



Nídia Alexandra Ribeiro de Almeida

Licenciatura em Bioquímica

Estudo da Libertação de Ferro em Miniferritinas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

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 José Ricardo Ramos Franco Tavares
Arguente: Prof. Doutora Maria Cristina de Oliveira Costa
Vogal: Prof. Doutora Maria Alice Santos Pereira



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro 2014

Nídia Alexandra Ribeiro de Almeida

Licenciatura em Bioquímica

**Estudo da Libertação de Ferro em
Miniferritinas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

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

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

Outubro 2014

Estudo da Libertação de Ferro em Miniferritinas

Copyright © Nídia Alexandra Ribeiro de Almeida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 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 a 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

Gostaria de em primeiro lugar agradecer aos meus orientadores, Professora Doutora Alice Pereira e Professor Doutor Pedro Tavares, por me terem possibilitado a oportunidade de desenvolver esta Tese. Agradeço a confiança depositada em mim, toda a disponibilidade, apoio e ajuda que me deram ao longo deste último ano. Obrigada pela partilha de conhecimento e pelo estímulo que me leva a querer saber mais e desenvolver sempre o melhor trabalho.

À Daniela Penas, muito obrigada por toda a ajuda no desenvolvimento do trabalho laboratorial, especialmente em relação à subclonagem dos genes utilizados, bem como o apoio prestado no desenvolvimento dos ensaios de Mössbauer. Agradeço a partilha de conhecimentos e experiências, a disponibilidade sempre demonstrada, os conselhos, a preocupação, a amizade e os bons momentos partilhados dentro e até fora do laboratório.

Ao Doutor Filipe Folgosa, quero agradecer a disponibilidade, a ajuda e os conselhos, bem como a boa disposição e gargalhadas proporcionadas, mesmo ao final de um dia longo de trabalho.

À Doutora Cristina Timóteo, à Doutora Cristina Cordas, à Joana Macedo e Vasco Ribeiro, obrigada pela partilha de conhecimento e bons momentos ao longo deste ano.

Obrigada a todos por me terem proporcionado um ano extraordinário em termos de desenvolvimento a nível de conhecimento científico bem como a nível pessoal.

Aos meus amigos e família quero agradecer pela constante preocupação e apoio demonstrados.

Ao Fausto, agradeço toda a ajuda, apoio, paciência e compreensão e ainda por tudo o que me proporcionou ao longo destes últimos anos e por me ajudar e incentivar a querer ser uma pessoa e uma estudante melhor. Obrigada!

Por último, quero agradecer aos meus pais por tudo o que me proporcionaram e continuam a proporcionar, por saber e sentir que estão sempre presentes e preocupados, pela vossa compreensão e por, desde sempre, me colocarem em primeiro lugar na vossa vida. Muito obrigada por tudo!

Resumo

O presente trabalho teve como principais objectivos o estudo do mecanismo da libertação do ferro em proteínas da família da ferritina (*DNA-binding proteins from starved cells*, **Dps**), bem como a identificação, produção e caracterização de potenciais **parceiros redox** destas proteínas através da utilização de técnicas bioquímicas e espectroscópicas apropriadas.

Foram identificadas no genoma de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* duas **flavoproteínas** (2375 e 3073) reconhecidas como possíveis parceiros redox da Dps de *Pseudomonas nautica* 617.

Todas as proteínas foram expressas heterologicamente em células de *E. coli* BL21 (DE3) e delineados protocolos de purificação em dois passos, por cromatografias de permuta iónica e de exclusão molecular, que permitiram obter rendimentos expressivos (Dps — 31,9 mg/L de cultura, Flavoproteína 2375 — 73 mg/L de cultura e Flavoproteína 3073 — 79,4 mg/L de cultura).

Aquando da purificação da 2375 verificou-se que a estabilidade da holoproteína depende da força iónica, característica que limita a sua utilização como parceiro redox da Dps.

O estudo da reacção de transferência electrónica foi iniciado com testes preliminares através da **espectroscopia de UV/Visível**, permitindo avaliar da ocorrência da reacção de redução do core férrico da Dps e concomitante libertação do produto final ferroso, por análise de uma mistura contendo NADH, flavoproteína 3073 oxidada e Dps core Fe. Este estudo não permite, contudo, estabelecer uma relação de causa efeito concreta e fiável que nos permita identificar o NADH como doador inicial de electrões e ferro ferroso como produto final desta reacção. O mecanismo de libertação foi estudado em maior detalhe através de **espectroscopia de Mössbauer** permitindo estabelecer a natureza das diferentes espécies intervenientes na reacção e assim verificar, pela primeira vez, que na presença dos três componentes, acima mencionados, existe redução e **libertação de ferro** previamente incorporado na Dps, na forma de iões ferrosos, bem como determinar parâmetros cinéticos apropriados.

Palavras-chave: Dps, parceiros redox, flavoproteínas, Espectroscopia de UV/Visível, Espectroscopia de Mössbauer, libertação de ferro

Abstract

This work had as main objectives the mechanistic study of iron release in ferretin-like proteins (DNA-binding proteins from starved cells, **Dps**), as well as the identification, production and characterisation of plausible redox partners of these proteins through biochemical and spectroscopic technics.

It was possible to identify two **flavoproteins** (2375 and 3073) in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*'s genome, recognized as possible redox partners of *Pseudomonas nautica* 617 Dps.

These proteins were expressed in a heterologously way in *E. coli* BL21 (DE3) cells and appropriate purification protocols designed, comprehending two steps, ion exchange chromatography and size exclusion, that allowed to obtain high yields (Dps — 31,9 mg/L of culture, Flavoprotein 2375 — 73 mg/L of culture e Flavoprotein 3073 — 79,4 mg/L of culture).

When 2375 was purified, it was found that holoprotein stability was dependent of the ionic strength, feature that limits its utilization as redox partner of Dps.

UV/Vis spectroscopy was used for the electron transfer reaction's initial study, allowing to evaluate the possibility of Dps ferric core reduction an concomitant release of the final ferric product, using a mixture of NADH, flavoprotein 3073 and Dps core. However this study did not allowed to establish a concret and reliable correlation, that would allow us to identify NADH as an initial electron donor and the ferrous iron as the final product of the reaction. The releasing mechanism was further studied through **Mössbauer spectroscopy**, allowing to establish the nature of the different reaction species and to verify, for the first time, that in the presence of the three components, above mentioned, reduction and release of previously **incorporated iron** in Dps occurs. Solvated ferrous ions were identified as final reaction product, and proper kinetic parameters determined.

Key-words: Dps, redox partners, flavoproteins, UV/Vis spectroscopy, Mössbauer spectroscopy, incorporated iron

Índice

1	Introdução	1
1.1	<i>Ferro</i>	1
1.2	<i>Família das Ferritinas</i>	2
1.3	<i>Proteína Dps</i>	4
1.3.1	Actividade ferroxidase	7
1.4	<i>Flavoproteínas</i>	11
1.4.1	WrbA — NADH-oxidoreductase	15
2	Objectivos	17
3	Produção e caracterização de potenciais parceiros redox da Dps	19
3.1	<i>Produção de proteínas recombinantes</i>	19
3.1.1	Subclonagem dos genes MARHY2375 e MARHY3073 de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> (Construção dos vectores de expressão)	19
3.1.2	Optimização das condições de sobre-expressão das proteínas 3073 e 237525	
3.1.3	Purificação das proteínas 3073 e 2375	33
3.1.4	Caracterização das proteínas 3073 e 2375	42
3.1.5	Produção da proteína Dps de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	54
4	Estudos de transferência electrónica	61
4.1	<i>Estudo cinético por espectroscopia de UV/Visível</i>	61
4.2	<i>Estudo cinético pela espectroscopia de Mössbauer</i>	63
5	Discussão final e perspectivas futuras	73
6	Bibliografia	79
7	Anexos	83
7.1	<i>Amplificação dos genes MARHY3073 e MARHY2375 de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> por PCR</i>	83
7.2	<i>Mapa de restrição dos genes MARHY3073 e MARHY2375</i>	85
7.3	<i>Hidrólise dos vectores e purificação dos produtos da hidrólise</i>	86
7.4	<i>Transformação de células competentes <i>E. coli</i> NZY5α e <i>E. coli</i> BL21(DE3)</i>	87
7.5	<i>Sequenciação do DNA — Alinhamento das sequências obtidas dos vectores pET-21c—3073 e pET-21c—2375 com a sequência de aminoácidos das proteínas 3073 e 2375.</i>	

7.6	<i>Electroforese em gel de agarose para análise do DNA</i>	89
7.7	<i>Electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)</i>	90
7.8	<i>Isolamento de DNA plasmídico</i>	95
7.9	<i>Quantificação do DNA plasmídico isolado</i>	96
7.10	<i>Purificação das proteínas</i>	97
7.10.1	<i>Cromatografia de permuta iónica</i>	97
7.10.2	<i>Cromatografia de exclusão molecular</i>	99
7.11	<i>Quantificação da proteína</i>	100
7.11.1	<i>Espectroscopia de UV/Visível — Lei de Lambert-Beer</i>	100
7.11.2	<i>Método do BCA</i>	100
7.12	<i>Quantificação de solução de ferro</i>	101
7.13	<i>Meios de cultura</i>	103
7.13.1	<i>LB e LB-Agar</i>	103
7.13.2	<i>Meio 2xYT</i>	103
7.14	<i>Mapa do vector de sobre-expressão pET-21c da Novagen</i>	104
7.15	<i>Espectro UV/Visível do FMN</i>	105
7.16	<i>Incorporação de ferro na Dps</i>	105
7.17	<i>Espectroscopia de Mössbauer</i>	106

Índice de figuras

1. Introdução

Figura 1.1	Estrutura cristalina de Apo-Dps de <i>P. nautica</i> .	5
Figura 1.2	Possíveis vias do ferro na Dps. Entrada; oxidação; mineralização e libertação do ferro.	8
Figura 1.3	Centros ferroxidase de proteínas Dps.	9
Figura 1.4	Representação da estrutura da Riboflavina; FMN e FAD.	11
Figura 1.5	Representação de diferentes estruturas do anel de isoaloxazina, com variação da carga.	12
Figura 1.6	Espectros de UV/Visível da flavina nos diferentes estados de oxidação.	13
Figura 1.7	Representação da estrutura dos dois tipos de enrolamento mais comuns para as proteína dependentes de FMN (A e B) e das proteínas dependentes de FAD (C e D).	14
Figura 1.8	Estrutura quaternária da flavoproteína WrbA.	15

3. Produção e caracterização de potenciais parceiros redox da Dps

Figura 3.1	Verificação das Minipreps dos vectores pET-21c, pNZY28—3073 e pNZY28—2375.	21
Figura 3.2	Verificação das reacções de hidrólise dos vectores com as enzimas de restrição específicas <i>Sal</i> I e <i>Nde</i> I.	22
Figura 3.3	Verificação da purificação dos fragmentos contendo os genes MARHY3073 e MARHY2375 e do vector pET-21c linearizado.	23
Figura 3.4	Vector de sobre-expressão pET-21c—3073.	24
Figura 3.5	Vector de sobre-expressão pET-21c—2375.	25
Figura 3.6	Análise do perfil de sobre-expressão da proteína 3073.	27
Figura 3.7	Verificação dos testes de sobre-expressão da proteína 2375.	28
Figura 3.8	Verificação da sobre-expressão da proteína 3073.	29
Figura 3.9	Representação esquemática do protocolo de sobre-expressão das proteínas 3073 e 2375.	31
Figura 3.10	Perfil da produção da proteína 3073.	32
Figura 3.11	Perfil electroforético da produção da proteína 2375.	32
Figura 3.12	Perfil de eluição da purificação da proteína 2375 em coluna DEAE-Sephrose FF.	33
Figura 3.13	Análise do 1º passo cromatográfico em coluna DEAE-Sephrose FF da proteína 2375 por electroforese SDS-PAGE.	34
Figura 3.14	Cromatograma com perfil de eluição da proteína 2375 (Fracção I) por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200.	35
Figura 3.15	Verificação por electroforese SDS-PAGE da purificação da Fracção I da proteína 2375 em coluna Superdex 200.	36
Figura 3.16	Espectros de UV/Visível das Fracções 32 a 37 da proteína 2375.	36
Figura 3.17	Electroforese SDS-PAGE, em gel <i>pre-cast</i> de 12% de acrilamida, das fracções globais da proteína 2375 purificada.	37
Figura 3.18	Perfil de eluição da purificação da proteína 3073 em coluna DEAE-Sephrose FF.	38
Figura 3.19	Verificação por electroforese SDS-PAGE da purificação em coluna DEAE-Sephrose FF da proteína 3073.	39
Figura 3.20	Perfil de eluição da coluna Superdex 200 para purificação da proteína 3073.	40
Figura 3.21	Verificação por electroforese SDS-PAGE da purificação da Fracção I da proteína 3073 em coluna Superdex 200.	41

Figura 3.22	Electroforese SDS-PAGE, em gel <i>pre-cast</i> de 12% de acrilamida, das fracções globais da proteína 3073 purificada.	41
Figura 3.23	Espectros de UV/Visível da proteína 3073.	42
Figura 3.24	Recta de calibração utilizada para a determinação da concentração da proteína 3073 pelo método colorimétrico do BCA.	43
Figura 3.25	Espectro de UV/Visível da Fracção 1 da proteína 2375.	44
Figura 3.26	Recta de calibração utilizada para a determinação da concentração da proteína 2375 pelo método colorimétrico do BCA.	45
Figura 3.27	Espectro UV/Visível da proteína 2375 após reconstituição com o cofactor FMN.	47
Figura 3.28	Espectros de UV/Visível obtidos aquando da titulação da apoflavoproteína 2375 com cofactor FMN.	48
Figura 3.29	Representação dos valores de absorvância registados ao longo da titulação entre a apoflavoproteína 2375 e o cofactor FMN a três diferentes comprimentos de onda.	49
Figura 3.30	Efeito da adição de NADH-oxidorreductase (proteína 3073) no espectro de UV/Visível do NADH.	52
Figura 3.31	Efeito da adição de NADH no espectro de UV/Visível da NADH-oxidorreductase (proteína 3073).	53
Figura 3.32	Vector de sobre-expressão pET-21c—Dps.	54
Figura 3.33	Representação esquemática do protocolo de sobre-expressão da proteína Dps.	55
Figura 3.34	Verificação da produção da Dps por SDS-PAGE.	56
Figura 3.35	Perfil de eluição da coluna cromatográfica DEAE-Sepharose FF na purificação da proteína Dps.	57
Figura 3.36	Perfil de eluição da coluna Superdex 200 para purificação da proteína Dps.	58
Figura 3.37	Espectro UV/Visível representativo da proteína Dps.	59

4. Estudos de transferência electrónica

Figura 4.1	Representação esquemática do ensaio realizado por espectroscopia de UV/Visível para estudar a cinética da reacção de transferência electrónica.	61
Figura 4.2	Estudo cinético da reacção de transferência electrónica por espectroscopia de UV/Visível.	62
Figura 4.3	Espectros de Mössbauer adquiridos a 80 K, para a amostra Dps core $^{144}\text{Fe}/3073/\text{NADH}$ e do respectivo controlo.	65
Figura 4.4	Espectros de Mössbauer adquiridos a 10 K, para a amostra Dps core $^{144}\text{Fe}/3073/\text{NADH}$ e do respectivo controlo.	66
Figura 4.5	Espectros de Mössbauer adquiridos a alta e baixa temperatura para a amostra I (Dps core $^{144}\text{Fe}/3073/\text{NADH}$).	67
Figura 4.6	Resultados obtidos ao longo do tempo para a variação da percentagem de espécies de ferro caracterizadas nas amostras estudadas.	68
Figura 4.7	Representação do complexo ferro-ortofenantrolina.	68
Figura 4.8	Espectros de Mössbauer adquiridos a temperatura alta (80 K).	69
Figura 4.9	Espectro de Mössbauer adquirido a alta temperatura (80 K) da amostra de proteína Dps com incorporação de $^{144}\text{Fe}^{57}$ após ciclo de oxidação redução.	70
Figura 4.10	Esquema representativo do ciclo de oxidação-redução estudado, com apresentação dos passos que o constituem e respectivos espectros de Mössbauer adquiridos a temperaturas alta (80 K) e baixa (10 K).	71

7. Anexos

Figura 7.1	Mapa do gene MARHY3073 com enzimas de restrição.	85
Figura 7.2	Mapa do gene MARHY2375 com enzimas de restrição.	85
Figura 7.3	Alinhamento das sequências obtidas do vector pET-21c—3073 com a sequência de aminoácidos da proteína 3073.	88
Figura 7.4	Alinhamento das sequências obtidas do vector pET-21c—2375 com a sequência de aminoácidos da proteína 2375.	88
Figura 7.5	Marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder II, NZYTech.	89
Figura 7.6	Marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder III, NZYTech.	90
Figura 7.7	Marcadores de massas moleculares, <i>Low Molecular Weight</i> (LMW) e <i>NZYColour Protein Marker II</i> (NZYII), NZYTech.	92
Figura 7.8	Recta de calibração do ferro padrão utilizada para a determinação do valor da concentração do ferro na amostra de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.	102
Figura 7.9	Mapa de vector de sobre-expressão pET-21c (+) da Novagen.	104
Figura 7.10	Espectro UV/Visível de uma solução do cofactor FMN.	105
Figura 7.11	Representação esquemática do processo de incorporação de ferro na Dps.	106
Figura 7.12	Espectro de Mössbauer adquirido a temperatura alta (80 K) para a amostra controlo do complexo ferro-ortofenantrolina.	108

Índice de tabelas

3. Produção e caracterização de potenciais parceiros redox da Dps

Tabela 3-1 Sequência de nucleótidos dos <i>primers forward</i> (Fwd) e <i>reverse</i> (Rev) utilizados na PCR para amplificação dos genes MARHY3073 e MARHY2375.	20
Tabela 3-2 Composição da reacção de ligação com a T4 DNA ligase.	24
Tabela 3-3 Condições utilizadas para a expressão das proteínas 3073 e 2375, seleccionadas com base nos testes de sobre-expressão realizados.	30
Tabela 3-4 Apresentação de todas as fracções puras obtidas das proteínas 3073 e 2375.	42

7. Anexos

Tabela 7-1 Composição da reacção de PCR, num volume total de 50 µL.	83
Tabela 7-2 Condições da reacção de PCR.	84
Tabela 7-3 Composição da reacção de hidrólise dos vectores com a enzima de restrição <i>Sall</i> .	86
Tabela 7-4 Volumes de plasmídeo utilizados na transformação de células <i>E. coli</i> NZY5α.	87
Tabela 7-5 Volumes necessários para a preparação de um gel SDS-PAGE.	93
Tabela 7-6 Soluções <i>stock</i> para a preparação dos géis de poliacrilamida SDS-PAGE.	94
Tabela 7-7 Gradiente de concentração linear descontínuo de tampão B.	98
Tabela 7-8 Soluções e respectivos volumes utilizados no método colorimétrico para a determinação da concentração de ferro.	101
Tabela 7-9 Composição de 1 L de meio 2xYT.	103
Tabela 7-10 Parâmetros de Mössbauer obtidos, sem campo magnético aplicado a 80 K, para a proteína Dps core férrico; para o produto ferroso obtido; para o complexo ferro-ortofenantrolina (controlo) e complexo produto ferroso + ortofenantrolina.	106
Tabela 7-11 Diferentes percentagens de ferro obtidas ao longo do estudo da cinética da reacção de oxidação-redução.	107

Lista de Abreviaturas

AMP	Adenosina monofosfato
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina de soro bovino
Dps	DNA-binding protein from starved cells
Dps core 96Fe	Dps com incorporação de 96 ⁵⁶ Fe
Dps core 144Fe	Dps com incorporação de 144 ⁵⁷ Fe
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
Flavoproteína 2375	Produto do gene MARHY2375 de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
Flavoproteína 3073	Produto do gene MARHY3073 de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
FMN	Mononucleótido de flavina
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
<i>L. innocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
LB	Luria Bertani
LB/Agar	Meio de crescimento Luria Bertani contendo agar
LMW	<i>Low Molecular Weight</i>
MOPS	Ácido 3-(N-Morfolino)propanesulfônico
MWCO	<i>Molecular Weight cut-off</i>
NQO	NADH:quinona oxidoreductase
OD _{600nm}	Densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm
<i>P. nautica</i>	<i>Pseudomonas nautica</i> 617
pDNA	DNA plasmídico
PSA	Persulfato de amônia
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de 0,1% de SDS
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-1-,2-diaminometano
Tris	Tris(hidroximetil)metilamina
UV/Vis	Ultravioleta-visível
WT	<i>Wild-type</i>
δ	Desvio isomérico (espectroscopia de Mössbauer)
ΔEQ	Desdobramento de quadrupolo (espectroscopia de Mössbauer)
Γ	Largura de linha (espectroscopia de Mössbauer)

1 Introdução

1.1 Ferro

O ferro é o quarto elemento natural mais abundante no planeta Terra e um metal de transição versátil, com elevada importância para o bom funcionamento dos organismos.^{1, 2}

Podendo adoptar diferentes estados de oxidação; spins e potenciais redox, de acordo com os diferentes ligandos circundantes, este tem vindo a ser apontado como o elemento ideal para a incorporação em proteínas, de praticamente todas as espécies, tendo conservada ao longo dos anos.³

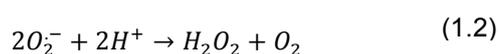
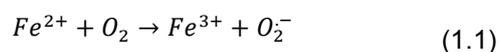
Em condições fisiológicas, o ferro livre apresenta duas formas que coexistem e que se interconvertem, Fe(II) – ferro ferroso – relativamente solúvel, e Fe(III) – ferro férrico – muito insolúvel.⁴ O ferro ferroso é termodinamicamente mais estável que o ferro férrico devido ao seu potencial redox padrão (0.77 V vs SHE).

É espectável que o ferro, devido à sua versatilidade química, esteja amplamente presente nos sítios activos de muitas enzimas e proteínas transportadoras de oxigénio, desempenhando um papel crucial em diversos processos biológicos como: regulação génica, respiração, fixação de azoto, transporte de oxigénio, síntese de DNA e reacções de transferência electrónica.^{1, 5}

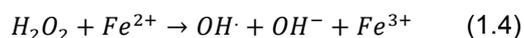
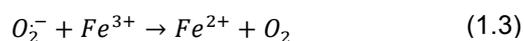
Apesar do ferro ter uma elevada abundância natural no meio ambiente, na atmosfera actual o ião ferroso reage com o oxigénio formando-se óxidos de ferro, levando a que sob estas condições o ferro férrico passe a ser a forma mais estável de ferro existente, habitualmente, na forma de um complexo insolúvel, o hidróxido férrico.^{6, 7} Este facto faz com que a biodisponibilidade do ferro seja muitíssimo baixa o que é geralmente um factor limitante no crescimento de bactérias.⁸

Sabe-se ainda, que o ferro em condições aeróbias pode ser potencialmente tóxico por ser capaz de gerar espécies reactivas de oxigénio (ROS).⁹

A formação de ROS, como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ou o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), é desencadeada pela reacção de Fe(II) com oxigénio molecular (O_2), tal como apresentado nas reacções (1.1) e (1.2).^{4, 5, 10}



Por outro lado, existe a possibilidade do Fe(III) ser reduzido voltando a originar Fe(II) (reação 1.3) o que constitui o primeiro passo de um ciclo catalítico destrutivo, conhecido como reação de Haber-Weiss. A presença de íons Fe(II) nas células pode levar ao surgimento de radicais hidroxilo pelas reações de Fenton (reação 1.4) e Haber-Weiss (reação 1.5).^{6, 11, 12}



Por ser uma das espécies mais reactivas presentes em sistemas biológicos, o radical hidroxilo é capaz de danificar vários componentes celulares, tais como: ácidos nucleicos; lípidos de membrana e proteínas, levando a alterações de função ou até mesmo à inactivação destes.^{5, 12}

Consequentemente, devido à necessidade de ultrapassar a baixa disponibilidade e alta toxicidade do ferro, os organismos desenvolveram mecanismos para obtenção e armazenamento de ferro numa forma não tóxica e solúvel, recorrendo para tal a uma família de proteínas armazenadoras de ferro, as ferritinas.^{2, 9}

1.2 Família das Ferritinas

As Ferritinas são uma família de proteínas armazenadoras de ferro que estão envolvidas em diversos processos celulares importantes, como a fixação de azoto, fotossíntese, respiração e síntese de DNA, processos que necessitam de níveis de ferro elevados.¹³

Estas proteínas têm a capacidade de sequestrar ferro ferroso, Fe(II), armazenando-o no interior da célula, depositado na cavidade da proteína sob a forma de ferro férrico, Fe(III).

A capacidade de armazenamento do ferro tem-se mantido de forma eficiente ao longo da evolução, pelo que o facto destas proteínas serem altamente conservadas em termos estruturais permite verificar que a forma tridimensional global destas é altamente imprescindível ao desenvolvimento da sua função. De mencionar, no entanto, que as sequências de DNA que as codificam, bem como as de aminoácidos, podem variar consideravelmente.^{14, 15}

Esta superfamília de proteínas divide-se em dois grandes grupos, as maxi-ferritinas e as mini-ferritinas, estando estes, por sua vez, organizados em subfamílias evolutivamente distintas mas com grandes semelhanças em termos estruturais e funcionais.

As proteínas de ambos os grupos são compostas por um determinado número de subunidades com um enrolamento em quatro hélices- α , que se agrupam formando uma concha quase-esférica que rodeia a cavidade responsável pelo armazenamento de ferro. O número de subunidades que constitui estas proteínas varia entre as diferentes subfamílias, mas não dentro da mesma.¹⁶

As maxi-ferritinas dividem-se em duas subfamílias, as ferritinas clássicas e as bacterioferritinas. São compostas por 24 subunidades iguais que possuem um centro ferroxidase por monómero e têm a capacidade de armazenar, aproximadamente, 4500 átomos de ferro. Por sua vez, as mini-ferritinas, grupo onde se inclui as proteínas Dps (*DNA-binding proteins from starved cells*) são compostas por 12 subunidades iguais que conseguem armazenar, aproximadamente, 500 átomos de ferro.¹⁷⁻¹⁹

Mesmo tendo diferentes mecanismos de oxidação de ferro e capacidade de acomodar uma quantidade distinta de ferro, as mini e as maxi-ferritinas têm propriedades de armazenamento semelhantes, armazenando o ferro sob a forma não-tóxica, solúvel e biodisponível.

Este tipo de proteínas tem tido diversas aplicações na área da biotecnologia, sendo utilizadas como moldes supramoleculares para a síntese de nanopartículas dentro da concha da proteína²⁰ e em diferentes aplicações tecnológicas, essencialmente devido à sua capacidade intrínseca de armazenar minerais e pela robustez destas.

1.3 Proteína Dps

Ao longo dos últimos anos tem sido reconhecido, que à semelhança das maxiferitinas também a subfamília das Dps possui capacidades de armazenamento e desintoxicação em células bacterianas.

A família de proteínas Dps é amplamente distribuída no reino *Bacteria*, onde se encontram cerca de 97% destas²¹⁻²⁴ ou outras ferritinas semelhantes²⁵, sendo que os restantes 3% correspondem às que podem ser encontradas no reino *Archea*.^{26, 27}

A primeira proteína Dps foi descoberta em *E. coli* por Almirón *et al.* e assim denominada após ter sido expressa em meio com carência nutritiva e sob stress oxidativo.²³ Foi descrita como sendo uma proteína com capacidade de se ligar ao DNA, com funções de regulação e protecção, desempenhando um papel fundamental ao regular a expressão génica quando as células são sujeitas a um período prolongado de privação nutricional.²⁸

As proteínas Dps encontradas tinham ainda como função proteger o DNA de danos provenientes de stress oxidativo, através da formação de um complexo extremamente estável sem especificidade de sequência,²⁹ tamanho ou topologia, quer *in vivo* quer *in vitro*. Células sem a presença de Dps alteravam o seu padrão de expressão de proteínas de uma forma drástica durante a fase de carência nutritiva (*starvation*), não desenvolvendo assim resistência ao peróxido de hidrogénio.

A Dps não é apenas uma proteína que armazena ferro, podendo também capturar oxidantes e/ou outros electrões livres provenientes de reacções de stress oxidativo.³⁰

Ao longo dos anos várias novas proteínas Dps têm vindo a ser descobertas,^{22, 24, 31-42} no entanto, verifica-se que nem todas possuem a capacidade de se ligarem ao DNA.^{31, 43-45} Apesar disso, todas as proteínas da família Dps mantêm a capacidade de proteger o DNA de danos causados pelo stress oxidativo.

Para além das funções de regulação e protecção mencionadas estão também identificadas outras funções das Dps de acordo com as necessidades de cada organismo, como por exemplo, o controlo da toxicidade do cobre^{28, 33} e a protecção ao stress térmico, com aumento da resistência das células à temperatura.^{46, 47}

A Dps é um dodecâmero (Figura 1.1) que possui uma cavidade central com capacidade para armazenar até 500 átomos de ferro. Os monómeros destas proteínas, com um peso molecular de, aproximadamente, 20 kDa, agrupam-se espontaneamente sob a forma de quatro hélices, formando uma estrutura quaternária que se assemelha a uma esfera.

Os monómeros de Dps diferem das restantes ferritinas devido à presença de uma pequena hélice extra, localizada entre duas das suas hélices (Figura 1.1, hélice verde e hélice azul) e exposta para o exterior da estrutura da proteína.

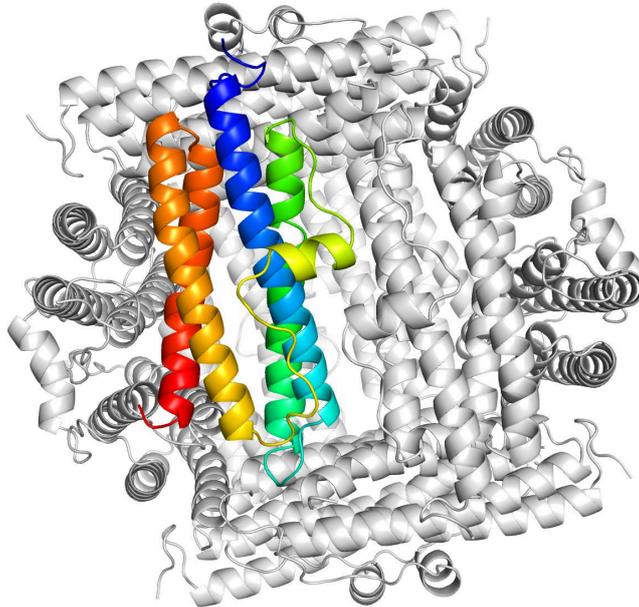


Figura 1.1 Estrutura cristalina de Apo-Dps de *P. nautica*. Representação da estrutura geral com doze monómeros agrupados, formando a estrutura típica das proteínas Dps. Um dos monómeros da Dps está destacado por cores, do azul na extremidade N-terminal até ao vermelho no C-terminal.⁷³

Estas proteínas são caracterizadas por terem um *core* central que contém diversos aminoácidos conservados na proximidade do centro ferroxidase e nas regiões N- e C-terminais, sendo que estas regiões possuem um tamanho variável e cargas positivas.⁴⁸

Já a superfície e a cavidade interna da Dps têm, principalmente, cargas negativas que favorecem a mineralização do ferro.⁴⁹

A estrutura da Dps é muito compacta e estável, apresentando grande flexibilidade da região N-terminal, que habitualmente se encontra voltada para o exterior do dodecâmero e que tem vindo a ser apontada como fundamental na capacidade que a proteína tem de se ligar ao DNA e por estabilizar a formação do dodecâmero.

Além desta, também a região C-terminal foi indicada como estando envolvida no processo de interação com o DNA.⁴⁹⁻⁵¹

Aquando da junção das diferentes subunidades da Dps formam-se poros que permitem a conexão entre o exterior do dodecâmero e a cavidade interna da proteína.

A extremidade N-terminal das diversas subunidades forma um poro, altamente hidrofílico e carregado negativamente, semelhante ao que se encontra nas ferritinas, sendo por isso designado por “*ferritin-like*”. Os resíduos carregados negativamente que o revestem promovem a criação de um potencial electrostático negativo, o que pode facilitar a entrada do ferro na proteína e a sua deslocação até ao centro ferroxidase.

Os poros formados pelas extremidades C-terminal, designados por “*Dps-type*”, são exclusivos de proteínas Dps e são, maioritariamente, hidrofóbicos. Devido ao facto da variabilidade de sequências destes poros ser maior entre proteínas Dps do que no caso dos poros formados pelo N-terminal, a função destes poros permanece ainda desconhecida.^{10, 19,}

33, 48

1.3.1 Actividade ferroxidase

Nas proteínas Dps podem encontrar-se três sítios de ferro: centros ferroxidase, centros de nucleação e poros de entrada/saída.²¹

Embora haja uma conservação estrutural dentro da família das ferritinas, o centro ferroxidase é uma das maiores e distintas variações estruturais entre as proteínas Dps e as maxi-ferritinas.⁵²

Dentro do dodecâmero de Dps existem doze centros ferroxidase que estão localizados na interface entre duas subunidades distintas, ao contrário do que se verifica nas maxi-ferritinas em que estes se localizam no interior de cada subunidade. Assim, no caso das Dps existem na interface de cada dímero dois centros de ferroxidase, sendo o local de ligação do metal composto por histidinas conservadas e por resíduos com grupos carboxilato, provenientes das duas subunidades (Figura 1.3).^{21, 48, 53}

Mesmo verificando-se a conservação dos resíduos que constituem o local de coordenação do metal, a ocupação por diferentes espécies de ferro, faz com que este varie bastante como é conhecido através de estruturas cristalográficas conhecidas.⁴⁸

A reacção de oxidação do ferro, conversão de Fe(II) a Fe(III), ocorrida no centro ferroxidase, foi reportada primeiramente em Dps de *Listeria innocua*⁴⁵ e *E. coli*¹⁰ e envolve cinco fases consecutivas (representadas esquematicamente na Figura 1.2):

- I. Entrada de ferro na proteína
- II. Ligação do ferro a um centro ferroxidase
- III. Oxidação do ferro no centro ferroxidase
- IV. Nucleação
- V. Mineralização

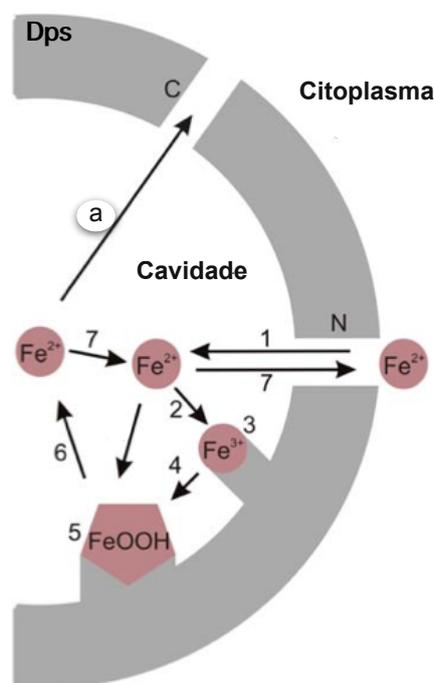
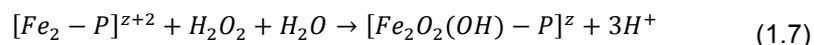
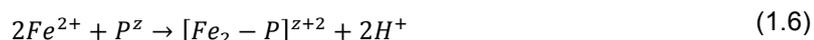


Figura 1.2 Possíveis vias do ferro na Dps. Entrada; oxidação; mineralização e libertação do ferro. **1)** Entrada dos íões Fe(II) na cavidade do dodecâmero através de poros na região N-terminal; **2 e 3)** Ligação ao centro ferroxidase e oxidação a Fe(III), respectivamente; **4 e 5)** Deslocação para o centro de nucleação e início de mineralização; **6)** Nova redução a Fe(II); **7)** Libertação de Fe(II) para o citoplasma pela mesma via de entrada (canal no N-terminal). **(a)** Possibilidade de libertação de Fe(II) da cavidade através de poros no C-terminal. Imagem adaptada de 21

No caso das proteínas Dps é, preferencialmente, utilizado como oxidante de ferro o peróxido de hidrogénio, o que difere das maxi-ferritinas que habitualmente usam oxigénio molecular. A oxidação de ferro com peróxido de hidrogénio, nas Dps, ocorre com uma taxa de eficiência muito maior, aproximadamente 100 vezes maior, em comparação com a utilização de oxigénio molecular. O facto de os centros ferroxidase das maxi- e mini-ferritinas serem constituídos por diferentes aminoácidos pode ter influência e estar directamente relacionado com esta variação verificada.^{10, 28, 45}

Utilizando peróxido de hidrogénio como oxidante, a oxidação do ferro ocorre de acordo com as reacções 1.6 a 1.8, onde P^z representa a apoproteína Dps e $[Fe_2-P]^{z+2}$ o complexo bimetalico do centro ferroxidase.^{10, 21}



No centro ferroxidase o Fe(II) é oxidado a Fe(III), como $[\text{Fe}_2\text{O}_2(\text{OH})\text{-P}]^2$, um complexo oxidado de ferro (reacção 1.7).

Após sofrer oxidação, o ferro é mineralizado a óxido de ferro férrico hidratado (FeOOH), na cavidade interna da proteína (reacção 1.8).

No caso das proteínas Dps a formação do *core* férrico ocorre mais rápido que a reacção de ferroxidação,^{45, 54} pelo que a proteína fica assim disponível para armazenar até 500 iões de ferro férrico por dodecâmero.

De modo a verificar a influência do segundo local de ligação de cada centro ferroxidase, várias estruturas de Dps foram determinadas contendo um, ou até dois ferros, ou duas moléculas de água.⁵⁵ Nos casos em que a Dps tem apenas águas ligadas nos sítios de ligação dos iões ferro, verifica-se que estes sítios de ligação são altamente conservados e crê-se que possam estar envolvidos nos processos de estabilização e flexibilidade da proteína e na manutenção da estrutura quaternária.¹³

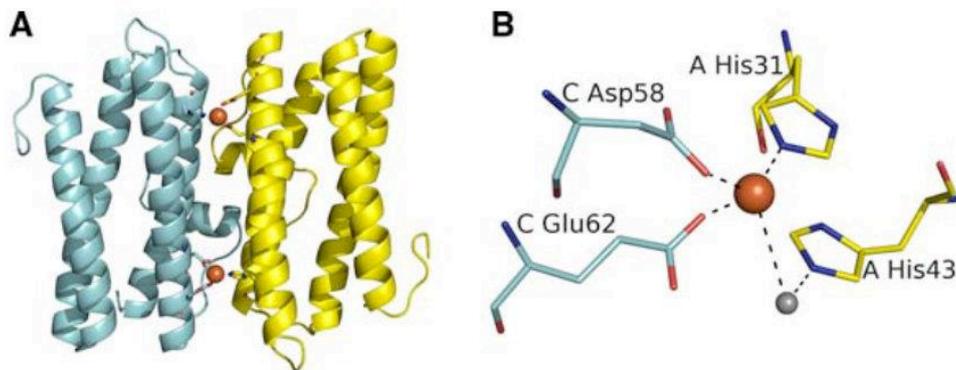


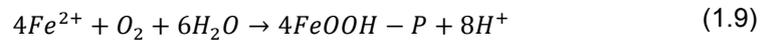
Figura 1.3 Centros ferroxidase de proteínas Dps. **A)** Centros ferroxidase localizados entre dois monómeros na interfase dimérica da proteína Dps de *L. innocua*; **B)** Centro ferroxidase de proteínas Dps. Imagem adaptada de 21

Apesar de se verificar a conservação global da família das ferritinas, no caso das proteínas Dps os resíduos dos locais de ligação do ferro são diferentes e a actividade ferroxidase apresenta características distintas (Figura 1.3).^{48, 56}

Nas proteínas Dps, assumindo-se a ligação de dois iões de ferro por cada centro ferroxidase, verifica-se que dois iões de ferro ferroso são oxidados por cada molécula de peróxido de hidrogénio e um ião de ferro férrico (Fe^{3+}) é mineralizado no *core* do dodecâmero como ferridrita (FeOOH), tal como é descrito pela reacção 1.8.^{10, 53}

Desta forma, a oxidação dos iões de ferro ferroso pelo peróxido de hidrogénio no interior da Dps conduz à diminuição dos níveis de formação do radical hidroxilo pela reacção de Fenton, levando assim à protecção das células em situações de stress oxidativo.^{45, 48}

É também possível utilizar o oxigénio molecular, mesmo sendo este menos eficiente, e a reacção 1.9 traduz o que ocorre aquando do processo de mineralização do ferro.^{21, 28}



O ferro, oxidado e mineralizado, é armazenado na cavidade proteica até que ocorra a sua libertação motivada pela necessidade deste em processos biológicos.^{53, 57}

Até à data as informações acerca da dissolução do *core* de ferro *in vivo* são bastante reduzidas. Experiências *in vitro* mostram que a mobilização do ferro pode ocorrer na presença de agentes quelantes ou redutores de ferro ferroso, não se sabendo, no entanto, se estes agentes têm a capacidade de penetrar até ao interior da proteína e reduzir o *core* de ferro.^{57, 58}

1.4 Flavoproteínas

Flavodoxinas são pequenas proteínas com, aproximadamente, 16 kDa, que usam FMN como cofactor para reacções de transferência electrónica.

Estas proteínas podem ser encontradas em diversos organismos, desde bactérias até a algumas algas. Nos eucariotas, proteínas homólogas à flavodoxina e à sua reductase são proteínas com multi-domínios como é o caso da metionina sintase reductase.

As flavoproteínas são proteínas que contêm cofactores flavínicos e que podem funcionar como proteínas redox mas também como moléculas sinalizadoras usando potenciais redox ou alterações mediadas por luz.

O FAD (dinucleótido de flavina e adenina) e FMN (mononucleótido de flavina) são os dois tipos de cofactores de flavinas mais utilizados como centros redox em diversas proteínas. As conformações e propriedades químicas destes podem ser afectadas pelo seu estado de oxidação bem como pelas reacções fotoquímicas em que participam.

Estes dois cofactores são grupos prostéticos que se encontram fortemente ligados à proteína, maioritariamente, através de ligações covalentes que estabelecem com a cadeia polipeptídica. Quando a proteína possui o grupo prostético é designada por holoproteína, sendo de outra forma designada por apoproteína no caso deste grupo estar ausente.⁵⁹

Como mostrado na Figura 1.4 as flavinas, FMN e FAD, apenas diferem na sua estrutura pela presença de um resíduo AMP no FAD, mantendo-se o esqueleto comum de um anel de isoaloxazina e uma cadeia de ribitol (Riboflavina) e um grupo fosfato.

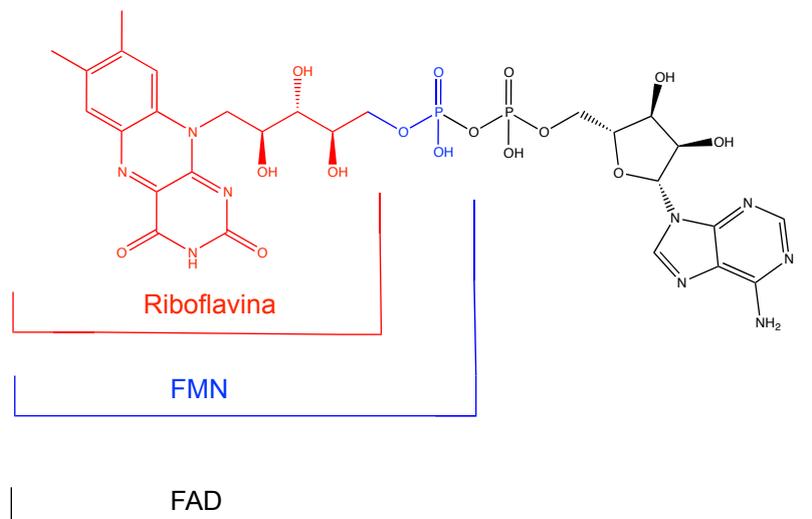


Figura 1.4 Representação da estrutura da Riboflavina; FMN e FAD.

As flavinas podem existir em três estados de oxidação distintos: oxidado (Figura 1.5 **A**); reduzido por um electrão – semiquinona (Figura 1.5 **B**) e totalmente reduzido por dois electrões – hidroquinona (Figura 1.5 **C**).

Estes estados redox conferem diferentes propriedades espectroscópicas (Figura 1.6) às flavoproteínas, apresentando estas na forma oxidada um máximo de absorção na região dos 450 nm e uma coloração amarela.⁶⁰ A variação de cores consoante o estado de oxidação torna esta família de flavinas os cofactores ideais para estudos redox envolvendo flavoproteínas.

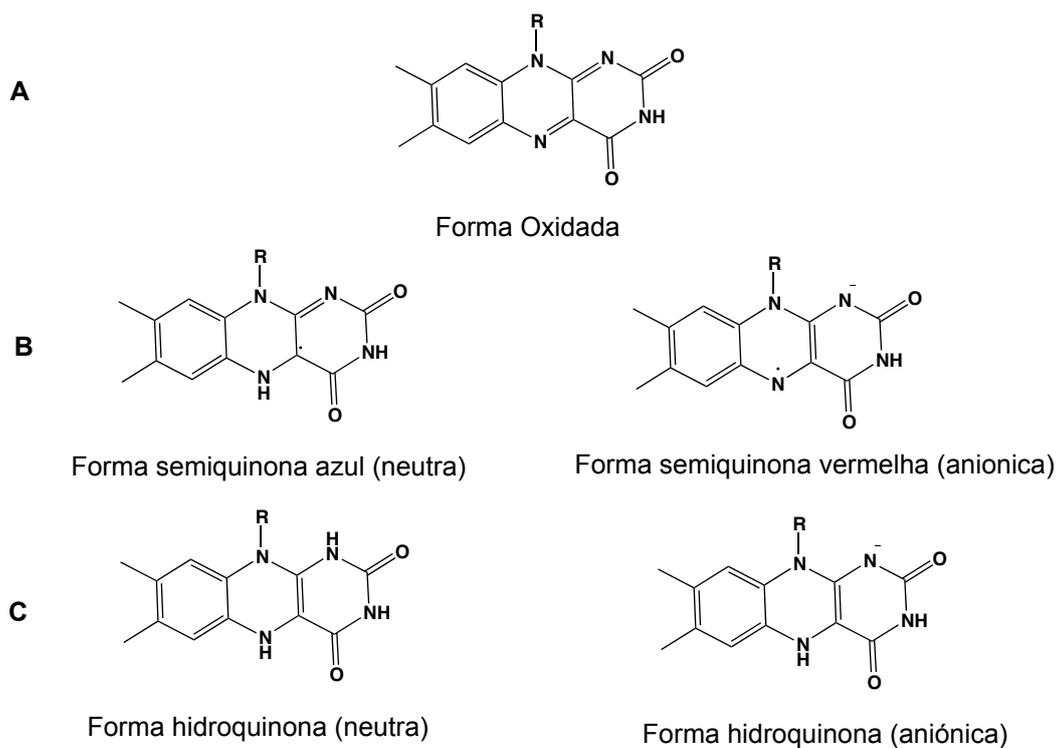


Figura 1.5 Representação de diferentes estruturas do anel de isoaloxazina, com variação da carga. **A)** Forma oxidada; **B)** Forma reduzida, por um electrão; **C)** Forma reduzida, por dois electrões.

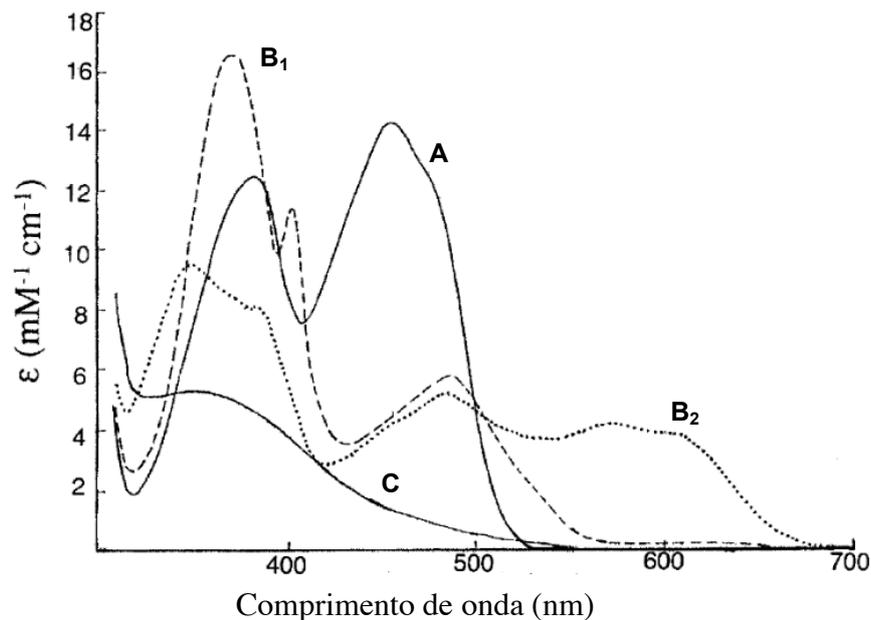


Figura 1.6 Espectros de UV/Visível da flavina nos diferentes estados de oxidação. **A)** Oxidada; **B₁)** Semiquinona aniônica; **B₂)** Semiquinona neutra **C)** Reduzida. Imagem adaptada de 59

Devido às propriedades redox do anel de isoaloxazina, o FAD e o FMN podem ser usados como cofactores redox por flavoproteínas que catalisam uma vasta variedade de reacções.⁶¹ Destes dois cofactores o FAD é claramente o mais abundante como cofactor das flavoproteínas, cerca de 75% enquanto que os outros 25% ficam a cargo do FMN.⁶²

Diferentes classes de flavoproteínas apresentam diferentes propriedades e características, estando envolvidas em diferentes tipos de reacções:⁶³

- Transferases – Electro-transferases, tais como flavodoxina e ferredoxina-NADP reductase reagem prontamente com aceitadores ou doadores de um electrão levando à formação de elevadas quantidades de superóxido, quando reagem com oxigénio molecular. Em geral estabilizam termodinamicamente a forma neutra semiquinona da flavina numa larga escala de pH;
- Desidrogenases/transidrogenases – Exemplos desta classe são a acetil-CoA desidrogenase; a NAD(P)H:quinona oxidoreductase e a família de flavoproteínas disulfido reductases. Estas enzimas, geralmente, não estabilizam termodinamicamente a flavina e geram quantidades variáveis de superóxido no seu ciclo catalítico com oxigénio molecular;
- Oxidases – Este grupo apresenta características bastante bem definidas e distintas dos outros tipos de flavoproteínas, com a capacidade de estabilizar termodinamicamente a forma aniônica da semiquinona.

- Monooxigenases – A característica distinta deste grupo de enzimas prende-se com o facto de serem capazes de estabilizar a flavina com elevada facilidade. Em geral esta estabilização é feita não de uma forma termodinâmica mas sim através da formação de um complexo flavina-sulfito encontrado na lactato monooxigenase.

Estruturalmente, FMN e FAD têm formas de ligação bastante diferente de acordo com a topologia de ligação do centro activo da proteína em questão. No entanto verifica-se que o resíduo de adenosina afecta bastante o modo de ligação do cofactor. A estrutura preferencial para as proteínas do tipo FMN são os clássicos barril-(β/α)₈, e o enrolamento flavodoxina, designado por do tipo flavoproteína. Estas estruturas constituem metade dos enrolamentos conhecidos para as flavoproteínas que utilizam FMN, Figura 1.7 **A** e **B**. No enrolamento do tipo flavoproteína, todas as proteínas dependentes de FMN actuam como reductases, com transferência de dois electrões.



Figura 1.7 Representação da estrutura dos dois tipos de enrolamento mais comuns para as proteína dependentes de FMN (**A e B**) e das proteínas dependentes de FAD (**C e D**). **A)** Flavodoxina de *Desulfovibrio vulgaris* (Código PDB: **1fx1**); **B)** Flavodoxina de *Sa. cerevisiae* (Código PDB: **1oyx**); **C)** Glutathiona disulfido reductase de humano (Código PDB: **3grs**); **D)** UDP-N-acetilmuramato dehidrogenase de *E. coli* (Código PDB: **1mbt**).

As topologias para as proteínas dependentes de FAD são na sua maioria enrolamento do tipo Rossmann, seis folhas- β paralelas ligadas a dois pares de hélices- α pela ordem β - α - β - α - β , Figura 1.7 **C** e **D**.⁶²

1.4.1 WrbA — NADH-oxidorreductase

A flavoproteína WrbA, foi inicialmente descrita como uma proteína repressora da ligação ao triptofano (W) em *E. coli*. Posteriormente, foi descoberta a sua actividade de NADH:quinona oxidorreductase. Esta descoberta fundamentou o seu possível papel na resposta ao stress oxidativo, mantendo os níveis de quinona reduzida.⁶⁴

Com base em ensaios bioquímicos foi demonstrada a actividade NADH-oxidorreductase da flavoproteína de *E. coli* e de *Archaeoglobus fulgidus*, formando-se assim uma nova classe da família das flavoproteínas denominada como tipo IV NQOs.

Estudos de voltametria cíclica permitiram demonstrar que estas proteínas (WrbA) utilizam dois electrões para reduzir as quinonas durante o processo de protecção numa situação de stress oxidativo.

Esta família de flavoproteínas, tetraméricas (Figura 1.8 **A**), constitui uma larga família com diversas funções na catálise de reacções redox. A WrbA liga substratos no seu centro activo, uma vez que este tem a capacidade de armazenar compostos aromáticos que conduzem à formação de um *pocket* ideal para a estabilização do grupo ADP da molécula de NADH (Figura 1.8 **B**). As estruturas do complexo WrbA-benzoquinona-NADH sugerem que existe um mecanismo de ligação sequencial no ciclo catalítico.

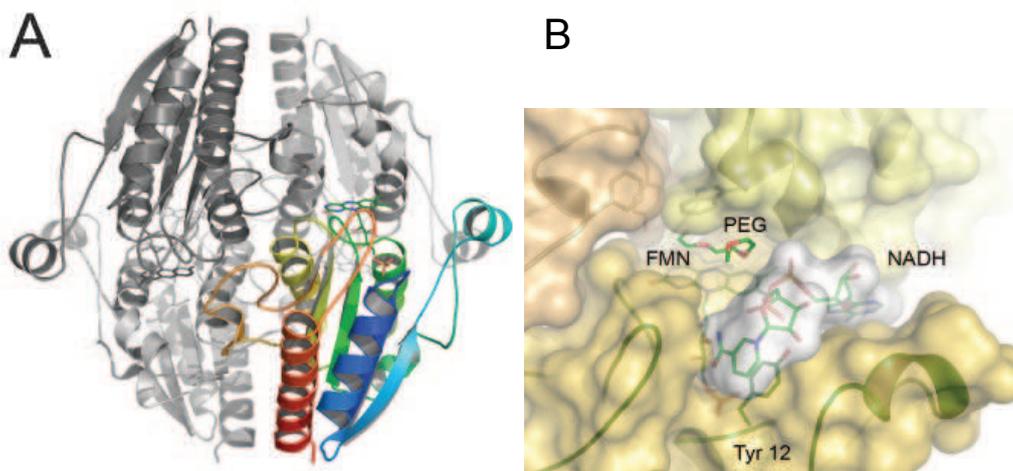


Figura 1.8 Estrutura quaternária da flavoproteína WrbA. **A)** Representação tetramérica com destaque de um monómero; **B)** Representação da interacção do anel nicotinamida do NADH com a tirosina (Tyr 12). Imagem adaptada de 64

2 Objectivos

As mini-ferritinas, devido ao facto de serem proteínas exclusivamente bacterianas e de participarem dos mecanismos de protecção celular contra ROS e de hidrólise do DNA, têm sido bastante estudadas ao longo dos últimos anos.

Os mecanismos de oxidação do ferro ferroso em *core* férrico, bem como da ligação, não específica, que é estabelecida com o DNA são já conhecidos e encontram-se bem descritos tendo como fundamento dados experimentais obtidos. No entanto, por outro lado, e ainda que seja expectável do ponto de vista funcional, não está bem estabelecida a forma como o *core* férrico formado participa na biossíntese de cofactores necessários às células. Sabe-se apenas que, para que tal aconteça, é necessário que o processo de libertação do ferro ocorra e seja fortemente regulado.

Assim, com base no conhecimento disponível na literatura e nas características dos possíveis reagentes e produtos envolvidos na libertação do ferro crê-se que a obtenção do ferro ferroso por redução do *core* férrico seja o passo essencial deste processo.

Deste modo, foram inicialmente estabelecidos os objectivos deste trabalho que se centravam no estudo mecanístico da libertação do ferro constituinte do *core*, com vista à caracterização do mesmo.

Por forma a atingir os objectivos desta Tese foi delineado um plano de trabalho de onde constam as seguintes etapas:

- Procura de um parceiro redox apropriado à interacção com a proteína Dps e com possível participação na cadeia de transferência electrónica envolvida no mecanismo de libertação do ferro em estudo:
 - Produção;
 - Caracterização bioquímica e espectroscópica por aplicação das espectroscopias de UV/Visível e Mössbauer.
- Procura de possíveis intermediários reaccionais na reacção de libertação do ferro
 - Caracterização cinética (identificação e quantificação de todas as espécies de ferro presentes)
- Caracterização do produto final da reacção e verificação da sua possível disponibilidade biológica.

3 Produção e caracterização de potenciais parceiros redox da Dps

Com o objectivo de se encontrarem potenciais parceiros redox da Dps (proveniente de *P. nautica* 617) foi, inicialmente, efectuada a análise do genoma de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* para se identificarem quais os genes que codificam proteínas específicas com essa capacidade. Assim, identificaram-se como possíveis parceiros as proteínas codificadas pelos genes com os códigos MARHY3073 e MARHY2375, utilizadas ao longo deste projecto.

3.1 Produção de proteínas recombinantes

Este capítulo tem como objectivo apresentar a sobre-expressão e purificação das proteínas utilizadas ao longo deste trabalho, as flavoproteínas 3073 e 2375 e a proteína Dps. Aqui encontram-se descritos os vários passos para a construção dos vectores de expressão de 3073 e 2375, os testes de sobre-expressão efectuados, para se poderem determinar quais as condições óptimas para a sobre-produção destas proteínas, e ainda os vários passos de purificação das mesmas. Descreve-se também a sobre-expressão e purificação da proteína Dps com base em protocolos desenvolvidos, anteriormente a este projecto pelo Grupo de Biofísica Molecular.

Proteínas 3073 e 2375

3.1.1 Subclonagem dos genes MARHY2375 e MARHY3073 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Construção dos vectores de expressão)

O primeiro passo para a subclonagem dos genes MARHY3073 (600 pb) e MARHY2375 (606 pb) de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* implicou a amplificação destes genes pela reacção em cadeia de polimerase (PCR), descrita no Anexo 7.1.

Para tal, foram desenhados oligonucleótidos iniciadores (*primers*) (Tabela 3-1) com sequências específicas para as enzimas de restrição *Sal* I e a *Nde* I, seleccionadas por não hidrolisarem o gene pretendido (Anexo 7.2 — **Figura 7.1** e **Figura 7.2**) e por isso poderem ser utilizadas durante os vários passos até à construção dos vectores de sobre-expressão. Todas as operações efectuadas foram monitorizadas por electroforese em gel de agarose de 0,8% ou 1% em TAE (tampão 40 mM Tris, 20 mM acetato, 1 mM EDTA, pH ~8,3), a 80 V e durante cerca de 1 hora e 30 minutos.

Tabela 3-1 Sequência de nucleótidos dos *primers forward* (Fwd) e *reverse* (Rev) utilizados na PCR para amplificação dos genes MARHY3073 e MARHY2375.

<i>Primers</i>		Sequência	Tamanho (pb)	Temp. fusão (T _f)
3073	Fwd	5' CCATCATATGGCGAAAATTCTTGTTCTTTACTACT 3'	35	63 °C
	Rev	5' CCATGTCGACTTAACCGTGCAGCTTGATCG 3'	30	70 °C
2375	Fwd	5' CCATCATATGACAGAAACAACCTCCCTATGTGCTGG 3'	35	68 °C
	Rev	5' CCATGTCGACTTAGTTGGCCAGTTTCAGGGCC 3'	32	72 °C

Após correcta amplificação dos genes e posterior subclonagem num vector pNZY28, de acordo com o *Kit* de clonagem NZY-A PCR, NZYTech⁶⁵, o DNA plasmídico (pDNA) foi obtido através da realização de uma Miniprep (*Kit* NZYMiniprep, NZYTech⁶⁶), tal como descrito no Anexo 7.8, após transformação de 50 µL de células competentes *E. coli* NZYStar (como indicado pelo *Kit* de clonagem NZY-A PCR, NZYTech) com 5 µL dos produtos da reacção de ligação, pNZY28—3073 e pNZY28—2375 plaqueamento em meio sólido LB/agar/ampicilina (100 µg/mL). Das colónias obtidas, 4 de pNZY28—3073 e 4 de pNZY28—2375 foram escolhidas para inocular mini-culturas de 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL em pequena escala, de onde se isolou o pDNA.

Dos clones obtidos, 25 µL de pDNA foram enviados para sequenciação para confirmar se a sequência de nucleótidos estava correcta em todos eles e assim, das 4 colónias escolhidas, anteriormente, de cada um dos genes, apenas um clone foi utilizado nos passos posteriores.

De seguida, com o objectivo de se obterem os vectores pNZY28—3073 e pNZY28—2375, bem como o vector de sobre-expressão pET-21c (Novagen, mapa do vector apresentado no Anexo 7.14), 50 µL de células *E. coli* NZY5α (NZYTech⁶⁷), protocolo apresentado no Anexo 7.4) quimicamente competentes foram transformadas com 5 µL do pDNA de cada um dos vectores, realizando-se depois a Miniprep para isolar o pDNA. A verificação das várias preparações de DNA plasmídico foram analisadas por electroforese em gel de agarose como mostra a Figura 3.1.

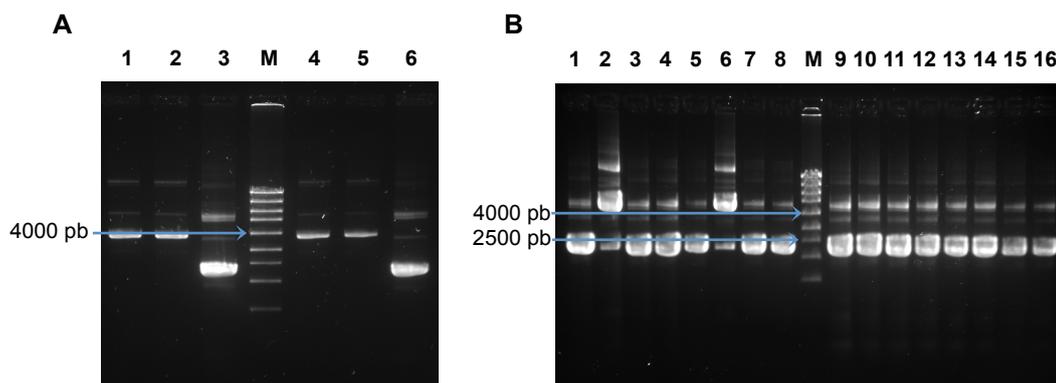


Figura 3.1 A) Verificação das Minipreps dos vectores pET-21c e pNZY28—3073. 1 e 2 — Vector pET-21c concentrado; 3 — Vector pNZY28—3073 concentrado; M — Marcador de pesos moleculares (NZYDNA *Ladder* II, NZYTech — Anexo 7.6); 4 e 5 — Vector pET-21c diluído; 6 — Vector pNZY28—3073 diluído; **B)** Verificação da Miniprep dos vectores pNZY28—3073 e pNZY28—2375. 1-4 — Vector pNZY28—3073 concentrado; 5-8 — Vector pNZY28—3073 diluído; M — Marcador de pesos moleculares (NZYDNA *Ladder* II, NZYTech); 9-12 — Vector pNZY28—2375 concentrado; 13-16 — Vector pNZY28—2375 diluído. Gel de agarose de 0,8% em TAE, 80 V, 1 h 30 min.

Após o isolamento e purificação dos pDNAs que contêm os genes pretendidos e o vector de expressão de interesse procedeu-se à realização das reacções de hidrólise dos vectores, utilizando-se para tal duas enzimas de restrição.

A hidrólise dividiu-se desta forma em duas partes uma primeira reacção efectuada com a enzima *Sal* I (10 U/ μ L, NZYTech) e uma segunda reacção com a enzima *Nde* I (10 U/ μ L, NZYTech), que foram realizadas de acordo com o procedimento descrito no Anexo 7.3.

Através da observação da Figura 3.2 é possível verificar-se a eficiência de cada uma das reacções de hidrólise, sendo que no final da segunda hidrólise se obtiveram os genes MARHY3073 e MARHY2375, com cerca de 600 pb e 606 pb, respectivamente, e o vector pET-21c com cerca de 5443 pb.

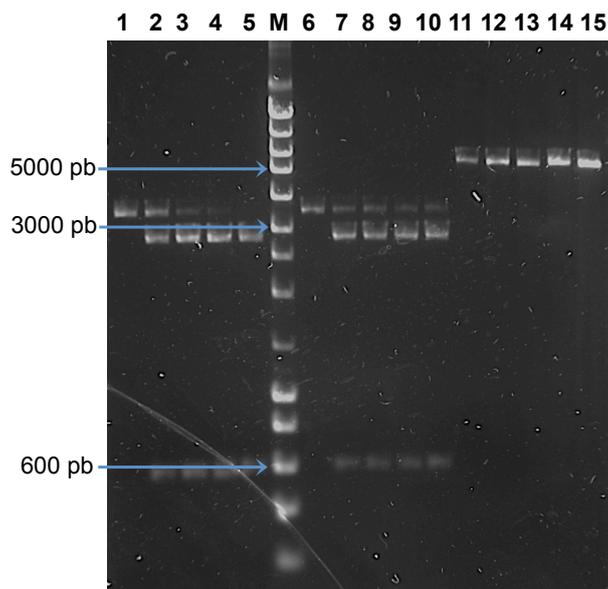


Figura 3.2 Verificação das reacções de hidrólise dos vectores com as enzimas de restrição específicas *Sal* I e *Nde* I. 1 — Primeira hidrólise com a enzima de restrição *Sal* I do vector pNZY28—3073; 2-5 — Segunda hidrólise com a enzima de restrição *Nde* I do vector pNZY28—3073; M — Marcador de pesos moleculares (NZYDNA Ladder III, NZYTech — Anexo 7.6); 6 — Primeira hidrólise com a enzima de restrição *Sal* I do vector pNZY28—2375; 7-10 — Segunda hidrólise com a enzima de restrição *Nde* I do vector pNZY28—2375; 11 — Primeira hidrólise com a enzima de restrição *Sal* I do vector pET-21c; 12-15 — Segunda hidrólise com a enzima de restrição *Nde* I do vector pET-21c. Gel de agarose de 1% em TAE, 80V, 1h40min.

Os fragmentos hidrolisados dos genes e o vector pET-21c linearizado foram de seguida purificados por *E-Gel® CloneWell™ Extraction System (Invitrogen, Life Technologies)*⁶⁸, como descrito no Anexo 7.3. Os géis de agarose para análise e estimativa da concentração dos vários fragmentos de DNA são apresentados na Figura 3.3.

Estimou-se a concentração dos fragmentos purificados, tal como apresentado no Anexo 7.9, do gene MARHY3073 nas fracções mais e menos concentrada como, 11,58 ng/μL e 1 ng/μL, respectivamente; do gene MARHY2375 como 10,87 ng/μL e 1 ng/μL e do vector linearizado pET-21c como 9,88 ng/μL e 2,38 ng/μL.

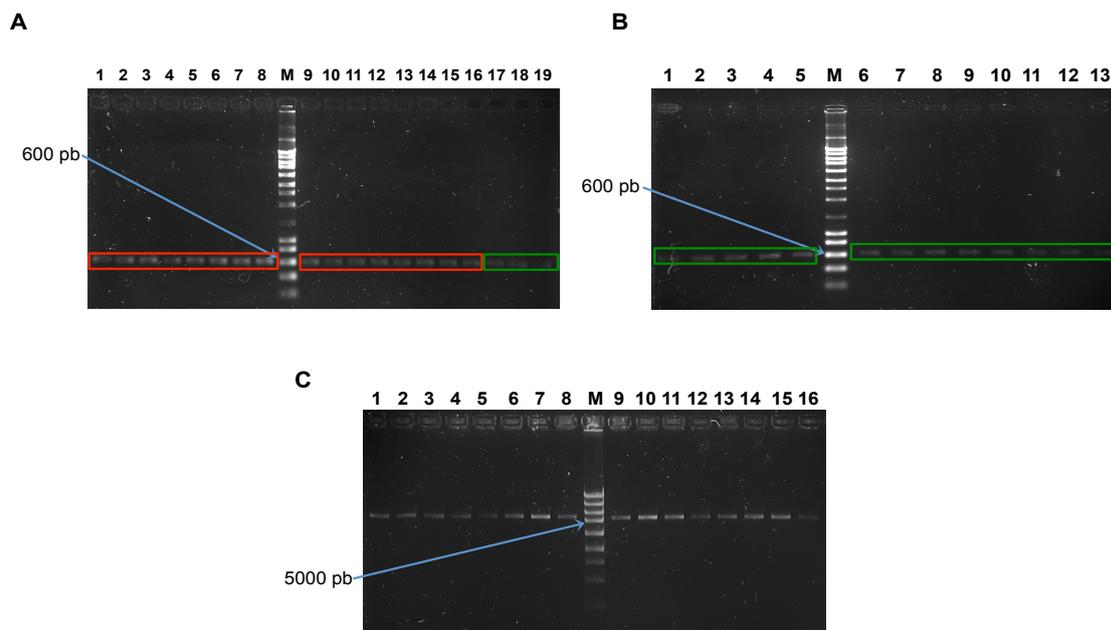


Figura 3.3 **A)** Verificação da purificação dos fragmentos contendo os genes MARHY3073 e MARHY2375. 1-8 — Gene MARHY3073, amostras concentradas; M — Marcador de pesos moleculares (NZYDNA *Ladder* III, NZYTech); 9-16 — Gene MARHY3073, amostras diluídas; 17-19 — Gene MARHY2375, amostras concentradas; **B)** Verificação da purificação do fragmento com o gene MARHY2375. 1-5 — Gene MARHY2375, amostras concentradas; M — Marcador de pesos moleculares (NZYDNA *Ladder* III, NZYTech); 6-13 — Gene MARHY2375, amostras diluídas; **C)** Verificação da purificação do vector pET-21c linearizado. M — Marcador de pesos moleculares (NZYDNA *Ladder* II, NZYTech); 6, 7 e 9-11 — Vector pET-21c, amostras concentradas; 1-5 e 12-16 — Vector pET-21c, amostras diluídas. Caixas vermelhas e verdes indicam a banda correspondente aos genes MARHY3073 e MARHY2375, respectivamente. Gel de agarose de 1% em TAE, 80 V, 1 h 30 min.

Por fim, realizou-se a reacção de ligação dos genes MARHY3073 e MARHY2375 ao vector de sobre-expressão pET-21c, linearizado e puro, catalisada pela enzima T4 DNA ligase, de acordo com o Kit T4 DNA ligase, fornecido pela NZYTech⁶⁹.

Tal como descrito na Tabela 3-2, foram efectuadas quatro reacções que foram deixadas a incubar durante a noite à temperatura ambiente, aproximadamente, 20 °C.

Tabela 3-2 Composição da reacção de ligação com a T4 DNA ligase.

	Reacção A (μL)	Reacção B (μL)	Reacção C (μL)	Reacção D (μL)
pET-21c linearizado (9,88 ng/ μL)	2	4	8	10
Gene MARHY3073 (11,58 ng/ μL)	15	13	9	7
Gene MARHY2375 (10,87 ng/ μL)				
10x Tampão da reacção	2	2	2	2
T4 DNA ligase (1 U/ μL)	1	1	1	1
Volume Total	20 μL			

Os mapas dos vectores de sobre-expressão pET-21c—3073 e pET-21c—2375 encontram-se representados nas Figura 3.4 e Figura 3.5, respectivamente. O mapa do vector de sobre-expressão pET-21c encontra-se apresentado na Figura 7.9.

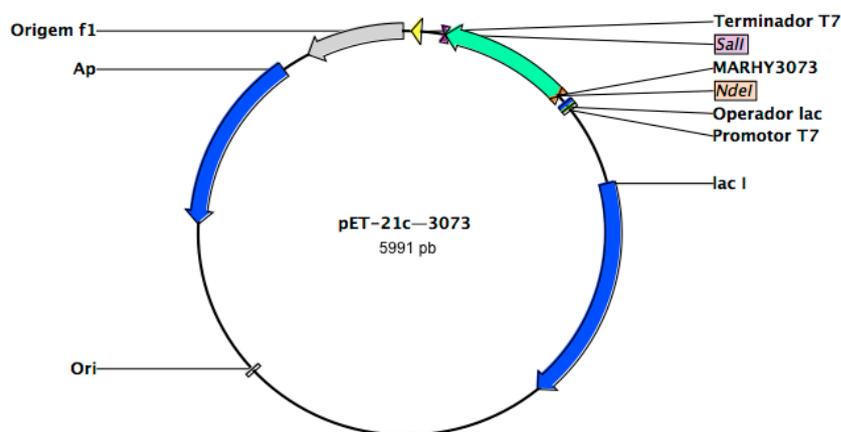


Figura 3.4 Vector de sobre-expressão pET-21c—3073 utilizando o *software* CLC Sequence Viewer.

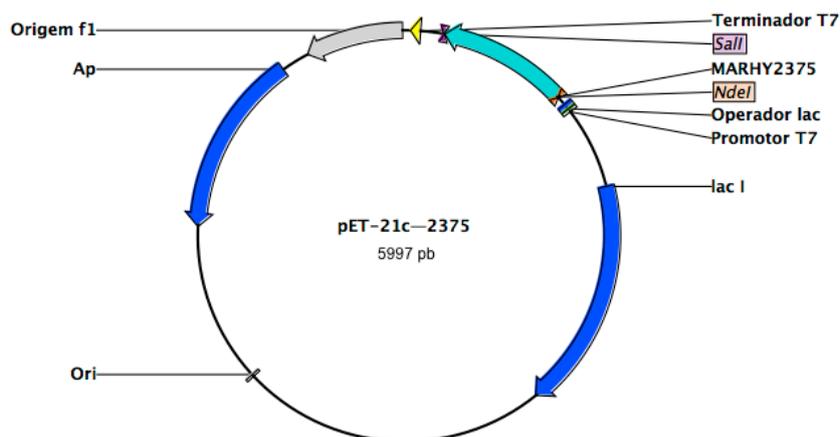


Figura 3.5 Vector de sobre-expressão pET-21c—2375 utilizando o *software* CLC Sequence Viewer.

Seguidamente, de acordo com o protocolo fornecido pela NZYTech (Anexo 7.4), 5 μ L do produto das reacções de ligação foi utilizado para transformar 50 μ L de células *E. coli* NZY5 α (NZYTech) quimicamente competentes. De entre as colónias obtidas, após crescimento em meio de cultura LB-Agar contendo 100 μ g/mL de ampicilina (Anexo 7.13.1), 5 foram seleccionadas para se isolar o pDNA através da realização de Miniprep (NZYTech, Anexo 7.8).

As sequências de nucleótidos dos genes que codificam para as proteínas em estudo foram confirmadas por sequenciação de, aproximadamente, 30 μ L de cada vector de expressão Eurofins (*Genomic Services da Eurofins*, Alemanha), alinhamento das sequências obtidas apresentado no Anexo 7.5.

3.1.2 Optimização das condições de sobre-expressão das proteínas 3073 e 2375

Com os vectores de sobre-expressão pET-21c—3073 e pET-21c—2375 construídos seguiu-se a etapa de produção, em larga escala, das proteínas.

Foram efectuados testes de sobre-expressão dos genes MARHY3073 e MARHY2375, sendo testadas várias condições: meios de cultura (LB e 2xYT), (Anexo 7.13); concentração de indutor da expressão dos genes (IPTG, NZYTech) e tempo de indução (OD_{600nm} aproximadamente igual a 0,5 e 2,0).

Todos os testes realizados foram monitorizados por electroforese em gel SDS-PAGE a 12,5% de acrilamida (Anexo 7.7), através dos quais foi verificada a produção das proteínas

3073 e 2375 sabendo-se que a massa molecular destas é de 20 936 Da e 20 950 Da, respectivamente.

Assim, 50 μ L de células competentes *E. coli* BL21(DE3) (NZYTech⁷⁰, protocolo apresentado no Anexo 7.4) foram transformados com 5 μ L de pDNA (3073 e 2375) e das colónias obtidas foi seleccionada uma colónia isolada para se efectuarem os testes de sobre-expressão das proteínas.

Para todos os testes preparou-se um pré-inóculo de 5 mL de meio de cultura LB contendo 100 μ g/mL de ampicilina (NZYTech) cuja incubação ocorreu durante a noite (cerca de 16 horas), a 37 °C com agitação de 200 rpm (incubadora I10-O+ACOP.E, OVAN). O pré-inóculo foi, posteriormente, diluído para 100 mL dos meios de cultura (1:100) contendo 100 μ g/mL de ampicilina e cresceu com agitação de 200 rpm a 37 °C.

Ao longo do crescimento efectuou-se a recolha de alíquotas das diferentes culturas antes da indução ($t = 0$); 3 horas ($t = 3$ h) e cerca de 16 h após a indução.

Os testes foram realizados através da variação de diferentes condições de sobre-expressão para cada uma das proteínas. Tendo-se mantido a indução a uma densidade óptica (OD_{600nm}) de 0,5 ou 2 e variando-se o meio de cultura utilizado e a concentração do indutor. Desta forma, tinham-se três culturas de meio de cultura LB/Ampicilina (100 μ g/mL) e outras três culturas que continham meio de cultura 2xYT/Ampicilina (100 μ g/mL) que foram induzidas a uma densidade óptica seleccionada ($OD_{600nm} = 0,5$ ou $OD_{600nm} = 2$) com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG.

Os geis com os resultados destes testes de sobre-expressão encontram-se apresentados na Figura 3.6 para a proteína 3073 e na Figura 3.7 para a 2375. As amostras aplicadas nos geis foram previamente normalizadas tal como descrito no Anexo 7.7, onde é explicitada a forma como se realiza a electroforese SDS-PAGE.

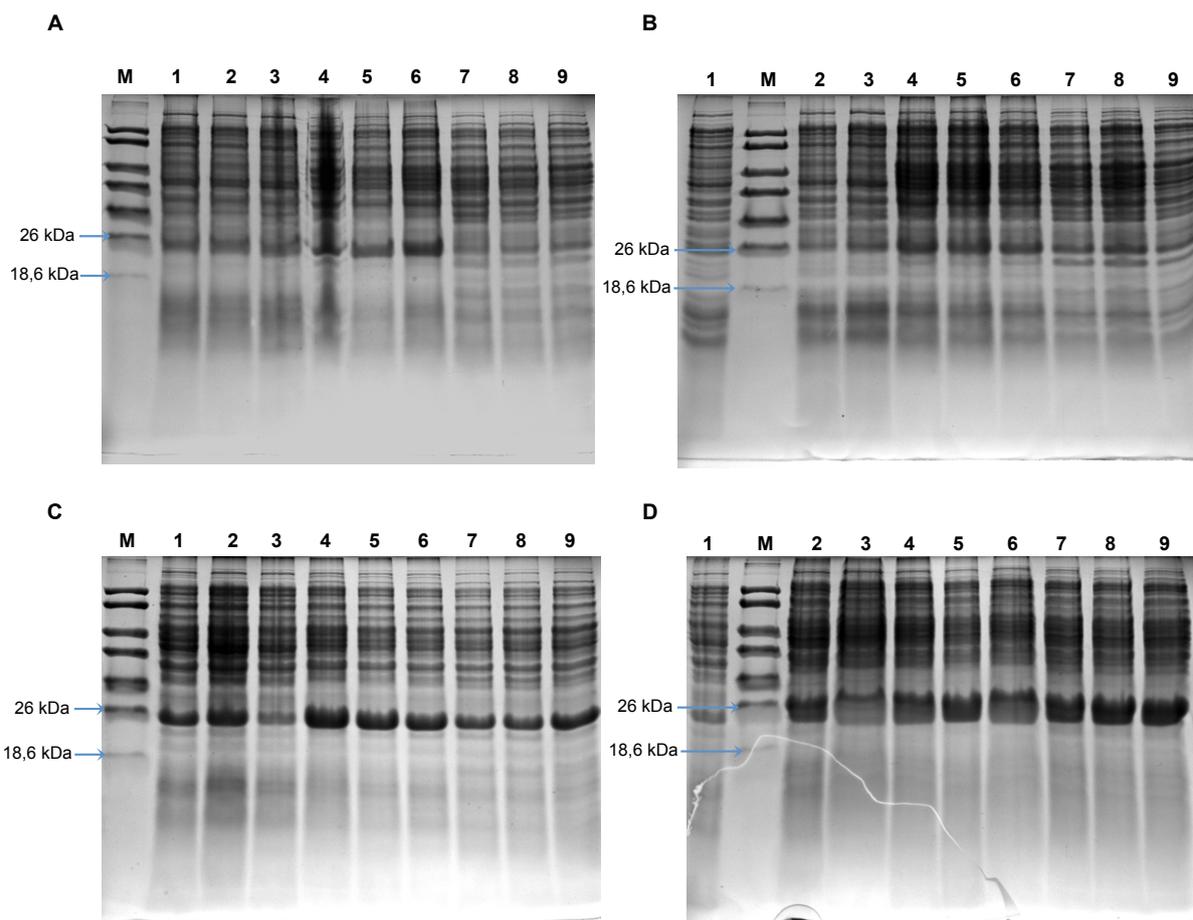


Figura 3.6 Análise do perfil de sobre-expressão da proteína 3073. **A)** Meio de cultura LB/Ampicilina com indução a baixa densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech — Anexo 7.7); 1-3 — Aliquotas antes da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 4-6 — Aliquotas após 3 h de indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 7-9 — Aliquotas após 16 h da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; **B)** Meio de cultura 2xYT/Ampicilina com indução a baixa densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Aliquotas antes da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 4-6 — Aliquotas após 3 h de indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 7-9 — Aliquotas após 16 h da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; **C)** Meio de cultura LB/Ampicilina com indução a alta densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Aliquotas antes da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 4-6 — Aliquotas após 3 h de indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 7-9 — Aliquotas após 16h da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; **D)** Meio de cultura 2xYT/Ampicilina com indução a alta densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Aliquotas antes da indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 4-6 — Aliquotas após 3 h de indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente; 7-9 — Aliquotas após 16 h de indução com 0,1 mM; 0,5 mM e 1 mM de IPTG, respectivamente. Aplicaram-se nos geis 8 μ L de cada amostra.

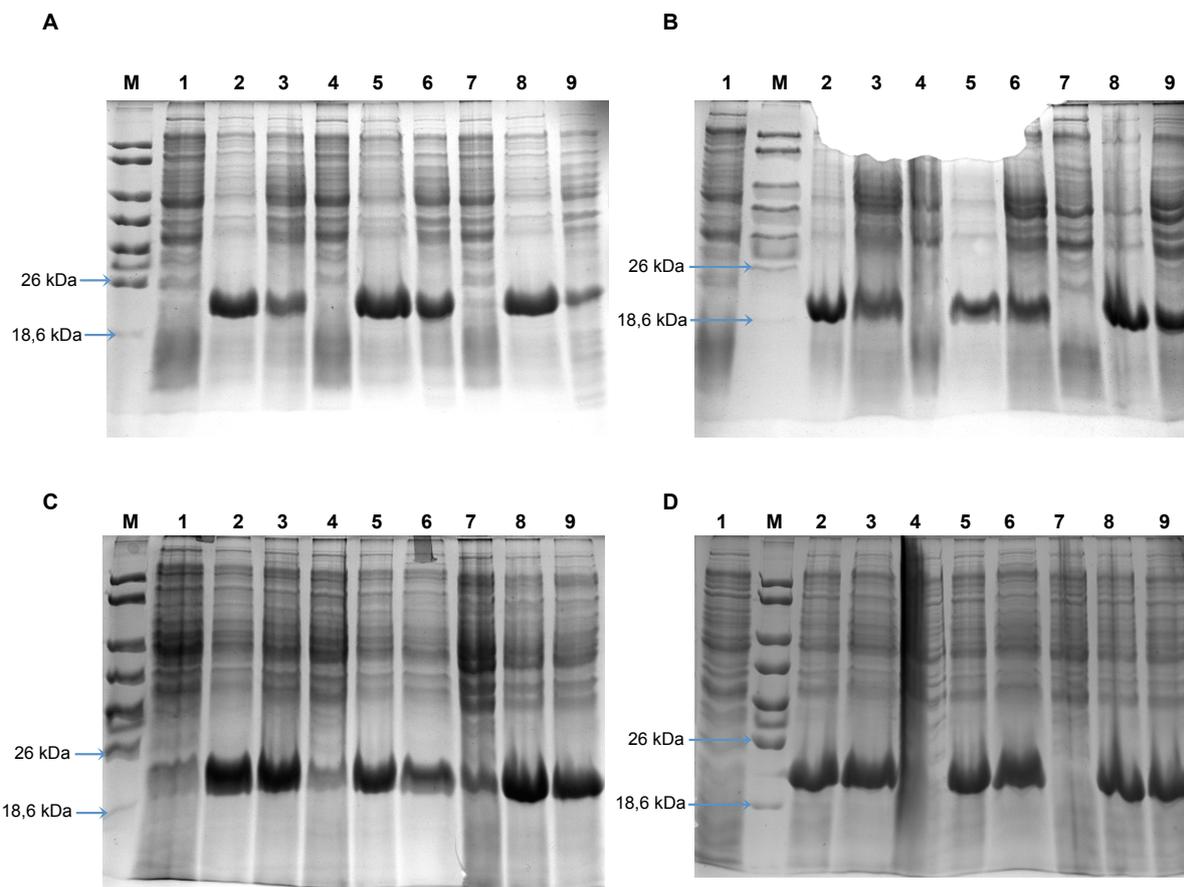


Figura 3.7 Verificação dos testes de sobre-expressão da proteína 2375. **A)** Meio de cultura LB/Ampicilina com indução a baixa densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Estudo do efeito da indução com 0,1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 4-6 — Estudo do efeito da indução com 0,5 mM de IPTG, antes da indução; 3h e 16 h após a indução, respectivamente; 7-9 — Aliquotas da indução com 1 mM de IPTG, antes da indução; 3h e 16h após a indução, respectivamente; **B)** Meio de cultura 2xYT/Ampicilina com indução a baixa densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Estudo do efeito da indução com 0,1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 4-6 — Estudo do efeito da indução com 0,5 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 7-9 — Estudo do efeito da indução com 1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; **C)** Meio de cultura LB/Ampicilina com indução a alta densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Estudo do efeito da indução com 0,1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 4-6 — Estudo do efeito da indução com 0,5 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 7-9 — Estudo do efeito da indução com 1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; **D)** Meio de cultura 2xYT/Ampicilina com indução a alta densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Estudo do efeito da indução com 0,1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 4-6 — Estudo do efeito da indução com 0,5 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente; 7-9 — Estudo do efeito da indução com 1 mM de IPTG, antes da indução; 3 h e 16 h após a indução, respectivamente. Aplicaram-se nos geis 8 μ L de cada amostra.

No caso da proteína 2375 pode-se verificar nos geis da Figura 3.7 que com meio de cultura LB/Ampicilina há uma maior expressão da proteína do que com meio de cultura 2xYT/Ampicilina, quando as culturas são induzidas a uma densidade óptica de 0,5. No caso da indução ser realizada a uma densidade óptica mais elevada ($OD_{600nm} = 2$) a expressão é bastante semelhante, para ambos os meios de cultura.

Analisando-se ainda estes géis verifica-se que a intensidade das bandas aparenta indicar que de todas as culturas com meio LB/Ampicilina, cuja indução foi efectuada a uma densidade óptica mais baixa, a que apresenta maior produção da proteína 2375 é a induzida com 0,5 mM de IPTG.

Tal como já mencionado foram realizados ainda novos testes de sobre-expressão para a proteína 3073, com o objectivo de melhor se definirem as condições para a sua produção uma vez que os primeiros testes foram pouco explícitos. Assim, efectuaram-se testes de sobre-expressão com indução a baixa ($OD_{600nm} = 0,5$) e alta ($OD_{600nm} = 2$) densidades ópticas com 0,1 mM de IPTG em culturas com diferentes meios de cultura, LB/Ampicilina e 2xYT/Ampicilina.

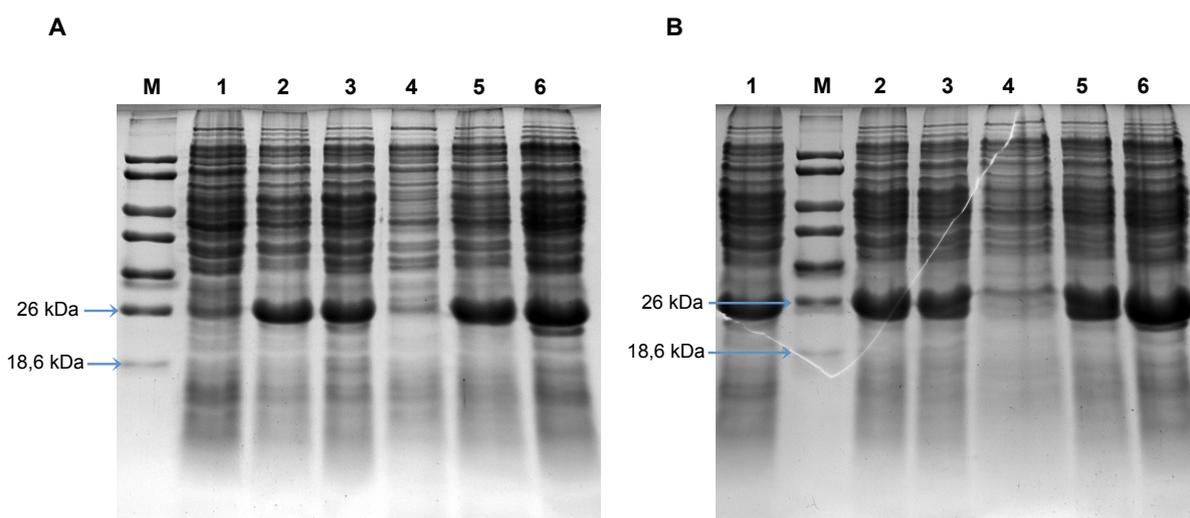


Figura 3.8 Verificação da sobre-expressão da proteína 3073. Todas as culturas foram induzidas com 0,1 mM de IPTG. **A)** Indução a baixa densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Meio de cultura LB/Ampicilina, alíquotas recolhidas antes da indução; 3 h e 16 h após indução, respectivamente; 4-6 — Meio de cultura 2xYT/Ampicilina, alíquotas recolhidas antes da indução; 3 h e 16 h após indução, respectivamente; **B)** Indução a alta densidade óptica. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-3 — Meio de cultura LB/Ampicilina, alíquotas recolhidas antes da indução; 3 h e 16 h após indução, respectivamente; 4-6 — Meio de cultura 2xYT/Ampicilina, alíquotas recolhidas antes da indução; 3 h e 16 h após indução, respectivamente. Aplicaram-se nos géis 8 μ L de cada amostra.

A análise dos resultados apresentados na Figura 3.8 indica-nos que a expressão da proteína 3073 ocorre de forma bastante semelhante em todas as condições testadas, pelo que se escolheram as condições mais favoráveis em termos de eficiência do crescimento. Assim, para efectuar essa decisão teve-se em conta a facilidade de operação em laboratório (por exemplo, a preparação do meio de cultura — Anexo 7.13) e o tempo decorrido na produção da proteína (a indução a uma densidade óptica mais elevada implica um maior tempo de crescimento até que seja atingido o valor de OD_{600nm} pretendido).

Tendo em conta os resultados obtidos, para todos os testes de sobre-expressão realizados, a expressão das proteínas foi efectuada de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3-3.

Tabela 3-3 Condições utilizadas para a expressão das proteínas 3073 e 2375, seleccionadas com base nos testes de sobre-expressão realizados.

Condições de expressão	3073	2375
Meio de cultura	LB/Ampicilina	LB/Ampicilina
Indução (OD _{600nm})	0,5	0,5
Concentração de IPTG	0,1 mM	0,5 mM
Temperatura e agitação	37 °C e 200 rpm	37 °C e 200 rpm

➤ **Produção das proteínas 3073 e 2375**

Aos 5 mL de meio de cultura LB/Ampicilina (100 µg/mL) adicionou-se a colónia seleccionada (da transformação de células *E. coli* BL21(DE3) (NZYTech) quimicamente competentes com pDNA crescidas em meio LB-Agar/Ampicilina (100 µg/mL) e incubou-se a 37 °C com agitação de 200 rpm durante 8 horas. Ao fim deste tempo efectuou-se uma diluição do pré-inóculo para 100 mL (1:100) do mesmo meio de cultura e deixou-se a incubar durante a noite (cerca de 16 horas), mantendo-se as mesmas condições de temperatura e agitação. Posteriormente, esta cultura foi diluída para 1 L (1:100) do mesmo meio de cultura e mantida com agitação de 200 rpm a 37 °C com monitorização da OD_{600nm} até se atingir o valor de, aproximadamente, 0,5. Nesse momento as culturas bacterianas foram induzidas com 0,1 mM no caso da 3073, e 0,5 mM na 2375, de IPTG e mantidas com as condições de incubação (temperatura e agitação) durante 3 horas, período após o qual se efectuou a recolha celular. As células foram recolhidas por centrifugação a 11 000 xg (centrífuga Z 36 HK, Hermle LaborTechnik), durante 10 minutos a 7 °C. O sedimento bacteriano obtido foi seguidamente ressuspenso em tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6 e conservado a -80 °C até se proceder ao passo de extracção e isolamento da proteína.

O rendimento celular foi de cerca de 4 g/L de cultura e de 2,9 g/L de cultura (peso húmido), na produção das proteínas 3073 e 2375, respectivamente.

O procedimento para a produção das proteínas encontra-se representado esquematicamente na Figura 3.9.

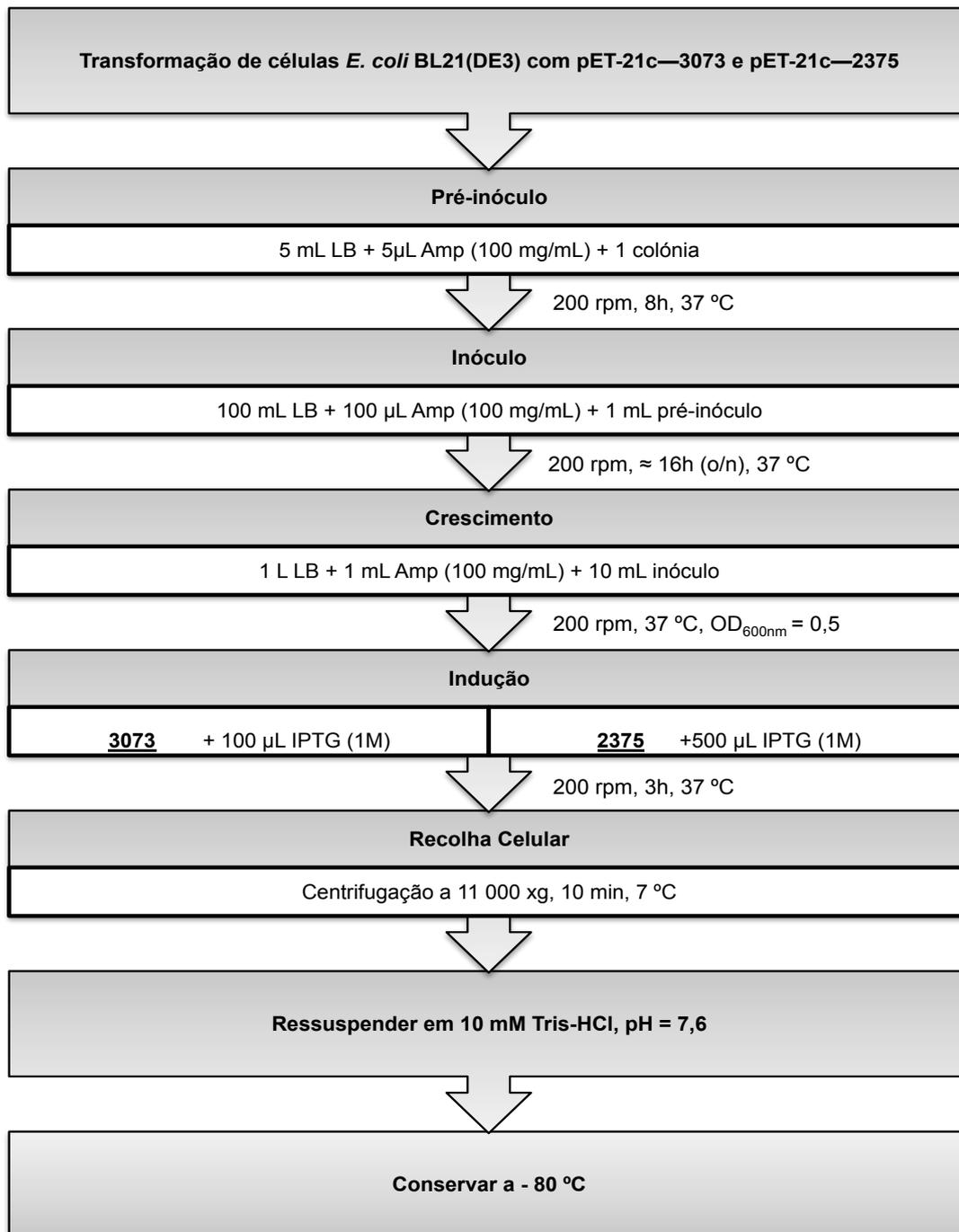


Figura 3.9 Representação esquemática do protocolo de sobre-expressão das proteínas 3073 e 2375.

O isolamento proteico iniciou-se com a lise celular realizada através de 3 ciclos de congelação/descongelação, na presença de DNase I (Roche) e com posterior sonificação (sonicador LABSONIC M, Sartorius). A suspensão celular foi em seguida centrifugada a 10 000 xg (centrífuga Z 36 HK, Hermle LaborTechnik) durante 10 minutos a 7 °C. O sobrenadante obtido foi ainda ultracentrifugado a 42 000 rpm (centrífuga Optima LE-80K com rotor 70Ti, Beckam) durante 1 hora e 30 minutos a 4 °C. Este último sobrenadante corresponde à fracção proteica solúvel e foi utilizado em seguida para se proceder à purificação das proteínas.

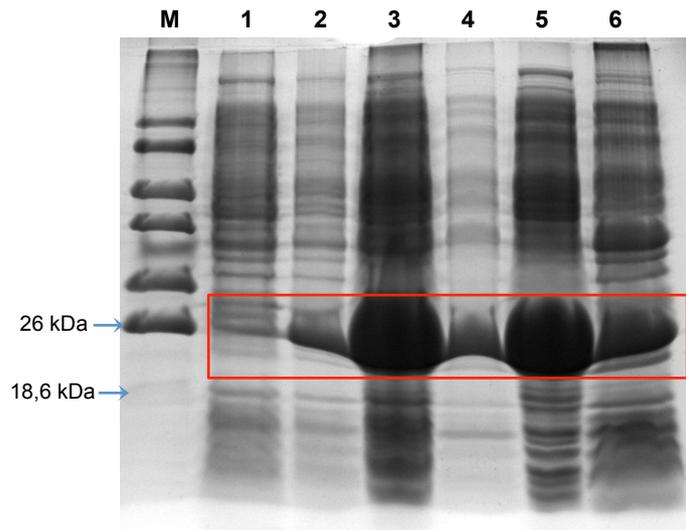


Figura 3.10 Perfil da produção da proteína 3073. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1 — Cultura celular antes da indução com IPTG; 2 — Cultura celular 3 h após a indução com 0,1 mM de IPTG; 3 e 4 — Sobrenadante e *pellet* da centrifugação a baixa velocidade, respectivamente; 5 — Sobrenadante da ultracentrifugação; 6 — *Pellet* da ultracentrifugação. Aplicaram-se no gel 8 μ L de cada amostra. A caixa vermelha indica a banda correspondente à proteína 3073.

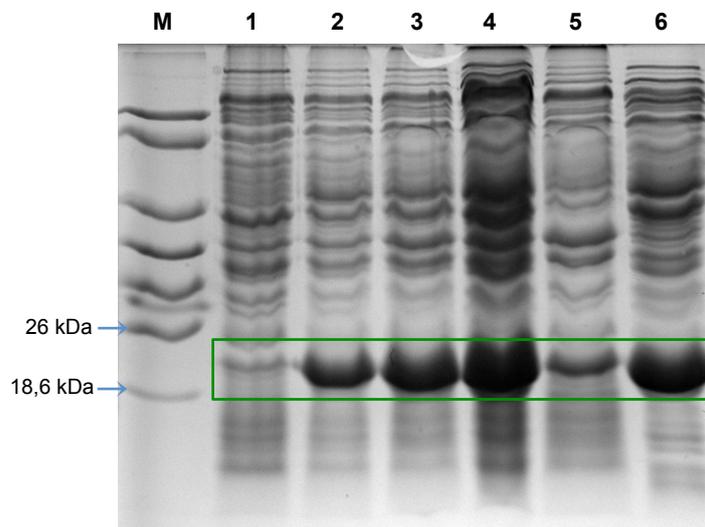


Figura 3.11 Perfil electroforético da produção da proteína 2375. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1 — Cultura celular antes da indução com IPTG; 2 — Cultura celular 3 h após a indução com 0,5 mM de IPTG; 3 — *Pellet* da centrifugação a baixa velocidade; 4 — Sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; 5 — *Pellet* da ultracentrifugação; 6 — Sobrenadante da ultracentrifugação. Aplicaram-se no gel 8 μ L de cada amostra. A caixa verde indica a banda correspondente à proteína 2375.

A análise dos perfis electroforéticos da produção das proteínas 3073 e 2375 representados na Figura 3.10 e Figura 3.11, respectivamente, permite-nos concluir, pela presença de uma banda mais intensa a cerca de 20 kDa no sobrenadante da ultracentrifugação, que ambas as proteínas foram expressas numa forma solúvel e em larga escala.

3.1.3 Purificação das proteínas 3073 e 2375

Com a obtenção das proteínas numa forma solúvel, tal como pretendido, foi possível passar ao passo seguinte, o da purificação das amostras obtidas.

➤ Purificação da proteína 2375

A proteína 2375 foi, inicialmente, purificada por cromatografia de permuta iónica em coluna preparativa de resina aniónica (DEAE – *Sepharose fast flow*, GE Healthcare, Life Sciences), tal como descrito detalhadamente no Anexo 7.10.

Pela aplicação *ProtParam tool* (ExPaSy) determinou-se que o ponto isoeléctrico da proteína é igual a 6,28. Uma vez que esta se encontrava num tampão com pH = 7,6 possui carga negativa, o que permitiu realizar a purificação com a resina mencionada.

A proteína foi purificada por aplicação de um gradiente linear descontínuo de tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl — Tampão B, estando o seu perfil de eluição apresentado na Figura 3.12.

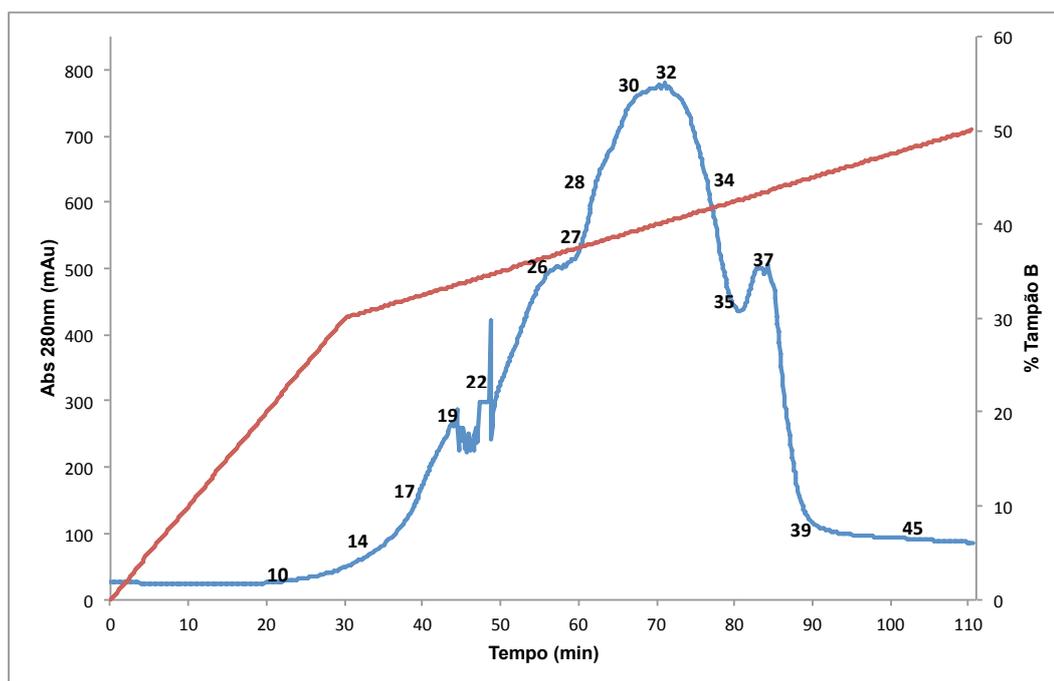


Figura 3.12 Perfil de eluição da purificação da proteína 2375 em coluna DEAE-Sepharose FF. — Absorvância a 280 nm; — % de Tampão B (10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl). A numeração representada corresponde a algumas das fracções recolhidas (12 mL/tubo) de proteína eluída.

Uma vez que se desconhecia qual o comportamento desta proteína durante a eluição, o gradiente foi realizado com base no protocolo já efectuado para a Dps desenvolvido anteriormente a este projecto (Anexo 7.10.1) com esta mesma coluna cromatográfica. Desta forma, o comportamento da proteína 2375 foi monitorizado ao longo

da eluição e verificou-se pela análise em tempo real do cromatograma (apresentado na Figura 3.12) que toda a proteína foi eluída até, cerca de, 50% de tampão B. Assim, nesse momento interrompeu-se o gradiente previamente definido e aumentou-se a percentagem de tampão para 100%. Em simultâneo foi também interrompida a recolha das amostras nos tubos e prosseguiu-se com os restantes passos do protocolo.

As fracções recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE (12,5% em acrilamida) com o objectivo avaliar a pureza das mesmas (Figura 3.13).

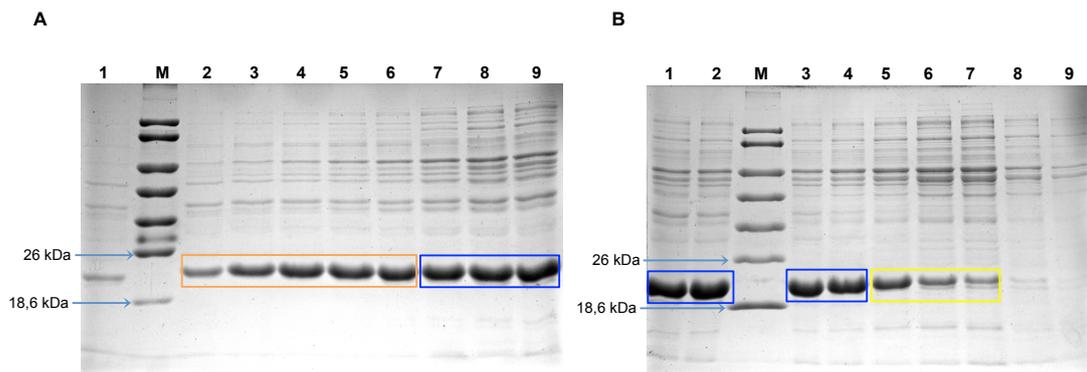


Figura 3.13 Análise do 1º passo cromatográfico em coluna DEAE-Sepharose FF da proteína 2375 por electroforese SDS-PAGE. **A)** 1 — Fracção 21; 2-9 — Fracções 22 a 29. **B)** 1 e 2 — Fracções 30 e 31; 3-9 — Fracções 32 a 38. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); Aplicaram-se nos géis 9 µL de cada amostra. As caixas indicam quais as fracções que se juntaram numa só fracção global: Laranja — Fracção I; Azul — Fracção II e Amarelo — Fracção III.

Com base nos géis realizados (estando aqui representados apenas os géis das fracções que continham proteína) verificou-se que houve uma boa separação proteica, com a presença de alguns contaminantes em solução. De acordo com a análise do cromatograma (Figura 3.12) e dos géis de electroforese (Figura 3.13) procedeu-se à junção das fracções 22-26 (Fracção I); fracções 27-33 (Fracção II) e fracções 34-36 (Fracção III), que foram eluídas entre 35-37% de tampão B; 37-41% de tampão B e 41-43% de tampão B, respectivamente. Decidiu-se prosseguir com a purificação em coluna de exclusão molecular.

Seguidamente, estas fracções (I, II e III) foram concentradas numa célula de ultrafiltração *Vivaspin* de 20 mL com *MWCO* de 5 kDa (GE Healthcare), por centrifugação a 8000 xg a 7 °C, e filtradas em filtro de membrana de 0,45 µm antes de serem aplicadas numa coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) com, cerca de, 83 mL e limites de exclusão molecular entre 10 e 600 kDa. O tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl foi utilizado para eluir a proteína de acordo com o protocolo descrito no Anexo 7.10.2.

Foram realizadas várias aplicações (5 mL cada) de cada uma das fracções da proteína 2375 na coluna. Na Figura 3.14 encontra-se representado, como exemplo, um dos

cromatograma obtidos para uma das fracções purificadas (Fracção I), onde é possível visualizar o perfil de eluição da purificação da proteína 2375.

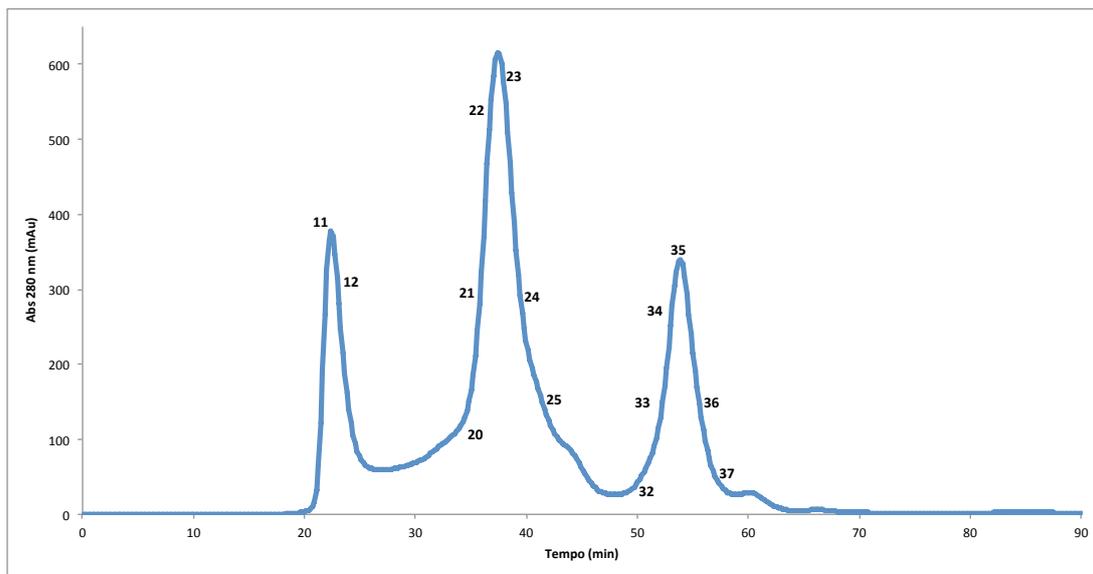


Figura 3.14 Cromatograma com perfil de eluição da proteína 2375 (Fracção I) por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. — Absorvância a 280 nm. Ao longo do cromatograma encontram-se assinaladas todas as fracções que foram verificadas por SDS-PAGE.

Pela observação e análise do cromatograma verifica-se que ocorreu uma boa separação proteica, existindo uma boa definição de cada um dos picos apresentados. Aqui, tal como na purificação anterior, também foi necessário efectuar a verificação das fracções recolhidas por SDS-PAGE. Tal como no caso do cromatograma também aqui se encontram representados na Figura 3.15, como exemplo, os géis apenas da purificação da Fracção I da proteína em estudo.

Pela observação directa das fracções recolhidas verificou-se ainda que ocorreu a perda do cofactor (FMN) por parte da proteína. As fracções com coloração amarela (cor característica do cofactor) foram eluídas da coluna após a eluição da proteína, fracções 32-37 e 20-25, respectivamente. Este facto foi confirmado pela electroforese (Figura 3.15 — B), pois as fracções com coloração amarela não apresentam qualquer vestígio da proteína 2375 que se encontra apenas nas fracções incolores já mencionadas. De forma a sustentar ainda melhor este facto foram traçados espectros UV/Visível das fracções 32 a 37 (espectros apresentados na Figura 3.16), que quando comparados com o espectro do FMN (AppliChem), apresentado na Figura 7.10 (Anexo 7.15), permitiram confirmar a presença do cofactor através das bandas características deste aos comprimentos de onda de, cerca de, 265 nm; 370 nm e 440 nm.

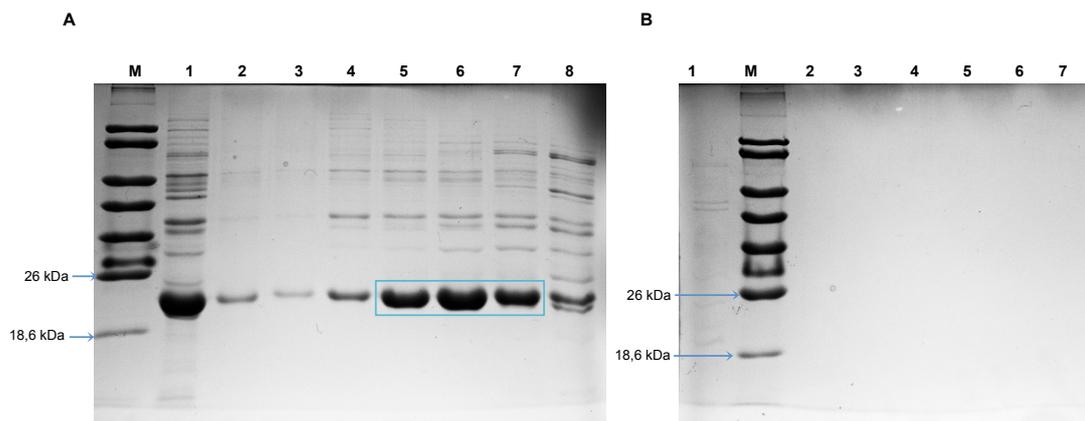


Figura 3.15 Verificação por electroforese SDS-PAGE da purificação da Fracção I da proteína 2375 em coluna Superdex 200 (filtração em gel). **A)** 1 — Fracção I de 2375 aplicada na coluna; 2 — Fracção 11; 3 — Fracção 12; 4-8 — Fracções 20 a 24. A caixa a azul indica a banda correspondente à proteína 2375 das fracções que se juntaram. **B)** 1 — Fracção 25; 2-7 — Fracções 32 a 37. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech). Aplicaram-se 7 μ L de cada amostra.

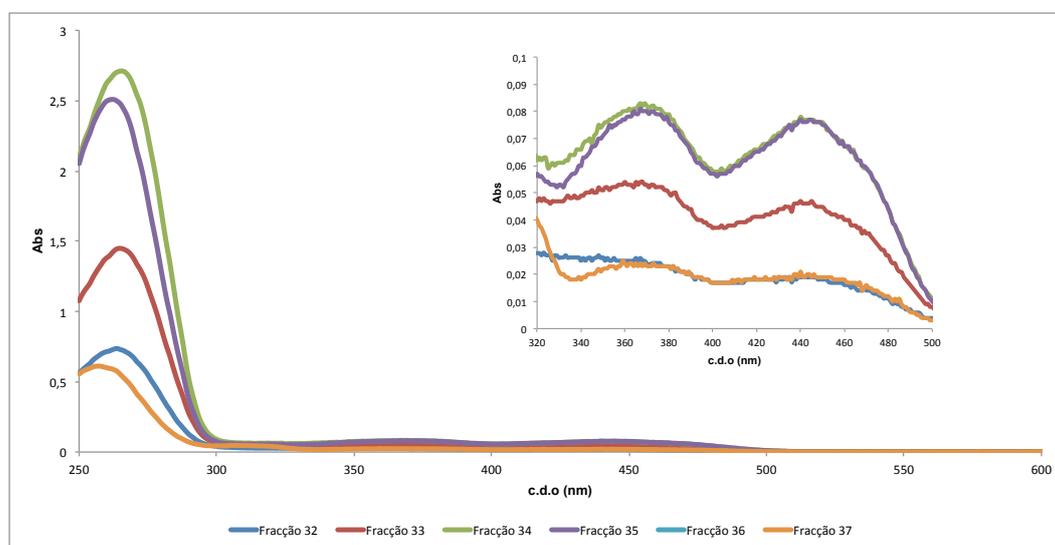


Figura 3.16 Espectros de UV/Visível das Fracções 32 a 37 da proteína 2375 em tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl. Linha de base foi traçada com o mesmo tampão em que se encontra a proteína.

Com base nos cromatogramas e nos geis das electroforeses de todas as fracções de 2375 purificadas juntaram-se as fracções recolhidas, tendo-se no final obtido um total de quatro fracções. As Fracções 1 a 4 são resultado da purificação das Fracções I; II e III e os seus perfis electroforéticos estão apresentados na Figura 3.17.

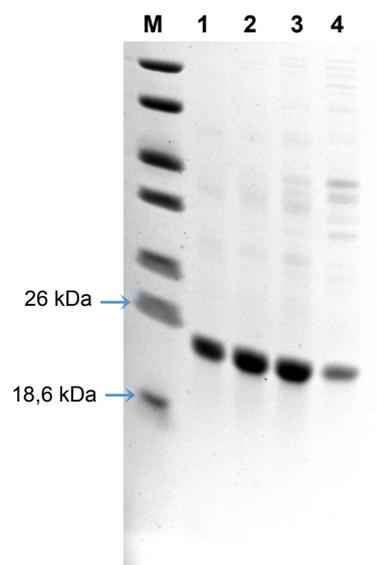


Figura 3.17 Electroforese SDS-PAGE, em gel *pre-cast* de 12% de acrilamida, das fracções globais da proteína 2375 purificada. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1-4 — Fracção 1 a Fracção 4.

Analisando-se o gel das fracções globais da proteína 2375 decidiu-se juntar as Fracções 1; 2 e 3 numa única nova fracção. Assim, ficou-se apenas com duas Fracções (1 e 2) da proteína 2375 purificada, fracções estas que foram utilizadas ao longo do trabalho nos diferentes estudos efectuados.

O rendimento da purificação foi de 73 mg de flavoproteína 2375 / L de cultura.

➤ Purificação da proteína 3073

Pela aplicação *ProtParam tool* (ExPaSy) determinou-se que o ponto isoelétrico da proteína 3073 é igual a 5,46 e uma vez que a proteína se encontra num tampão com pH = 7,6 esta possui carga negativa, o que possibilita a purificação por cromatografia de permuta iónica numa coluna com resina aniónica, tal como foi efectuado para a proteína 2375.

Assim a coluna utilizada foi também a DEAE – *Sepharose fast flow* (GE Healthcare, Life Sciences) e a purificação foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Anexo 7.10. No entanto, e com o conhecimento adquirido na purificação da proteína 2375, a eluição da proteína 3073 não ocorreu por aplicação de um gradiente descontínuo mas sim de um gradiente linear contínuo até 70% de tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl — Tampão B (aproximadamente, 600 mL) e posterior aumento da percentagem de tampão B até 100%, onde permaneceu até tudo ser eluído da coluna (cerca de, 100 mL). O perfil de eluição da proteína está apresentado na Figura 3.18.

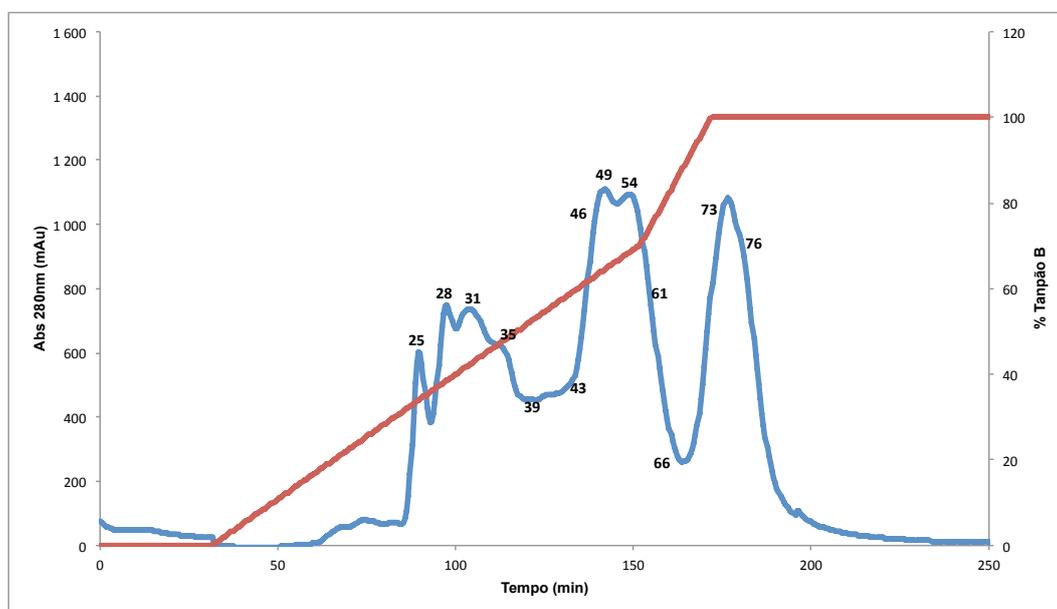


Figura 3.18 Perfil de eluição da purificação da proteína 3073 em coluna DEAE-Sepharose FF. — Absorvância a 280 nm; — % de Tampão B (10 mM Tris-HCl, pH = 7,6, 500 mM NaCl). A numeração representada corresponde a algumas das fracções recolhidas com 12 mL de proteína eluída.

A informação obtida através do cromatograma é complementada com a verificação da purificação por electroforese SDS-PAGE (Figura 3.19 — com representação apenas dos géis que continham fracções com proteína, tendo as restantes fracções recolhidas sido descartadas), com o objectivo de identificar a presença de outras proteínas (contaminantes) e a quantidade relativa de proteína 3073 nas fracções recolhidas.

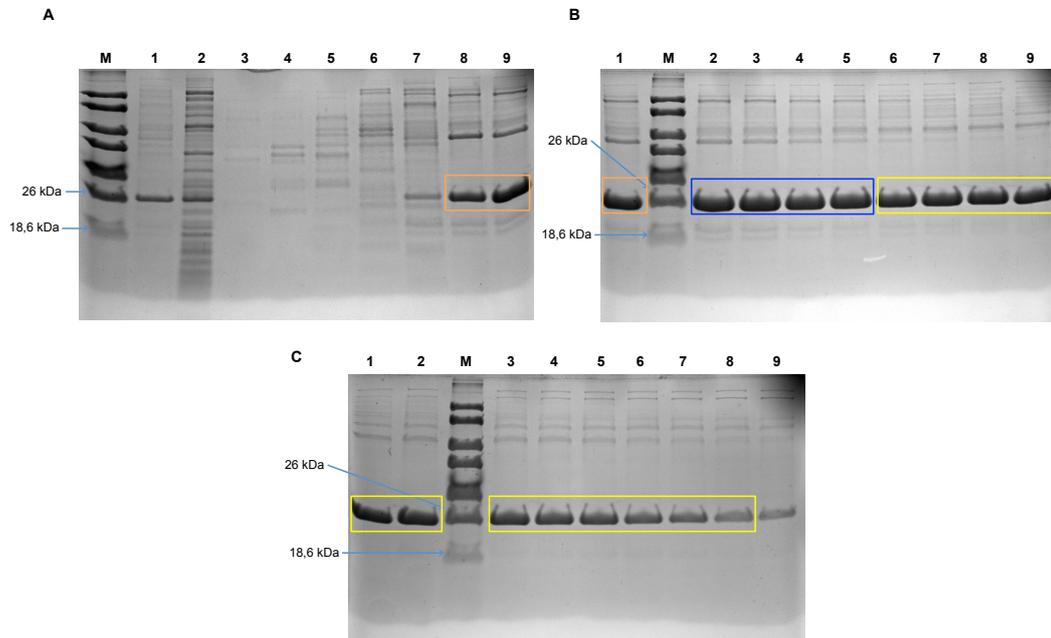


Figura 3.19 Verificação por electroforese SDS-PAGE da purificação em coluna DEAE-Sepharose FF da proteína 3073. **A)** 1 — Proteína aplicada na coluna (extracto dialisado e filtrado); 2 — Fracção recolhida no passo de lavagem da coluna com tampão A (10 mM Tris-HCl, pH= 7,6); 3-9 — Fracções 25, 28, 31, 35, 39, 43, e 44, respectivamente; **B)** 1 — Fracção 45; 2-9 — Fracções 46 a 53; **C)** 1-3, e 4 — Fracções 63 a 65, e 66; 5-8 — Fracções 73 a 76. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech). Aplicaram-se 5 μ L de cada amostra. As caixas indicam quais as fracções que se juntaram: Laranja — Fracção I; Azul — Fracção II e Amarelo — Fracção III.

De acordo com a análise do cromatograma (Figura 3.18) e dos géis (Figura 3.19), procedeu-se à junção das fracções 43-45 (Fracção I); fracções 46-49 (Fracção II) e fracções 54-61 (Fracção III), que foram eluídas a, cerca de, 59-61% de tampão B; 62-64% de tampão B e 67-75% de tampão B, respectivamente.

Verificou-se que houve uma boa separação proteica e que as fracções obtidas apresentam apenas uma pequena quantidade de contaminantes em solução, tendo-se prosseguido para novo passo de purificação por cromatografia de exclusão molecular.

As fracções (I; II e III) foram concentradas em *Vivaspin* de 20 mL com *MWCO* de 10 kDa (GE Healthcare), por centrifugação a 8000 xg a 7 $^{\circ}C$, e filtradas em filtro de membrana de 0,45 μm antes de serem aplicadas na coluna cromatográfica de filtração em gel (Superdex 200 10/300 GL, GE Healthcare).

Para a eluição da proteína utilizou-se o tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl, de acordo com o protocolo descrito no Anexo 7.10.2.

Foram efectuadas três aplicações na coluna, uma correspondente a cada uma das três fracções, anteriormente obtidas da purificação por cromatografia de permuta iónica, estando representado na Figura 3.20 o perfil de eluição dessas mesmas fracções da proteína 3073 em coluna de filtração em gel.

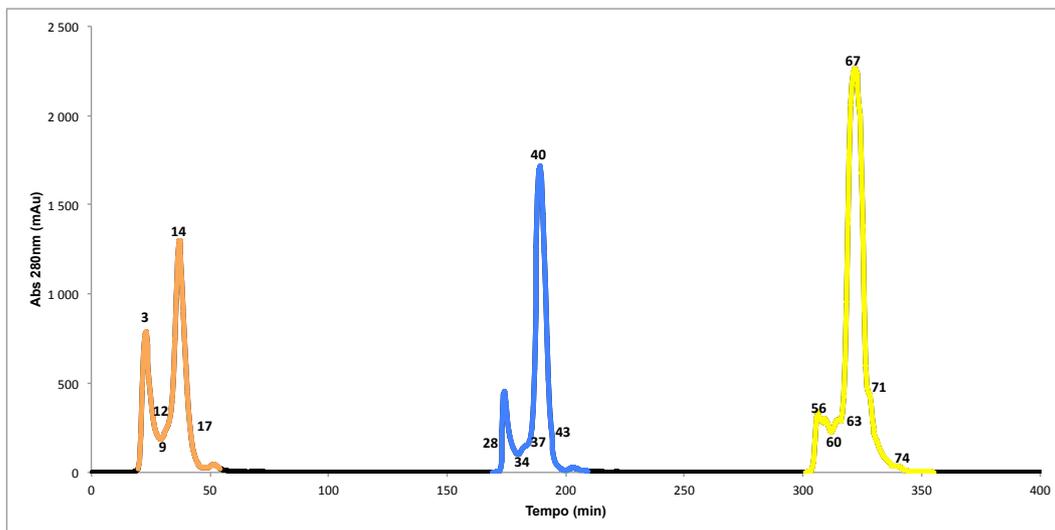


Figura 3.20 Perfil de eluição da coluna Superdex 200 para purificação da proteína 3073. — Absorvância a 280 nm, Fracção I; — Absorvância a 280 nm, Fracção II; — Absorvância a 280 nm, Fracção III. Ao longo do cromatograma encontram-se assinaladas algumas das fracções que foram verificadas por electroforese SDS-PAGE.

Pela análise do cromatograma verifica-se uma boa separação proteica, que veio a ser confirmada pela verificação das fracções recolhidas por electroforese de SDS-PAGE.

Na Figura 3.21 encontra-se representada, como exemplo, a electroforese das fracções recolhidas durante a purificação da Fracção I e pela análise do gel foi possível identificar quais as que continham uma maior quantidade relativa da proteína 3073 e decidir como juntar essas mesmas fracções.

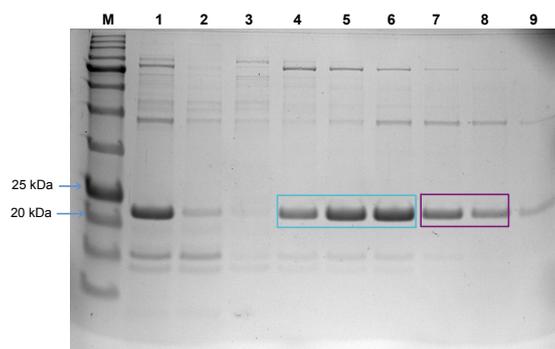


Figura 3.21 Verificação por electroforese SDS-PAGE da purificação da Fracção I da proteína 3073 em coluna Superdex 200 (filtração em gel). M — Marcador de pesos moleculares (*NZYColour Protein Marker II*, NZYTech); 1 — Fracção aplicada na coluna; 2 — Fracção 3; 3 — Fracção 9; 4-9 — Fracções 12 a 17. As caixas, a azul claro e roxo, indicam quais das fracções recolhidas foram juntas dando origem às Fracções 1 e 2, respectivamente.

Juntaram-se as fracções recolhidas com base na informação dos cromatogramas e electroforese de todas as fracções de 3073 purificadas, tendo-se no final obtido um total de quatro fracções (Fracções 1 a 4), cujos perfis electroforéticos estão apresentados na Figura 3.22.

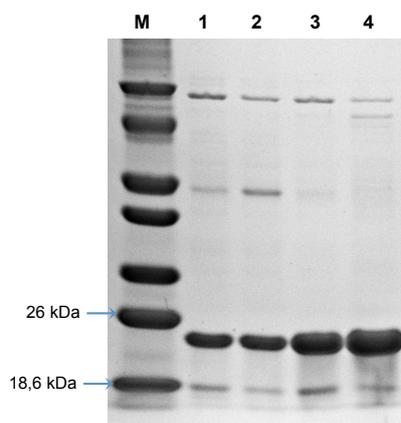


Figura 3.22 Electroforese SDS-PAGE, em gel *pre-cast* de 12% de acrilamida, das fracções globais da proteína 3073 purificada. M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight (LMW)*, NZYTech); 1-4 — Fracção 1 a Fracção 4.

As quatro fracções aqui apresentadas foram conservadas e utilizadas ao longo do projecto nos diversos estudos efectuados. O rendimento da purificação foi de 79,35 mg de flavoproteína 3073 / L de cultura.

3.1.4 Caracterização das proteínas 3073 e 2375

Após obtenção das fracções puras das proteínas 3073 e 2375 (apresentadas na Tabela 3-4) procedeu-se à caracterização destas, tal como seguidamente apresentado.

Tabela 3-4 Apresentação de todas as fracções puras obtidas das proteínas 3073 e 2375.

Proteínas	
3073	Fracção 1
	Fracção 2
	Fracção 3
	Fracção 4
2375	Fracção 1
	Fracção 2

3.1.4.1 Espectros de UV/Visível e Quantificação das proteínas

- **Proteína 3073**

Foram traçados espectros de UV/Visível (230 a 800 nm) das quatro fracções puras da proteína 3073, apresentados na Figura 3.23, com o objectivo de a caracterizar através desta espectroscopia. Verificando-se, pelas bandas características do mesmo, em que fracção o cofactor está em maior quantidade.

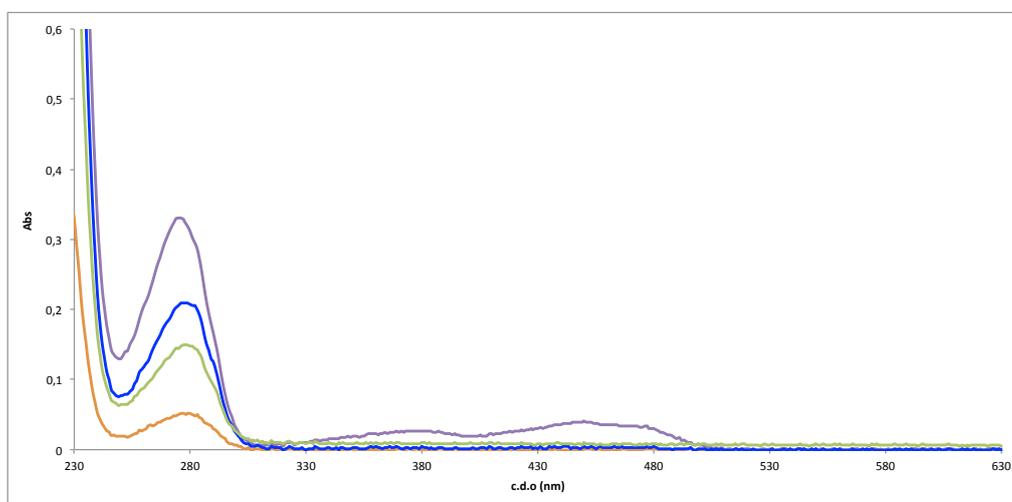


Figura 3.23 Espectros de UV/Visível da proteína 3073 em tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6 (diluição 1:50,5). — Fracção 1; — Fracção 2; — Fracção 3; — Fracção 4. Linha de base traçada com o mesmo tampão em que se encontra a proteína.

A proteína foi quantificada pelo Método do BCA, que foi realizado, sem alterações, com base no protocolo descrito no Anexo 7.11.2.

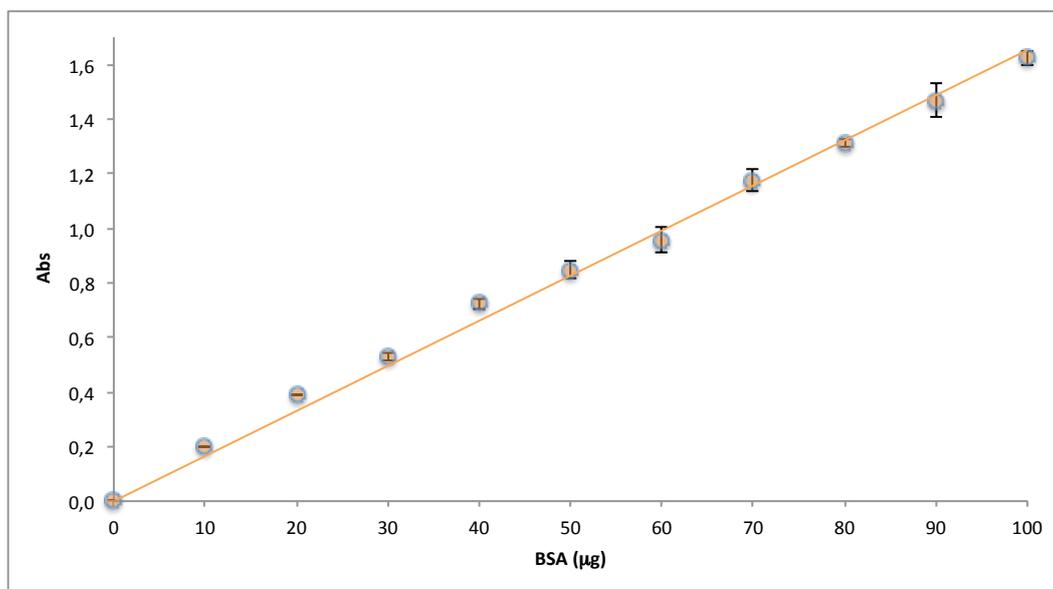


Figura 3.24 Recta de calibração utilizada para a determinação da concentração da proteína 3073 pelo método colorimétrico do BCA. Proteína padrão, BSA (solução *stock*, 1 mg/mL) diluída em água, $Abs=0,0165 \times BSA(\mu g)$, $R^2 = 0,9954$.

Na Figura 3.24 encontra-se representada a curva de calibração com a proteína padrão BSA, através da qual se determinou a concentração da proteína como $354,9 \pm 15,0 \mu M$ na Fracção 1; $169,2 \pm 13,9 \mu M$ na Fracção 2; $504,8 \pm 40,04 \mu M$ na Fracção 3 e $828,9 \pm 67,2 \mu M$ na Fracção 4.

Com base na concentração calculada foi determinado o coeficiente de extinção molar da proteína a 280 nm, sendo o seu valor experimental igual a $(1,90 \pm 0,27) \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$, que está próximo do valor teórico $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,99 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (*ProtParam tool* (ExPaSy)).

- **Proteína 2375**

Das duas fracções obtidas da proteína 2375, apenas a Fracção 1 foi utilizada nos estudo efectuados ao longo deste projecto. Apesar de ambas as fracções estarem puras, a 1 foi seleccionada porque, como foi possível verificar pela Figura 3.17, encontra-se mais concentrada e existe em maior quantidade (Fracção 1 — 22 mL e Fracção 2 — 5 mL).

No entanto, a Fracção 2 foi também analisada e quantificada antes de ser conservada a -80 °C. Traçou-se o espectro de UV/Visível desta fracção (não apresentado) e através da Lei de Lambert-Beer, como descrito no Anexo 7.11.1, determinou-se a concentração de 181,5 µM (foi utilizado para o cálculo o valor de $\epsilon_{280\text{ nm}} = 1,86 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, determinado através da aplicação *ProtParam tool* (ExPaSy)).

A Fracção 1, uma vez que seria utilizada nos estudos futuros foi primeiramente, concentrada em célula de ultrafiltração *Vivaspin* de 20 mL com *MWCO* de 5 kDa (GE Healthcare), como já anteriormente descrito, e seguidamente dialisada contra tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, durante a noite a 4 °C.

O espectro UV/Visível desta fracção dialisada foi traçado e encontra-se apresentado na Figura 3.25).

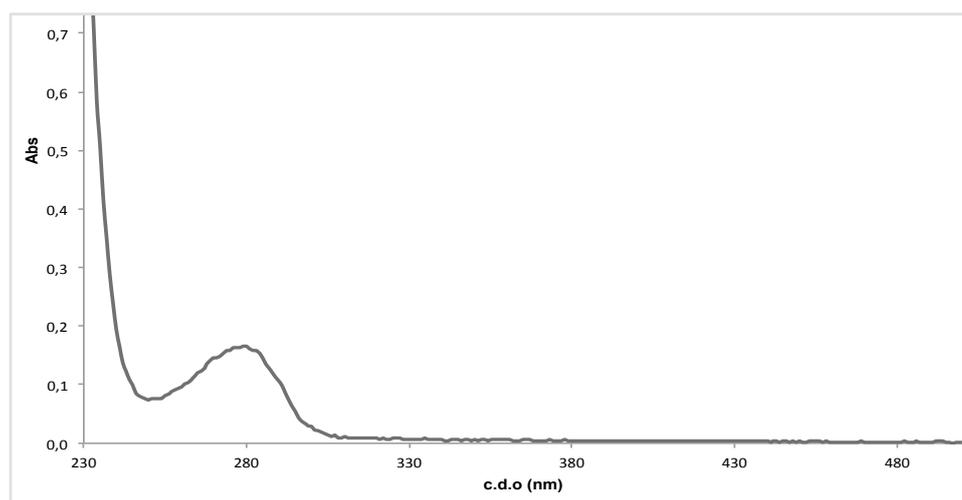


Figura 3.25 Espectro de UV/Visível da Fracção 1 da proteína 2375 em tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6 (diluição 1:67). Linha de base traçada com o mesmo tampão em que se encontra a proteína.

De seguida, efectuou-se a quantificação desta mesma fracção da proteína pelo método colorimétrico do BCA.

Na Figura 3.26 é possível visualizar a recta de calibração com BSA utilizada (medição das amostras padrão a 562 nm).

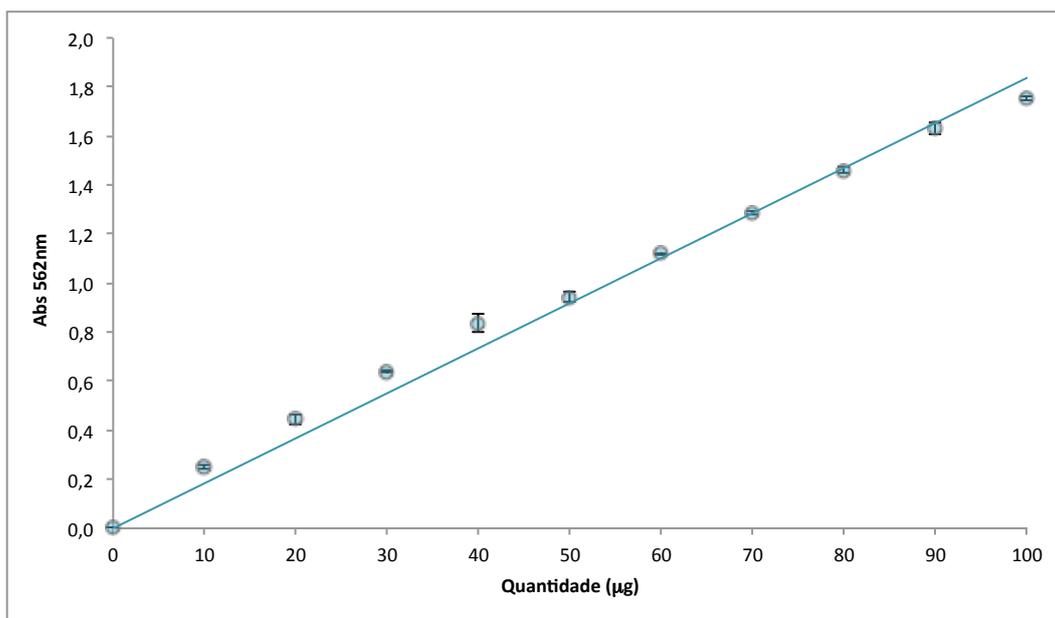


Figura 3.26 Recta de calibração utilizada para a determinação da concentração da proteína 2375 pelo método colorimétrico do BCA. Proteína padrão, BSA (solução *stock*, 1 mg/mL) diluída em água, $Abs=0,0184 \times BSA(\mu g)$, $R^2 = 0,9886$.

Assim, após medição das amostras da proteína em estudo a 562 nm a concentração foi determinada utilizando a equação da curva de calibração da Figura 3.26 como sendo igual a $746,8 \pm 47,7 \mu M$.

3.1.4.2 Reconstituição da proteína 2375 com o cofactor FMN

Tal como referido acima na Secção 3.1.3, aquando da segunda etapa de purificação da proteína 2375, por cromatografia de exclusão molecular, verificou-se que ocorreu a perda do cofactor, tendo este sido eluído em diferentes momentos na purificação na forma livre.

Este facto foi, no momento da purificação, constatado pela coloração das fracções obtidas (fracções com proteína não apresentavam a característica coloração amarela resultante da presença do cofactor em solução) e confirmado através de electroforese SDS-PAGE dessas mesmas fracções (tal como apresentado na Figura 3.15). Posteriormente, também o espectro UV/Visível efectuado, apresentado na Figura 3.25, permitiu validar estes resultados.

Por comparação do espectro da proteína com o espectro do cofactor FMN livre (Figura 7.10) é possível verificar, que tal como espectável, no caso da fracção da proteína pura não são visíveis as bandas características do FMN a, aproximadamente, 370 nm e 440 nm, o que permite concluir que este não se encontra em solução ou, está presente em quantidades vestigiais.

Desta forma, decidiu-se efectuar a reconstituição da proteína 2375 com o cofactor FMN, tendo-se tido como base o protocolo descrito por L. J. Rogers e G. A. Sykes⁷¹. Estabeleceu-se que para se realizar a reconstituição a concentração do cofactor (FMN) deveria ser, cerca de, dez vezes superior à concentração da proteína 2375. Assim, prepararam-se as soluções com as concentrações apropriadas e efectuou-se uma mistura (Volume total = 2 mL) de 0,5 mL de apoflavodoxina (proteína 2375, com concentração *stock* igual a $746,8 \pm 47,7 \mu\text{M}$) com 1,5 mL de tampão 10 mM Tris-HCl contendo 0,5 mM de FMN.

Seguiram-se os passos abaixo descritos:

1. Incubar a mistura durante 2 horas a 4 °C;
2. Centrifugar a 1400 xg durante 10 minutos e descartar o *pellet* que contém todo o material não solúvel;
3. Dialisar o sobrenadante obtido no passo 2 contra tampão 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, durante 5 horas a 4 °C;
4. Efectuar nova diálise contra tampão 10 mM Tris-HCl (sem EDTA), durante 1 hora a 4 °C. Realizar três trocas de tampão de 1 em 1 hora;
5. Traçar espectro UV/Visível.

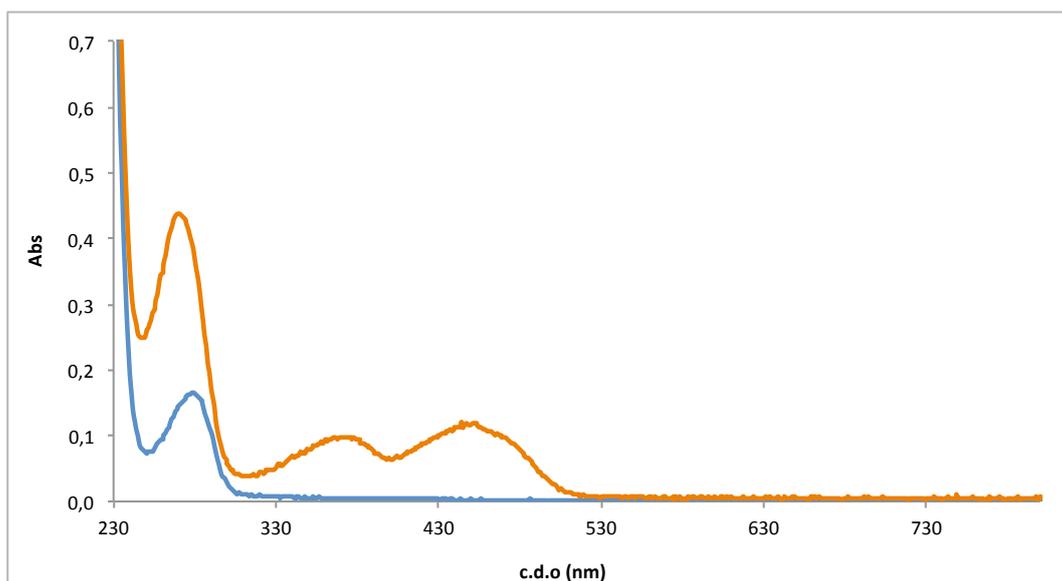


Figura 3.27 Espectro UV/Visível da proteína 2375 após reconstituição com o cofactor FMN. — Proteína 2375, tal como purificada; — Proteína 2375 reconstituída com cofactor (2375/FMN).

O espectro UV/Visível da flavodoxina (proteína 2375) reconstituída com FMN é apresentado na Figura 3.27 e pela sua análise verificou-se que foi possível reconstituir a proteína, devido à presença das bandas características do cofactor, ausentes no espectro da forma apo (espectro a azul na Figura 3.27).

➤ Quantificação da proteína 2375 reconstituída

Seguidamente, efectuou-se a quantificação da proteína reconstituída pelo método do BCA. A recta de calibração utilizada está apresentada na Figura 3.24 e o protocolo seguido encontra-se descrito no Anexo 7.11.2.

Através deste método determinou-se que a concentração da proteína 2375 reconstituída é de $279,78 \pm 46,49 \mu\text{M}$.

Com base na concentração assim determinada e no espectro UV/Vis apresentado na Figura 3.27, calculou-se o coeficiente de extinção molar da holoproteína 2375 a 280 nm, sendo este valor experimental de $5260 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

➤ Reconstituição e determinação da estequiometria

Comprovando-se que é possível efectuar a reconstituição da flavoproteína 2375 com o cofactor FMN decidiu-se realizar um ensaio, recorrendo à espectroscopia de UV/Visível, que nos permitisse caracterizar a reacção através da determinação da estequiometria da mesma.

Para tal, realizaram-se sucessivas adições, num total de vinte, de um volume definido de FMN (20 mM) às cuvets contendo:

- Cuvete 1: Apoproteína 2375 ($746,8 \pm 47,7 \mu\text{M}$);
- Cuvete 2: Tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6.

A primeira adição realizada corresponde a uma razão de 0,2 FMN / flavoproteína 2375 e a última a 4 FMN / flavoproteína 2375 e os espectros traçados encontram-se apresentados na Figura 3.28.

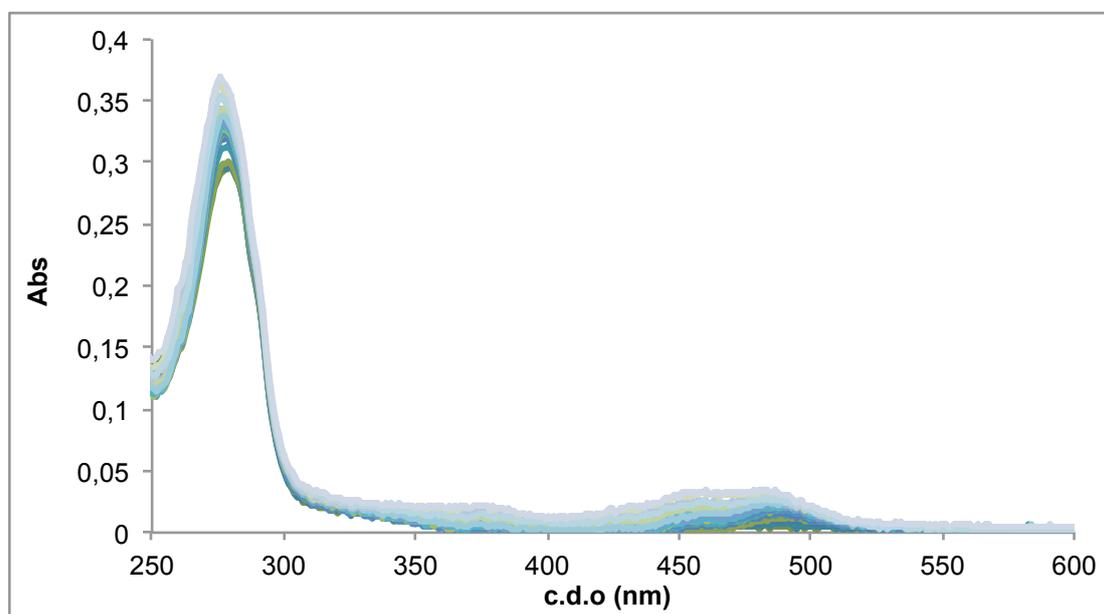


Figura 3.28 Espectros de UV/Visível obtidos aquando da titulação da apoflavoproteína 2375 com cofactor FMN.

Com base nos dados obtidos seleccionaram-se três comprimentos de onda diferentes, 371 nm, 450 nm e 485 nm, característicos das espécies em solução, e a partir destes traçaram-se as curvas apresentadas na Figura 3.29.

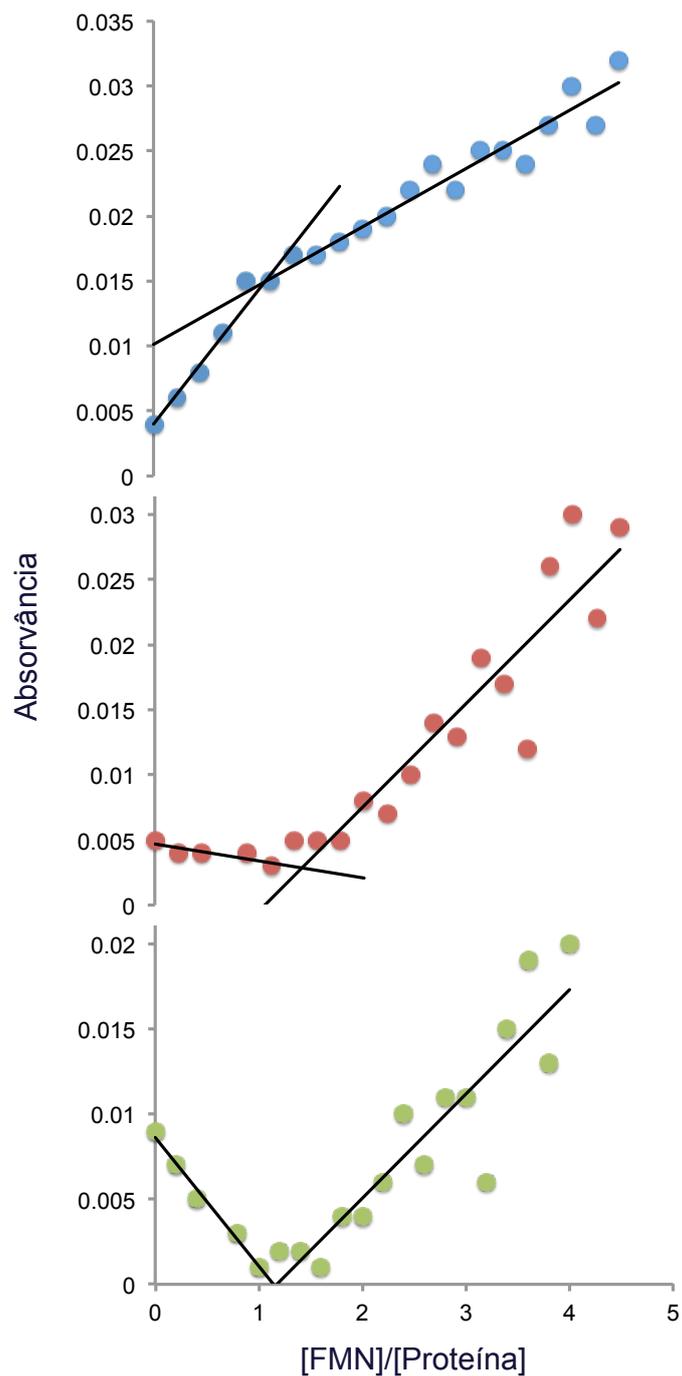


Figura 3.29 Representação dos valores de absorvância registados ao longo da titulação entre a apoflavoproteína 2375 e o cofactor FMN a três diferentes comprimentos de onda. Curva azul — 317 nm, Curva vermelha — 450 nm e Curva verde — 485 nm.

As curvas aqui apresentadas correspondem aos valores de absorvância registados ao longo da titulação entre a apoflavoproteína 2375 e o cofactor FMN para as diferentes razões FMN/proteína efectuadas.

Assim, pela análise da Figura 3.29 é possível concluir que a diferença verificada na evolução das curvas aos comprimentos de onda seleccionados (curva azul — 371 nm, curva vermelha — 450 nm e curva verde — 485 nm) deve-se ao facto do valor do coeficiente de extinção molecular (ϵ) ser diferente. Portanto a intercepção entre as rectas traçadas para cada curva dá-nos uma estimativa do valor da estequiometria da reacção.

Com os três comprimentos de onda seleccionados são obtidas três curvas distintas, sendo que é com base nas equações das rectas definidas que se obtém três valores de intercepção distintos que nos permitem obter a estimativa do valor de intercepção global, que é igual a $1,15 \pm 0,25$. É este valor de intercepção que nos permite então definir a razão FMN/proteína.

Estima-se, assim, que a estequiometria da reacção de reconstituição da proteína 2375 com o cofactor FMN é de, aproximadamente, 1 FMN / apoflavoproteína 2375.

3.1.4.3 Actividade de NADH-oxidoreductase da proteína 3073

Num dos primeiros estudos realizados, pretendeu-se avaliar a actividade NADH-oxidoreductase da proteína 3073. A actividade enzimática foi monitorizada por espectroscopia de UV/Visível num espectrofotómetro Evolution 300 UV-Vis, Thermo Scientific utilizando cuvetes com percurso óptico de 1 cm e traçando-se os espectros entre os comprimentos de onda de 230 nm a 800 nm.

Utilizando-se uma solução de NADH (VWR) 0,49 mM e com conhecimento da concentração da proteína efectuou-se uma diluição desta em tampão 200 mM MOPS pH = 7,0, 200 mM NaCl, de modo a que se conseguissem efectuar pequenas adições sequenciais (volume igual) às cuvetes, tal como seguidamente apresentado.

O estudo da actividade da proteína 3073 foi analisado de duas formas distintas:

1. Análise das alterações no espectro UV/Vis do substrato NADH

Neste ensaio, fixou-se a quantidade de NADH e efectuaram-se adições sucessivas de proteína 3073.

Iniciou-se a leitura da amostra com uma quantidade fixa de NADH na célula de leitura e foram realizadas três adições sucessivas de proteína. Estabeleceu-se o volume a adicionar, previamente, de forma a que se variasse a razão molar NADH/proteína de 1:1 a 1:3.

Na Figura 3.30 encontram-se apresentados os espectros traçados após cada adição de proteína à amostra.

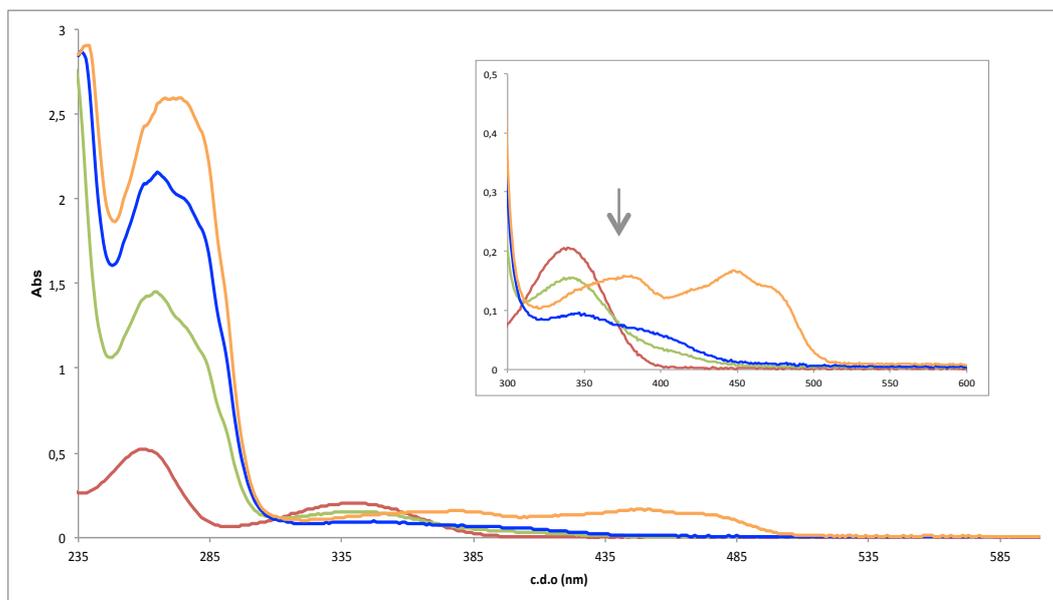


Figura 3.30 Efeito da adição de NADH-oxidoredutase (proteína 3073) no espectro de UV/visível do NADH. — NADH, controlo do ensaio; — NADH/proteína, 1:1; — NADH/proteína, 1:2; — NADH/proteína, 1:3. No canto superior direito é apresentada uma expansão da região espectral entre 300 e 800 nm.

Pela análise da figura é possível verificar as alterações sofridas pelo espectro de NADH resultantes da presença da flavoproteína em solução. Verifica-se uma diminuição do valor de absorvância a 340 nm (comprimento de onda ao qual a absorvância de NADH é máxima), resultante da oxidação deste pela acção da proteína 3073. Consequentemente, há um desvio para a direita acompanhado de um aumento da absorvância na região característica do FMN, uma vez que ao longo da reacção ocorre a interconversão entre as diferentes formas que o cofactor FMN pode apresentar.

2. Análise das alterações no espectro UV/visível da flavoproteína 3073

Já neste segundo ensaio, o que se fixou foi a concentração de proteína e foram realizadas sucessivas adições de NADH, tendo-se analisado neste caso as alterações no espectro da proteína (na região dos máximos de absorvância característica do cofactor, FMN), tal como apresentado na Figura 3.31.

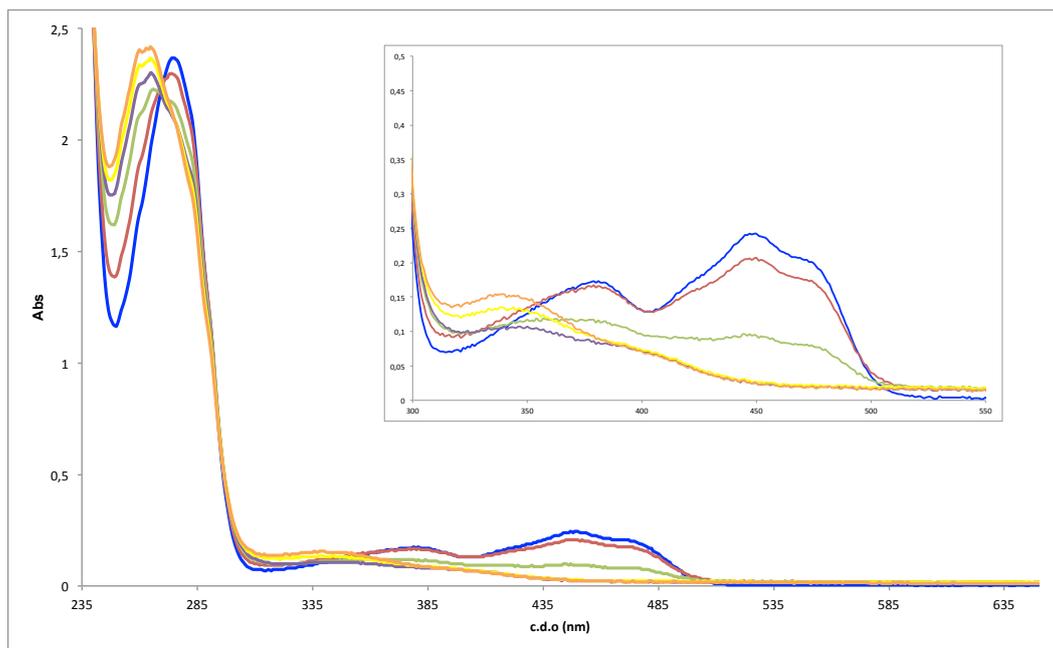


Figura 3.31 Efeito da adição de NADH no espectro de UV/Visível da NADH-oxidorreductase (proteína 3073). — Proteína 3073, controlo do ensaio; — Proteína/NADH, 1:0,2; — Proteína/NADH, 1:0,4; — Proteína/NADH, 1:0,6; — Proteína /NADH, 1:0,8; — Proteína /NADH, 1:1. No canto superior direito é apresentada uma expansão da região espectral entre 300 e 800 nm.

Através da figura é possível analisar as alterações ocorridas no espectro da proteína, verificando-se alterações na região onde o cofactor absorve, resultantes da, já referida, interconversão entre as formas oxidada e reduzida que este pode assumir durante a reacção. Consequentemente, observa-se um aumento do valor de absorvância a 340 nm, comprimento de onda onde a absorvância de NADH é máxima, resultante das adições sucessivas realizadas.

Ambos os ensaios nos permitiram concluir que o FMN funciona como grupo prostético, confirmando-se a actividade NADH-oxidorreductase da flavoproteína 3073, que catalisa a reacção de transferência de eletrões do NADH.

Dps

3.1.5 Produção da proteína Dps de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

Tal como as proteínas 3073 e 2375 também a proteína Dps foi sobre-expressa; purificada e posteriormente utilizada nos diversos estudos efectuados.

As condições utilizadas na sobre-expressão e purificação da Dps, encontram-se apresentadas em seguida, tendo sido seguidos os protocolos otimizados pelo grupo de Biofísica Molecular.

➤ Sobre-expressão

O primeiro passo consiste em obter colónias das células, procedendo-se para isso à transformação de 50 μ L de células quimicamente competentes de *E. coli* BL21(DE3) (NZYTech) com 5 μ L do pDNA do vector pET-21c—Dps (mapa do vector apresentado na Figura 3.32), tal como anteriormente descrito.

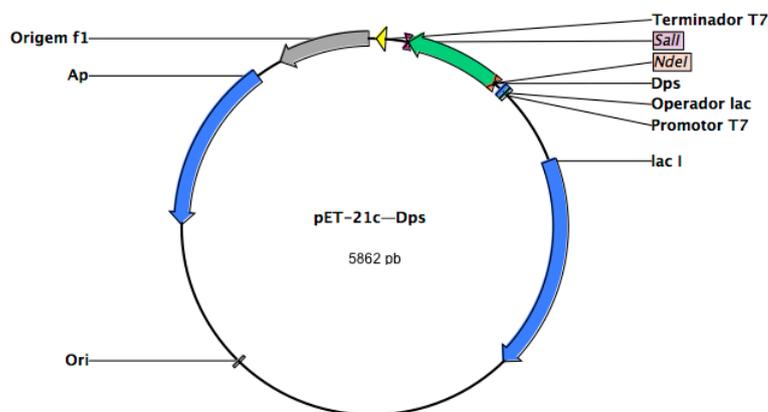


Figura 3.32 Vector de sobre-expressão pET-21c—Dps utilizando o software CLC Sequence Viewer.

Seleccionou-se uma colónia isolada da placa de transformação, com a qual se inoculou um pré-inóculo de 5 mL de meio de cultura LB/Ampicilina (100 μ g/mL) que cresceu a 37 °C com agitação de 200 rpm durante 8 horas. Ao fim deste tempo efectuou-se uma diluição do pré-inóculo para 100 mL (1:100) no mesmo meio de cultura e deixou-se a incubar durante a noite (cerca de 16 horas), mantendo-se as mesmas condições de temperatura e agitação. Posteriormente, esta cultura foi diluída para 1 L (1:100) do mesmo meio de cultura e mantida com agitação de 200 rpm a 37 °C com monitorização da densidade óptica ($OD_{600\text{ nm}}$) até se atingir o valor de, aproximadamente, 0,5. Nesse momento a cultura bacteriana foi induzida com 0,5 mM de IPTG e mantida com as condições de incubação (temperatura e agitação) durante 3 horas, período após o qual se efectuou a recolha celular. As células

foram recolhidas por centrifugação a 11 000 xg, durante 10 minutos a 7 °C. O sedimento bacteriano obtido foi seguidamente ressuspendido em tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6 e conservado a -80 °C até se proceder ao passo de extracção e isolamento da proteína. O rendimento celular obtido foi de 1,9 g células/L de cultura (peso húmido).

O procedimento utilizado para a sobre-expressão da Dps aqui descrito encontra-se representado esquematicamente na Figura 3.33.

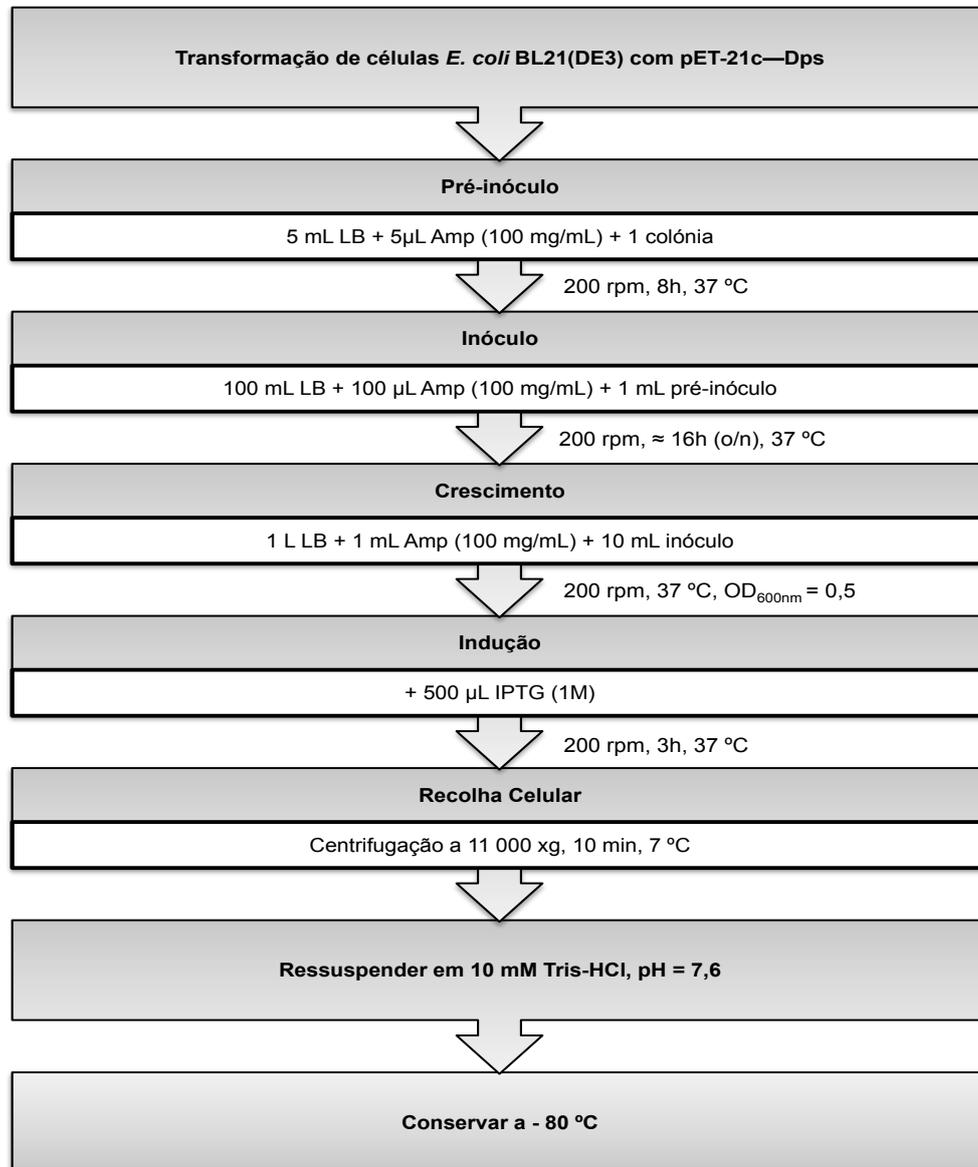


Figura 3.33 Representação esquemática do protocolo de sobre-expressão da proteína Dps.

Efectuou-se o isolamento proteico, tendo a lise celular ocorrido através de 3 ciclos de congelação/descongelação, na presença de DNase I (Roche) e com posterior sonificação. A suspensão celular obtida foi em seguida centrifugada a 10 000 xg durante 10 minutos a 7 °C. O sobrenadante foi ainda ultracentrifugado a 42 000 rpm durante 1 hora e 30 minutos a 4 °C.

A sobre-expressão da Dps foi avaliada através de electroforese SDS-PAGE (como descrito no Anexo 7.7), sabendo-se que a massa molecular desta é de 215689,4 Da⁷² encontrando-se o gel apresentado na Figura 3.34.

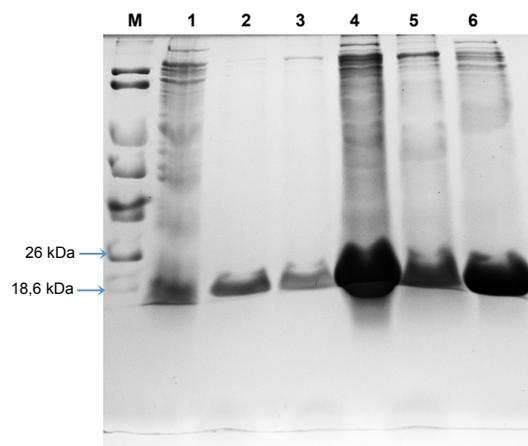


Figura 3.34 Verificação da produção da Dps por SDS-PAGE (poliacrilamida 12,5%). M — Marcador de pesos moleculares (*Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech); 1 — Cultura celular antes da indução com IPTG; 2 — Cultura celular 3 h após a indução com 0,5 mM de IPTG; 3 — *Pellet* da centrifugação a baixa velocidade; 4 — Sobrenadante da centrifugação a baixa velocidade; 5 — *Pellet* da ultracentrifugação; 6 — Sobrenadante da ultracentrifugação. Aplicaram-se no gel 8 μ L de cada amostra.

➤ Purificação da Dps

O sobrenadante da proteína Dps resultante da ultracentrifugação, correspondente à fracção proteica solúvel, foi seguidamente purificado tal como aqui descrito e de acordo com o protocolo apresentado no Anexo 7.10.

Iniciou-se o processo de purificação da Dps com uma cromatografia de permuta iónica em coluna de resina aniónica (DEAE – *Sepharose fast flow*, GE Healthcare Life Sciences). O extracto proteico foi aplicado na coluna que foi de seguida lavada com tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6 (Tampão A); a eluição das proteínas adsorvidas à matriz cromatográfica foi realizada por aplicação de um gradiente linear descontínuo de tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl — Tampão B (Anexo 7.10.1), estando o seu perfil de eluição apresentado na Figura 3.35.

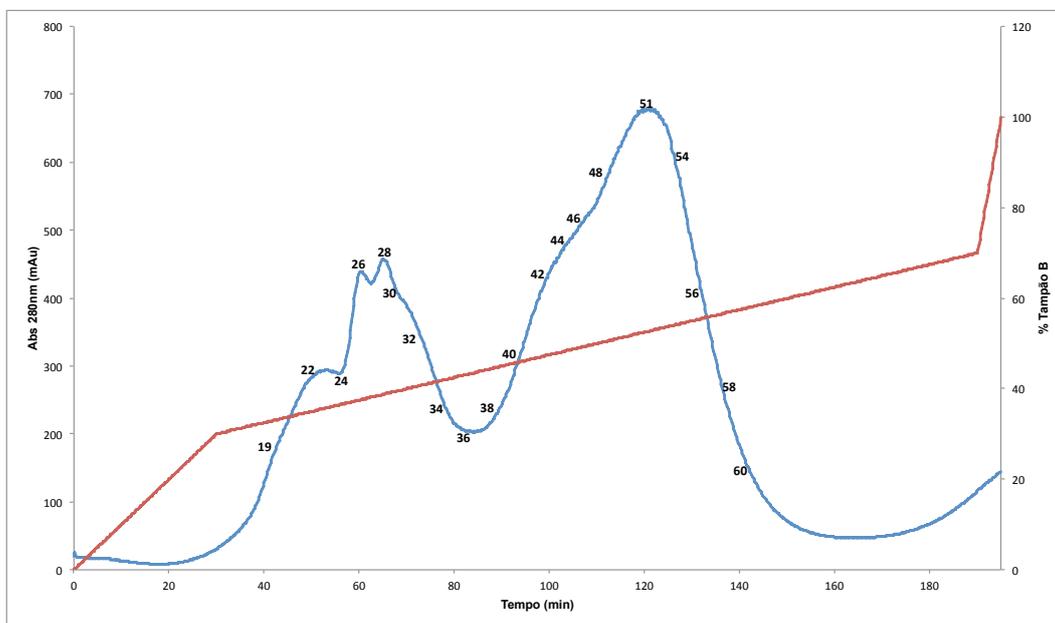


Figura 3.35 Perfil de eluição da coluna cromatográfica DEAE-Sepharose FF na purificação da proteína Dps. — Absorvância a 280 nm; — % de Tampão B. A numeração representada corresponde a algumas das fracções recolhidas (12 mL/tubo) que foram analisadas posteriormente por electroforese SDS-PAGE.

Com base no cromatograma concluiu-se que a separação proteica foi eficiente, informação que foi confirmada por electroforese SDS-PAGE (não apresentados). Com a informação obtida e sabendo-se que a proteína de interesse foi eluída entre 45 e 57% de tampão B, as fracções 39 a 58 foram juntas numa única fracção global.

De seguida, prosseguiu-se para a nova etapa de purificação por cromatografia de exclusão molecular em coluna de filtração em gel Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), usada anteriormente como passo de polimento no processo de purificação das proteínas 2375 e 3073.

A fracção a injectar na coluna foi, previamente, concentrada em *Vivacell* 70 com *MWCO* de 30 kDa (Sartorius), através de aplicação de pressão (cerca de 4,5 bar) e com agitação de 135 rpm a 11 °C e filtrada com filtro de membrana de 0,45 µm.

Foram efectuadas três injeções sequenciais, da mesma fracção, na coluna e a proteína foi eluída com tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl. Seguiu-se o protocolo descrito no Anexo 7.10.2 e o perfil de eluição da proteína nesta etapa de purificação está representado na Figura 3.36.

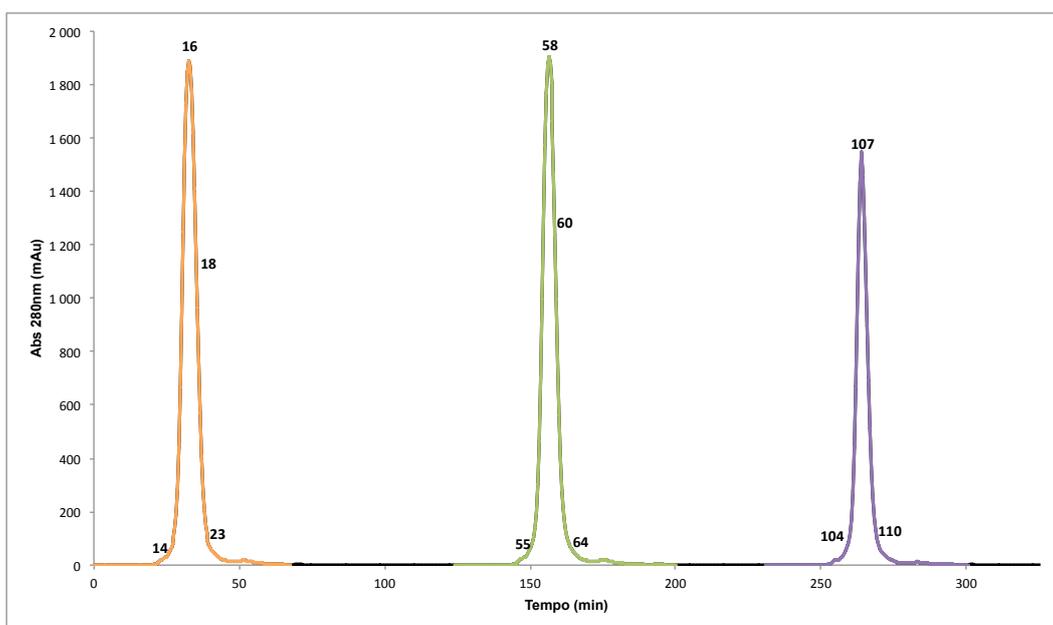


Figura 3.36 Perfil de eluição da coluna Superdex 200 para purificação da proteína Dps. — Absorvância a 280 nm, Injecção 1; — Absorvância a 280 nm, Injecção 2; — Absorvância a 280 nm, Injecção 3. Ao longo do cromatograma encontram-se assinaladas algumas das fracções que foram verificadas por electroforese SDS-PAGE.

As fracções de 2 mL recolhidas 14-23 (Injecção 1); 55-64 (Injecção 2) e 104-110 (Injecção 3) foram verificadas por SDS-PAGE, com o objectivo de confirmar a boa separação proteica, já inferida a partir do cromatograma (Figura 3.36) e verificar quais as fracções que apresentavam maior pureza e quantidade relativa de proteína e assim obter fracções global. Para além disso, foi ainda realizada a verificação da presença da enzima catalase nas fracções, visto esta ser um contaminante muito comum, que catalisa a reacção 3.1.



O teste da presença da catalase consiste na verificação do aparecimento de bolhas nas amostras, resultante da formação de O₂ após adição do substrato H₂O₂ (30% w/v, Panreac) a uma pequenas amostra das diferentes fracções.

Desta forma, foram obtidas duas fracções da proteína de interesse, a Fracção 1 que compreende as fracções 17-19; 58-61 e 105-107, que não apresentaram a formação de bolhas aquando do teste da catalase e que possuem quantidade de proteína semelhante (verificado através de electroforese SDS-PAGE, não apresentado). E a Fracção 2, resultante da junção das fracções 15; 16; 56; 57 e 104, que apresentaram bolhas (em reduzida quantidade) durante o teste.

O rendimento da purificação foi de 31,92 mg de proteína Dps / L de cultura.

➤ Quantificação

A proteína Dps foi quantificada por espectroscopia de UV/Visível, como descrito no Anexo 7.11.1, utilizando-se o coeficiente de extinção molar a 280 nm de $2,93 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Antes de ser efectuado qualquer estudo com estas fracções foram concentradas em célula de ultrafiltração, tal como já descrito anteriormente. Este passo de concentração implicou que fosse realizada nova quantificação das fracções pelo mesmo método UV/Vis (Figura 3.37), tendo-se determinado o valor final de concentração para a Fracção 1 igual a 133,6 µM e para a Fracção 2 igual a 183,6 µM.

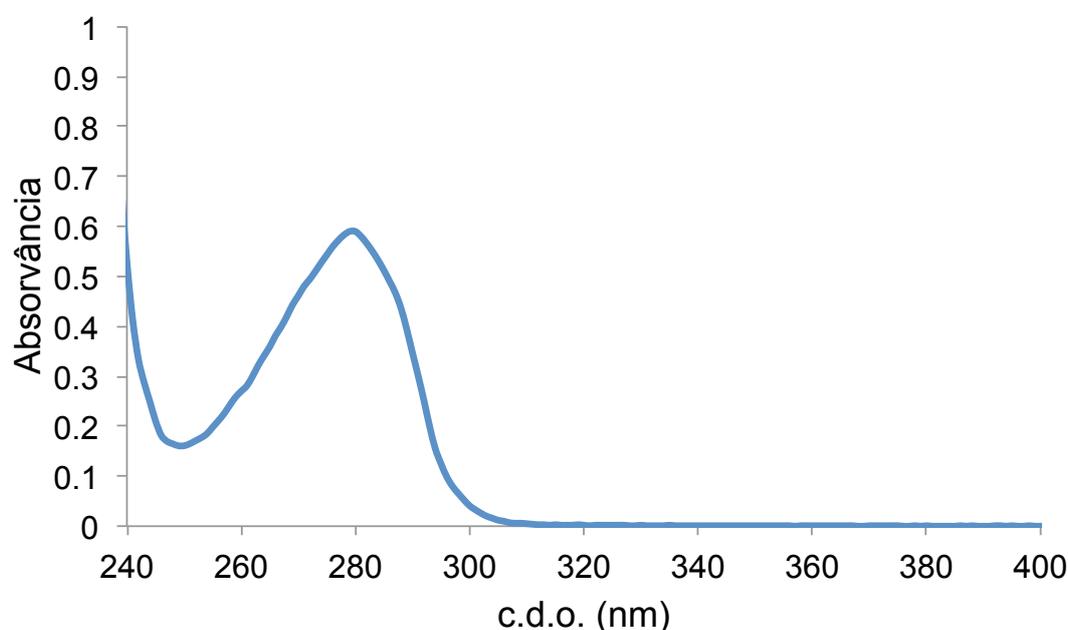


Figura 3.37 Espectro UV/Visível representativo da proteína Dps.

4 Estudos de transferência electrónica

Após se ter comprovado a actividade NADH-oxidoreductase da flavoproteína 3073 (estudo apresentado na Secção 3.1.4.3) foram realizados ensaios, pelas espectroscopias de UV/Visível e de Mossbäuer, para averiguar se esta proteína poderia funcionar como parceiro redox da Dps.

4.1 Estudo cinético por espectroscopia de UV/Visível

Inicialmente, procedeu-se ao estudo por espectroscopia de UV/Visível, monitorizando-se as amostras no espectrofotómetro Evolution 300 UV-Vis, Thermo Scientific, em cuvetes com percurso óptico de 1 cm e traçando-se os espectros entre os comprimentos de onda de 230 nm a 800 nm.

O ensaio foi realizado com tampão 200 mM MOPS pH = 7, 200 mM NaCl, utilizando-se a proteína 3073 (828,9 μ M); uma solução de NADH (24,4 mM) e a proteína Dps com incorporação de 96 ferros (Dps core 96Fe — 50 μ M Dps : 4,8 mM ^{56}Fe), preparada de acordo com o protocolo descrito no Anexo 7.16.

O ensaio foi realizado tal como apresentado esquematicamente na Figura 4.1, sendo que a cada passo foram, de imediato, traçados os espectros UV/Visível da amostra, representados na Figura 4.2.

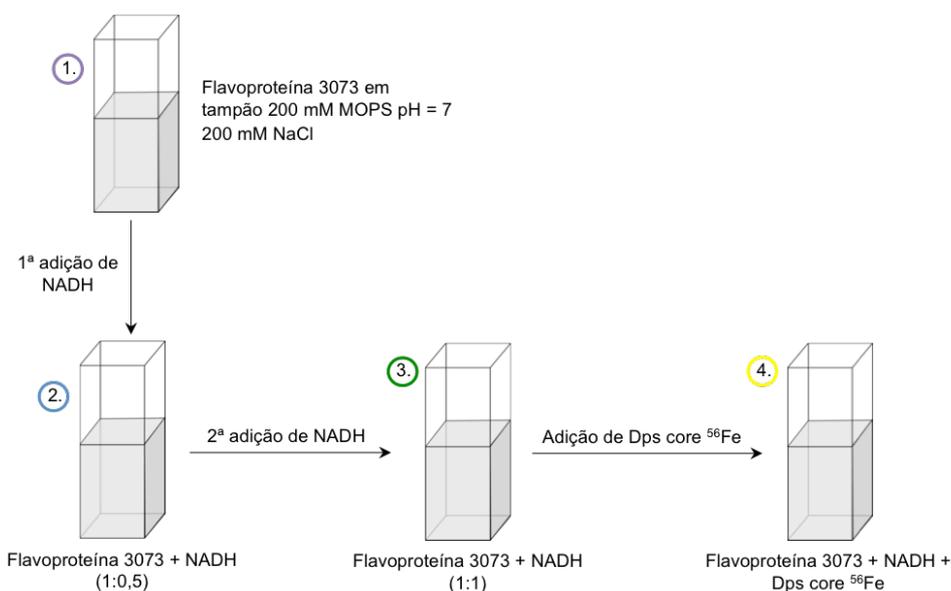


Figura 4.1 Representação esquemática do ensaio realizado por espectroscopia de UV/Visível para estudar a cinética da reacção de transferência electrónica.

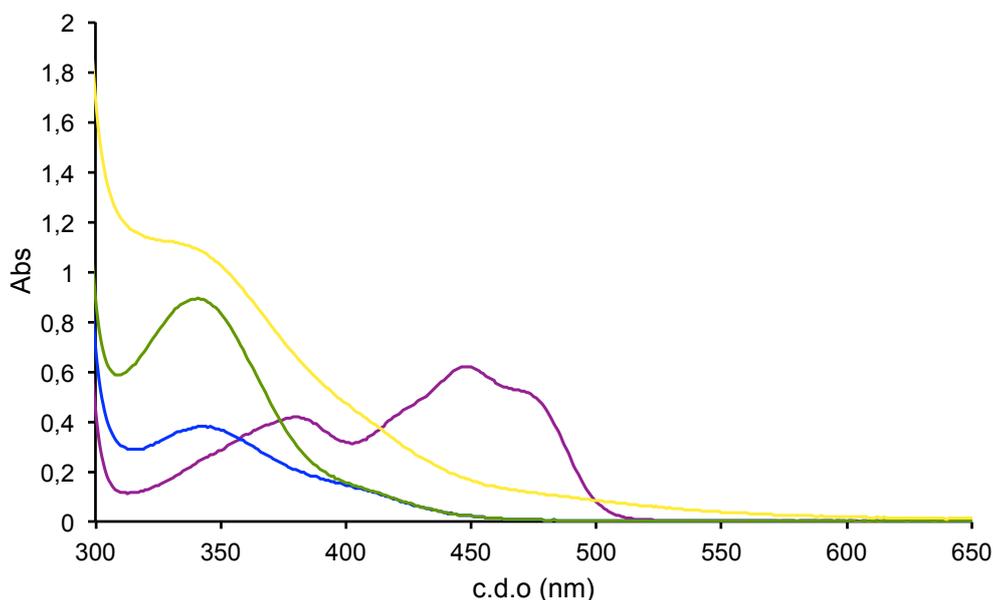


Figura 4.2 Estudo cinético da reação de transferência eletrônica por espectroscopia de UV/Visível. — Flavoproteína 3073; — 1ª Adição de NADH (3073/NADH, 1:0,5); — 2ª Adição de NADH (3073/NADH, 1:1); — Adição de Dps core 96Fe, 1:1 (3073/Fe).

O facto de as várias espécies em solução apresentarem máximos de absorvância a comprimentos de onda próximos (NADH a 340 nm; FMN a 265 nm; 370 nm e 440nm; Dps core Fe a 340 nm) torna difícil a desconvolução espectral e a consequente interpretação das reações de transferência eletrônica que estão a ocorrer.

Através dos espectros apresentados é, no entanto, possível confirmar a ocorrência da reação de transferência eletrônica com participação da flavoproteína 3073.

Pela análise do espectro representado a azul, correspondente à primeira adição de NADH à cuvete que contem a flavoproteína, verifica-se que há uma diminuição do valor de absorvância na região do comprimento de onda característico do FMN (cofactor de 3073), o que indica que na presença de NADH há uma conversão da forma oxidada para a forma reduzida. Verifica-se também uma redução na absorvância no espectro a verde, correspondente à segunda adição de NADH à amostra. Estes resultados confirmam a actividade de NADH oxidoreductase anteriormente observada (Secção 3.1.4.3).

A única diferença entre os dois espectros acima mencionados prende-se com o facto de o valor de absorvância a, cerca de, 340 nm, aumentar no espectro verde devido à presença de algum excesso de NADH.

Por sua vez, o espectro a amarelo corresponde à leitura da amostra após a adição sequencial da Dps com ferro incorporado, verificando-se uma aumento da absorvância na região de comprimentos de onda correspondente ao core, acompanhado de um aumento na região do comprimento de onda característico do cofactor da flavoproteína. Ou seja, este resultado sugere que na presença da Dps com ferro incorporado há transferência de electrões da 3073, ocorrendo a reoxidação do FMN com consequente redução e libertação

do ferro incorporado na Dps ($\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). É no entanto impossível desconvoluir os espectros por forma a quantificar e compreender a extensão dessa redução. Um dos motivos desta dificuldade reside no facto da amostra conter uma componente férrica de coloração alaranjada que após reacção deverá dar origem a uma espécie ferrosa incolor e a FMN na forma oxidada de coloração amarela.

Estes resultados obtidos pela espectroscopia de UV/Visível levaram-nos assim a colocar a hipótese da flavoproteína 3073 funcionar como parceiro redox da Dps. No entanto, através desta espectroscopia não foi possível obter uma resposta inequívoca nem qualquer informação sobre as taxas de redução.

De forma a ultrapassar o problema experimental observado recorreu-se à espectroscopia de Mössbauer que possibilita a monitorização simultânea das diferentes espécies de ferro nas amostras.

4.2 Estudo cinético pela espectroscopia de Mössbauer

Tendo por base os resultados anteriormente obtidos desenhou-se uma experiência para a qual fosse possível seguir a velocidade redução do core férrico e caracterizar a natureza do produto ferroso.

Para tal, foi utilizado um espectrómetro de campo baixo que opera numa geometria de transmissão com 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 aquisição de espectros entre 4,5 K e 325 K. A aquisição pode ser feita na ausência ou presença de um campo magnético fixo de 600 G.

Para a experiência em causa, foi necessário preparar previamente a Dps com incorporação do isótopo de ferro 57 (^{57}Fe), de acordo com o procedimento descrito no Anexo 7.16, numa razão de 144 ferros por Dps.

Cada uma das amostras analisadas foi preparada em tampão 200 mM MOPS pH = 7, 200 mM NaCl, com um volume máximo de 400 μL , transferida para uma célula de Mössbauer (Delrin®, DuPont) e congelada em azoto líquido. Todo este procedimento foi realizado em condições anaeróbias (< 4 ppm O_2) numa câmara de luvas MBraun labmaster.

Para efeitos de análise as amostras foram colocadas no espectrómetro de Mössbauer descrito e a aquisição efectuada com diferentes temperaturas (10 K e 80 K) e na ausência de campo magnético aplicado.

A análise dos espectros de Mössbauer apresentados foi efectuada utilizando o programa *WMOSS 2.51* (SEE co.).

A primeira amostra analisada foi preparada através da incubação da proteína Dps com 144 ferros incorporados (Dps core ^{144}Fe — 25 μM Dps : 3,6 mM ^{57}Fe) com 300 μM da flavoproteína 3073 (12x Dps) e 18 mM de NADH (5x Fe^{2+}) — **Amostra I**. Realizaram-se vários tempos de incubação, num total de 12 horas, tempo ao longo do qual se verificou a conversão das espécies através do desaparecimento do ferro férrico com concomitante aparecimento do produto ferroso, tal como apresentado na Tabela 7-11.

Na Figura 4.3, apresentam-se os espectros obtidos para esta amostra (espectro **B** a espectro **N**) adquiridos a temperatura alta (80 K). É possível verificar pela posição das linhas a conversão da espécie férrica, caracterizada pela presença de doubletos de quadrupolo característicos do substrato (core férrico com linhas de absorção 0,15 e 0,77 mm/s) e produto (ferro ferroso de spin alto com linhas de absorção a -0,24 e 2,87 mm/s). A análise dos espectros foi feita por ajuste a dois doubletos de quadrupolo (Figura 4.5 **B**, linhas sólidas a vermelho e a azul) com parâmetros típicos das espécies mencionadas e constantes na Tabela 7-10.

Como controlo preparou-se uma amostra contendo a proteína Dps com incorporação de 144 ferros (Dps core ^{144}Fe — 25 μM Dps : 3,6 mM ^{57}Fe) e 18 mM de NADH (5x Fe^{2+}) — **Amostra II**, com tempo de incubação total igual ao da **Amostra I**. Esta amostra (Figura 4.3 **A**) permitiu comprovar que a reacção apenas ocorre na presença da flavoproteína 3073, uma vez que neste caso não se verifica nenhuma alteração no espectro obtido, estando apenas presente o doubleto característico do ferro férrico.

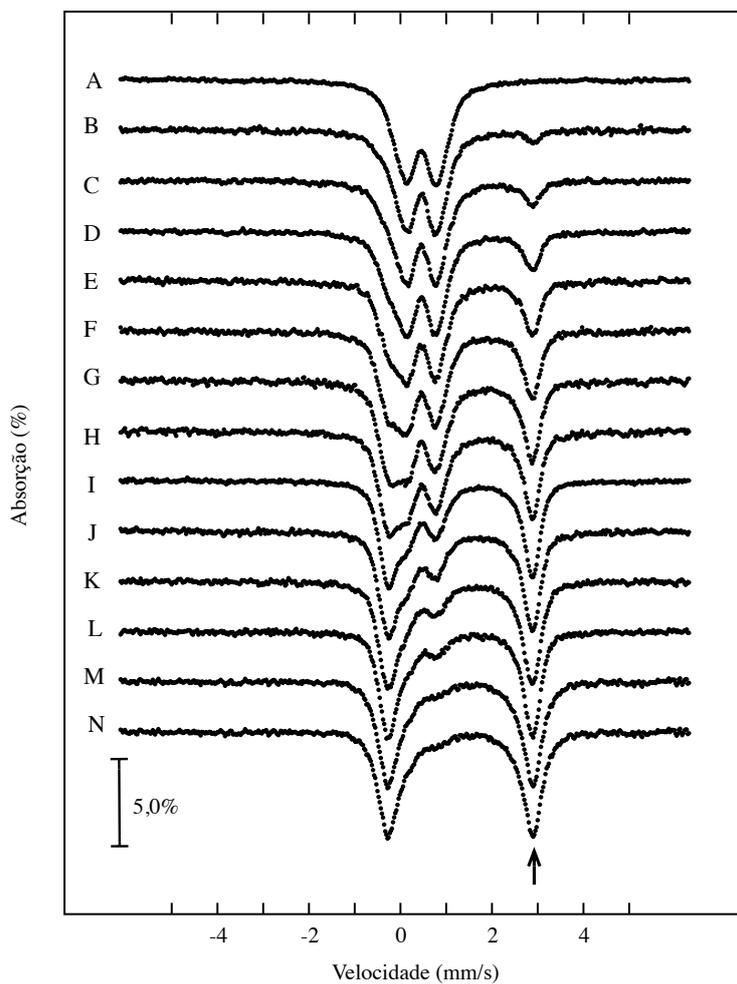


Figura 4.3 Espectros de Mössbauer adquiridos a 80 K, para a amostra Dps core $^{144}\text{Fe}/3073/\text{NADH}$ e do respectivo controlo. **A)** Espectro da amostra controlo, amostra II; **B a N)** Espectros da amostra I com variação dos tempos de incubação, de 4,33 minutos a 12 horas, respectivamente. A seta apresentada indica o pico de alta energia correspondente ao produto de ferro ferroso.

Na Figura 4.4 apresentam-se os resultados obtidos para a aquisição a temperatura baixa (10 K).

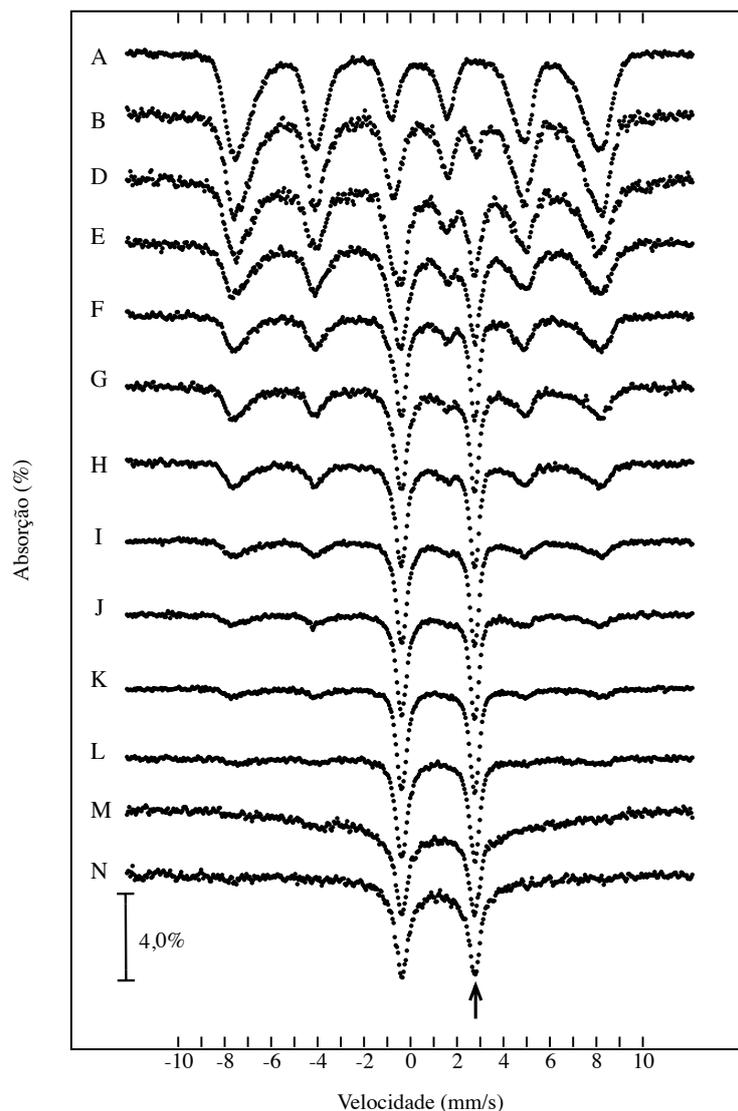


Figura 4.4 Espectros de Mössbauer adquiridos a 10 K, para a amostra Dps core $^{144}\text{Fe}/3073/\text{NADH}$ e respectivo controlo **A)** Espectro da amostra controlo, amostra II; **B** a **N**, excepto **C)** Espectros da amostra I com variação dos tempos de incubação, de 4,33 minutos a 12 horas, respectivamente. A seta apresentada indica o pico de alta energia correspondente ao aparecimento do produto de ferro ferroso.

Na Figura 4.5 encontram-se representados os espectros da **Amostra I** adquiridos a 10 K (espectro **A**) e a 80 K (espectro **B**), para o tempo reaccional de 34,33 minutos. No espectro obtido a 10 K podem-se observar duas componentes: i) uma componente magnética constituída por 6 linhas (marcadas com *) e uma espécie representada por um único dobleto de quadrupolo. Este dobleto apresenta parâmetros típicos para ferro ferroso de spin alto (linha azul). Já em **B** observam-se os resultados da mesma amostra quando analisada a alta temperatura onde se verifica o colapso das 6 linhas num dobleto de quadrupolo com parâmetros típicos de ferro férrico, (linha vermelha). Este comportamento é

típico em proteínas da família das ferritinas para cores férricos superparamagnéticos. Os respectivos parâmetros usados podem ser consultados Tabela 7-10.

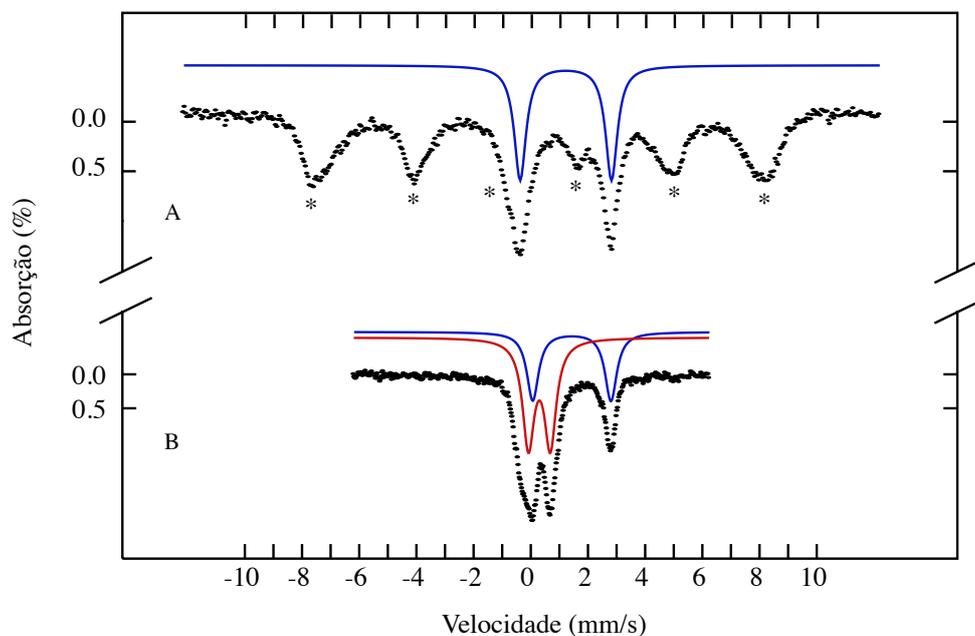


Figura 4.5 Espectros de Mössbauer adquiridos a alta e baixa temperatura para a amostra I (Dps core 144Fe/3073/NADH). **A)** Espectro adquirido a 10 K. Espécie superparamagnética com seis picos de absorção, entre -7,5 e 8 mm/s (*). Linha sólida azul — Simulação de um dobreto de quadrupolo ferroso. **B)** Espectro adquirido a 80 K. Dobreto de quadrupolo férrico. Linha sólida vermelha — Simulação de um dobreto de quadrupolo férrico; Linha sólida azul — Simulação de um dobreto de quadrupolo do produto ferroso.

Com base nos resultados obtidos às diferentes temperaturas (10 K e 80 K), constantes das Figura 4.3 e Figura 4.4., efectuou-se a quantificação das diferentes espécies ao longo do tempo, apresentada na Tabela 7-11.

A análise cinética mostra uma diminuição mono-exponencial para o core férrico com concomitante aparecimento do produto ferroso, podendo a variação ser explicada por uma cinética de primeira ordem (representação na Figura 4.6), com a reacção (4.1) e uma constante de primeira ordem $k = 0,011 \text{ min}^{-1}$.



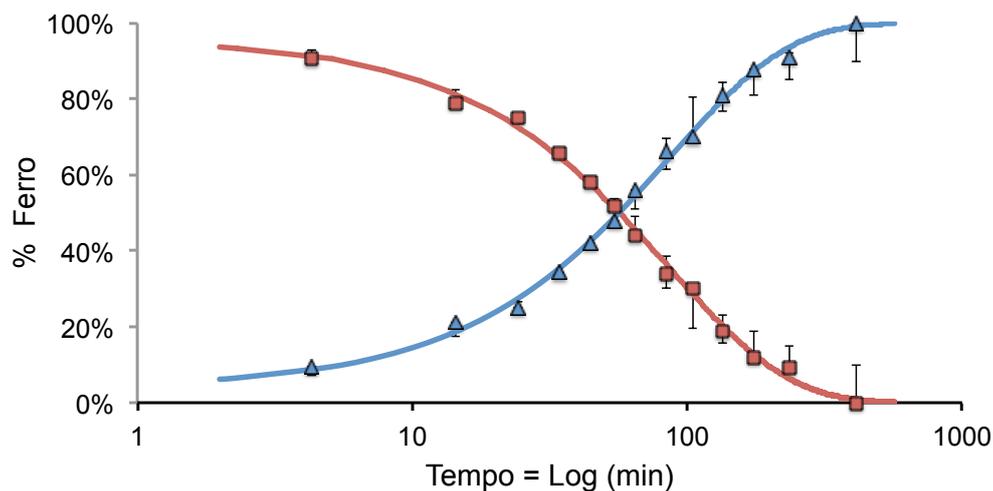


Figura 4.6 Resultados obtidos ao longo do tempo para a variação da percentagem de espécies de ferro caracterizadas nas amostras estudadas. Vermelho — Ferro férrico; Azul — Ferro ferroso.

Conclui-se que existe conversão directa do substrato (core férrico) em produto (ferro ferroso de spin alto) sem que seja possível observar a presença de um intermediário adicional.

Por forma a melhor caracterizar o produto da reacção obtido foi adicionado, em excesso, à **Amostra I** o composto 1,10-fenantrolina, composto este capaz de coordenar ferro ferroso em solução aquosa. O complexo ferro-ortofenantrolina forma-se numa razão estequiométrica 1:3 (Figura 4.7).

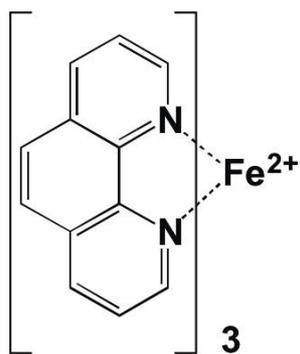


Figura 4.7 Representação do complexo ferro-ortofenantrolina.

Após incubação, esta nova amostra foi analisada e o seu espectro adquirido a temperatura alta (80 K) está apresentado na Figura 4.8 **A**. Neste espectro é possível detectar um único dobreto com desdobramento de quadrupolo (ΔE_q) de valor muito baixo, devido à elevada simetria do complexo formado.

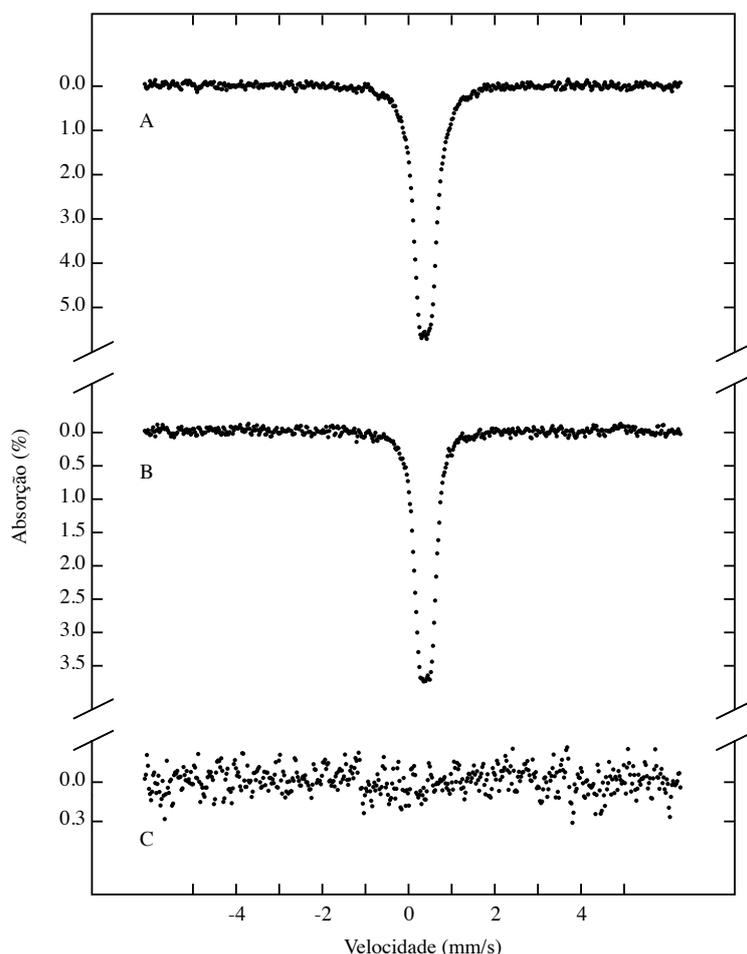


Figura 4.8 Espectros de Mössbauer adquiridos a temperatura alta (80 K). **A)** Amostra obtida após adição de 1,10-fenantrolina à Amostra I; **B)** Filtrado obtido após filtração em *Microcon*; **C)** Amostra constituída pelo volume retido na membrana após filtração em *Microcon*.

O espectro apresentado é virtualmente idêntico ao espectro da amostra controlo realizada do complexo ferro-ortofenantrolina (razão estequiométrica 1:9), representado na Figura 7.12. Para além dos espectros apresentados também os valores dos parâmetros obtidos e apresentados na Tabela 7-10 permitem comprovar esta informação.

Para determinar se o complexo do produto ferroso formado estava em solução ou se estaria ainda em interacção com a proteína Dps, efectuou-se, em condições anaeróbicas, a permuta da amostra num *Microcon*® — *Centrifugal Filter*, Millipore. Foram efectuadas sucessivas adições de tampão 200 mM MOPS pH = 7, 200 mM NaCl, com volumes variáveis, realizando-se a permuta através de centrifugação (centrifuga Spin Fuge/Vortex, Combi-spin FVL-2400N).

Este ensaio permitiu-nos assim obter duas novas amostras, a amostra contendo o volume que passa através da membrana (filtrado) e a amostra constituída pelo volume que fica retido por acção desta no Microcon. Os respectivos espectros adquiridos a alta temperatura (80 K) estão representados na Figura 4.8.

Pela observação e análise dos espectros obtidos verifica-se que todo o complexo de ferro pode ser colectado (espectro **B**), comprovando-se desta forma que a amostra correspondente ao volume retido no filtro (espectro **C**) não contém ferro (ausência de sinal após 5 horas de aquisição espectral). Ou seja, conclui-se desta forma que todo o ferro presente em solução foi complexado pela 1,10-fenantrolina e que já se encontrava todo em solução sem qualquer tipo de interacção com a Dps.

Por último, decidiu-se realizar ainda um novo ensaio que nos permitiu testar a actividade da proteína retida. Para tal, utilizando o volume retido no Microcon, foi realizada uma nova incubação da Dps com Ferro 57, seguindo-se o protocolo apresentado no Anexo 7.16, tal como anteriormente efectuado.

Esta nova amostra foi, igualmente, analisada por espectroscopia de Mössbauer, tendo-se obtido o espectro apresentado na Figura 4.9.

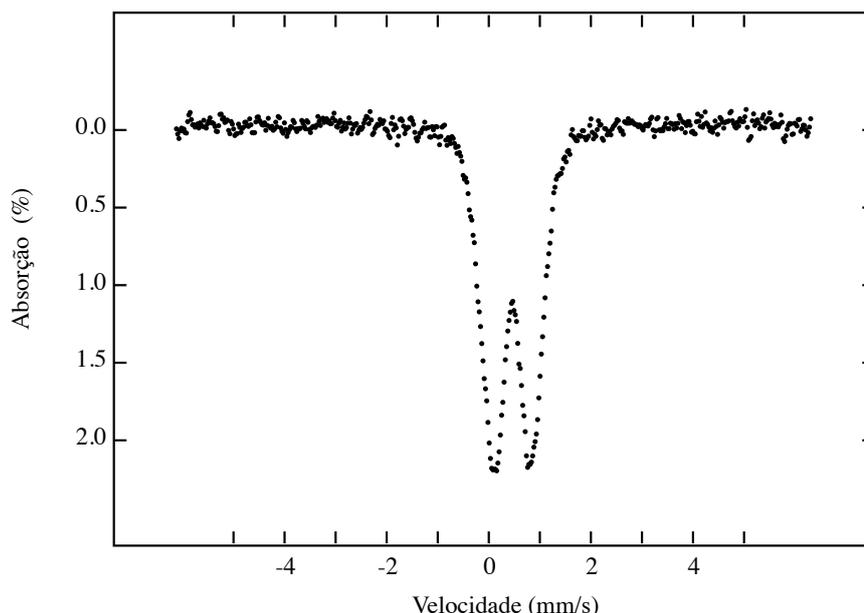


Figura 4.9 Espectro de Mössbauer adquirido a alta temperatura (80 K) da amostra de proteína Dps com incorporação de ^{57}Fe após ciclo de oxidação redução.

Pela análise deste espectro verificou-se que a proteína possui ainda a capacidade de formar um novo core férrico após o decorrer do ciclo de oxidação-redução estudado, pois esta apresenta um duplete de quadrupolo característico do core formado.

Na Figura 4.10 é apresentado de forma esquemática o ciclo de oxidação-redução ocorrido, com respectivos passos, descritos seguidamente, e espectros de Mössbauer adquiridos.

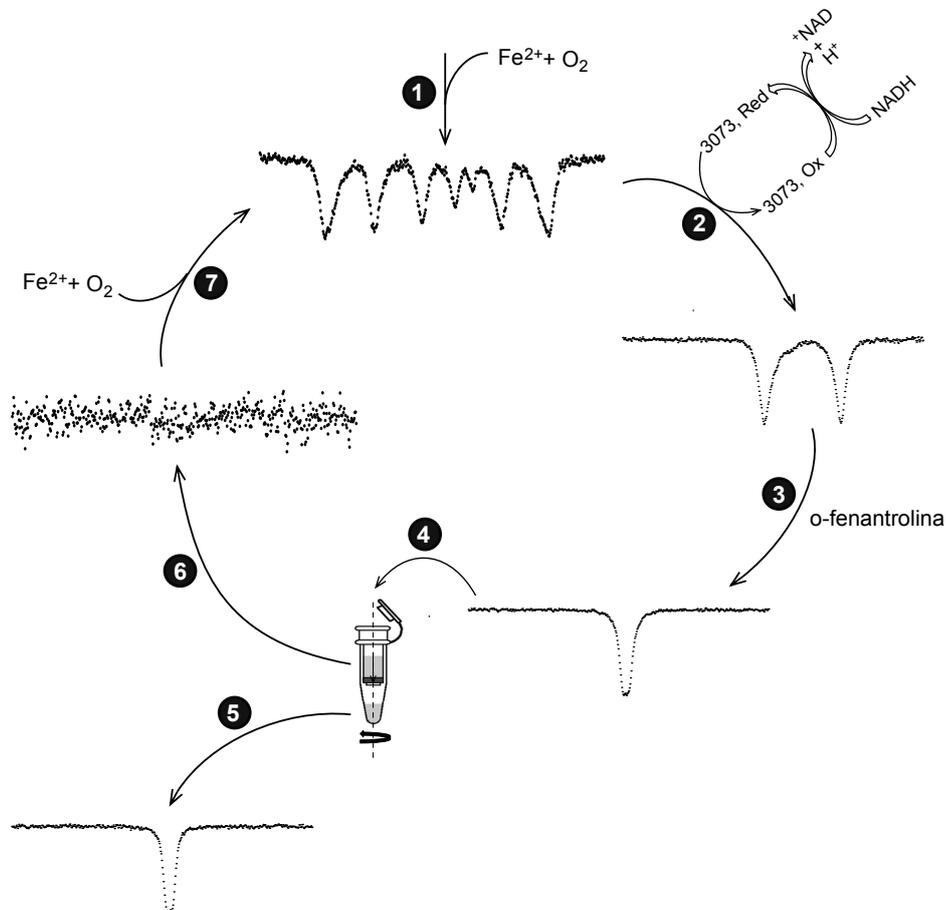


Figura 4.10 Esquema representativo do ciclo de oxidação-redução estudado, com apresentação dos passos que o constituem e respectivos espectros de Mössbauer adquiridos a temperaturas alta (80 K) e baixa (10 K). **1)** Formação do core — Adição de ^{57}Fe na presença do oxidante O_2 ; **2)** Reacção de oxidação-redução na presença da flavoproteína 3073 e de NADH; **3)** Formação do complexo Fe-Orto — Adição de o-fenantrolina em excesso à amostra; **4)** Permuta da amostra em *Microcon*; **5)** Obtenção da amostra correspondente ao volume filtrado pela membrana; **6)** Amostra correspondente ao volume retido na membrana; **7)** Reincorporação de Ferro 57 na amostra de Dps obtida no final do ciclo redox.

Através da observação da Figura 4.10 é possível analisar os diferentes passos ocorridos ao longo da reacção de oxidação-redução em estudo. O passo 1 assinala o início do processo, que corresponde à incubação da proteína Dps com 144 ferros 57, com respectiva formação de Dps core Fe. Esta primeira amostra, correspondente apenas ao core formado foi analisada e o espectro de Mössbauer adquirido a baixa temperatura (10 K). No

espectro apresentado é então possível verificar, tal como já referido anteriormente, tratar-se de uma espécie superparamagnética.

Posteriormente, o passo **2** corresponde à incubação do core com a flavoproteína 3073 e com NADH. A incubação, tal como anteriormente mencionado, foi realizada durante um total de 12h, sendo realizados diferentes tempos de incubação e seguidamente adquiridos os espectros de Mössbauer (apresentados nas Figura 4.3 e Figura 4.4). O espectro aqui apresentado corresponde ao último tempo de incubação e foi adquirido a 80 K.

Com o estudo cinético realizado e após se verificar a total conversão do ferro férrico no produto ferroso (Tabela 7-11) efectuou-se a adição do composto 1,10-fenantrolina (passo **3**) na tentativa, que se veio a comprovar, de obter a formação do complexo Fe-Orto, i.e. adicionou-se ortofenantrolina em excesso à amostra com o objectivo desta sequestrar o ferro ferroso em solução e assim comprovar a libertação do ferro da Dps ocorrida.

Após formação do complexo foi então necessário analisar se todo o ferro ferroso que foi complexado pela ortofenantrolina estaria livre em solução ou se por outro lado ainda estaria em interacção com a Dps. Assim, no passo **4** realizou-se a permuta da amostra num *Microcon* que permitiu realizar a separação em duas fracções. O volume recolhido após passagem pela membrana (passo **5**), que corresponde à fracção sem proteína e onde está presente o complexo Fe-Orto, e o volume retido na membrana (passo **6**) onde se encontra a proteína, que tal como se pode observar pelo espectro adquirido a alta temperatura não apresenta qualquer pico, ou seja, permitiu-nos comprovar que todo o ferro em solução se encontra na forma de complexo e que deixou de estar incorporado e em interacção com a proteína.

Por fim, e de forma a comprovar a actividade da Dps ao final deste ciclo, realizou-se no passo **7** a reincorporação do ferro na proteína com formação de novo core, tendo-se assim encerrado o ciclo obtendo-se uma amostra com as características espectrais da amostra inicial.

5 Discussão final e perspectivas futuras

Na última década as mini-ferritinas têm sido bastantes estudadas devido ao facto de, sendo proteínas exclusivamente bacterianas, estarem envolvidas no mecanismo de protecção celular contra espécies reactivas de oxigénio e de hidrólise de DNA. Tal como atrás descrito existe já um conhecimento bem fundamentado em dados experimentais sobre o mecanismo de oxidação do ferro ferroso em core férrico e de ligação, não específica, ao DNA. Do ponto de vista funcional é ainda expectável que o core férrico formado possa ser utilizado metabolicamente na biossíntese de cofactores necessários às células, tendo no entanto para isso de existir uma libertação fortemente regulada do ferro. De acordo com o racional baseado em dados bibliográficos e nas características fisico-químicas dos possíveis reagentes e produtos envolvidos nessa libertação assume-se que o passo fulcral será a redução do core férrico a ferro ferroso.

Assim, para esta tese, foram definidos inicialmente objectivos que se centravam na caracterização do mecanismo de libertação do ferro constituinte do core. Desses objectivos constava a procura de um parceiro redox apropriado à interacção com a Dps bem como da possível cadeia de transferência electrónica envolvida nesse mecanismo. Mais, foi claramente definido como objectivo a procura de possíveis intermediários reaccionais na reacção de libertação do ferro sendo para isso necessário utilizar uma técnica de caracterização cinética que permitisse identificar e quantificar todas as espécies de ferro presentes. Finalmente, a proposta inicial contemplava também a caracterização do produto final do ponto de vista da sua possível disponibilidade biológica.

Tendo em conta os objectivos explicitados recorreu-se ao conjunto apropriado de metodologias de biologia molecular, bioquímicas e espectroscópicas. Para a procura do possível parceiro redox iniciou-se uma pesquisa no genoma de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (genoma totalmente sequenciado e previsivelmente quase idêntico ao genoma de *Pseudomonas nautica* 617 de onde a Dps em estudo é proveniente) na tentativa de encontrar genes que codificassem para proteínas envolvidas em mecanismos de transferência electrónica. Dessa pesquisa resultou um conjunto de candidatos que integravam proteínas de diferentes classes: proteínas hémicas, proteínas de ferro-enxofre e flavoproteínas, estando no entanto excluídas as proteínas contendo cobre, nomeadamente, as cupredoxinas. Sendo efectivamente impossível efectuar a clonagem e expressão de todas estas proteínas de acordo com a calendarização dos trabalhos constantes de uma Tese de Mestrado optou-se por congregar esforços à volta de uma única classe de proteínas de transferência electrónica, tendo a classe das flavoproteínas sido considerada mais promissora para prossecução dos trabalhos. Ainda que esta escolha esteja aberta a discussão os critérios centraram-se na facilidade de expressão de holoproteínas com cofactores flavínicos em quantidades suficientes para os trabalhos espectroscópicos realizados (como discutido de seguida). Outro factor determinante é a boa adequação da gama de potenciais formais de oxidação-redução de flavoproteínas ao que se espera que

seja o valor necessário para promover a redução do core férrico. Foram então identificadas duas flavoproteínas (2375 e 3073) para as quais foi testada a expressão em diferentes condições. Os melhores resultados de expressão (obtenção de 2,9 g de células/L de cultura no caso da 2375 e 4 g de células/L de cultura para a 3073, peso húmido) foram obtidos para crescimentos em meio LB e para recolha celular efectuada 3 horas após a indução a densidade óptica (OD_{600nm}) igual a 0,5 utilizando diferentes concentrações de indutor dependendo da flavoproteína a ser expressa.

Os procedimentos de purificação desenvolvidos permitiram obter rendimentos significativos e não limitantes para as experiências subsequentes (73 mg de flavoproteína 2375 / L de cultura e 79,35 mg de flavoproteína 3073 / L de cultura).

Foi também observado durante a purificação da flavoproteína 2375 que a estabilidade da holoproteína era dependente da força iónica do meio, decorrendo esta observação do facto de no segundo passo de purificação por cromatografia de exclusão molecular utilizando o tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl se ter conseguido separar na totalidade a apoproteína do cofactor flavínico. Este cofactor, identificado por espectroscopia de UV/Visível como FMN (Figura 3.16), pode facilmente ser utilizado para reconstituir a proteína tendo sido obtido uma estequiometria de aproximadamente 1 FMN/ Flavoproteína 2375, como facilmente é verificado nos resultados da Figura 3.29. Esta característica da proteína 2375 limita a sua utilização como parceiro redox da Dps pois a estabilidade desta última normalmente implica a manutenção de uma força iónica mais elevada, sendo utilizado um tampão 200 mM MOPS pH = 7, 200 mM NaCl. Como tal, numa experiência de transferência electrónica entre a flavoproteína 2375 e a Dps, não é possível garantir que não exista, ainda que parcialmente, FMN no estado livre o que certamente leva a resultados passíveis de nos induzir em erro. Alternativamente, neste caso seria necessário a realização de um ensaio de transferência electrónica com utilização de tampões com baixa força iónica, o que apesar de vir a evitar a dissociação do cofactor da flavoproteína diminuiria a estabilidade da Dps com ferro incorporado, possivelmente levando à libertação não específica do metal. Perante estas características foi decidido excluir a flavoproteína 2375 dos testes de transferência electrónica.

A flavoproteína 3073 foi purificada até homogeneidade permanecendo estável aos diferentes valores de pH e força iónica testados durante o procedimento. Dada a homologia com as proteínas da classe NADH:quinona oxidoreductase foram efectuados testes de redução na presença de NADH. Adições sucessivas de NADH comprovaram a capacidade deste reagente transferir electrões para o cofactor flavínico, sendo possível também verificar a capacidade de re-oxidação através de incubações na presença de oxigénio molecular. Tendo em conta estas características bem como as estruturas já conhecidas para proteínas homólogas procedeu-se aos testes de transferência electrónica recorrendo, inicialmente, à espectroscopia de UV/Visível. Estes testes pretendiam avaliar a possibilidade de estabelecimento de uma cadeia de transferência electrónica entre o NADH e a proteína Dps com incorporação prévia de ferro, para tal na incubação total dos diferentes componentes

existia em solução uma mistura de NADH, flavoproteína 3073 oxidada e Dps core 96Fe. A escolha das razões de ferro/Dps utilizadas para os trabalhos realizados nesta tese foi sempre feita tendo em conta resultados já conhecidos, no âmbito de outros trabalhos realizados no Laboratório de Biofísica Molecular, para razões que variam entre 12 e aproximadamente 400 ferros por Dps. Os resultados obtidos para estes testes foram encorajadores uma vez que se observaram mudanças significativas nos diferentes espectros de UV/Visível durante as adições sequenciais de reagentes, como se pode ver na Figura 4.2. No entanto, a coalescência que se observa a vários comprimentos de onda importantes para identificar as diferentes espécies formadas no ensaio (tal como a inexistência significativa de espectro para o produto final da reacção) não permite estabelecer em rigor uma relação de causa-efeito concreta e fiável que nos permita identificar o NADH como doador inicial de electrões e ferro ferroso como produto final desta reacção. Permitiu, no entanto, estabelecer um conjunto de parâmetros experimentais que possibilitaram o planeamento de uma experiência em tudo semelhante mas desta vez executada em anaerobiose (câmara anaeróbia $pO_2 \leq 4$ ppm) e monitorizando a transferência electrónica por espectroscopia de Mössbauer.

A utilização da espectroscopia de Mössbauer é particularmente adequada a sistemas biológicos que contêm ferro. Esta espectroscopia utiliza uma fonte de ^{57}Co para possibilitar a absorção ressonante de energia por núcleos de ^{57}Fe presentes na nossa amostra. Essa absorção promove a transição do estado fundamental do núcleo de ^{57}Fe (momento angular nuclear, $I = 1/2$) para o estado excitado ($I = 3/2$). Estes estados de momento angular são efectivamente influenciados por três efeitos devidos ao ambiente electrónico criado por átomos na vizinhança do ião ferro (uma interacção monopolar eléctrica, interacção quadrupolar eléctrica e interacção dipolar magnética). Tendo em conta que o ambiente na vizinhança do núcleo de ^{57}Fe será característico do número de electrões 3d e da densidade de carga dos electrões, quer do ferro quer dos seus ligandos, a mudança no estado de oxidação do átomo de ^{57}Fe bem como no seu número e tipo de coordenação faz com que seja, normalmente, possível identificar e distinguir espécies de ferro que se formam ao longo da reacção biológica a monitorizar. É importante realçar que nesta espectroscopia não existem espécies de ferro silenciosas, que nenhum sistema é demasiado grande ou pequeno, e que é relativamente simples acoplar a utilização desta espectroscopia a metodologias cinéticas. Em relação a este último ponto a monitorização cinética torna-se possível através da utilização de tempos de incubação bem estabelecidos (com gama de tempo entre dezenas de mm/s a horas ou dias de incubação) e posterior congelação da amostra por forma a parar a reacção biológica em estudo.

A experiência cinética desenhada, no caso dos trabalhos desta Tese, permitiu verificar, pela primeira vez, que na presença dos três componentes (NADH, flavoproteína 3073 reduzida e Dps core 144Fe) existe redução e libertação de iões ferrosos do ferro

previamente incorporado na Dps. Na ausência do doador electrónico (NADH) ou do parceiro redox (flavoproteína 3073) não se verifica qualquer redução permanecendo o ferro no seu interior da cavidade proteica. Mais interessante é a observação efectuada que o processo de libertação obedece a uma cinética de primeira ordem para a qual o core férrico é directamente transformado no produto ferroso, não sendo possível detectar qualquer espécie intermediária. Este processo ocorre com uma constante cinética de primeira ordem (k), cujo valor é $0,011 \text{ min}^{-1}$, configurando assim um processo substancialmente mais lento que o processo de incorporação do ferro quando o co-substrato utilizado é peróxido de hidrogénio ($k = 7 \text{ s}^{-1}$), mas não aquando da utilização de oxigénio ($k = 0,015 \text{ min}^{-1}$)⁷³.

A verificação de que o produto final é libertado ou é tornado acessível aquando da redução foi efectuada através de um agente quelante simples (o-fenantrolina) que permitiu perceber que todo o ferro libertado estava acessível devido à formação do complexo ternário Fe-Orto. Foi ainda possível estabelecer que a proteína após libertação do ferro incorporado fica novamente disponível para dar início a um novo ciclo de incorporação. Este processo encontra-se esquematizado na Figura 4.10 e é bem revelador da possibilidade da Dps não estar apenas limitada à utilização de um mecanismo de incorporação de ferro para a protecção contra ROS, mas também de participar de um mais complexo mecanismo de regulação/resposta a estes agentes tóxicos. O facto de ser possível a uma ou mais moléculas efectuarem vários ciclos de incorporação/desincorporação permite que cumpram diferentes funções em diferentes alturas metabólicas adequando-se assim a um papel regulador do metabolismo.

Perante os resultados obtidos impõe-se perspectivar as opções de trabalho futuras. Em primeiro lugar é importante realçar que serão sempre necessários mais ensaios cinéticos por forma a determinar inequivocamente a ordem da reacção bem como o valor da verdadeira constante de primeira ordem do processo estudado. Tal, pode simplesmente ser feito por variação da concentração relativa da flavoproteína 3073 vs Dps, mantendo-se um excesso do dador electrónico inicial, o NADH. Apesar de ser um processo experimentalmente exequível e para o qual não se espera qualquer dificuldade experimental, trata-se de uma situação bastante onerosa do ponto de vista de tempo e também de custo financeiro. Para tal bastará dizer que seriam necessários entre 30 a 50 mg de Dps, ca. 2 g de flavoproteína 3073 e, aproximadamente, 10 meses de aquisição de espectros de Mössbauer para completar um conjunto de dados passível de ser analisado. Assim, dever-se-á desenhar um processo experimental mais simples que nos permita obter um conjunto de dados mais reduzido mas igualmente válido para possibilitar a estimativa dos parâmetros cinéticos supracitados.

A adicionar à variação descrita poderia também ser estudado a influência do tamanho do core férrico na velocidade de libertação do ferro. Seria interessante perceber se cores de menores dimensões teriam velocidades de libertação maiores ou mais pequenas. Este mesmo racional poderá ser aplicado a cores de maiores dimensões, sabendo que a

Dps consegue formar cores férricas de dimensões variáveis entre 24 e aproximadamente 500 ferros por molécula.

Ainda que tenha sido estabelecido inequivocamente que a flavoproteína 3073 funciona como parceiro redox da Dps no processo de libertação do ferro não podemos descartar a possibilidade de outros sistemas/cadeias de transferência electrónica o possam também fazer. Para avaliar desta possibilidade deverá ser desenvolvido um processo de *screening* de possíveis dadores electrónicos, em que proteínas de transferência electrónica tal como rubredoxinas, ferredoxinas e proteínas hémicas são incubadas, anaerobiamente e na sua forma reduzida, com Dps com core férrico analisando posteriormente essas amostras para a existência de ferroso se possível através da espectroscopia de Mössbauer. Para qualquer resposta positiva teriam necessariamente de ser repetidos os estudos cinéticos descritos neste manuscrito, podendo-se assim determinar qual ou quais os dadores electrónicos que seriam mais eficientes e portanto, de alguma forma, metabolicamente mais favoráveis.

Numa perspectiva mais abrangente e tendo em conta outros trabalhos realizados no Laboratório de Biofísica Molecular podemos pensar em utilizar as metodologias desenvolvidas nesta tese para:

- estudar a libertação de iões metálicos em cores de óxidos heterometálicos, cujo impacto pode ser interessante do ponto de vista de tolerância a altas concentrações de outros metais que não o ferro;
- tentar a co-cristalização da flavoproteína 3073 com Dps para caracterização do complexo de transferência electrónica ou alternativamente a determinação da estrutura da flavoproteína 3073 e modelação do complexo através de metodologias computacionais;
- tentar utilizar a flavoproteína 3073 ou o seu cofactor em solução para proceder à redução de estruturas cristalinas de Dps com core.

6 Bibliografia

1. Proulx-curry, P. M., and Chasteen, N. D. (1995) Molecular aspects of iron uptake and storage in ferritin, *Coordination Chemistry Reviews* 144, 347-368.
2. Briat, J. F. (1992) Iron assimilation and storage in prokaryotes, *Journal of General Microbiology* 138, 2475-2483.
3. Andrews, S. C., Robinson, A. K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis, *Fems Microbiology Reviews* 27, 215-237.
4. Bou-Abdallah, F. (2010) The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1800, 719-731.
5. Chiancone, E., Ceci, P., Ilari, A., Ribacchi, F., and Stefanini, S. (2004) Iron and proteins for iron storage and detoxification, *Biometals* 17, 197-202.
6. Timóteo, C. G., Guilherme, M., Penas, D., Folgosa, F., Tavares, P., and Pereira, A. S. (2012) *Desulfovibrio vulgaris* bacterioferritin uses H₂O₂ as a co-substrate for iron oxidation and reveals DPS-like DNA protection and binding activities, *Biochemical Journal* 446, 125-133.
7. Aisen, P., Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, 940-959.
8. Pesek, J., Buechler, R., Albrecht, R., Boland, W., and Zeth, K. (2011) Structure and mechanism of iron translocation by a Dps protein from *Microbacterium arborescens*, *Journal of Biological Chemistry* 286, 34872-34882.
9. Bradley, J. M., Moore, G. R., and Le Brun, N. E. (2014) Mechanisms of iron mineralization in ferritins: one size does not fit all, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19, 775-785.
10. Zhao, G. H., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E., and Chasteen, N. D. (2002) Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells - A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* 277, 27689-27696.
11. Le Brun, N. E., Crow, A., Murphy, M. E. P., Mauk, A. G., and Moore, G. R. (2010) Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1800, 732-744.
12. Lewin, A., Moore, G. R., and Le Brun, N. E. (2005) Formation of protein-coated iron minerals, *Dalton Transactions*, 3597-3610.
13. Liu, X. F., and Theil, E. C. (2005) Ferritins: Dynamic management of biological iron and oxygen chemistry, *Accounts of Chemical Research* 38, 167-175.
14. Andrews, S. C. (2010) The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1800, 691-705.
15. Zhang, Y., and Orner, B. P. (2011) Self-assembly in the ferritin nano-cage protein superfamily, *International Journal of Molecular Sciences* 12, 5406-5421.
16. Chasteen, N. D., and Harrison, P. M. (1999) Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage, *Journal of Structural Biology* 126, 182-194.
17. Theil, E. C., Behera, R. K., and Tosha, T. (2013) Ferritins for chemistry and for life, *Coordination Chemistry Reviews* 257, 579-586.
18. Theil, E. C. (2012) Ferritin protein nanocages—the story, pp 7-16, *Nanotechnol Percept*.
19. Ilari, A., Stefanini, S., Chiancone, E., and Tsernoglou, D. (2000) The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site, *Nature Structural Biology* 7, 38-43.
20. Uchida, M., Kang, S., Reichhardt, C., Harlen, K., and Douglas, T. (2010) The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1800, 834-845.
21. Haikarainen, T., and Papageorgiou, A. C. (2010) Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family, *Cellular and Molecular Life Sciences* 67, 341-351.

22. Frenkiel-Krispin, D., Levin-Zaidman, S., Shimoni, E., Wolf, S. G., Wachtel, E. J., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., and Minsky, A. (2001) Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection, *Embo Journal* 20, 1184-1191.
23. Almirón, M., Link, A. J., Furlong, D., and Kolter, R. (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*, *Genes & Development* 6, 2646-2654.
24. Castruita, M., Saito, M., Schottel, P. C., Elmegreen, L. A., Myneni, S., Stiefel, E. I., and Morel, F. M. M. (2006) Overexpression and characterization of an iron storage and DNA-binding Dps protein from *Trichodesmium erythraeum*, *Applied and Environmental Microbiology* 72, 2918-2924.
25. Pena, M. M. O., and Bullerjahn, G. S. (1995) The DpsA protein of *Synechococcus* sp. Strain PCC7942 is a DNA-binding hemoprotein. Linkage of the Dps and bacterioferritin protein families, *Journal of Biological Chemistry* 270, 22478-22482.
26. Wiedenheft, B., Mosolf, J., Willits, D., Yeager, M., Dryden, K. A., Young, M., and Douglas, T. (2005) An archaeal antioxidant: Characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10551-10556.
27. Reindel, S., Schmidt, C. L., Anemuller, S., and Matzanke, B. F. (2005) Expression and regulation pattern of ferritin-like DpsA in the Archaeon *Halobacterium salinarum*, *Biometals* 18, 387-397.
28. Nair, S., and Finkel, S. E. (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase, *Journal of Bacteriology* 186, 4192-4198.
29. Azam, T. A., and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli* - Sequence recognition specificity and DNA binding affinity, *Journal of Biological Chemistry* 274, 33105-33113.
30. Bellapadrona, G., Ardini, M., Ceci, P., Stefanini, S., and Chiancone, E. (2010) Dps proteins prevent Fenton-mediated oxidative damage by trapping hydroxyl radicals within the protein shell, *Free Radical Biology and Medicine* 48, 292-297.
31. Ishikawa, T., Mizunoe, Y., Kawabata, S., Takade, A., Harada, M., Wai, S. N., and Yoshida, S. (2003) The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*, *Journal of Bacteriology* 185, 1010-1017.
32. Kauko, A., Pulliainen, A. T., Haataja, S., Meyer-Klaucke, W., Finne, J., and Papageorgiou, A. C. (2006) Iron incorporation in *Streptococcus suis* Dps-like peroxide resistance protein Dpr requires mobility in the ferroxidase center and leads to the formation of a ferrihydrite-like core, *Journal of Molecular Biology* 364, 97-109.
33. Romão, C. V., Mitchell, E. P., and McSweeney, S. (2006) The crystal structure of *Deinococcus radiodurans* Dps protein (DR2263) reveals the presence of a novel metal centre in the N terminus, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11, 891-902.
34. Saumaa, S., Tover, A., Tark, M., Tegova, R., and Kivisaar, M. (2007) Oxidative DNA damage defense systems in avoidance of stationary-phase mutagenesis in *Pseudomonas putida*, *Journal of Bacteriology* 189, 5504-5514.
35. Pacello, F., Ceci, P., Ammendola, S., Pasquali, P., Chiancone, E., and Battistoni, A. (2008) Periplasmic Cu,Zn superoxide dismutase and cytoplasmic Dps concur in protecting *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from extracellular reactive oxygen species, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1780, 226-232.
36. Franceschini, S., Ceci, P., Alaleona, F., Chiancone, E., and Ilari, A. (2006) Antioxidant Dps protein from the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* - An intrinsically stable cage-like structure endowed with enhanced stability, *Febs Journal* 273, 4913-4928.
37. Ueshima, J., Shoji, M., Ratnayake, D. B., Abe, K., Yoshida, S., Yamamoto, K., and Nakayama, K. (2003) Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*, *Infection and Immunity* 71, 1170-1178.
38. Bozzi, M., Mignogna, G., Stefanini, S., Barra, D., Longhi, C., Valenti, P., and Chiancone, E. (1997) A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*, *Journal of Biological Chemistry* 272, 3259-3265.

39. Nicodeme, M., Perrin, C., Hols, P., Bracquart, P., and Gaillard, J. L. (2004) Identification of an iron-binding protein of the Dps family expressed by *Streptococcus thermophilus*, *Current Microbiology* 48, 51-56.
40. Ren, B., Tibbelin, G., Kajino, T., Asami, O., and Ladenstein, R. (2003) The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center, *Journal of Molecular Biology* 329, 467-477.
41. Papinutto, E., Dundon, W. G., Pitulis, N., Battistutta, R., Montecucco, C., and Zanotti, G. (2002) Structure of two iron-binding proteins from *Bacillus anthracis*, *Journal of Biological Chemistry* 277, 15093-15098.
42. Gupta, S., and Chatterji, D. (2003) Bimodal protection of DNA by *Mycobacterium smegmatis* DNA-binding protein from stationary phase cells, *Journal of Biological Chemistry* 278, 5235-5241.
43. Ceci, P., Ilari, A., Falvo, E., and Chiancone, E. (2003) The Dps protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not bind to DNA but protects it toward oxidative cleavage, *Journal of Biological Chemistry* 278, 20319-20326.
44. Tonello, F., Dundon, W. G., Satin, B., Molinari, M., Tognon, G., Grandi, G., Del Giudice, G., Rappuoli, R., and Montecucco, C. (1999) The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure, *Molecular Microbiology* 34, 238-246.
45. Su, M. H., Cavallo, S., Stefanini, S., Chiancone, E., and Chasteen, N. D. (2005) The so-called *Listeria innocua* ferritin is a Dps protein. Iron incorporation, detoxification, and DNA protection properties, *Biochemistry* 44, 5572-5578.
46. Yu, M.-j., Ren, J., Zeng, Y.-l., Zhou, S.-n., and Lu, Y.-j. (2009) The *Legionella pneumophila* Dps homolog is regulated by iron and involved in multiple stress tolerance, *Journal of Basic Microbiology* 49, S79-S86.
47. Brentjens, R. J., Ketterer, M., Apicella, M. A., and Spinola, S. M. (1996) Fine tangled pili expressed by *Haemophilus ducreyi* are a novel class of pili, *Journal of Bacteriology* 178, 808-816.
48. Chiancone, E., and Ceci, P. (2010) The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects* 1800, 798-805.
49. Grant, R. A., Filman, D. J., Finkel, S. E., Kolter, R., and Hogle, J. M. (1998) The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA, *Nature Structural Biology* 5, 294-303.
50. Roy, S., Gupta, S., Das, S., Sekar, K., Chatterji, D., and Vijayan, M. (2004) X-ray analysis of *Mycobacterium smegmatis* Dps and a comparative study involving other Dps and Dps-like molecules, *Journal of Molecular Biology* 339, 1103-1113.
51. Stillman, T. J., Upadhyay, M., Norte, V. A., Sedelnikova, S. E., Carradus, M., Tzokov, S., Bullough, P. A., Shearman, C. A., Gasson, M. J., Williams, C. H., Artymiuk, P. J., and Green, J. (2005) The crystal structures of *Lactococcus lactis* MG1363 Dps proteins reveal the presence of an N-terminal helix that is required for DNA binding, *Molecular Microbiology* 57, 1101-1112.
52. Ilari, A., Ceci, P., Ferrari, D., Rossi, G. L., and Chiancone, E. (2002) Iron incorporation into *Escherichia coli* Dps gives rise to a ferritin-like microcrystalline core, *Journal of Biological Chemistry* 277, 37619-37623.
53. Calhoun, L. N., and Kwon, Y. M. (2011) Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review, *Journal of Applied Microbiology* 110, 375-386.
54. Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., and Minsky, A. (1999) DNA protection by stress-induced biocrystallization, *Nature* 400, 83-85.
55. Ranjani, C. V., Rangarajan, S., Michael, D., Roy, S., and Sekar, K. (2008) Role of water molecules and ion pairs in Dps and related ferritin-like structures, *International Journal of Biological Macromolecules* 43, 333-338.
56. Zhao, G. H., Bou-Abdallah, F., Arosio, P., Levi, S., Janus-Chandler, C., and Chasteen, N. D. (2003) Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide, *Biochemistry* 42, 3142-3150.
57. Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L., and Fang, F. C. (2007) The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence, *Molecular Microbiology* 63, 1495-1507.

58. Castruita, M., Elmegreen, L. A., Shaked, Y., Stlefel, E., and Morel, F. O. M. M. (2007) Comparison of the kinetics of iron release from a marine (*Trichodesmium erythraeum*) Dps protein and mammalian ferritin in the presence and absence of ligands, *Journal of Inorganic Biochemistry* 101, 1686-1691.
59. Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2008) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company, New York.
60. Massey, V. (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin, *Biochemical Society Transactions* 28, 283-296.
61. Merrill, A. H., Lambeth, J. D., Edmondson, D. E., and McCormick, D. B. (1981) Formation and mode of action of flavoproteins, *Annual Review of Nutrition* 1, 281-317.
62. Macheroux, P., Kappes, B., and Ealick, S. E. (2011) Flavogenomics - a genomic and structural view of flavin-dependent proteins, *Febs Journal* 278, 2625-2634.
63. Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins, *Journal of Biological Chemistry* 269, 22459-22462.
64. Andrade, S. L. A., Patridge, E. V., Ferry, J. G., and Einsle, O. (2007) Crystal structure of the NADH : Quinone oxidoreductase WrbA from *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology* 189, 9101-9107.
65. NZYTech, NZY-A PCR cloning kit (2013).
66. NZYTech, NZYMiniprep-1 (2014).
67. NZYTech, NZY5 α Competent Cells (2011).
68. Invitrogen, *E-Gel*® *CloneWell* Agarose Gels Invitrogen (2007).
69. NZYTech, T4 DNA ligase (2011).
70. NZYTech, BL21(DE3) Competent Cells (2011).
71. Rogers, L. J., Sykes, G. A. (1990) Conformational changes in *Chondrus crispus* flavodoxin on dissociation of FMN and reconstitution with flavin analogues, *Biochemical Journal* 272, 775-779.
72. Márcia Guilherme, *Estudos mecanísticos e estruturais da oxidação de ferro por ferritinas rápidas*, Tese de Doutoramento (2009), FCT-UNL, PT
73. Joana Tavares Macedo, *Functional and structural studies of a mini-ferritin protein*, Tese de Mestrado (2014), FCT-UNL, PT
74. NZYTech, NZYDNA Ladder II (2012).
75. NZYTech, NZYDNA Ladder III (2012).
76. U. K. Laemmli (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
77. NZYTech, *Low Molecular Weight (LMW) Protein Marker* (2012).
78. NZYTech, *NZYColour Protein Marker II* (2013)
79. Novagen, pET-21a-d (+) Vectors Novagen (2011)

7 Anexos

7.1 Amplificação dos genes MARHY3073 e MARHY2375 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* por PCR

Antes de se efectuar a reacção de PCR é necessário efectuar-se dois passos importantes, ou seja, é necessário obter o DNA genómico usado como molde para a DNA polimerase e desenhar e sintetizar os *primers* necessários.

Obtenção do DNA genómico

1. Mergulhar, repetidas vezes, um palito com várias colónias de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* num tubo *ependorf* com 50 μ L de H₂O Milli-Q autoclavada e ferver o tubo durante 5 minutos;
2. Centrifugar a 8 000 rpm durante 5 minutos;
3. Recolher e reservar o sobrenadante. Manter a 4 °C.

Design dos primers

1. Recorrendo a *software* apropriado (BLAST) escolher quais as sequências de nucleóticos mais apropriadas complementares à extremidades das duas cadeias dos genes que se pretendem amplificar;
2. Desenhar os *primers*, *forward* e *reverse*, a utilizar;
3. Antes da utilização, efectuar uma diluição numa razão 1:10 (os *primers* foram sintetizados pela STAB VIDA, Portugal).

A composição da reacção de PCR é apresentada na Tabela 7-1.

Tabela 7-1 Composição da reacção de PCR, num volume total de 50 μ L.

Reagentes (Concentração do stock)	Concentração final	Ensaio (μ L)	Controlo Negativo (μ L)
Tampão 10x NH ₄ (Tampão <i>Taq</i> polimerase)	1x	2.5 / 5	2.5 / 5
Solução de MgCl ₂ 50 mM	3 mM	1.5 / 3	1.5 / 3
Mistura de dNTP's 2,5 mM	200 μ M	2 / 4	2 / 4
<i>Primer Rev</i> (10 pmol/ μ L)	50 pmol	5 / 10	5 / 10
<i>Primer Fwd</i> (10 pmol/ μ L)	50 pmol	5 / 10	5 / 10
DNA molde (DNA genómico)	-	5 / 10	-
Bio <i>Taq</i> polimerase (5 U/ μ L, Bioline)	1-1,5 U	0.3 / 0.6	0.3 / 0.6
H ₂ O Milli-Q autoclavada	Até Vt = 25 μ L	3.7 / 7.4	8.7 / 17.4

As condições da PCR utilizadas (Tabela 7-2) foram as mesmas para as proteínas 3073 e 2375, com excepção da temperatura de hibridação, que varia de acordo com a temperatura de fusão (T_f) de cada um dos *primers* utilizados.

Tabela 7-2 Condições da reacção de PCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo	
Desnaturação inicial da cadeia	94	5 min	
Desnaturação da cadeia	94	60 seg	} Repetir 29x
Hibridação		60 seg	
3073	62		
2375	67		
Extensão da cadeia	72	90 seg	
Extensão final	72	5 min	
Fim da reacção	4	-	

7.2 Mapa de restrição dos genes MARHY3073 e MARHY2375

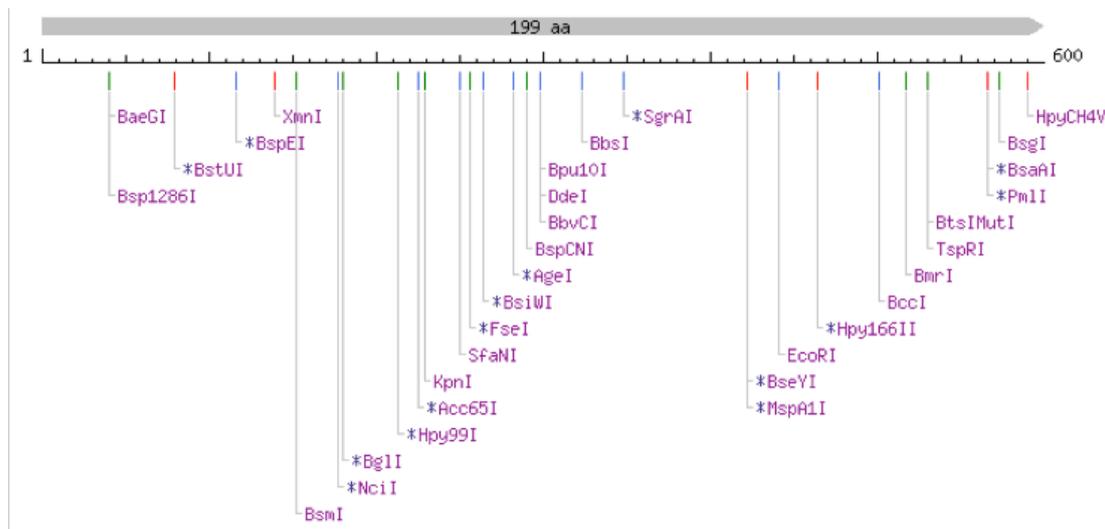


Figura 7.1 Mapa do gene MARHY3073 com enzimas de restrição utilizando o software NEBcutter V2.0

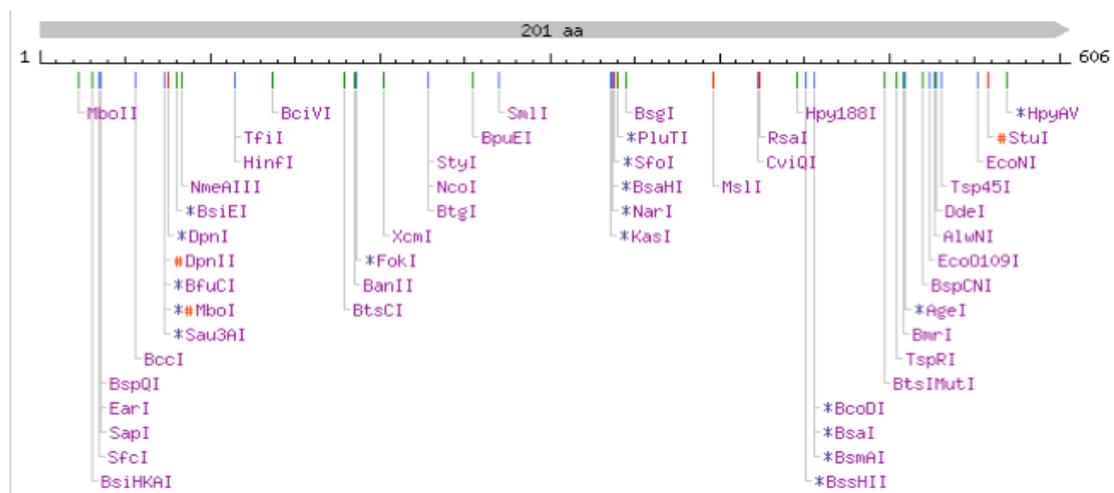


Figura 7.2 Mapa do gene MARHY2375 com enzimas de restrição utilizando o software NEBcutter V2.0

7.3 Hidrólise dos vectores e purificação dos produtos da hidrólise

Os DNA plasmídicos, vectores pNZY28—3073 e pNZY28—2375 e vector de sobre-expressão pET-21c, foram purificados usando o Kit NZYMiniprep (NZYTech).

A hidrólise foi efectuada utilizando-se as enzimas de restrição específicas, *Sal* I (10 U/ μ L, NZYTech) e *Nde* I (10 U/ μ L, NZYTech), estando assim dividida em duas partes: uma primeira reacção efectuada com a enzima *Sal* I e uma segunda reacção com a enzima *Nde* I.

Para a primeira reacção de hidrólise a mistura, com volume total de 40 μ L, descrita na Tabela 7-3, foi incubada a 37 °C durante 2 horas, tempo ao fim do qual se efectuou a verificação da hidrólise com a primeira enzima de restrição por electroforese em gel de agarose. Seguidamente, adicionou-se 2 μ L de *Nde* I e incubou-se a 37 °C durante 2 horas, verificando-se novamente a hidrólise.

As verificações dos vectores hidrolisados foram efectuadas por electroforese em gel de agarose 0,8% e 1% em tampão TAE.

Tabela 7-3 Composição da reacção de hidrólise dos vectores com a enzima de restrição *Sal* I.

Componente	Volume (μ L)		
	pNZY28—3073 (503,7 ng/ μ L)	pNZY28—2375 (521,2 ng/ μ L)	pET-21c (93 ng/ μ L)
pDNA	3,90	3,80	20
10x Tampão da enzima	4	4	4
<i>Sal</i> I (10 U/μL)	2	2	2
H₂O Milli-Q	30,1	30,2	14
Volume total (μL)	40		

Após hidrólise dupla dos fragmentos de DNA que contêm os genes MARHY3073 e MARHY2375 e linearização do vector pET-21c (Novagen) procedeu-se à purificação destes utilizando-se o E-Gel® CloneWell™ Extraction System da Invitrogen⁶⁸. Esta purificação consiste numa electroforese realizada numa cassette específica que contêm um gel de agarose 0,8% com duas fileiras de poços, uma para a aplicação das amostras e outra para a recolha das bandas. O gel possui na sua constituição SYBR Safe que permite a visualização em tempo real, com a luz azul, da migração das bandas, que podem assim ser recolhidas quando atingem os poços indicados para esse efeito.

Depois da recolha das bandas realizou-se a verificação da purificação por electroforese em gel de agarose 0,8% em TAE, com posterior quantificação de cada um dos fragmentos obtidos tal como descrito na Anexo 7.9.

7.4 Transformação de células competentes *E. coli* NZY5α e *E. coli* BL21(DE3)

Protocolo da transformação fornecido pela NZYTech⁷⁰

1. Descongelar as células competentes em gelo;
2. Aliquotar as células em três tubos de 1,5 mL, dois com volume de 30 µL (controles) e um com 50 µL (transformação);
3. Adicionar a cada um dos tubos o DNA pretendido para a transformação, de acordo com a Tabela 7-4, e agitar suavemente;

Tabela 7-4 Volumes de plasmídeo utilizados na transformação de células *E. coli* NZY5α.

	Transformação	Controlo positivo	Controlo negativo
Plasmídeo	5 µL	-	-
pNZY28	-	1 µL	-

4. Incubar em gelo durante 30 minutos;
5. Sujeitar as células a um choque térmico durante 40 segundos num banho a 42 °C;
6. Colocar no gelo durante 2 minutos;
7. Adicionar 900 µL de meio LB a cada reacção e incubar a 225 rpm, durante 1h a 37 °C;
8. Plaquear, em placas com meio de cultura LB-Agar contendo 100 µg/mL de ampicilina, três volumes diferentes das células transformadas (tais como 50, 100 e 200 µL). Para os controlos, positivo e negativo, plaquear somente um volume (como 100 µL);
9. Incubar as placas durante a noite a 37 °C.

7.5 Sequenciação do DNA — Alinhamento das sequências obtidas dos vectores pET-21c—3073 e pET-21c—2375 com a sequência de aminoácidos das proteínas 3073 e 2375.

Alinhamento efectuado pelo software CLC Sequence Viewer 6.

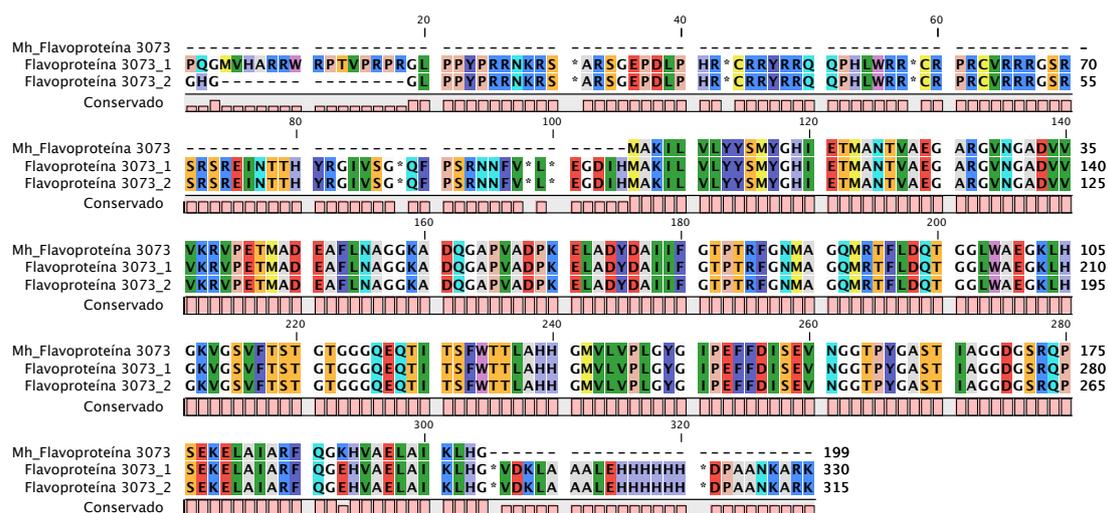


Figura 7.3 Alinhamento das sequências obtidas do vector pET-21c—3073 com a sequência de aminoácidos da proteína 3073.

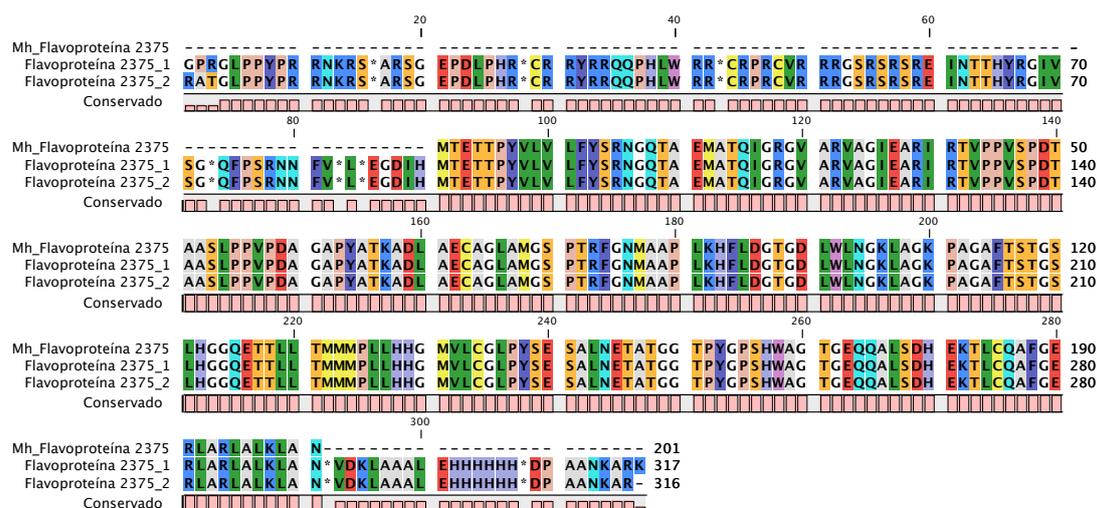


Figura 7.4 Alinhamento das sequências obtidas do vector pET-21c—2375 com a sequência de aminoácidos da proteína 2375.

7.6 Electroforese em gel de agarose para análise do DNA

Assim, foram utilizados géis de agarose de 0,8% e de 1% em tampão TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM acetato, pH = 8,0, 1 mM EDTA).

Para se preparar este gel, a agarose (NZYTech) é dissolvida num volume apropriado de tampão TAE e colocada para solidificar num suporte apropriado, com prévia colocação de um pente que permite a formação dos poços para aplicação das amostras. Em seguida, o gel é colocado numa tina de electroforese (Horizon® 11-14, Life Technologies ou MSMini e MSMidi, Cleaver) e coberto com tampão TAE.

As amostras de DNA, previamente preparadas com tampão de amostra (*BlueJuice*™, Invitrogen), são colocadas nos poços do gel e um campo eléctrico é aplicado. As moléculas migram ao longo do gel de acordo com o seu tamanho; as que têm o mesmo tamanho migram em conjunto e formam-se as bandas e as de menor peso molecular migram mais rápida e facilmente.

A electroforese é efectuada a 80 V (fonte de tensão *Electrophoresis Power Supply* - 301, GE Healthcare) durante, normalmente, 1 hora e 30 minutos, tempo ao fim do qual é necessário retirar o gel da tina e colocá-lo para corar numa solução de SYBR Safe (Invitrogen), durante 30-45 minutos. Após estar corado, o gel é colocado sobre um transiluminador (*Safe Imager*™, Invitrogen) para que se possam visualizar as bandas formadas e fotografado com a máquina *Gel Logic 100, Imaging System* (Kodak).

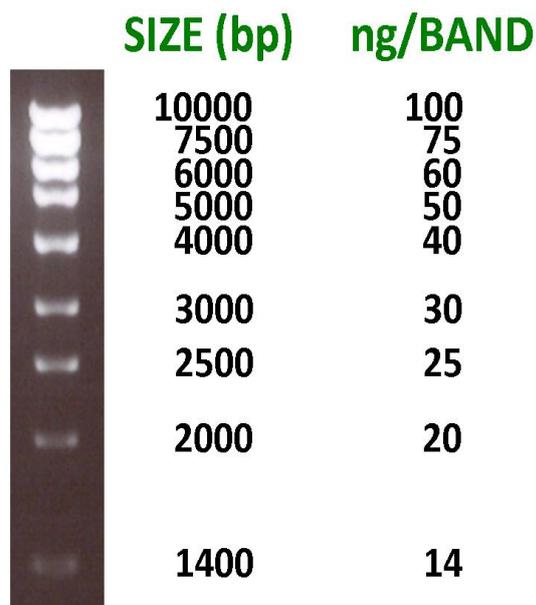


Figura 7.5 Marcador de pesos moleculares NZYDNA Ladder II, NZYTech⁷⁴. 5 µL de marcador aplicados num gel 1% de agarose em tampão TAE 1x.

Os marcadores de pesos moleculares utilizados foram o NZYDNA *Ladder* II e o NZYDNA *Ladder* III (NZYTech), que apresentam perfis electroforéticos aqui representados nas Figura 7.5 e Figura 7.6.

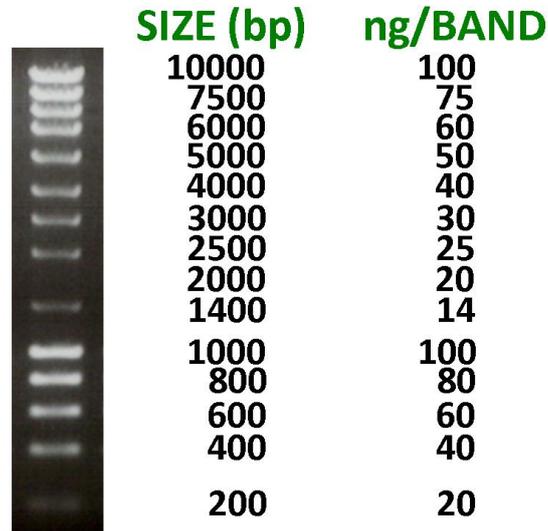


Figura 7.6 Marcador de pesos moleculares NZYDNA *Ladder* III, NZYTech⁷⁵. 5 μ L de marcador aplicados num gel 1% de agarose em tampão TAE 1x.

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

Foi utilizada a electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para a verificação da produção das proteínas 3073 e 2375 durante os testes de sobre-expressão, bem como para a verificação posterior ao longo da produção e purificação destas e da Dps WT, também utilizada.

Foram preparados e utilizados géis de poliacrilamida a 12,5% e ainda géis *pre-cast* (GE Healthcare) de poliacrilamida a 12%, ambos em condições desnaturantes.

A electroforese SDS-PAGE aqui mencionada foi efectuada com base na técnica descrita por Laemmli⁷⁶ e a polimerização do géis de poliacrilamida efectuada utilizando-se os volumes tal como descrito na Tabela 7-5.

A mistura necessária para a formação do géis foi preparada e colocada entre dois vidros colocados em suportes, onde permaneceram até solidificar. Após, este período os vidros foram retirados e colocados em suportes apropriados, que por sua vez foram colocados na tina de electroforese (Bio-Rad), tina essa onde foi colocado um volume apropriado de tampão de corrida (Tampão de electroforese Tris-Glicina). Com toda a montagem preparada procedeu-se à aplicação das amostras nos poços do gel, amostras que

foram previamente preparadas e às quais foi necessário adicionar o tampão de amostra (habitualmente adiciona-se 5 µL de tampão de amostra a cada uma das amostras, excepto no caso das amostras para verificação de produção de proteínas em que são adicionados 50 µL).

No caso das amostras para verificação da produção das proteínas, o primeiro passo passa pela normalização das amostras a aplicar no gel de acordo com a equação previamente estabelecida e que indica que a quantidade em mL de amostra a ser utilizada é determinada pela razão entre 1,2 e o valor da densidade óptica da alíquota retirada da cultura celular ($\text{Amostra (mL)} = 1,2 / \text{OD}_{600 \text{ nm}}$). Seguidamente, o volume de cultura determinado na normalização foi centrifugado a 8000 xg durante 8 minutos (centrífuga Sigma 1-14, Sartorius) e o *pellet* obtido foi ressuspendido no tampão de amostra.

As amostras foram ainda fervidas durante 2-3 minutos imediatamente antes da sua aplicação no gel (nos testes de sobre-expressão mesmo após esse tempo as amostras foram mantidas a temperatura elevada durante a aplicação no gel).

Efectou-se primeiramente a electroforese a 80 V, até que as amostras percorram a região do gel de concentração e quando atingindo o gel de separação aumentou-se para 120 V, tendo a corrida a duração de, aproximadamente, 1 hora e 30 minutos (fonte de tensão Electrophoresis Power Supply - 301, GE Healthcare). No fim de realizada a electroforese, o géis foram corados com uma solução de Azul de Coomassie R-250 durante 20-30 minutos e posteriormente colocados numa solução descorante, indicada na Tabela 7-6. Após descoloração fotografaram-se os géis com a máquina Gel Logic 100, Imaging System (Kodak).

Os marcadores de pesos moleculares utilizados na electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram o *Low Molecular Weight* (NZYTech)⁷⁷ e o *NZYColour Protein Marker II* (NZYTech)⁷⁸, com perfis electroforéticos apresentados na Figura 7.7 — A e B, respectivamente.

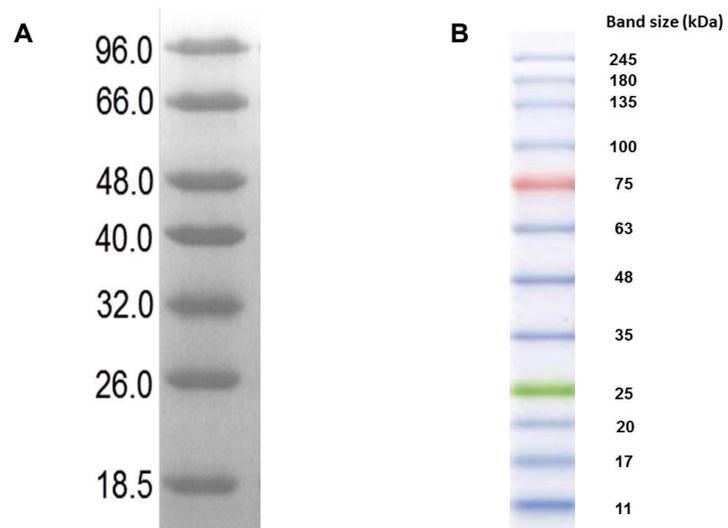


Figura 7.7 **A)** Marcador de massas moleculares, em kDa, *Low Molecular Weight* (LMW), NZYTech. 15 μ L de LMW aplicados num gel 14% SDS-PAGE. **B)** Marcador de massas moleculares, em kDa, *NZYColour Protein Marker II* (NZYII), NZYTech. 5 μ L de NZYII aplicados num gel 10% SDS-PAGE.

Tabela 7-5 Volumes necessários para a preparação de um gel SDS-PAGE.

Soluções	Gel de Concentração 5% Acrilamida	Gel de Separação 12,5% Acrilamida
Solução I	-	0,75 mL
Solução II	0,45 mL	-
Solução III	0,3 mL	2,08 mL
SDS 10%	0,018 mL	0,05 mL
H ₂ O	0,94 mL	2,1 mL
PSA 10%	13,5 µL	38 µL
TEMED	2,0 µL	2,5 µL

Tabela 7-6 Soluções *stock* para a preparação dos géis de poliacrilamida SDS-PAGE.

Solução	Reagentes	Quantidades	Observações
Tampão do gel de separação (Solução I)	Tris-Base, 2,5 M, (Sigma-Aldrich) HCl conc., (Sigma-Aldrich) H ₂ O	30,3 g Até pH = 8,8 Até 100 mL	pH = 8,8 - 9,0 Diluir 1:2 antes de utilizar
Tampão do gel de concentração (Solução II)	Tris-Base, 0,5 M, (Sigma-Aldrich) HCl conc., (Sigma-Aldrich) H ₂ O	6,06 g Até pH = 6,8 Até 100 mL	pH = 6,6 – 6,8
Acrilamida-Bisacrilamida 30% (37,5:1) (Solução III)	Acrilamida-Bis (37,5:1), (Merck)		
SDS 10%	SDS, (Sigma-Aldrich) H ₂ O	10g Até 100 mL	
Persulfato de amónia (PSA) 10%	Persulfato de amónia, (Bio-Rad) H ₂ O	500 mg Até 5 mL	Preparar antes de utilizar
Tampão de electroforese Tris-Glicina (Tampão de corrida)	Tris-Base 0,25 M, (Sigma- Aldrich) Glicina 1,92 M, (NZYTEch) SDS, (Sigma-Aldrich) 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, (Sigma-Aldrich) Glicerol, (Scharlau) Azul bromofenol, (Riedel-de Haën)	5 mL 8 mL 1 mL 2 mL 4 mg	Volume total de 20 mL
Solução Corante Azul Coomassie R-250	Azul Coomassie R-250, (Sigma-Aldrich) Ácido acético glacial, (Merck) Metanol, (Carlo Erba) H ₂ O	1 g 15 mL 90 mL Até 200 mL	
Solução Descorante	Ácido acético glacial, (Merck) Metanol, (Carlo Erba) H ₂ O	75 mL 450 mL Até 1000 mL	

7.8 Isolamento de DNA plasmídico

Miniprep

NZYMiniprep — Kit e protocolo fornecidos pela NZYTech⁶⁶.

O isolamento dos pDNA no caso dos vectores pNZY28—3073 e pNZY28—2375 foi efectuado de acordo com o protocolo para plasmídeos *High-copy-number*, enquanto para os vectores pET-21c; pET-21c—3073 e pET-21c—2375 foi seguido o protocolo para plasmídeos *Low-copy-number*. Em ambos os casos o volume de cultura celular a utilizar é o mesmo (5-7 mL de meio de cultura contendo 100 µg/mL de ampicilina), os protocolos diferem apenas nos volumes utilizados no passo de lise celular, para o caso *Low-copy-number* o volume das soluções A1; A2 e A3 é o dobro do utilizado para o outro.

O protocolo descrito é o utilizado para isolamento de plasmídeos *High-copy-number*.

1. Recolha de células:

- Centrifugar 5 mL de cultura celular a 12 000 xg durante 30 segundos, à temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante;

2. Lise Celular:

- Ressuspender o *pellet* em 250 µL de solução A1, utilizar o vortex até que a suspensão fique homogénea;
- Adicionar 250 µL de solução A2, agitar suavemente por inversão dos tubos 6-8 vezes e incubar durante 4 minutos à temperatura ambiente;
- Adicionar 300 µL de solução A3 e agitar suavemente invertendo os tubos 6-8 vezes. Centrifugar durante 8 minutos a 11 000 xg, à temperatura ambiente;

3. Ligação do DNA à coluna:

- Colocar a coluna num tubo colector de 2 mL e aplicar o sobrenadante do passo 2;
- Centrifugar a 11 000 xg, durante 1 minuto à temperatura ambiente. Descartar o eluído;

4. Lavagem da coluna:

- Adicionar 500 µL de solução AY à coluna e centrifugar a 11 000 xg, durante 1 minuto à temperatura ambiente. Descartar o eluído;
- Adicionar 600 µL de solução A4, centrifugar a 11 000 xg durante 1 minuto à temperatura ambiente e descartar o eluído;

5. Secagem da coluna:

- Re-inserir a coluna num novo tubo colector e centrifugar durante 2 minutos, a 11 000 xg e à temperatura ambiente;

6. Eluição o pDNA:

- Colocar a coluna num tubo de 1,5 mL e adicionar 30-50 µL de solução AE (o volume adicionado varia de acordo com a concentração final desejada), previamente aquecida a 50 °C, e incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente;
- Centrifugar a 11 000 xg, durante 1 minuto à temperatura ambiente.

Recolher os tubos obtidos e conservar a -20 °C.

7.9 **Quantificação do DNA plasmídico isolado**

A determinação da concentração do pDNA isolado pode ser efectuada por :

1. Espectroscopia de UV

Através da leitura da absorvância da amostra, traçando-se o espectro entre 230 e 500 nm e registando o valor a 260 nm é possível determinar a concentração do pDNA.

Assumindo-se que se $OD_{260\text{ nm}} = 1,0$ então a $[dsDNA] = 50\text{ ng}/\mu\text{L}$ temos que:

$$[\text{pDNA}] (\text{ng}/\mu\text{L}) = (OD_{260\text{ nm}} \times \text{Factor de diluição}) \times 50\text{ ng}/\mu\text{L},$$

obtendo-se assim a quantificação do DNA plasmídico isolado.

2. Comparação da intensidade das bandas num gel de agarose 1% em TAE 1x

Para se estimar a concentração do DNA plasmídico é utilizada uma fórmula, apresentada a baixo, que tem como princípio a comparação da intensidade das bandas. Assim, a concentração é determinada através da comparação entre a intensidade da banda que se pretende quantificar e a intensidade das bandas do marcador com tamanho semelhante a ela e de concentração conhecida.

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

7.10 Purificação das proteínas

Todas as proteínas utilizadas neste projecto (proteína 3073, 2375 e Dps) foram purificadas em duas etapas, por cromatografia de permuta iónica e por cromatografia de exclusão molecular, num Äkta Prime Plus (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com os protocolos apresentados em seguida.

7.10.1 Cromatografia de permuta iónica

As proteínas foram purificadas, primeiramente, por **cromatografia de permuta iónica** utilizando-se uma coluna cromatográfica aniónica, DEAE – *Sepharose fast flow* de 2,6 cm de diâmetro e 30 cm de altura, com um volume de 160 mL (GE Healthcare Life Sciences).

Ao longo da purificação as condições utilizadas foram mantidas, caudal de 5 mL/min e pressão de 0,5 MPa, e os tampões filtrados (filtro de 0,45 µm) utilizados foram: tampão A — 10 mM Tris-HCl pH = 7,6 e tampão B — 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl.

1. Preparação do extracto proteico bruto

- Dialisar o extracto proteico numa fita de diálise (Visking, Medicell International Ltd) com MWCO de 12-14 kDa, durante a noite contra 10 mM Tris-HCl pH = 7,6;
- Centrifugar o extracto dialisado a 10 000 xg (centrífuga Z 36 HK, Hermle LaborTechnik), durante 10 minutos a 8 °C;
- Filtrar com um filtro de membrana polietersulfona de 0,45 µm (VWR).

2. Preparação da coluna

- Lavar a coluna com 480 mL H₂O Milli-Q (correspondente a 3x volume de coluna);
- Equilibrar a coluna com tampão A (passar no mínimo 1,5x volume de coluna).

3. Aplicação na coluna

- Injectar o extracto na coluna;
- Efectuar o passo de lavagem com tampão A por forma a eluir todas as proteínas que não adsorvem à resina;
- Eluir a proteína por aplicação de um gradiente de concentração linear descontínuo de tampão B (Tabela 7-7) num total de 195 minutos, com fraccionamento de 12 mL.

Tabela 7-7 Gradiente de concentração linear descontínuo de tampão B.

Tempo (min)	% tampão B
0	0
30	30
190	70
195	100

4. Lavagem da coluna

- Parar a recolha das fracções e deixar passar tampão B até que tudo seja eluído da coluna;
- Fazer passagens rápidas (5 minutos) e alternadas entre tampão A e tampão B;
- Lavar a coluna com, aproximadamente, 320 mL H₂O Milli-Q (2x volume coluna).

Para conservar coluna até próxima utilização deve-se passar cerca de 320 mL de 20% de EtOH com caudal 0,5 mL/min e pressão de 0,5 MPa e assim deixá-la preparada para iniciar nova purificação a partir do ponto 1 como aqui indicado.

Para determinar quais das fracções recolhidas continham a proteína e qual o seu grau de pureza analisaram-se as mesmas por SDS-PAGE utilizando géis de poliacrilamida de 12,5% a 80/120 V durante 1 hora e 30 minutos, tal como descrito na Anexo 7.7, tendo como referência o marcador de pesos moleculares *Low Molecular Weight* (NZYTech) apresentado na Figura 7.7.

Depois de se juntarem todas as fracções que continham proteína, estas foram concentradas numa célula de ultrafiltração e prosseguiu-se para a nova etapa de purificação.

7.10.2 Cromatografia de exclusão molecular

Após termos toda a proteína concentrada passou-se ao segundo passo da purificação por **cromatografia de exclusão molecular** onde se utilizou uma coluna cromatográfica de filtração em gel a Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) com limites de exclusão entre 10 e 600 kDa e de, aproximadamente, 83 mL.

Ao longo da purificação utilizou-se o tampão 10 mM Tris-HCl pH = 7,6, 500 mM NaCl e as condições foram mantidas num caudal de 1,5 mL/min e pressão de 0,6 MPa.

1. Preparação da proteína

- Concentrar a proteína, proveniente do primeiro passo de purificação numa célula de ultrafiltração de volume e *MWCO* apropriados;
- Filtrar com um filtro de membrana polietersulfona de 0,45 µm (VWR).

2. Preparação da coluna e do *loop*

- Lavar a coluna com 3x volume de coluna de H₂O Milli-Q;
- Equilibrar a coluna com o tampão (passar cerca de 2x volume de coluna);
- Lavar o *loop* a utilizar (5 mL) com 30 mL de H₂O Milli-Q e 30 mL de tampão.

3. Alicação da proteína

- Injectar a proteína no *loop*;
- No sistema, trocar a posição de *load* para *inject* para que a proteína seja aplicada na coluna;
- Eluir a proteína com o tampão, e recolher com fraccionamento de 2 mL.

4. Lavagem da coluna e *loop*

- Parar a recolha das fracções
- Passar tampão na coluna, cerca de 1,5x volume de coluna;
- No sistema, trocar a posição de *inject* para *load* e proceder à lavagem do *loop* com 30 mL de H₂O Milli-Q;
- Lavar a coluna com H₂O Milli-Q, aproximadamente, 3x volume de coluna.

Para conservar coluna até próxima utilização deve-se passar cerca de 3x volume da coluna de 20% de EtOH com caudal 0,5 mL/min e pressão de 0,6 MPa e assim deixá-la preparada para iniciar nova purificação, a partir do ponto 1 acima descrito.

7.11 Quantificação da proteína

A concentração das proteínas foi determinada recorrendo a três métodos diferentes e em diferentes momentos deste projecto.

7.11.1 Espectroscopia de UV/Visível — Lei de Lambert-Beer

Sabendo-se que o valor de absorvância de uma amostra a determinado comprimento de onda é directamente proporcional à sua concentração é possível, pela Lei de Lambert-Beer

$$A = \epsilon \times b \times c$$

quantificar a proteína presente em solução.

Utilizando-se este método deve-se ter em conta que é necessário que se conheça, previamente, o valor do ϵ (coeficiente de extinção molar) da substância ao comprimento de onda medido, no caso das proteínas em estudo temos de conhecer o $\epsilon_{280 \text{ nm}}$.

7.11.2 Método do BCA

Para se proceder à determinação da concentração pelo método do BCA (Ácido bicinonínico), tal como descrito em seguida, foi utilizado o Kit *Bicinchoninic Acid Assay* da Sigma-Aldrich. Todos os ensaios foram realizados em triplicado e a proteína padrão utilizada foi a BSA 1 mg/mL (Sigma-Aldrich).

O método colorimétrico do BCA é baseado na interacção do ião Cu^{2+} com as proteínas, que em meio alcalino conduz à produção do ião Cu^{1+} e à formação de um complexo com o BCA, complexo esse que absorve fortemente a 562 nm.

1. Preparar, em tubos, várias diluições da proteína padrão, num volume total de 100 μL , obtendo-se diferentes concentrações entre 0 e 1 mg/mL. Em simultâneo preparam-se também diluições da amostra que se pretende quantificar;
2. Adicionar, a cada um dos tubos, 1 mL de solução (Solução BCA + Solução de Cobre, 50:1) e incubar, durante 30 minutos a 37 °C;
3. Após o tempo de incubação deve-se aguardar que atinja a temperatura ambiente e medir o valor de absorvância de cada um dos tubos a 562 nm (espectrofotómetro Evolution 300, Thermo Scientific);
4. Traçar uma recta de calibração tendo em conta os valores lidos para o padrão e recorrendo à equação da recta determinada o valor da concentração da amostra analisada.

Nota: Subtrair aos valores medidos para os diferentes tubos o valor de absorvância medido para o branco.

7.12 Quantificação de solução de ferro

O método colorimétrico utilizado para a quantificação de ferro da solução utilizada de cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH}=3,0$) é efectuado com base no método da 1,10-fenantrolina.

Este método baseia-se na utilização de um ligando bidentado (1,10-fenantrolina) que forma um complexo estável com o ião ferroso (Fe^{2+}) presente em solução, complexo este que possui uma cor intensa vermelho-alaranjado, com coeficiente de extinção molar característico a 510 nm ($\epsilon_{510 \text{ nm}}$) de valor igual a $11,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Na Tabela 7-8 é possível observar as soluções e volumes utilizados para a determinação da concentração da solução de ferro, tanto para o padrão como para a amostra de ferro a quantificar. Para padrão e amostra foram efectuados triplicados e a recta de calibração construída, típica para este método, encontra-se representada na Figura 7.8.

Tabela 7-8 Soluções e respectivos volumes utilizados no método colorimétrico para a determinação da concentração de ferro.

Reagentes	Tubos (mL)									
	Padrão							Amostra		
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ferro padrão, 0,01 mg/mL ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Fluka)	0	0,2	0,4	0,8	1,2	1,5	2,0	0,05	0,1	0,2
H_2O	2,5	2,3	2,1	1,7	1,3	1	0,5	2,45	2,4	2,3
Misturar (Vortex)										
10% hidrocloreto de hidroxilamina (Sigma-Aldrich)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Misturar (Vortex)										
0,3% 1,10-fenantrolina (Panreac)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Misturar (Vortex) e esperar 10 minutos										
H_2O	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7
Medir absorvância a 510 nm										

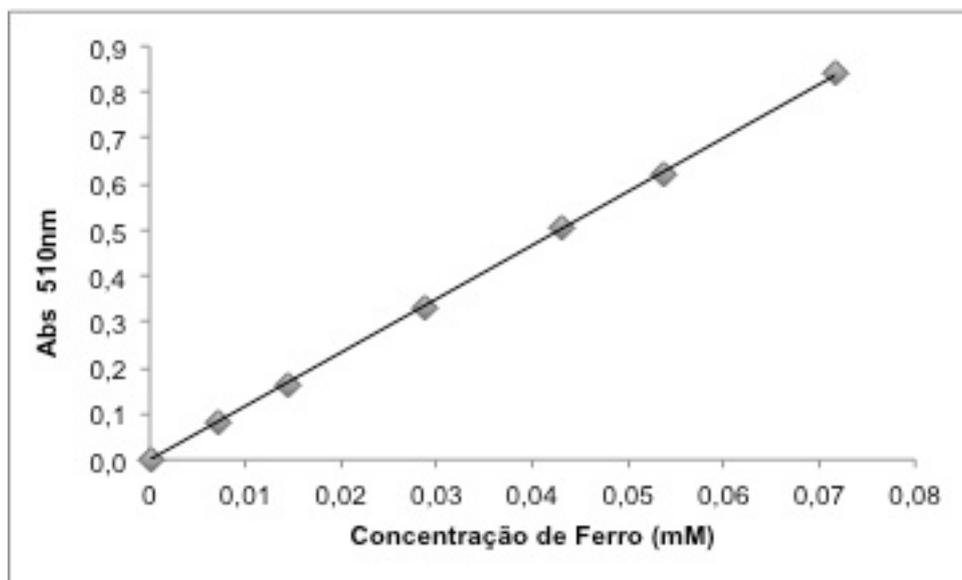


Figura 7.8 Recta de calibração do ferro padrão utilizada para a determinação do valor da concentração do ferro na amostra de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. A equação da recta apresentada é: $\text{Abs} = 11,68 \times [\text{Fe}]$, com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,99983$.

7.13 Meios de cultura

7.13.1 LB e LB-Agar

O meio LB (*Luria-Bertani*) é um meio nutricionalmente rico e normalmente bastante utilizado na propagação e manutenção de linhagens recombinantes de *E. coli*.

O meio de cultura LB (Tryptona — 10 g/L; Extracto de levedura — 5 g/L e NaCl — 10 g/L, NZYTech) foi preparado dissolvendo-se em água destilada (25 g de LB em 1 L de ddH₂O), tendo sido posteriormente autoclavado (Labo Autoclave, Sanyo) a 121 °C durante 20 minutos. Já autoclavada foi necessário deixar a solução arrefecer antes de se efectuar a adição do antibiótico, que foi adicionado ao meio imediatamente antes da utilização do mesmo.

No caso do meio de cultura LB-Agar (Tryptona — 10 g/L; Extracto de levedura — 5 g/L; NaCl — 10 g/L e Agar — 12 g/L, NZYTech) o procedimento foi o mesmo, dissolveu-se em água destilada (37 g de LB Agar em 1 L de ddH₂O) autoclavou-se a 121 °C durante 20 minutos e deixou-se arrefecer até se adicionar o antibiótico. Seguidamente o meio é distribuído por placas de Petri estéreis e quando totalmente frio solidifica.

7.13.2 Meio 2xYT

O meio 2xYT (Extracto de Levedura Tryptona) é um meio nutricionalmente rico desenvolvido para o crescimento de linhagens recombinantes de *E. coli*. Neste meio a bactéria desenvolve-se melhor devido ao facto deste possuir na sua composição, aminoácidos; precursores de nucleótidos; vitaminas; entre outros metabolitos essenciais para o crescimento e desenvolvimento da célula.

Para a preparação deste meio foi necessário dissolver cada um dos reagentes que o constituem em água destilada, tal como apresentado na Tabela 7-9. A solução preparada foi então autoclave a 121 °C durante 20 minutos e deixou-se arrefecer até se adicionar o antibiótico, adição que é feita apenas momentos antes de se utilizar o meio.

Tabela 7-9 Composição de 1 L de meio 2xYT

Reagentes	Quantidade (g/L)
Tryptona (VWR)	20
NaCl (LabChem)	20
Extracto de Levedura (VWR)	10

7.14 Mapa do vetor de sobre-expressão pET-21c da Novagen

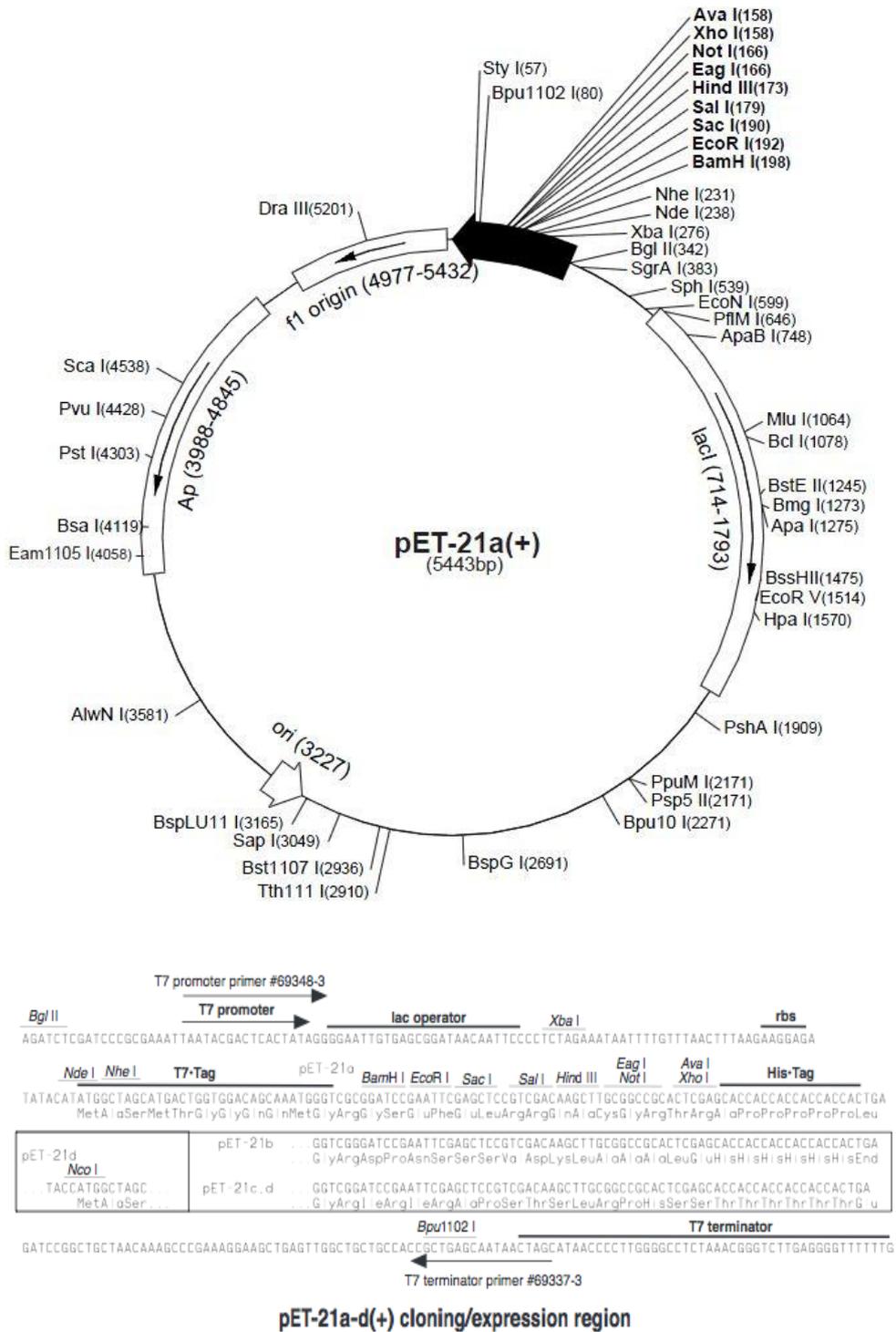


Figura 7.9 Mapa de vetor de sobre-expressão pET-21c (+) da Novagen⁷⁹.

7.15 Espectro UV/Visível do FMN

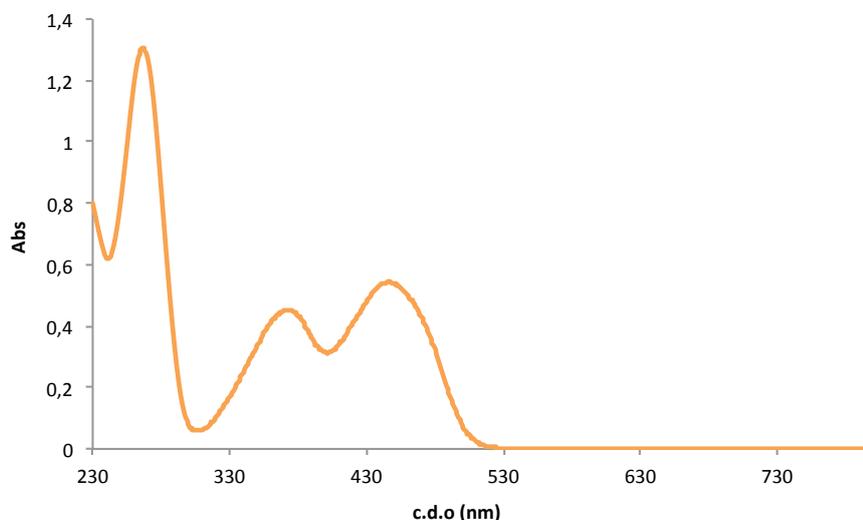


Figura 7.10 Espectro UV/Visível de uma solução 20mM do cofactor FMN (AppliChem) preparada em tampão 10 mM Tris-HCl, pH = 7,6.

7.16 Incorporação de ferro na Dps

A incorporação de ferro na proteína Dps foi realizada com base no protocolo, desenvolvido anteriormente pelo Grupo de Biofísica Molecular, descrito seguidamente e representado esquematicamente na Figura 7.11.

A proteína Dps foi incorporada com o ferro em tampão 200 mM MOPS pH = 7, 200 mM NaCl, e o oxigénio como oxidante.

1. Estabelecer razão entre a concentração de Dps e de ferro a incorporar (Dps : nFe, sendo n o número de ferros a incorporar na proteína);
2. Preparar a amostra de proteína com a concentração pretendida;
3. Preparar a solução de ferro a utilizar ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), quantificando-a de acordo com o protocolo apresentado no Anexo 7.12;
4. Parcelar o volume total de ferro a adicionar à proteína e realizar pequenas adições sucessivas deste. Incubar a mistura durante 5 minutos, à temperatura ambiente, entre cada adição;
5. Saturar a amostra com oxigénio e conservar a 4 °C. Repetir a saturação com O_2 ao longo de 4 dias, 2 vezes por dia.

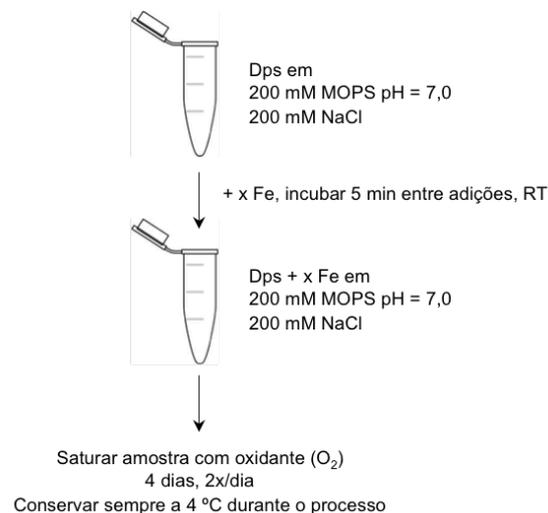


Figura 7.11 Representação esquemática do processo de incorporação de ferro na Dps.

Ao fim dos 4 dias, utilizar a Dps com ferro incorporado (Dps core Fe) ou conservar a -20 °C até ser utilizada.

7.17 Espectroscopia de Mössbauer

Resultados

- **Parâmetros de Mössbauer obtidos**

Tabela 7-10 Parâmetros de Mössbauer obtidos, sem campo magnético aplicado a 80 K, para a proteína Dps core férrico; para o produto ferroso obtido; para o complexo ferro-ortofenantrolina (controle) e complexo produto ferroso + ortofenantrolina. Valor apresentado entre parêntesis corresponde ao erro associado ao último decimal.

Parâmetros a 80 K	Amostras			
	Core Férrico (Fe ³⁺)	Produto Ferroso (Fe ²⁺)	Complexo Ferro- Ortofenantrolina 	Produto Ferroso + Ortofenantrolina
ΔEq (mm/s)	0,663 (6)	3,144 (4)	0,245 (2)	0,254 (4)
δ (mm/s)	0,467 (5)	1,319 (5)	0,408 (4)	0,407 (3)
Γ (mm/s)	0,500 (5)	0,433 (6)	0,276 (6)	0,361 (4)

- **Resultados da cinética — Conversão ferro férrico em ferro ferroso**

Tabela 7-11 Diferentes percentagens de ferro obtidas ao longo do estudo da cinética da reacção de oxidação-redução.

	Tempo (min)	% Ferro	
		Ferroso (Fe ²⁺)	Férrico (Fe ³⁺)
A (Controlo)	0 e 414,3	0	100
B	4,3	9,4	90,6
C	14,3	21,0	79,0
D	24,3	25,0	75,0
E	34,3	34,4	65,6
F	44,3	42,0	58,0
G	54,3	48,0	52,0
H	64,3	56,0	44,0
I	84,3	66,0	34,0
J	104,3	70,0	30,0
K	134,3	81,0	19,0
L	174,3	88,0	12,0
M	234,3	91,0	9,0
N	414,3	100,0	0,0

- **Espectro — Controlo Complexo Ferro-Ortofenantrolina**

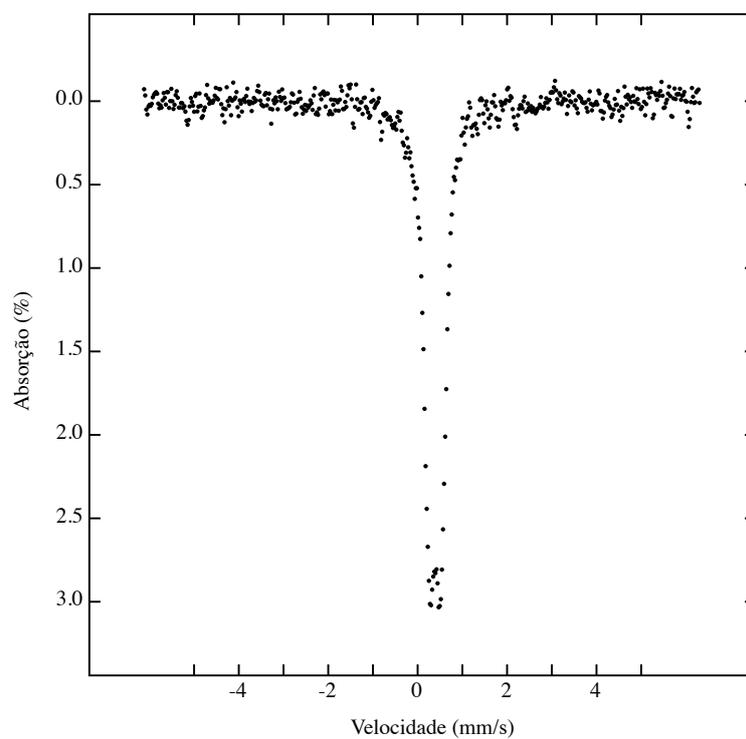


Figura 7.12 Espectro de Mössbauer adquirido a temperatura alta (80 K) para a amostra controlo do complexo Ferro-Ortofenantrolina.