AGCTCCGTCG ACAAGCTTGC GGCCGCACTC GAGCACCACC
pET21c_GAGA-DBD_8  TAAGAATTCG AGCTCCGTCG ACAAGCTTGC GGCCGCACTC GAGCACCACC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      255     265     275     285     295
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  ACCACCACCA CTGAGATCCG GCTGCTAACA AAGCCCGAAA GGAAGCTGAG
pET21c_GAGA-DBD_8  ACCACCACCA CTGAGATCCG GCTGCTAACA AAGCCCGAAA GGAAGCTGAG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305     315     325     335     345
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  TTGGCTGCTG CCACCGCTGA GCAATAACTA GCATAACCCC TTGGGGCCTC
pET21c_GAGA-DBD_8  TTGGCTGCTG CCACCGCTGA GCAATAACTA GCATAACCCC TTGGGGCCTC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      355     365     375     385     395
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  TAAACGGGTC TTGAGGGGTT TTTTGCTGAA AGGAGGAACT ATATCCGGAT
pET21c_GAGA-DBD_8  TAAACGGGTC TTGAGGGGTT TTTTGCTGAA AGGAGGAACT ATATCCGGAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      405     415     425     435     445
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG
pET21c_GAGA-DBD_8  TGGCGAATGG GACGCGCCCT GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      455     465     475     485     495
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT
pET21c_GAGA-DBD_8  TGGTTACGCG CAGCGTGACC GCTACACTTG CCAGCGCCCT AGCGCCCGCT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      505     515     525     535     545
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2  CCTTTCGCCT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCCG
pET21c_GAGA-DBD_8  CCTTTCGCCT TCTTCCCTTC CTTTCTCGCC ACGTTCGCCG GCTTTCCTCCG

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      555      565      575      585      595
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC
pET21c_GAGA-DBD_8 TCAAGCTCTA AATCGGGGGC TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      605      615      625      635      645
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG
pET21c_GAGA-DBD_8 GGCACCTCGA CCCCAAAAAA CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      655      665      675      685      695
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT
pET21c_GAGA-DBD_8 CCATCGCCCT GATAGACGGT TTTTCGCCCT TTGACGTTGG AGTCCACGTT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      705      715      725      735      745
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATCTT
pET21c_GAGA-DBD_8 CTTTAATAGT GGACTCTTGT TCCAAACTGG AACAACTC AACCCATCTT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      755      765      775      785      795
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 CGGCTATTTC TTTTGATTTA TAAGGGATT TGCCGATTC GGCCTATTGG
pET21c_GAGA-DBD_8 CGGCTATTTC TTTTGATTTA TAAGGGATT TGCCGATTC GGCCTATTGG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      805      815      825      835      845
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAAATT AACGCGAATT TTAACAAAAT
pET21c_GAGA-DBD_8 TTAAAAAATG AGCTGATTTA ACAAAAAATT AACGCGAATT TTAACAAAAT

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      855      865      875      885      895
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 ATTAACGCTT ACAATTTAGG TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCCGCGAAC
pET21c_GAGA-DBD_8 ATTAACGCTT ACAATTTAG- TGGCACTTTT CGGGGAAATG TGCCGCGAAC

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      905      915      925      935      945
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 CCCTATTTGT TTATTTTT-C TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG
pET21c_GAGA-DBD_8 CCCTATTTGT TTATTTTTTC TAAATACATT CAAATATGTA TCCGCTCATG

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      955      965      975      985      995
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 AGACAATAAC CCTGATAAAT GCTT-CAATA ATATTGAAAA AGGAAGAGTA
pET21c_GAGA-DBD_8 AGACA-TAAC CCTGATAAAT GCTTCAATA ATATTGAAAA AGGA-GAGTA

      ....|....| .
      1005
GAGA-DBD
pET21c_GAGA-DBD_2 TGAGTATTCA A
pET21c_GAGA-DBD_8 -----

```

7.5.2 Reading frames possíveis do gene *GAGA-DBD* no vector de sobre-expressão pET-21c–*GAGA-DBD_2* e pET-21c–*GAGA-DBD_8*

5'3' Frame 1

ILFNFKKEIYICRKQNVQNILRVQKNRVAVARANSLQPVRV
MetQLFVRAVICVVIWNCVILQNRVFKNSSSVDKLAAALEHHH
HHH**Stop**DPAANKARKEAELAAATAEQ**Stop**LA**Stop**PLGASKRVL
RGFLLKGGTISGLANGTRPVAAH**Stop**ARRVWWLRAA**Stop**PLHL
PAP**Stop**RPLLSSLSPFSPRSPAFPVKL**Stop**IGGSL**Stop**GSDLVLY
GTSTPKNLIRV**Met**VHVVGHRPDRRFFAL**Stop**RWSPRSLIVDSC
SKLEQHSTLSRSILLIYKGFRCFRPIG**Stop**K**Met**S**Stop**FNKNLTRI
LTKY**Stop**RLQFSGTFRGNVRGTPICLFFLNTEFKYVSAHET**Stop**P
Stop**Stop****Met**LSIILKKE

5'3' Frame 2

FCLTLRRRYTYAESKTCKTSSGYRKT**Stop**P**Stop**PERTACNLSD
LLCSYSSEP**Stop**SASSSGTASFCKTGCLRIRAPSTSLRPHSSTTT
TTTEIRLLTKPERKLSWLLPPLSNN**Stop**HNPLGPLNGS**Stop**GVF
C**Stop**KEELYPDWR**Met**GRAL**Stop**RRIKRGGCGGYAQRDRYTCQR
PSARSFRFLPFLSRHVRRLSPSSKSGAPFRVPI**Stop**CFTAPRPQ
KT**Stop**LG**Stop**WFT**Stop**WAIALIDGFSPFDVGVHVL**Stop****Stop**WTLV
PNWNNTQPYLGLFF**Stop**FIRDFADFGLLVKK**Stop**ADLTKI**Stop**RE
F**Stop**QNINAYNLVALFGE**Met**CAEPLFVYFF**Stop**IHSN**Met**YPL**Met**
RHNPDKCFQ**Stop**Y**Stop**KRRV

5'3' Frame 3

FV**Stop**L**Stop**EGDIH**Met**PKAKRAKHPPGTEKPRSRSQSEQPATCP
ICYAVIRQSRNLRRHLELRHFAKPGV**Stop**EFELRRQACGRTRA
PPPPPLRSGC**Stop**QSPKGS**Stop**VGCCHR**Stop**AIT SITPWGL**Stop**TG
LEGFFAERRNYIRIGEWDAPCSGALSAAGVVVTRSVTATLASA
LAPAPFAFFPSFLATFAGFPRQALNRGLPLGFRFSALRHLDPK
KLD**Stop**GDGSRSGPSP**Stop****Stop**TVFRPLTLESTFFNSGLLFQTGT
TLNPISVYSFDL**Stop**GILPISAYWLKNELI**Stop**QKFNANFNKILT
LTI**Stop**WHFSGKCARNPYLFIFSKYIQICIRS**Stop**DITLINA FN
EKE

7.6 Isolamento de DNA plasmídico

Midiprep:

Protocolo fornecido pela *Omega* (55).

Para o isolamento do vector pET-21c segue-se o protocolo descrito para plasmídeos *Low-copy-number*, enquanto que para o vector pMA – *GAGA-DBD* segue-se o dos *High-copy-number*. No primeiro o volume de cultura celular a utilizar é o dobro do volume dos *High-copy-number*, e no passo de ressuspensão, lise celular e neutralização utiliza-se o dobro do volume das soluções I a III. O protocolo descrito é para isolamento de DNA *High-copy-number*.

1. Recolher as células – centrifugar 20-50 ml de cultura celular a 7000 rpm, durante 10 minutos a 4 °C e rejeitar o sobrenadante;
2. Ressuspender as células – ressuspender em 2,25 ml de solução I/RNase A até a suspensão ficar homogénea;
3. Lise celular – adicionar 2,25 ml de solução II, agitar suavemente por inversão dos tubos e incubar à temperatura ambiente durante 2-3 minutos;
4. Neutralização – adicionar 3,2 ml da solução III e agitar suavemente até formar um precipitado floculado. Centrifugar a 8000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C;
5. Preparação da coluna – a coluna é equilibrada com 1 ml de tampão de equilíbrio, deixando durante 4 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar a 3000 xg, durante 3 minutos à temperatura ambiente. Descartar o eluído e inserir um novo tubo de recolha;
6. Carregar a coluna – adicionar 3,5 ml do sobrenadante do passo 4 na coluna. Centrifugar a 5000 xg, durante 5 minutos à temperatura ambiente. Descartar o eluído. Repetir este passo até todo o sobrenadante do passo 4 passar pela coluna;
7. Lavagem da coluna – adicionar 3 ml de tampão HB, centrifugar a 5000 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. Descartar o eluído e reutilizar o tubo. Adicionar 3,5 ml de tampão *DNA wash*, centrifugar a 5000 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. Descartar o eluído e repetir a lavagem com tampão *DNA wash*. Centrifugar a coluna a 8000 xg, durante 20 minutos à temperatura ambiente;
8. Eluição do DNA plasmídeo – colocar a coluna num novo tubo de colheita. Adicionar 0,5-10 ml de tampão de eluição (dependendo da concentração final desejada) e incubar durante 2-3 minutos à temperatura ambiente. Centrifugar a ≥ 8000 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente

O Kit não disponibiliza a composição das soluções.

Miniprep:

Protocolo fornecido pela *Omega* (56).

Miniprep para o isolamento do vector pET-21c – GAGA-DBD.

1. Recolher as células – centrifugar 1-5 ml de cultura celular a 10 000 xg, durante 1 minuto à temperatura ambiente e rejeitar o sobrenadante;
2. Ressuspender as células – ressuspender em 250 µl de solução I/RNase A até a suspensão ficar homogénea;
3. Lise celular – adicionar 250 µl de solução II, agitar suavemente por inversão dos tubos e incubar à temperatura ambiente durante 2 minutos;
4. Neutralização – adicionar 350 µl da solução III e agitar suavemente até formar um precipitado floculado. Centrifugar a 13 000 xg, durante 10 minutos à temperatura ambiente;
5. Preparação da coluna – a coluna é colocada num tubo colector de 2 ml e é equilibrada com 100 µl de tampão de equilíbrio. Centrifugar a 13 000 xg, durante 30-60 segundos à temperatura ambiente. Descartar o eluído e inserir um novo tubo de recolha;
6. Carregar a coluna – adicionar o sobrenadante do passo 4 na coluna. Centrifugar a 13 000 xg, durante 1 minuto à temperatura ambiente. Descartar o eluído;
7. Lavagem da coluna – adicionar 700 µl de tampão HB, centrifugar a 13 000 xg durante 30-60 segundos à temperatura ambiente. Descartar o eluído e reutilizar o tubo. Adicionar 700 µl de tampão *DNA wash*, centrifugar a 13 000 xg durante 30-60 segundos à temperatura ambiente. Descartar o eluído e repetir a lavagem com tampão *DNA wash*. Centrifugar a coluna a 13 000 xg, durante 2 minutos à temperatura ambiente;
8. Eluição do DNA plasmídeo – colocar a coluna num novo tubo de 1,5 ml. Adicionar 50-100 µl de tampão de eluição (dependendo da concentração final desejada) e incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a 13 000 xg durante 1 minuto à temperatura ambiente

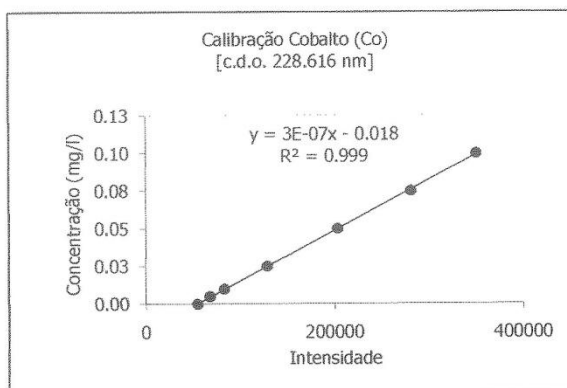
O Kit não disponibiliza a composição das soluções.

7.7 Quantificação de iões metálicos

Calibração

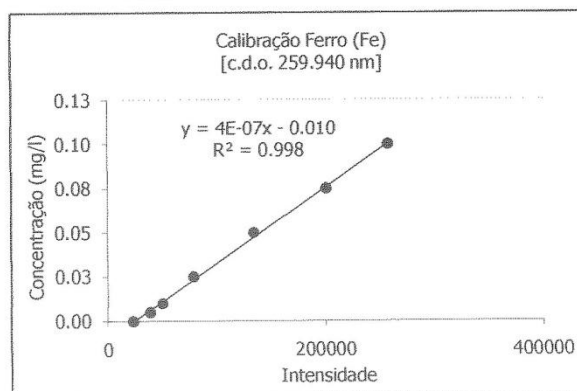
Cobalto

Intensidade	Conc. (mg/l)
54660	0.000
68077	0.005
83199	0.010
128601	0.025
203451	0.050
281471	0.075
350475	0.100



Ferro

Intensidade	Conc. (mg/l)
23187	0.000
38893	0.005
50051	0.010
78513	0.025
133945	0.050
200620	0.075
257660	0.100



Zinco

Intensidade	Conc. (mg/l)
62693	0.000
107318	0.005
146511	0.010
287754	0.025
545089	0.050
816448	0.075
1032120	0.100

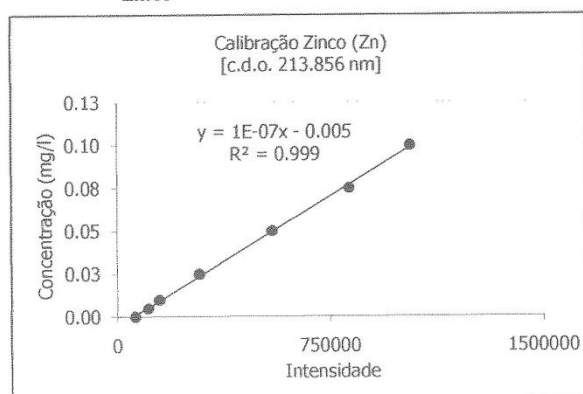


Figura 7.9 Rectas de calibração fornecidas pelo laboratório de análises *Atomic Emission Spectroscopy Service*, Departamento de química FCT/UNL.