

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E BIOQUÍMICOS DE PROTEÍNAS**  
**RECOMBINANTES MUTADAS DE FUSCOREDOXINA DE**  
***DESULFOVIBRIO DESULFURICANS ATCC 27774***

**Por**

**Ana Raquel Martinho Ramos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Rui Manuel de Oliveira Duarte

**Lisboa**  
**2008**



---

## AGRADECIMENTOS

A concretização desta tese não teria sido possível sem a colaboração preciosa de algumas pessoas e instituições a quem gostaria de agradecer.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador Rui O. Duarte pela possibilidade de realizar a minha tese, bem como por toda a disponibilidade, motivação e compreensão sempre demonstrados. Agradeço igualmente aos Professores José Moura e Isabel Moura pela possibilidade de concretizar a tese nos grupos de Química Bioinorgânica e Engenharia de Proteínas e de Bioquímica Física de Proteínas, do Centro de Química Fina e Biotecnologia do Departamento de Química da FCT/ UNL.

À Professora Alice Pereira por toda a auxílio e disponibilidade demonstrada sempre que precisei.

À Inês C. Pereira por toda compreensão e apoio na fase final da minha tese.

Ao Américo Duarte, por toda a paciência, prontidão e ajuda que sempre mostrou, todas as vezes que precisei.

A todos os meus colegas cuja cooperação tornou possível a concretização da minha tese, em especial o Carlos Martins, a Márcia Guilherme e a Ana Teresa Lopes.

Aos meus amigos que me apoiaram nos piores e melhores momentos, em particular a Diana Vieira e a Sofia Fragoso.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo que sempre me deram na vida e que sem ele não seria possível a concretização deste projecto.

E finalmente, à minha irmã, por todo o apoio, amizade, estímulo e auxílio que sempre deu.

Ana Raquel Ramos



---

## RESUMO

A Fuscoredoxina foi inicialmente isolada a partir de bactérias redutoras de sulfato (BRS) tais como *Desulfovibrio vulgaris* e *Desulfovibrio desulfuricans*. A proteína é constituída por dois centros de Ferro-enxofre, um dos quais invulgar, apresentando uma coordenação mista do tipo  $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}]$ , e cuja função, ainda não se encontra bem definida, daí a importância deste estudo.

Foi obtida mais uma proteína recombinante mutada (AR2) a partir da Fuscoredoxina recombinante (RD1). A mutação consistiu na substituição do resíduo de aminoácido Cys400 por um de Ala no centro de coordenação mista. Além desta proteína mutante foram alvo de estudo outras proteínas mutantes já existentes: RD2 - deleção da região N-terminal que contém os quatro primeiros resíduos de aminoácido de cisteína da proteína; SC1 - substituição do resíduo de aminoácido Glu265 pelo resíduo de aminoácido Ala no centro  $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}]$ ; e AR1 - deleção do resíduo de aminoácido Glu488 do centro  $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}]$ .

Numa tentativa de perceber qual a função biológica que os centros da Fuscoredoxina desempenham, as proteínas recombinante (RD1) e recombinantes mutadas purificadas, foram alvo de caracterização bioquímica e por técnicas espectroscópicas.

**Palavras-Chave:** Fuscoredoxina, Mutações, centro híbrido, caracterização bioquímica, espectroscopia.



---

## ABSTRACT

Fuscoredoxin was initially purified from sulfate reducing bacteria species like *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio desulfuricans*, and later the gene was found in a wide range of microorganisms. This protein was extensively studied because of the unusual structure of its cluster  $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}]$ , unique in biological systems. The function of this cluster, and consequently of the Fuscoredoxin, is still enigmatic, which lead us to perform this study.

One more recombinant mutant protein was obtained from the recombinant Fuscoredoxin (RD1) by the replacement of the amino acid Cys400/ Ala present in the hybrid cluster. Other pre-existing recombinant mutant proteins were subjected to this study: RD2 - deletion of the N-terminal region that contains the first four residues of cysteine; SC1 - substitution of amino acid residue Glu265 by Ala at the cluster  $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}]$ ; and AR1 - deletion of the amino acid residue Glu488 from the hybrid cluster.

In an attempt to understand what biological function the cluster of Fuscoredoxin play, the purified recombinant protein (RD1) and recombinant mutants were subjected to biochemical and spectroscopic characterization.

**Keywords:** Fuscoredoxin; Mutations; Hybrid cluster; biochemical characterization, spectroscopy

---

---

# ÍNDICE

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	v
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES .....	xvii
CAPITULO I - INTRODUÇÃO .....	1
1 - O GÉNERO <i>DESULFOVIBRIO</i> .....	2
2 – OS CENTROS DE FE-S .....	3
3 – A FUSCOREDOXINA .....	5
4 – CLONAGEM E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES MUTADAS ....	9
5 – ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS .....	12
5.1 – Espectroscopia de RPE.....	12
5.2 - ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER.....	14
CAPÍTULO II - PARTE EXPERIMENTAL .....	17
OBJECTIVOS .....	18
1 – ISOLAMENTO DE ADN PLASMÍDICO pRD1 A SER MUTADO .....	18
1.1 – TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE E. COLI COM O PLASMÍDEO RD1 .	18
1.2 – ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ADN PLASMÍDICO (MINI-PREP) .....	19
1.3 – VERIFICAÇÃO DO ADN ISOLADO E PURIFICADO POR ELECTROFORESE.....	19
1.4 – QUANTIFICAÇÃO DO ADN PLASMÍDICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV .....	20
2 – PRODUÇÃO DO MUTANTE DA FUSCOREDOXINA AR2.....	20
2.1 – SUBSTITUIÇÃO DA CISTEÍNA 400 .....	20
2.1.1 – Selecção dos Iniciadores Oligonucleotídicos .....	21
2.1.2 – Mutagénese Dirigida.....	21
2.1.3 – Selecção e Análise das Colónias .....	23
3 - VERIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO POR SEQUENCIAÇÃO DO ADN.....	24
3.1 – CRESCIMENTO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pAR225	

---

3.2 – SEQUENCIAÇÃO .....	25
4 - PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS MUTADAS EM LARGA ESCALA .....	25
4.1 – TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE E. COLI BL21 COM OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES .....	26
4.2 – CRESCIMENTO E INDUÇÃO DOS PLAMÍDEOS RECOMBINANTES .....	26
5 - ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, PROTEÓLISE E CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS GST/FUSCOREDOXINA E GST/ FUSCOREDOXINA MUTADA .....	27
5.1 – EXTRACÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO .....	27
5.2 – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE .....	28
5.3 – HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO COM A PRESSION .....	29
5.4 – CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS .....	30
6 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS MUTANTES DA FUSCOREDOXINA .	30
6.1 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS .....	30
6.2 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	31
6.3 – DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM FERRO DAS PROTEÍNAS .....	33
7 – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA .....	34
7.1 – ESPECTROSCOPIA DE UV/ VISÍVEL .....	34
7.2 – ESPECTROSCOPIA DE RPE .....	34
7.3 – ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER DA FUSCOREDOXINA RECOMBINANTE (RD1) .....	34
CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
1 – OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO RD1 .....	38
2 – PRODUÇÃO DO MUTANTE AR2 .....	39
3 – SEQUENCIAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES .....	40
4 – EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTE E RECOMBINANTES MUTADAS EM LARGA ESCALA .....	42
5– EXTRACÇÃO/ ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, PROTEÓLISE E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA GST/ FUSCOREDOXINA RECOMBINANTE E RECOMBINANTE MUTADA .....	45
6 – ESPECTROSCOPIA DE UV/ VISÍVEL .....	49
7– HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO COM A PRESSION .....	51

---

8 – CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA FUSCOREDOXINA .....	56
8.1 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS .....	56
8.2 – DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FERRO NÃO HÉMICO .....	57
8.3 – ESPECTROSCOPIA DE RPE.....	59
8.4 – ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RD1 .....	65
CAPÍTULO IV - CONCLUSÕES E PROJECTOS FUTUROS .....	67
BIBLIOGRAFIA.....	71
APÊNDICES .....	77
APÊNDICE A - PURIFICAÇÃO DA PROTEASE PRESSION .....	78
ANEXOS.....	81
ANEXO I – pGEX-6P-1.....	82
ANEXO II - CLONAGEM DO RD1 .....	83
ANEXO III – SEQUENCIAS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MUTADAS SC1, RD2 E AR1.....	84
ANEXO IV –MUTAGÉNESE DIRIGIDA.....	86
ANEXO V - PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> .....	87
ANEXO VI - PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO CÉLULAS COMPETENTES ....	89
ANEXO VII – PROTOCOLO DA MINIPREP DO KIT DA JETQUICK (GENOMED GMBH®).....	90
ANEXO VIII – SEQUÊNCIA/ESTRUTURA PRIMÁRIA DA FUSCOREDOXINA .....	91
ANEXO IX - REACÇÃO DE PCR.....	93
ANEXO X – ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	94
ANEXO XI – ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	95



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> .....	2
Figura 2 – Representação dos diversos tipos coordenação do ferro e do enxofre, na forma mais simples de centros de Fe-S: (i) [FeS <sub>4</sub> ]; (ii) [Fe <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ]; (iii) [Fe <sub>3</sub> S <sub>4</sub> ]; (iv) [Fe <sub>4</sub> S <sub>4</sub> ].....	3
Figura 3 – Representação de estruturas mais complexas dos centros de Fe-S da nitrogenase: (A) Centro P da nitrogenase com dois centros [Fe <sub>4</sub> S <sub>3</sub> ] que se ligam através de cisteínas; (B) Cofactor da nitrogenase com um centro de Fe-S misto.....	4
Figura 4 – Representação da estrutura tridimensional da Fuscoredoxina <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774.....	7
Figura 5 - Representação do centro 1 da Fuscoredoxina de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774, com os átomos de ferro representados com cor castanha e os átomos de enxofre com cor verde..	8
Figura 6 – Representação do centro 2 da Fuscoredoxina de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774, em que os átomos de ferro estão representados a preto, os de enxofre com cor amarela e os de oxigénio com coloração vermelha.....	9
Figura 7 – Representação esquemática de um espectrómetro de RPE.....	13
Figura 8 – Electroforese em gel de agarose para verificação do ADN plasmídico isolado e purificado a partir de células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , utilizando o kit <i>JETQUICK Plasmid Miniprep</i> (Genomed GmbH®). .....	38
Figura 9 – Electroforese em gel de agarose 0.8%; 1X TAE; 90mV; 45min, para verificar os produtos de PCR obtidos após amplificação do ADN para realização da mutagénese dirigida. (M – Marcador de pesos moleculares (1kb); A – pRD1 (45 ng); B – Produto do PCR antes da digestão com <i>DpnI</i> ; C – Produto do PCR depois de digerido). .....	40
Figura 10 – Electroforese em gel de agarose 0.8%; 1X TAE; 90 mV; 30 minutos; PCR de colónia para confirmar se o ADN plasmídico contém o fragmento de interesse. (M – Marcador de pesos moleculares (1kb); A – controlo negativo; B – controlo positivo; C e D – ADN das colónias analisado). .....	40

---

Figura 11 – Electroforese em gel de agarose 0.8%; 1X TAE; 90mV; 45 minutos. Gel de verificação do ADN plasmídico recombinante isolado da colónia com o fragmento de interesse. (M – Marcador de pesos moleculares (1kB); A – ADN Plasmídico isolado).....	41
Figura 12 – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína recombinante RD1 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.....	43
Figura 13 – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante RD2 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.....	43
Figura 14 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante SC1 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.....	44
Figura 15 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante AR1 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.....	44
Figura 16 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante AR2 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.....	45
Figura 17 – Cromatograma obtido durante a purificação da proteína de fusão RD1, com a Absorvância (mAU) em função do volume de eluído (ml). (A – O que não fica agarrado à coluna; B – Proteína de fusão eluída).....	46
Figura 18 – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão RD1 juntamente com a GST.....	47
Figura 19 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão RD2 juntamente com a GST.....	47
Figura 20 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão SC1 juntamente com a GST.....	48

---

Figura 21 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão AR1 + GST. ....	48
Figura 22 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão AR2 com a GST.....	49
Figura 23 – Espectro de UV/ Visível da amostra de Fuscoredoxina recombinante (RD1) no estado oxidado. ....	50
Figura 24 – Espectro de UV/ visível das amostras de Fuscoredoxina recombinantes mutadas nos seus estados oxidados. ....	50
Figura 25 - Cromatograma obtido durante a purificação da proteína recombinante RD1 após hidrólise, com a Absorvância (mAU) em função do volume de eluído (ml). (A – Proteína recombinante eluída; B – Eluição da GST e PreScission).....	51
Figura 26 – SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras da purificação da proteína recombinante RD1 após a hidrólise (primeiro ensaio). ....	52
Figura 27 - SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras da purificação da proteína recombinante RD1 após a hidrólise (segundo ensaio).....	53
Figura 28 – SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras analisadas da proteína recombinante RD1 após nova hidrólise (terceiro ensaio).....	54
Figura 29 - SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras da purificação da proteína recombinante mutada AR2, antes e após hidrólise com PreScission. ....	54
Figura 30 –SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, ~1h. Amostras da purificação da proteína de fusão mutada AR1 na coluna cromatográfica GSTrap <sup>TM</sup> FF.....	55
Figura 31 – Recta de calibração e respectiva equação, obtida a partir da representação dos valores de absorvância a 562 nm em função da quantidade de BSA ( $\mu$ g). ....	56
Figura 32 – Recta de calibração e respectiva equação, obtida a partir da representação dos valores de absorvância a 593 nm em função da quantidade de Ferro (nmol), a qual serve para determinar o coeficiente de absorvância característico ( $\epsilon$ ). ....	57

---

Figura 33 – Espectros de RPE da Fuscoredoxina recombinante (RD1) (A) e das proteínas recombinantes mutadas RD2 (B), SC1 (C), AR1 (D) e AR2 (E).....	62
Figura 34 – Espectros de RPE da Fuscoredoxina recombinante (RD1) (A) e das proteínas recombinantes mutadas RD2 (B), SC1 (C), AR1 (D) e AR2 (E).....	63
Figura 35 – Espectros de RPE das amostras reduzidas com ditionito da Fuscoredoxina recombinante (RD1) (A) e das proteínas mutadas RD2 (B), SC1 (C), AR1 (D) e AR2 (E). .....	64
Figura 36 – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a PreScission juntamente com a GST. ....	78
Figura 37 - Cromatograma obtido durante a purificação da proteína de fusão PreScission, com a Absorvância (mAU) em função do volume de eluído (ml). ....	79
Figura 38 - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. O gel obtido permite verificar a purificação da proteína de fusão PreScission juntamente com a GST. ....	79
Figura 39 – Esquema representativo do vector de expressão pGEX-6P-1.....	82
Figura 40 – O plasmídeo recombinante RD1 (~6500 pares de bases) foi obtido a partir da inserção do gene da Fuscoredoxina de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774 no vector plasmídico de expressão pGEX-6P-1.....	83
Figura 41 – A reacção de PCR baseia-se no processo de replicação de ADN que ocorre <i>in vivo</i> . ....	93
Figura 42 – A reacção de PCR que envolve as três etapas fundamentais da Figura 41, pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de ADN pré-existente.. ....	93
Figura 43 – Procedimentos experimentais de uma electroforese em gel de agarose. ....	94
Figura 44 – Esquema de preparação de um gel de poliacrilamida. ....	95
Figura 45 – Esquema de uma electroforese em gel de poliacrilamida. ....	96
Figura 46 – Representação do que sucede a duas amostras sujeitas a SDS-PAGE.. ....	97

---

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes e respectivas quantidades utilizados na reacção de mutagénesis dirigida.....	22
Tabela 2 – Programa de PCR utilizado na reacção de mutagénesis dirigida. ....	22
Tabela 3 – Reagentes e respectivas quantidades, utilizados para a transformação dos produtos da reacção de PCR em células super competentes DH5 $\alpha$ e respectiva reacção de controlo da transformação. ....	23
Tabela 4 – Reagentes e respectivas quantidades utilizados na reacção de PCR de colónia e respectivos controlos. ....	24
Tabela 5 – Programa de PCR utilizado para a reacção de PCR de colónia e respectivos controlos ....	24
Tabela 6 – Volumes padrão contendo uma concentração conhecida de BSA, para a determinação do coeficiente de absorvidade característico ( $\epsilon$ ). ....	32
Tabela 7 – Volumes utilizados para determinação da concentração de cada uma das amostras das proteínas mutadas.....	32
Tabela 8 - Reacções padrão contendo uma concentração de Ferro padrão conhecida, para a determinação do coeficiente de absorvidade característico ( $\epsilon$ ). ....	33
Tabela 9 – Valores de absorvância obtidos e de concentração calculados a partir da Equação 4 para a proteína recombinante RD1. ....	56
Tabela 10 – Valores de concentração média obtidos para as proteínas recombinantes mutadas SC1, RD2, AR1 e AR2.....	57
Tabela 11 - Valores de absorvância e de quantidade de Ferro por proteína obtidos para a proteína recombinante RD1.....	58
Tabela 12 - Quantidade de Ferro por proteína obtidos para as proteínas recombinantes mutadas.....	58
Tabela 13 – Valores teóricos e obtidos pelo método de quantificação do número de Ferros por molécula de proteína (TPTZ). ....	58
Tabela 14 – Resultados experimentais obtidos na caracterização bioquímica das proteínas recombinante e recombinantes mutadas. ....	69



---

## LISTA DE ABREVIATURAS E CONVENÇÕES

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**Ala** – Alanina

**ARN** – Ácido ribonucleico

**BSA** – Albumina de soro bovino

**Cys** – Cisteína

**dNTP's** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

***E. coli*** – *Escherichia coli*

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético

***et al (et aliae)*** – e outros (para pessoas)

**g** – unidade da força centrífuga relativa (gravidade)

**Glu** – Glutamato

**GST** – Glutathione-S-transferase

**h** – Horas

**His** – Histidina

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta pressão

**IPTG** – Isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosido

**LB** – Luria Bertani

**min** – Minutos

**PAGE** – Electroforese em gel de poliacrilamida

**PBS** – Solução salina de tampão fosfato

**PCR** – Reacção em cadeia da polimerase

**rpm** – Rotações por minuto

---

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TAE** – Tris-acetato-EDTA

**Taq** – *Thermus aquaticus*

**TEMED** – N-tetrametiletilenodiamina

**UV** – Ultravioleta

---

*“Reparta o seu conhecimento.  
É uma forma de alcançar a imortalidade.”*

*Dalai Lama*



---

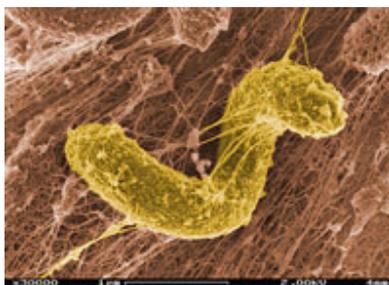
# CAPITULO I

## INTRODUÇÃO

## 1 - O GÊNERO *DESULFOVIBRIO*

As bactérias reductoras de sulfato (BRS) pertencem a um vasto grupo de microrganismos que se encontram disseminados por diversos ambientes, incluindo o tracto intestinal de alguns animais, como o do Homem. Estes microrganismos utilizam o sulfato como aceitador final de electrões <sup>(1)</sup>, mas possuem a capacidade de responder a outros aceptadores de electrões, tais como o enxofre, o nitrato e o nitrito, desempenhando por isso, funções ao nível do ciclo do enxofre e do azoto. As BRS são bastantes prejudiciais para a indústria devido à redução do sulfato a sulfureto, que é uma forma bastante reactiva, corrosiva e tóxica. Mas por outro lado, estas bactérias são alvo de grande interesse porque podem funcionar como biorremediadores, devido às suas capacidades de reduzir diversos metais tóxicos, tais como Urânio (VI), Crómio (VI) e Ferro (III) <sup>(3)</sup>.

O género mais estudado de bactérias reductoras de sulfato é o *Desulfovibrio*, que se encontra normalmente em ambientes aquáticos ou em solos abundantes em material orgânico e com níveis suficientes de sulfato <sup>(2)</sup>. As espécies de *Desulfovibrio* são Gram-negativas, não formam esporos e apresentam um diâmetro celular de 0.7µm. O trabalho bioquímico que tem vindo a ser desenvolvido com diversas metaloproteínas de *Desulfovibrio* e o estudo das respectivas funções celulares, tem permitido o conhecimento de novas proteínas, bem como a identificação de genes, presentes num grande número de genomas de organismos já sequenciados <sup>(1)</sup>.

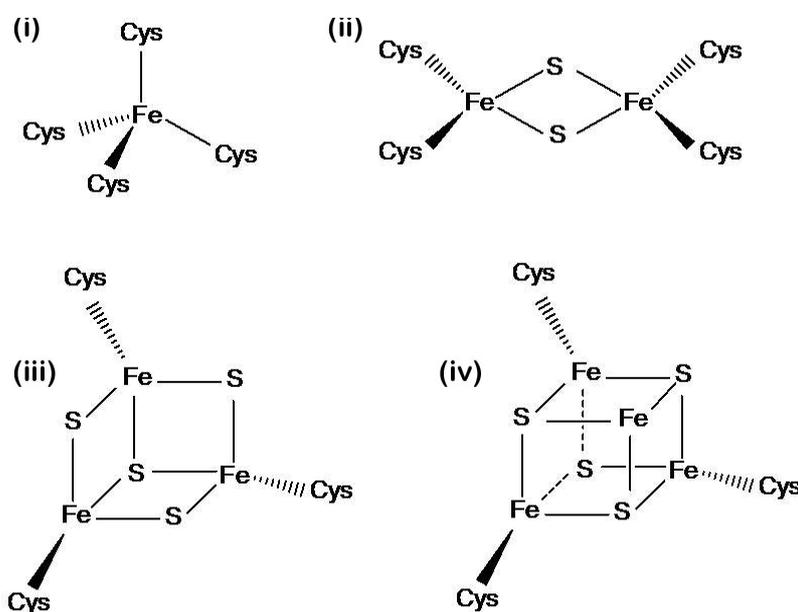


**Figura 1** – *Desulfovibrio desulfuricans*. Fonte: [3]

## 2 – OS CENTROS DE FE-S

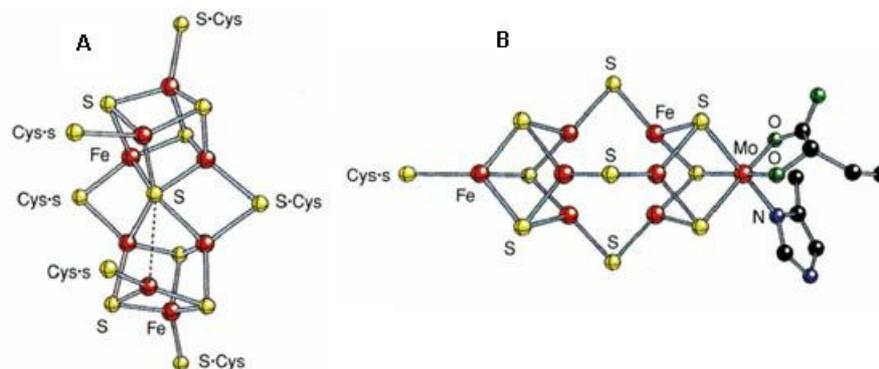
Os centros de Ferro-Enxofre (Fe-S) são um dos mais antigos grupos prostéticos constituídos por átomos de Ferro e Enxofre. Estas estruturas são formadas devido à coordenação dos grupos sulfureto, presentes no aminoácido cisteína, a átomos de ferro <sup>([4], [5], [6], [7])</sup>. Os centros de Fe-S podem conter entre um a oito átomos de ferro coordenados segundo uma geometria tetraédrica com quatro átomos de enxofre, através de enxofres inorgânicos, podendo a mesma proteína apresentar mais do que um centro <sup>([8])</sup>.

A composição em metais nos centros Fe-S é relativamente simples. Nas proteínas contendo um centro Fe-S mais simples, característico das rubredoxinas, (i) o átomo de ferro encontra-se coordenado a quatro resíduos de cisteína [FeS<sub>4</sub>] da cadeia polipeptídica; (ii) dois átomos de ferro e dois de enxofre [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] que constitui a estrutura básica dos centros ferro-enxofre, e pode ser combinada de modo a converter-se em centros de complexidade crescente; (iii) três átomos de ferro e quatro de enxofre [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>] e (iv) quatro átomos de ferro e quatro de enxofre [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>] (**Figura 2**) <sup>([7], [9])</sup>.



**Figura 2** – Representação dos diversos tipos coordenação do ferro e do enxofre, na forma mais simples de centros de Fe-S: (i) [FeS<sub>4</sub>]; (ii) [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>]; (iii) [Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>]; (iv) [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>].

Os centros de Ferro-Enxofre podem também apresentar variações mais complexas, como acontece, por exemplo, na nitrogenase, em que se verifica a existência de dois centros  $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$  ligados por via de cisteínas; e outro centro misto  $[\text{Fe}_7\text{MoS}_6]$  (**Figura 3**) <sup>([6], [8], [10])</sup>.



**Figura 3** – Representação de estruturas mais complexas dos centros de Fe-S da nitrogenase: (A) Centro P da nitrogenase com dois centros  $[\text{Fe}_4\text{S}_3]$  que se ligam através de cisteínas; (B) Cofactor da nitrogenase com um centro de Fe-S misto. **Fonte:** Adaptado de [10].

Até à década de 60 estes centros eram desconhecidos, mas desde que foram detectados em estudos com organismos fotossintéticos, em bactérias fixadoras de azoto e em mitocôndrias de mamíferos, a sua análise tem-se vindo cada vez mais a aprofundar, uma vez que os centros de Ferro-Enxofre revelaram ser essenciais em diversas funções biológicas <sup>([8])</sup>.

Os centros de Ferro-Enxofre estão presentes em todos, ou quase todos, os organismos vivos desempenhando funções biológicas tais como, e a mais óbvia, a transferência electrónica, como detectado durante os estudos com bactérias fotossintéticas, bactérias fixadoras de azoto e em mitocôndrias; e são responsáveis pela deslocalização electrónica como foi verificado por métodos espectroscópicos (RPE e Mössbauer) <sup>([10])</sup>. Os centros de Ferro-Enxofre também exercem outras funções, nomeadamente a ligação a substratos e a catálise de reacções, uma vez que os seus centros são capazes de deslocalizar electrões e os ligandos da sua estrutura, levando à polarização ou à ligação de grupos vizinhos. Assim, os centros de ferro-enxofre podem servir como centros activos de enzimas, como se verifica no caso da acotinase <sup>([10])</sup>. A capacidade que estes centros possuem de adquirir diferentes estados de oxidação faz com que possam desempenhar funções regulatórias e funcionem como sensores biológicos (sensores de Fe,  $\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^-$ ). Por último, os centros Ferro-Enxofre, devido às suas características possuem a

capacidade de estabilizar a estrutura proteica, tendo neste caso uma função estrutural <sup>([7], [8], [10])</sup>. Existem também proteínas com centros ferro-enxofre que são indispensáveis à actividade biológica, mas cuja função se desconhece.

As proteínas com centros Fe-S estão também presentes nas células eucarióticas, desempenhando funções biológicas essenciais à sobrevivência, sobretudo na mitocôndria durante o ciclo do ácido cítrico, na cadeia respiratória, na síntese da biotina e, ao nível do citoplasma <sup>([11], [12])</sup>.

### 3 – A FUSCOREDOXINA

A Fuscoredoxina é uma proteína que contém dois centros de ferro-enxofre, um dos quais pouco comum e foi inicialmente isolada a partir de bactérias redutoras de sulfato tais como *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough), e *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774).

Em 1989, Hagen *et al*, isolaram a partir da bactéria redutora de sulfato *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) uma proteína e concluíram que esta continha um centro com seis átomos de ferro e apresentava uma geometria espacial de prisma <sup>([13])</sup>. Esta proteína foi inicialmente denominada “6 Fe protein” e mais tarde por “*prismane protein*”. Os estudos espectroscópicos realizados com recurso a Ressonância Paramagnética Electrónica (RPE), permitiram concluir que a proteína apresentava um centro metálico com seis átomos de ferro e seis de enxofre [Fe<sub>6</sub>S<sub>6</sub>], bem como possuir a forma de prisma <sup>([13])</sup>.

Em 1992, Moura *et al*, isolaram e purificaram uma proteína semelhante a partir de *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) e através de análises espectroscópicas (RPE e Mössbauer) chegaram aos mesmos resultados, de que a proteína possuía um centro com seis átomos de ferro, mas neste estudo foi sugerido a presença de não um, mas de dois centros Fe-S na proteína, cada um dos quais contendo seis átomos de ferro e ainda, que um dos centros apresentava uma mistura de ligandos de N, O e S <sup>([4], [5])</sup>.

Mais tarde em 1998, Arendsen *et al*, efectuaram estudos de cristalografia de raios-X da mesma proteína e demonstraram que esta não possui um centro com 6 átomos de ferro, mas em vez disso possui oito átomos de ferro, divididos em dois centros de Fe-S. O centro 1 possui uma

estrutura com 4Fe-4S e, o centro 2 apresenta uma estrutura invulgar, com quatro átomos de ferro <sup>(14)</sup>.

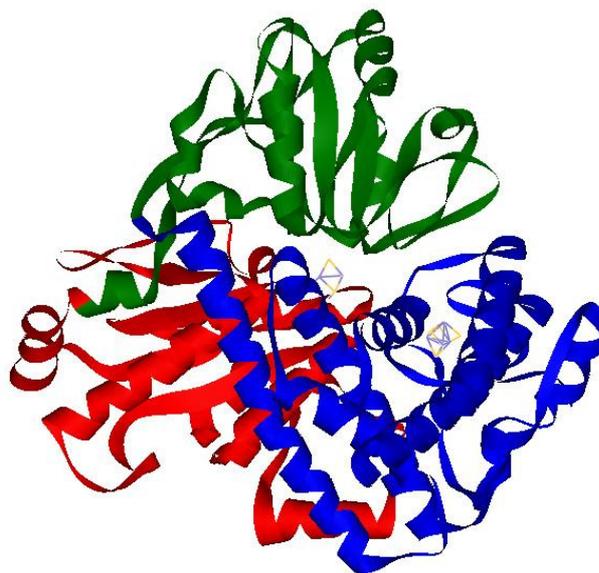
A partir da análise cristalográfica é possível verificar que o termo “*prismane protein*” não é apropriado para a descrição da proteína. No mesmo ano do estudo cristalográfico, Tavares *et al*, propuseram o nome de Fuscoredoxina, baseando-se na cor acastanhada e na capacidade que a proteína tem de estabilizar os centros metálicos em diversos estados de oxidação. A proteína também é conhecida por “*hybrid cluster protein*” (HCP) devido à estrutura invulgar de um dos seus centros. A função biológica desta proteína ainda não se encontra definida, mas prevê-se que seja bastante importante, devido à sua peculiar constituição no que respeita aos centros Fe-S. Estudos efectuados posteriormente sugerem que esta possa estar envolvida no ciclo do azoto, funcionando como uma reductase da hidroxilamina <sup>(15) e (16)</sup>, e estudos recentes revelaram que a proteína pode desempenhar a função de protecção no stress oxidativo <sup>(17)</sup>.

A Fuscoredoxina originária de *Desulfovibrio desulfuricans* (ATCC 27774) é uma proteína monomérica com 545 resíduos de aminoácidos e uma massa molecular aproximadamente igual a 58,5kDa.

A sua estrutura tridimensional encontra-se organizada em três domínios numerados desde a cadeia N-terminal até à cadeia C-terminal e, é possível observar que um dos centros de ferro-enxofre localiza-se no domínio 1, enquanto o outro centro encontra-se na interface dos três domínios (**Figura 4**) <sup>(14), (18)</sup>.

O domínio 1 (resíduos 1 ao 221), representado a azul na **Figura 4**, é o que apresenta maiores dimensões e contém uma região típica de ligação de metais (resíduos 1 ao 21). É constituído predominantemente por hélices- $\alpha$  que formam dois conjuntos pouco usuais, cada um dos quais constituído por três hélices- $\alpha$  antiparalelas ( $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$  e  $\alpha 5$ - $\alpha 6$ - $\alpha 7$  respectivamente). A cadeia C-terminal da hélice- $\alpha 2$  está direccionada para o centro 1 da proteína, o que faz com que o seu dipolo negativo tenha um efeito estabilizador do centro de ferro-enxofre. O domínio contém ainda 3 folhas- $\beta$  antiparalelas, uma das quais ( $\beta_3$ ) permite fazer a ligação ao domínio 2 através de outra folha- $\beta$  ( $\beta_{10}$ ) <sup>(18)</sup>.

O domínio 2 a verde (resíduos 222 ao 375) é constituído por uma mistura de hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ . O domínio começa e termina com duas folhas- $\beta$  paralelas ( $\beta_4$  e  $\beta_{12}$ ), enquanto o seu núcleo é constituído por seis folhas- $\beta$  paralelas e torcidas ( $\beta_7$ - $\beta_6$ - $\beta_5$ - $\beta_8$ - $\beta_9$ - $\beta_{11}$ ).

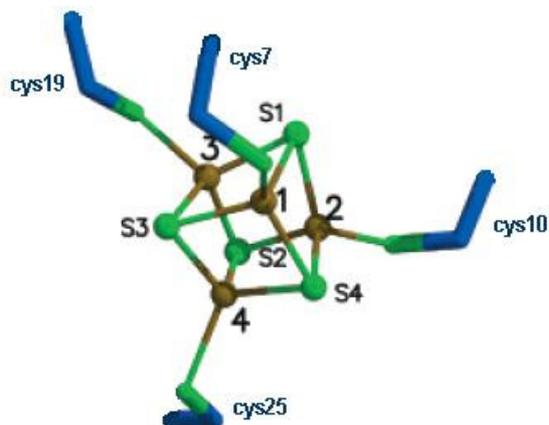


**Figura 4** – Representação da estrutura tridimensional da Fuscoredoxina *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

O domínio 3 a vermelho (resíduos 376 ao 545) é formado inicialmente por uma hélice- $\alpha$  torcida constituída por 20 resíduos de aminoácidos, a restante organização é semelhante à do domínio 2, com o núcleo igualmente constituído por seis folhas- $\beta$  torcidas ( $\beta_{15}$ - $\beta_{14}$ - $\beta_{13}$ - $\beta_{16}$ - $\beta_{17}$ - $\beta_{18}$ ). Os domínios 2 e 3 podem ser sobrepostos mas apenas as estruturas centrais podem ser alinhadas correctamente <sup>(118)</sup>.

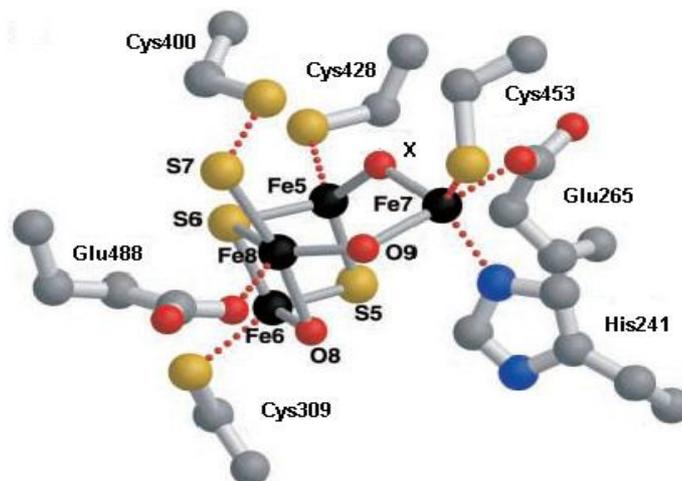
A proteína contém dois centros de Ferro-enxofre. O centro 1, constituído pela estrutura convencional de  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$  localiza-se na região N-terminal do domínio 1 e, encontra-se ligado a quatro resíduos de cisteína de uma forma pouco usual. Os átomos de ferro, numerados respectivamente por Fe1, Fe2, Fe3 e Fe4 estão ligados aos resíduos Cys7, Cys10, Cys19 e Cys25 na forma: Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>8</sub>-Cys-X<sub>5</sub>-Cys (**Figura 5**). Para além dos resíduos de cisteína, cada átomo de ferro está ainda coordenado a três átomos de enxofre. O centro é aceitador de um electrão e uma vez que se encontra próximo do exterior da proteína pode ser responsável por reacções de oxidação-redução <sup>(15), [14]</sup>. Em estudos realizados envolvendo a espectroscopia

de RPE e Mössbauer verificou-se que este centro quando reduzido com ditionito de sódio se apresenta na forma  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  e, exibe propriedades magnéticas únicas, com mistura dos estados de spin  $S=3/2$  e  $S=1/2$  <sup>([4],[6])</sup>.



**Figura 5** - Representação do centro 1 da Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, com os átomos de ferro representados com cor castanha e os átomos de enxofre com cor verde. **Fonte:** Adaptado de [18].

O centro 2 da Fuscoredoxina localiza-se na interface dos três domínios e apresenta uma coordenação mista do tipo  $[\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}]$ , constituindo um centro raro nunca descrito em qualquer outra proteína deste género. O centro é assim, constituído por átomos de ferro que estabelecem ligações com átomos de oxigénio e de enxofre, apresentando uma geometria tetraédrica para os átomos Fe5 e Fe6 e outra bipiramidal trigonal para os átomos Fe7 e Fe8. O Fe5 encontra-se coordenado a um resíduo da proteína (Cys428), a dois átomos de enxofre (S5 e S6) e a um átomo na posição X. O Fe6 encontra-se também ligado a um resíduo de aminoácido (Cys309), a dois átomos de enxofre (S5 e S6) e a um átomo de oxigénio (O8), que estabelece a ponte entre o Fe6 e o Fe8, conferindo a geometria tetraédrica ao Fe6. O Fe7 está ligado a três resíduos de aminoácido, His241, Glu265 e Cys453, liga-se também, a um átomo de oxigénio, O9, que faz a ponte entre o Fe7 e o Fe8 e a um átomo na posição X. O Fe8 encontra-se ligado directamente a um resíduo (Glu488), a dois átomos de oxigénio da ponte (O8 e O9) e a dois átomos de enxofre, S6 e S7. O S6 estabelece uma ponte entre o Fe5 e Fe6, conferindo ao Fe8 a geometria bipiramidal trigonal <sup>([18])</sup>. O S7 forma uma ligação dissulfureto com o resíduo de aminoácido Cys400, formando uma ligação única neste tipo de complexos (**Figura 6**).



**Figura 6** – Representação do centro 2 da Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, em que os átomos de ferro estão representados a preto, os de enxofre com cor amarela e os de oxigénio com coloração vermelha. **Fonte:** Adaptado de [48].

O centro 2, ao contrário do centro 1, é capaz de aceitar mais do que um electrão, e pode ser estabilizado em, pelo menos, quatro estados de oxidação. Esta característica sugere então que o centro pode desempenhar uma função catalítica em reacções de oxidação-redução<sup>([6], [14])</sup>. O centro é diamagnético na forma totalmente oxidada, com todos os átomos no estado férrico [Fe (III)]; quando reduzido com um electrão apresenta os estados de spin  $S=9/2$  e  $S=1/2$ , se voltar a ser reduzido apresenta um estado de spin  $S=0$  ou  $S=4$ , por último a forma totalmente reduzida apresenta um sistema com  $S=1/2$ <sup>([6], [18])</sup>.

#### 4 – CLONAGEM E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES MUTADAS

O objectivo principal deste estudo é o de caracterizar espectroscopicamente proteínas recombinantes mutadas de Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. A tecnologia de ADN recombinado e o conhecimento cada vez mais alargado da sequência dos genomas permite a obtenção de proteínas com propriedades mais adequadas para determinadas aplicações, neste caso em particular, a obtenção de mutações específicas.

A estratégia básica para a expressão de proteínas recombinantes passa pela clonagem do gene correspondente num vector de expressão e a sua transformação no hospedeiro. O vector de

expressão na bactéria é usualmente um plasmídeo, que possui uma origem de replicação e marcas genéticas de selecção. Uma característica essencial dos vectores de expressão é a existência de promotores reguláveis que, quando induzidos, permitem uma grande produção de mARN a partir do gene clonado<sup>([20], [21])</sup>.

O gene que codifica a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 foi isolado e inserido num vector plasmídico de expressão, o pGEX-6P-1 [*GST Gene Fusion System* (Amersham Biosciences)]<sup>([22])</sup> (**Anexo I**). O plasmídeo recombinante contém aproximadamente 6500 pares de bases e contém um gene de resistência à ampicilina, um gene que codifica a GST e um promotor passível de ser induzido para sobre expressar a proteína de fusão (promotor *lac I*) (**Anexo II**).

A Engenharia de Proteínas tem como principal objectivo a alteração da sequência primária (sequência de aminoácidos) por inserção de mutações no gene respectivo, influenciando a estrutura e a função de uma dada proteína. Essas mutações podem ser geradas de forma aleatória e inespecífica, ou podem ser predefinidas, baseando-se no conhecimento da sequência nucleotídica. As alterações podem, assim, ser efectuadas de modo específico e preciso, chamando-se a esta estratégia Mutagénese Dirigida<sup>([20], [24])</sup>.

A Mutagénese Dirigida, numa primeira etapa, consiste na clonagem do gene que codifica a proteína que se pretende alterar, a partir do organismo original; em seguida, pretende-se inserir, eliminar ou substituir um ou mais codões dessa sequência de nucleótidos, correspondentes ao(s) aminoácido(s) da proteína que se pretende modificar; por fim é avaliado o efeito dessas alterações na função ou nas características da proteína<sup>([20])</sup>.

#### Delecção da região N-terminal

O mutante RD2 foi produzido pela remoção da sequência que contém os quatro primeiros resíduos de cisteína (Cys) na estrutura primária da Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774, eliminando a região que contém todos os ligandos do centro 1, possibilitando assim uma melhor caracterização espectroscópica do centro 2 e, naturalmente o estudo da relação entre a estrutura e a função da proteína nativa. Para este mutante realizou-se uma reacção de PCR (**Anexo IX**) com os iniciadores oligonucleotídicos que flanqueiam o

gene que codifica esta proteína, contendo um deles a mutação desejada de modo a poder ser induzida no gene. O fragmento mutado foi inserido num vector de clonagem pCR®II-TOPO®, para amplificar a quantidade de ADN mutado. Após o seu isolamento e purificação, foi inserido num vector de expressão pGEX-6P-1, para permitir a síntese da proteína mutada<sup>(125)</sup>. Para confirmar a mutação induzida, o fragmento foi submetido a sequenciação. (**Anexo III**)

#### Produção da mutação Glu265/ Ala

O mutante SC1 foi produzido por substituição de um resíduo de aminoácido de glutamato (Glu265) por um de alanina (Ala), no plasmídeo recombinante pRD1<sup>(125)</sup>. Esta mutação implica a alteração da esfera de coordenação do Fe(7), do centro 2 da Fuscoredoxina [Fe<sub>4</sub>S<sub>3</sub>O<sub>2</sub>X], uma vez que o Fe(7) se encontra ligado a três ligandos proteicos (His244, Glu265, Cys459), a um átomo de oxigénio e ao ligando que se encontra na posição X, que ainda não se encontra perfeitamente identificado, mas assume-se que seja um átomo de oxigénio<sup>(15), (14)</sup>, isto permite evidenciar a importância do Glu265 naquele que se pensa poder ser um centro activo (ver **Figura 5**). Para aplicar a técnica de mutagénese dirigida foi utilizado um kit (*QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* – Stratagene<sup>(126)</sup>), que permite induzir mutações pontuais, ou seja alterar a posição, remover ou inserir aminoácidos (**Anexo IV**).

#### Delecção do Glu488

O mutante AR1 foi obtido a partir da delecção do resíduo de aminoácido glutamato na posição 488 no plasmídeo recombinante pRD1. A mutação provoca uma alteração da esfera de coordenação do Fe(8) do centro 2 da Fuscoredoxina, tornando este centro do tipo 2Fe-2S. À semelhança do SC1 também foi adoptado o kit de mutagénese dirigida *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* – Stratagene<sup>(126)</sup>, para induzir a mutação no gene da Fuscoredoxina.

### Produção da mutação Cys400/ Ala

O mutante AR2 foi produzido por substituição de um resíduo de aminoácido de cisteína (Cys400) por um de alanina (Ala), no plasmídeo recombinante pRD1. O resíduo Cys400 forma uma ligação única com o átomo de enxofre, S(7), que por sua vez se encontra ligado ao átomo de Ferro na posição 8 do centro híbrido. Esta mutação deve implicar uma alteração da esfera de coordenação do Fe(8) e foi produzida com recurso à mesma técnica utilizada para a produção dos mutantes SC1 e AR1.

## **5 – ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS**

### **5.1 – ESPECTROSCOPIA DE RPE**

A RPE (Ressonância Paramagnética Electrónica) é uma técnica espectroscópica usada para detectar espécies com electrões desemparelhados e permite identificar espécies paramagnéticas. Esta técnica com diversos campos de aplicação, tais como a Química, a Física, a Biologia e a Medicina, permite a detecção de radicais e de iões de metais de transição e, por isso, pode ser usada para a determinação da estrutura dos centros activos de metaloproteínas. O estudo das metaloproteínas só é possível devido às propriedades paramagnéticas que estas adquirem em alguns estados de oxidação, o que as torna propensas à realização destes estudos e, assim, obter informação relativa ao mecanismo de reacção enzimática ou mesmo da função da proteína <sup>([27], [28])</sup>.

Este método espectroscópico detecta transições de electrões desemparelhados quando submetidos a um campo magnético externo. O comportamento do electrão é semelhante ao de uma pequena barra magnética (electroímã) e, é devido ao momento magnético resultante do seu spin electrónico, cujo número quântico de spin ( $S$ ) é  $1/2$ . Os electrões, quando submetidos a um campo magnético externo, podem orientar-se paralela ou antiparalelamente à direcção do campo magnético criando assim dois níveis distintos de energia que nos permitem a sua medição à medida que se movimentam entre eles. Os dois estados são identificados pela projecção do spin electrónico,  $M_s$ , na direcção do campo magnético. Assim, o estado paralelo é designado  $M_s = -1/2$  e corresponde a um nível energético mais baixo e, o antiparalelo é  $M_s = +1/2$ , correspondendo a um estado de energia superior <sup>([27], [28], [29], [30])</sup>.

A intensidade das transições é proporcional ao número de spins desemparelhados presentes na substância que por sua vez é proporcional à dose absorvida. A absorção da radiação electromagnética aplicada é detectada por um espectrómetro de RPE e após uma amplificação apropriada é exibida como uma primeira ou segunda derivada da curva de absorção, em relação ao campo magnético aplicado. Os espectros obtidos são caracterizados pela sua forma, largura, intensidade e pelo factor de separação ou factor g, permitindo retirar informações importantes sobre os sistemas em estudo ([27], [28], [30]).

Um espectrómetro de RPE (**Figura 7**) apresenta três componentes fundamentais: uma fonte de radiação electromagnética, um suporte da amostra e um detector. Para obter um espectro, altera-se a frequência da radiação electromagnética e é medida a quantidade de radiação que atravessa a amostra com um detector para observar as absorções espectroscópicas.

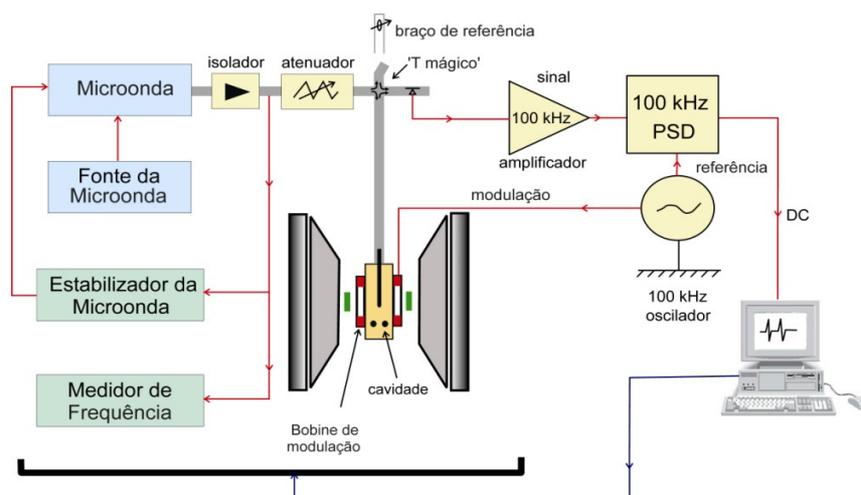


Figura 7 – Representação esquemática de um espectrómetro de RPE.

O espectro de RPE consiste essencialmente no registo da absorção da energia de radiação em função do campo magnético aplicado. O sinal de RPE consiste numa banda de absorção centrada em torno do valor de absorção, que aparece geralmente sob a forma de primeira derivada devido aos processos electrónicos de detecção do sinal. O valor do campo de ressonância é determinado pelo ponto de encontro da curva derivada com a linha de base (derivada nula no ponto de máxima absorção). A intensidade do sinal de RPE depende de diversos factores, tais como, a temperatura, amplitude de modulação, ganho e potência ([27]).

Um espectro de RPE para além da interacção com o campo magnético aplicado, apresenta uma série de interacções entre o momento de spin do electrão desemparelhado, e a sua vizinhança, uma vez que o electrão desemparelhado é muito sensível à sua vizinhança próxima, ou seja, núcleos atómicos e outros electrões desemparelhados <sup>(127)</sup>, é a interpretação das características do espectro com base nestas várias interacções que torna a espectroscopia de RPE particularmente útil no estudo e identificação de centros paramagnéticos.

## **5.2 - ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER**

Ao contrário da espectroscopia de RPE, que detecta transições entre estados de energia degenerados do spin electrónico, a espectroscopia de Mössbauer detecta transições entre estados de diferente energia do spin nuclear <sup>(31)</sup>. Esta técnica espectroscópica foi descoberta em 1958 com a observação do efeito de absorção de raios gama pelo núcleo em <sup>57</sup>Fe. A espectroscopia de Mössbauer permite a caracterização estrutural de proteínas contendo ferro na composição dos seus cofactores providenciando informação sobre o número de ligandos do(s) átomo(s) de ferro e a natureza química dos mesmos, o que por sua vez ajudam na compreensão da forma como actuam na actividade biológica das proteínas que os contêm <sup>(31)</sup>, <sup>(32)</sup>. A principal vantagem desta técnica é de todos os estados redox e de spin serem observados, ao contrário da espectroscopia de RPE.

A fonte de energia nesta espectroscopia são raios gama ( $\gamma$ ) com uma energia de 14.4KeV e de largura de linha  $4.7 \times 10^{-9}$  eV. A radiação  $\gamma$  provém, neste caso, de uma fonte de <sup>57</sup>Co em decaimento radioactivo (captura electrónica); este decai para um estado excitado de <sup>57</sup>Fe (I=5/2), que por sua vez decai para o estado fundamental ou para o estado I=3/2 de <sup>57</sup>Fe. É esta última transição a utilizada neste tipo de espectroscopia, com energia igual a 14.4 keV. Devido ao considerável tempo de vida do núcleo neste estado de energia, a radiação  $\gamma$  produzida é monocromática (largura de risca muito estreita) e adequada para se poder detectar desdobramentos hiperfinos que em geral são menores que  $10^{-7}$  eV <sup>(31)</sup>, <sup>(32)</sup>.

O dispositivo experimental é constituído por uma fonte, por um absorvedor e por um detector. A fonte pode vibrar de modo a alterar a energia da radiação  $\gamma$  que incide sobre a amostra que é colocada entre a fonte e o detector. Um campo magnético externo pode também ser aplicado neste arranjo experimental quer perpendicular quer paralelo à direcção da radiação  $\gamma$ . No

espectro resultante, a intensidade dos raios gama é representada graficamente em função da velocidade da fonte, daí podemos extrair dois parâmetros espectrais importantes: o desvio isomérico ( $\delta$ ) e o desdobramento de quadrupolo ( $\Delta E_Q$ ). Estes dois parâmetros são dependentes do estado de oxidação do ferro e também da sua esfera de coordenação. O desvio isomérico é expresso em mm/s e é uma consequência da alteração de energia dos estados de spin nucleares, resultantes da interacção entre a densidade electrónica e o núcleo. Sem esta interacção todos os núcleos teriam a mesma diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Em relação ao desdobramento de quadrupolo ( $\Delta E_Q$ ), o estado excitado nuclear tem um momento de quadrupolo eléctrico, o que significa uma distribuição não esférica da carga. O gradiente de campo eléctrico criado pelos electrões circundantes vai interactuar com o estado nuclear excitado originando um desdobramento em dois níveis de energia. Pode-se assim observar duas transições cuja diferença em energia é proporcional ao momento de quadrupolo eléctrico <sup>(131)</sup>.



---

**CAPÍTULO II**  
**PARTE EXPERIMENTAL**

## **OBJECTIVOS**

A Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 contém um centro de Fe-S com uma conformação rara, sendo portanto alvo de grande interesse, acrescentando o facto de ainda não se saber ao certo qual a função biológica desempenhada por esta proteína. O principal objectivo deste estudo consistiu em caracterizar bioquímica e espectroscopicamente, proteínas recombinantes mutadas da Fuscoredoxina, com o propósito de estudar melhor o centro 2 desta proteína.

O ponto de partida deste estudo consistiu na realização de uma mutagénesis dirigida no plasmídeo recombinante que contém o gene da Fuscoredoxina (RD1), de forma a criar mais uma proteína recombinante mutada (AR2). Seguiu-se o crescimento, sobreexpressão e purificação de quatro proteínas recombinantes mutadas (RD2, SC1, AR1 e AR2) e da proteína recombinante (RD1). A caracterização bioquímica consistiu na determinação da massa molecular das proteínas, da concentração proteica e do conteúdo em ferro não hémico. Do ponto de vista espectroscópico foram realizados espectros de UV/ Visível, RPE e Mössbauer (RD1).

## **1 – ISOLAMENTO DE ADN PLASMÍDICO pRD1 A SER MUTADO**

Os mutantes pRD2, pSC1, pAR1 e pAR2 foram produzidos a partir do plasmídeo recombinante pRD1 já existente no laboratório, que contém o gene que codifica a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

### **1.1 – TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI* COM O PLASMÍDEO RD1**

A transformação consiste na incorporação de um plasmídeo em células competentes de bactérias, que possuem a parede celular fragilizada; este processo pode ser realizado por diferentes métodos, neste caso foi utilizado o choque térmico. As células competentes utilizadas neste processo, *E.coli* DH5  $\alpha$  e BL21, foram preparadas de acordo com o protocolo no **Anexo V**, e cujo inóculo proveio da Invitrogen® e Novagen®, respectivamente.

A transformação foi efectuada de acordo com o protocolo em anexo (**Anexo VI**), em que se utilizaram 500 $\mu$ l de meio Luria Bertani (LB – Sigma®) - 5g de NaCl; 10g de Triptona; 5g de

Extracto de levedura por cada litro de meio - para incubar a reacção. As células transformadas foram incubadas em placas contendo um meio de cultura sólido semi-definido, LB-Agar - 5g de NaCl; 10g de Triptona; 5g de Extracto de levedura; 20g Agar, por cada litro de meio. O meio contém ainda um antimicrobiano (Ampicilina, 100µg/ml) que permite evitar contaminações e possibilita a selecção das colónias bacterianas que contêm o plasmídeo RD1. A incubação foi efectuada a uma temperatura de 37 °C por um período de tempo de aproximadamente 16 a 18 horas (h).

Após o crescimento das colónias seleccionou-se uma e preparou-se um inóculo em meio LB contendo Ampicilina (100µg/ml), de modo a permitir o crescimento e multiplicação das bactérias e consequentemente do plasmídeo RD1. A incubação foi feita a 37 °C com agitação orbital constante de 230 rotações por minuto (rpm), por um período de tempo de 16 a 18h.

## **1.2 – ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE ADN PLASMÍDICO (MINI-PREP)**

Para o isolamento e purificação do ADN plasmídico a partir de células de *E. coli* DH5α, foi utilizado o Kit JETQUICK Plasmid Miniprep (GENOMED GmbH®)<sup>(133)</sup> – **Anexo VII**.

## **1.3 – VERIFICAÇÃO DO ADN ISOLADO E PURIFICADO POR ELECTROFORESE**

A electroforese em gel de agarose (**Anexo X**) permite verificar o isolamento e o estado de pureza do ADN plasmídico, ou seja, verificar se está livre de ADN genómico e ARN, susceptíveis de contaminar a amostra em análise. Este passo permite também observar que formas de ADN plasmídico se encontram em solução (linear, circular e super enrolado) e avaliar se o ADN está em condições para ser utilizado para a produção de mutações no gene da Fuscoredoxina, uma vez que é necessário que o ADN esteja mais de 80% na forma super enrolada (de acordo com o kit de mutagénese *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit – Stratagene, Anexo IV*)<sup>(126)</sup>.

Foi preparado um gel de agarose com uma concentração de 0.8% em solução tampão TAE 1X (0,04M Tris-acetato e 1mM EDTA), contendo 0.5µg/ml de brometo de etídeo e utilizando o marcador de pesos moleculares 1 kb *Gene Ruler™ DNA Ladder* da Fermentas®. O gel foi submetido a uma corrente eléctrica de 85 V, durante 45 minutos; as bandas obtidas foram

visualizadas através de radiação ultravioleta e ficou registado em fotografia (Gel Logic 100 Imaging System - Kodak)

#### **1.4 – QUANTIFICAÇÃO DO ADN PLASMÍDICO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV**

A quantificação do ADN isolado e purificado, é essencial na produção de mutações, tendo-se recorrido à quantificação do ADN por espectroscopia de UV. A quantificação foi feita num espectrofotómetro de feixe duplo Shimadzu® (UV-160A), utilizando-se como linha de base o solvente utilizado para diluir a amostra (água “MilliQ”).

A concentração de ADN é determinada através da absorvância da amostra a 260 nm, que é o comprimento de onda correspondente ao pico de absorção dos ácidos nucleicos e, sabendo que o valor de absorvância de 1 corresponde a uma concentração de ADN plasmídico de 50 µg/ml<sup>(134)</sup>, quando a célula apresenta 1 cm de largura, podemos calcular a concentração de ADN recorrendo à seguinte equação:

$$C_{ADN} = \text{Conversão Espectrofotométrica (50 µg/ml)} \times A_{260} \times \text{Factor de diluição}$$

**Equação 1** - Quantificação de ADN por espectroscopia de UV

## **2 – PRODUÇÃO DO MUTANTE DA FUSCOREDOXINA AR2**

O passo que se seguiu no desenvolvimento deste estudo foi a produção de mais um mutante da Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. O mutante AR2 foi obtido a partir da substituição de um resíduo de aminoácido de cisteína, na posição 400, por um de alanina.

### **2.1 – SUBSTITUIÇÃO DA CISTEÍNA 400**

A mutagénese dirigida foi a técnica escolhida para realizar esta mutação, que consiste em substituir um resíduo de aminoácido na estrutura primária da Fuscoredoxina. Para aplicar esta

técnica foi utilizado um kit de mutagénese dirigida (*QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit – Stratagene, Anexo IV*)<sup>(126)</sup>, que permite induzir mutações pontuais.

### **2.1.1 – Selecção dos Iniciadores Oligonucleotídicos**

O primeiro passo da mutação é a escolha dos iniciadores oligonucleotídicos para a reacção de PCR. Os iniciadores oligonucleotídicos foram escolhidos com base na sequência de aminoácidos e correspondentes codões que constituem e codificam a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (**Anexo VIII**), e tendo em conta a mutação que se pretende induzir no gene que codifica a proteína. Estes foram seleccionados de acordo com as instruções fornecidas pelo manual de instruções do kit de mutagénese dirigida adoptado (*QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit – Stratagene*)<sup>(126)</sup>, e foram produzidos e purificados através de HPLC, pela SIGMA® Genosys.

Os iniciadores oligonucleotídicos seleccionados para este estudo contêm a mutação desejada; ambos hibridam com a mesma sequência nas diferentes cadeias do plasmídeo, de modo a permitir copiar todo o plasmídeo; contêm 27 bases azotadas, com uma temperatura de fusão igual a 91°C (>78°C), para evitar a sua degradação durante o processo de PCR. A mutação desejada encontra-se no meio da sequência que constitui o iniciador, contendo 12 bases correctas antes e depois da mutação. Os iniciadores contêm 85% (>40%) de bases azotadas de citosina e guanina e, iniciam em guanina terminando em citosina. A mutação pretendida consiste na substituição do resíduo do aminoácido cisteína, que se encontra na posição 400, por um resíduo de alanina, sendo estes os iniciadores:

**RD3:** 5' gtcattggccggcgccgacggccgccc 3'

**RD4:** 5' ggcgcggccgtcggcgccggccatgac 3'

### **2.1.2 – Mutagénese Dirigida**

A mutagénese dirigida teve por base uma reacção de PCR, e consistiu em fazer variar adequadamente a temperatura, de modo a permitir a síntese de novas moléculas de ADN a partir de uma precursora. Recorreu-se para tal a um termociclador Biometra® (Tpersonal

Combi) onde se colocaram tubos de 200 µl contendo todos os reagentes necessários nas quantidades indicadas na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Reagentes e respectivas quantidades utilizados na reacção de mutagénese dirigida.

Reagentes	Reacção contendo pRD1 (45 ng)
Solução tampão 10X	5 µl
ADN plasmídico	45 ng – 6.3 µl
	125 ng – 2.6 µl
Iniciador de controlo 1/ RD3	a partir de um stock de 48.2 ng/µl
	125 ng – 2 µl
Iniciador de controlo 2/ RD4	a partir de um stock de 64.86 ng/ µl
dNTP mix (2.5mM)	1 µl
Água MiliQ autoclavada	33.1 µl
PfuTurbo® ADN Polimerase (2.5U/µl)	1 µl
Volume final	50 µl

**Tabela 2** – Programa de PCR utilizado na reacção de mutagénese dirigida.

	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação	1	95 °C	30 seg
	16	95 °C	30 seg
Hibridação	16	55 °C	1 minuto
Extensão	16	68 °C	7 minutos

Depois da reacção de PCR, na qual originou um plasmídeo mutado pAR2, foi adicionado à reacção uma endonuclease (1 µl de *DpnI*, 10 U/µl), cuja sequência de reconhecimento é 5' – Gm6ATC – 3'. A enzima é específica para o ADN metilado e hemimetilado, permitindo digerir o vector inicial a partir do qual foi produzida a mutação, distinguindo-o do ADN sintetizado que contém a mutação. A hidrólise ocorreu durante 1h a uma temperatura de 37 °C. Para verificar a amplificação e digestão do ADN foi realizada uma electroforese em gel de agarose 0.8%, 90V durante 45 minutos.

O próximo passo foi a transformação de células super competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , com o vector mutado através de choque térmico e de acordo com as recomendações do manual de instruções do kit de mutagénesis dirigida <sup>(126)</sup>. Foi também utilizado um controlo para verificar a eficiência da transformação, utilizando-se para isso 100  $\mu$ l de células competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  e o plasmídeo pRD1. O plasmídeo pAR2 e o controlo da transformação, foram colocados em placas de LB-agar/ Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) e foram incubadas por um período de tempo aproximado de 16 a 18 h, a uma temperatura de 37 °C.

**Tabela 3** – Reagentes e respectivas quantidades, utilizados para a transformação dos produtos da reacção de PCR em células super competentes DH5  $\alpha$  e respectiva reacção de controlo da transformação.

Reacções	Células Super competentes DH5 $\alpha$	ADN plasmídico	Meio de cultura LB	Volume plaqueado
Amostra (pAR2)	100 $\mu$ l	10 $\mu$ l	500 $\mu$ l	200 $\mu$ l e 300 $\mu$ l
Controlo positivo (pRD1)	100 $\mu$ l	2 $\mu$ l	500 $\mu$ l	200 $\mu$ l

### 2.1.3 – Selecção e Análise das Colónias

As colónias seleccionadas para estudo foram ordenadamente transferidas para outra placa (nas mesmas condições), para permitir o crescimento de novas colónias iguais às anteriores de modo a serem preservadas para posteriores análises. As colónias foram analisadas através de uma reacção de PCR, para verificar se o plasmídeo incorporado é o plasmídeo recombinante ou seja aquele que contém o fragmento de interesse. As colónias seleccionadas foram colocadas em diferentes tubos de 200  $\mu$ l onde se encontrava preparado uma mistura reaccional contendo os iniciadores específicos para o gene que codifica a Fuscoredoxina (Fus1 e Fus2, representados em baixo), que permitem amplificar o gene e garantir a presença do plasmídeo, isto pôde ser visualizado através de uma electroforese em gel de agarose 0.8%.

**Fus1:** 5' cattgaattcggatccatgagtaatgccatgttctgc 3' Tf=72 °C; GC=43%

**Fus2:** 5' ttgtcgacgcggccgcttagccgaagaacgcc 3' Tf=80 °C; GC=66%

**Tabela 4** – Reagentes e respectivas quantidades utilizados na reacção de PCR de colónia e respectivos controlos.

Reagentes	Colónias em análise	Reacção de controlo	Reacção de controlo
	(2 reacções)	Positivo pRD1	Negativo
Solução tampão 10X	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
ADN	Retirado das colónias com um palito	18 ng – 2 µl	-
Iniciador Fus 1 (25pmol)	5 µl	5 µl	5 µl
Iniciador Fus 2 (25pmol)	4.3 µl	4.3 µl	4.3 µl
dNTP's Promega® (2.5mM)	2 µl	2 µl	2 µl
Água MiliQ autoclavada	11 µl	9 µl	11 µl
Taq® ADN Polimerase Pharmacia® (250U/µl)	2.5 U/µl – 0.25 µl	2.5 U/µl – 0.25 µl	2.5 U/µl – 0.25 µl
Volume final	25 µl	25 µl	25 µl

**Tabela 5** – Programa de PCR utilizado para a reacção de PCR de colónia e respectivos controlos

	Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação	1	94°C	3 minutos
	30	94°C	1 minuto
Hibridação	30	65°C	1 minuto
Extensão	30	72°C	3 minutos
Completar a extensão	1	72°C	7 minutos

### 3 - VERIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO POR SEQUENCIAÇÃO DO ADN

As colónias analisadas que apresentavam o fragmento de interesse, constituído por aproximadamente 1600 pares de bases, foram sujeitas a uma sequenciação, ou seja, a determinação da sequência nucleotídica que codifica os aminoácidos constituintes da proteína,

para verificar se a mutação pretendida foi induzida no gene que codifica para a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.

### **3.1 – CRESCIMENTO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE pAR2**

As colónias seleccionadas para análise e que apresentaram o fragmento de interesse, também chamadas de colónias positivas, foram incubadas em meio de cultura LB contendo Ampicilina (100 µg/ml), por um período de 16 a 18 horas a 37 °C, com uma agitação contínua a velocidade constante de 230 rpm. Após o crescimento e multiplicação das células, procedeu-se ao isolamento e purificação do ADN plasmídico recorrendo ao kit JETQUICK Plasmid Miniprep (GENOMED GmBH®) <sup>(133)</sup> (**Anexo VII**).

O isolamento e purificação foram efectuados de acordo com os procedimentos indicados pelo kit utilizado e confirmados através da realização de uma electroforese em gel de agarose 0.8%, a uma voltagem constante de 90V durante 45 minutos.

### **3.2 – SEQUENCIAÇÃO**

A sequenciação do plasmídeo pAR2 permitiu conhecer a sua sequência nucleotídica e verificar a presença ou ausência da mutação. A sequenciação automática do plasmídeo recombinante foi requisitada à STAB Vida, para a qual foi enviado a amostra de ADN com o fragmento a ser analisado. Apenas foi seleccionado um iniciador nucleotídico, o pGEX 3', para a análise da sequência, uma vez que o gene da Fuscoredoxina contém 545 resíduos de aminoácidos e a mutação induzida se localiza no resíduo 400, bastando para isso este iniciador para abranger a zona da mutação.

**pGEX 3': 5' ccgggagctgcatgtgtcagagg 3'**

## **4 - PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS MUTADAS EM LARGA ESCALA**

Os estudos espectroscópicos da Fuscoredoxina recombinante de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 e das proteínas recombinantes mutadas só foi possível a partir da produção e purificação das mesmas.

#### **4.1 – TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI* BL21 COM OS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES**

A transformação foi efectuada de acordo com o protocolo em anexo (**Anexo VI**), em que se utilizaram 500 µl de meio LB para incubar a reacção. As células transformadas foram incubadas em placas contendo um meio de cultura sólido semi-definido, LB-Agar, com um antimicrobiano (Ampicilina, 100 µg/ml). A incubação foi efectuada a uma temperatura de 37 °C por um período de tempo de aproximadamente 16 a 18 h.

#### **4.2 – CRESCIMENTO E INDUÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES**

Após o crescimento das colónias, seleccionou-se uma e a partir desta preparou-se um inóculo em meio de cultura LB contendo Ampicilina (100µg/ml), de modo a permitir o crescimento e multiplicação das bactérias e consequentemente do plasmídeo recombinante (pRD1) e recombinantes mutados (pRD2, pSC1, pAR1 e pAR2). A incubação foi feita a 37°C com agitação orbital constante de 230 rpm durante 16 a 17 h.

A produção de proteínas em larga escala foi feita em meio de cultura estéril YT 2X (16g de Triptona; 10g de Extracto de Levedura e 5g de NaCl, por cada litro de meio) a pH 7 e a alta densidade óptica (densidade óptica de aproximadamente 2). No início do crescimento foram colocados em cada erlenmayer (erlenmayers de 2 litros para um volume final de 1 litro de meio de cultura) 500 ml de meio estéril YT 2X, 5 ml do inóculo e 500 µl de Ampicilina (100µg/ml) e deixou-se incubar a 37°C com uma agitação constante de 230 rpm. A densidade celular foi controlada através de medições de densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm, até se registar um valor de aproximadamente 2. Quando se atingiu a densidade óptica desejada adicionou-se a cada erlenmayer mais 500 ml de meio YT 2X, 500 µl de Ampicilina (100 µg/ml) e 100 µl de IPTG 1M (concentração final de 100 µM) e permaneceram a incubar a 18 °C e com agitação contínua de 170 rpm. Foram recolhidas amostras da sobreexpressão das proteínas de fusão antes da indução, de hora a hora durante 4 horas após a indução e, ao fim de 17 ou 18 h depois de induzir; com estas amostras realizou-se um gel de SDS-PAGE (**Anexo XI**), 12.5% de acrilamida, que permitiu verificar se as proteínas de fusão foram correctamente induzidas.

## **5 - ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, PROTEÓLISE E CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS GST/FUSCOREDOXINA E GST/FUSCOREDOXINA MUTADA**

A seguir à sobreexpressão das proteínas de fusão é necessário proceder ao isolamento e purificação da proteína recombinante e proteínas recombinantes mutadas; assim, é necessário proceder à disrupção celular para libertar as proteínas de interesse, isolar as proteínas dos outros componentes celulares, purificar a proteína de fusão, separar a proteína de interesse da GST e, por último, concentrar a proteína para poder ser utilizada em estudos espectroscópicos e bioquímicos.

### **5.1 – EXTRACÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO**

As culturas celulares nos erlenmeyers foram sujeitas a centrifugação numa centrífuga Avanti® J-25 (Beckman Coulter™) a uma velocidade de 11 325 g durante 10 minutos, de modo a poder sedimentar as células e eliminar o sobrenadante. As células sedimentadas foram pesadas para determinar o peso húmido das células e, foram ressuspensas numa solução salina de tampão fosfato, PBS 1X (diluído a partir de uma solução concentrada 10X, composta por 1.4 M de NaCl, 27 mM de KCl, 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, a pH 7.3), contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF – inibidor de proteases).

Após a obtenção das células em solução tampão, procedeu-se à sua disrupção celular de forma a libertar as proteínas solúveis para o sobrenadante, esta etapa foi feita num homogeneizador de alta pressão (EmulsiFlex – C5). No final deste processo encontra-se em solução, para além das proteínas de fusão, organelos celulares, células não partidas e macromoléculas de diferentes tamanhos, cargas e densidades; para libertar da solução alguns restos celulares e células não partidas, esta foi sujeita a uma centrifugação a baixa velocidade (centrífuga Avanti® J-25) de 9 820 g durante 10 minutos. Os restantes constituintes celulares são depois separados, numa ultracentrifugação a 200 000 g durante 1h30, utilizando uma centrífuga Beckman® (Optima LE-80K); no final obtém-se um sedimentado com os restos celulares e um sobrenadante com as proteínas de fusão para purificar. Recolheram-se amostras do sobrenadante e do precipitado para serem analisadas por SDS-PAGE e confirmar a presença ou ausência das proteínas de fusão no sobrenadante.

## 5.2 – PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

A técnica de recombinação de ADN adoptada permitiu produzir uma proteína com uma sequência específica de reconhecimento, permitindo a sua purificação por cromatografia de afinidade. Quando se produzem proteínas de fusão com a enzima GST (*Glutathione-S-Transferase*), as proteínas podem ser purificadas por retenção numa coluna de afinidade, contendo Glutathione immobilizada numa resina. A Glutathione liga-se fortemente e especificamente à GST e podem-se assim passar lisados bacterianos através da coluna e obter as respectivas proteínas recombinantes, uma vez que a proteína de fusão e as que a ela estão ligadas, podem depois ser eluídas com Glutathione<sup>([21], [35])</sup>.

Esta técnica pode ainda ser melhorada com a criação de uma sequência de aminoácidos, que corresponda a um local de restrição específico de uma protease, entre a GST e a proteína de interesse, podendo assim remover a GST por hidrólise, sem danificar a proteína de interesse<sup>([36])</sup>. A enzima PreScission é o exemplo de uma protease que pode ser utilizada para separar estas proteínas de fusão.

A purificação das proteínas de fusão foi efectuada com base no manual *GST Gene Fusion System* (Amersham Biosciences®)<sup>([22])</sup> com recurso à técnica de HPLC (ÄKTA – Amersham Pharmacia Biotech). Foi utilizada uma coluna (58,4 cm<sup>3</sup>) de afinidade pré-empacotada (Amersham Biosciences), contendo uma resina de Sepharose 4 *fast flow* com Glutathione immobilizada (120-320 µmol/ml) – fase estacionária – que possui uma elevada capacidade de ligação à GST (10-12 mg GST/ ml), presente na extremidade N-terminal da proteína de fusão, que constitui a fase móvel.

O primeiro passo para a purificação das proteínas de fusão foi equilibrar a coluna com solução tampão PBS 1X. As amostras a purificar antes de serem injectadas na coluna foram centrifugadas (centrífuga Avanti® J-25, Beckman Coulter) a 9 820 g durante 10 minutos para limpar a solução de eventuais restos celulares que pudessem ainda permanecer e, foram ainda filtradas em filtros com poros de 0.45 µm. Quando a coluna estava equilibrada, as amostras foram injectadas no sistema a um fluxo contínuo de 1 ml/min e foi monitorizada a absorvância a 280 e 400 nm. Depois de as amostras terem sido totalmente injectadas foi aplicado

novamente o tampão PBS 1X, até não haver mais registo de absorvância de proteínas, permitindo assim remover todas as impurezas que não ficaram agarradas à resina. Quando já não havia registo de absorvância, foi aplicado a solução tampão de eluição, constituída por 10 mM de Glutathione reduzida e 50 mM de Tris-HCl pH 8, a um fluxo contínuo de 3 ml/min, alterando assim a afinidade da coluna e fazendo com que as proteínas de fusão fossem eluídas. Durante a purificação foram retiradas amostras antes da injeção da amostra, do que não ficou agarrado à coluna e do que foi eluído, para serem analisados por SDS-PAGE.

### **5.3 – HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO COM A PRESCISSION**

A separação da Fuscoredoxina mutada da GST é feita pela acção de uma protease, a PreScission, que é uma proteína de fusão resultante da GST e da Protease 3C do rinovírus humano. Esta protease possui uma sequência de reconhecimento específica que se encontra entre a GST e a proteína de interesse, tal como se encontra representado em anexo (**Anexo I**). A PreScission utilizada para a hidrólise foi obtida da mesma forma que as proteínas recombinantes, em que se efectuou uma transformação do plasmídeo que contém o gene da PreScission em células super competentes de *E. coli*, procedendo-se depois ao crescimento, sobreexpressão e extracção da proteína, por último a purificação foi feita pelo mesmo método cromatográfico das outras proteínas de fusão (**Apêndice A**).

Para se efectuar a hidrólise das proteínas de fusão trocou-se o tampão da solução que contém as proteínas para o tampão de corte da PreScission – 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM ditiotretol (DTT); depois, adicionou-se a PreScission e deixou-se incubar durante 4 h a 4 °C, que é a temperatura óptima para a actividade desta protease.

A purificação depois da hidrólise foi feita novamente com recurso à cromatografia de afinidade utilizando-se a mesma coluna empacotada com resina Sepharose 4 *fast flow* com Glutathione imobilizada. As proteínas hidrolisadas foram centrifugadas (centrífuga Avanti J-25) a 9 820 g durante 10 minutos a 4°C, decantou-se o sobrenadante e filtrou-se utilizando filtros de poro de 0.45 µM. A solução foi injectada na coluna de afinidade em sistema de HPLC, previamente equilibrada com tampão PBS 1X, num fluxo contínuo de 1 ml/min. A absorvância do eluído foi monitorizada aos comprimentos de onda de 280 e 400 nm, através da qual foi

possível controlar a eluição das proteínas. As proteínas mutadas são eluídas com o tampão PBS 1X, enquanto a GST e a PreScission permanecem ligadas à Glutathione imobilizada, sendo depois eluídas com o tampão 10 mM de Glutathione reduzida e 50 mM de Tris-HCl pH 8. Durante o processo de purificação recolheram-se amostras para posterior análise por SDS-PAGE.

#### **5.4 – CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS**

As proteínas purificadas foram concentradas pelo processo de ultrafiltração, com o auxílio de microconcentradores (centricons) e de células de agitação Amicon® (Millipore®), providos de membranas semipermeáveis YM30. Estas membranas possuem poros de tamanho específico (30kDa), que permitem separar moléculas com base no seu tamanho molecular e forma, ficando retidas as partículas de diâmetro superior ao poro (massa molecular superior a 30 kDa), permitindo assim aumentar a concentração de proteína.

## **6 – CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS MUTANTES DA FUSCOREDOXINA**

### **6.1 – DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DAS PROTEÍNAS**

A massa molecular das proteínas foi determinada através de electroforese em gel de poliacrilamida. Esta técnica permite determinar o tamanho e percentagem de pureza das proteínas obtidas, pois além da proteína de interesse permite a detecção de outros contaminantes.

O SDS-PAGE<sup>(137)</sup> foi efectuado com uma concentração de poliacrilamida de 12,5% de acordo com a massa molecular esperada para a proteína e as amostras analisadas foram tratadas com  $\beta$ -mercaptoetanol. O kit de baixo peso molecular da Amersham Biosciences®, foi utilizado como marcador proteico. Os géis foram submetidos a uma voltagem constante de 150 V durante 1 hora; depois da electroforese os géis foram corados utilizando uma solução corante contendo Comassie Blue R-250 e posteriormente descorados com uma solução contendo 7.5%

de ácido acético e 45% de metanol. Os géis ficaram registados em fotografia (Gel Logic 100 Imaging System – Kodak).

## 6.2 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A espectroscopia do Ultravioleta e Visível (UV/ Vis) é um método óptico analítico, que permite a análise de moléculas ou iões em solução. A lei de Lamber-Beer permite estabelecer uma relação entre a absorção e a concentração de uma espécie, servindo como método de quantificação:

$$A = -\log \left( \frac{I}{I_0} \right) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

**Equação 2** – Equação da Lei de Lamber-Beer

Em que  $A$  é a absorvância,  $I$  a intensidade transmitida pela amostra,  $I_0$  a intensidade da radiação incidente na amostra,  $\varepsilon$  o coeficiente de absorvidade molar ( $\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ),  $b$  o percurso óptico (cm) e  $c$  a concentração da amostra ( $\text{mol L}^{-1}$ ).

A quantificação de substâncias por análise directa num espectrofotómetro, por vezes, não é possível devido à ineficaz absorção de radiação por parte da amostra, é assim, necessário recorrer a métodos colorimétricos, que no caso da quantificação de proteínas podem ser os seguintes: Lowry, Bradford, Biureto e Ácido Bicinconínico. Estes métodos baseiam-se na formação de compostos coloridos devido às reacções de certos grupos ou radicais da molécula de proteína com reagentes químicos específicos <sup>(138)</sup>.

Com base no mesmo princípio também é possível quantificar o conteúdo de ferro presente numa proteína. O método que utiliza o reagente 2, 4, 6 – tri – 2 – piridil – 1, 3, 5 – triazina (TPTZ – Sigma®), permite determinar o ferro não hémico numa proteína. Neste método, a adição de ácido clorídrico destrói a estrutura proteica, libertando os átomos de ferro e, a adição de ácido tricloroacético permite a precipitação destes. A coloração é obtida devido à adição do reagente TPTZ, permitindo assim a quantificação colorimétrica <sup>(139)</sup>.

A concentração das proteínas foi determinada de acordo com as instruções do manual do kit adoptado (*Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* – SIGMA®) <sup>(140)</sup> e baseia-se na formação de complexos  $\text{Cu}^{2+}$ -Proteína, seguido pela redução do  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ , por ligação a alguns resíduos

de aminoácidos presentes nas proteínas (cisteína, cistina, triptofano e tirosina), o que confere uma coloração púrpura à solução. A quantidade de  $\text{Cu}^{2+}$  reduzido é proporcional à quantidade de proteína presente na solução em análise.

Para se realizar as quantificações começou-se por preparar reagente suficiente para todos os padrões, brancos e amostras, uma vez que é necessário misturar 50 partes de uma solução de ácido bicinconírico, carbonato de sódio, tartarato de sódio e bicarbonato de sódio em 0.1M NaOH (pH final de 11.25), com uma parte da solução de sulfato de cobre (II) pentahidratado a 4%. Foram também preparados tubos de 2 ml contendo as reacções padrão pretendidas, tendo sido para isso utilizado uma solução padrão de albumina de plasma bovino (BSA) 1 mg/ml e, as amostras em análise, tal como vem exemplificado nas **Tabelas 6 e 7**.

**Tabela 6** – Volumes padrão contendo uma concentração conhecida de BSA, para a determinação do coeficiente de absorvidade característico ( $\epsilon$ ).

<b>Tubo</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
BSA ( $\mu\text{l}$ )	0	10	20	40	60	80	100
BSA ( $\mu\text{g}$ )	0	10	20	40	60	80	100
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	100	90	80	60	40	20	0
Total ( $\mu\text{l}$ )	100						

**Tabela 7** – Volumes utilizados para determinação da concentração de cada uma das amostras das proteínas mutadas.

<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Proteína ( $\mu\text{l}$ )	5	10	15
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{l}$ )	95	80	85
Total ( $\mu\text{l}$ )	100		

Após as reacções estarem preparadas, adicionou-se 2 ml do reagente preparado por cada 100  $\mu\text{l}$  de amostra, branco e padrão proteico e, incubou-se durante 30 minutos a 37 °C; seguiu-se a medição da absorvância de cada uma das reacções preparadas ao comprimento de onda de 562 nm, num espectrofotómetro de feixe duplo Shimadzu® (UV-160A) e, cujos valores foram depois representados em função da quantidade de BSA ( $\mu\text{g}$ ).

### 6.3 – DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO EM FERRO DAS PROTEÍNAS

O conteúdo em ferro das proteínas foi determinado através do método do TPTZ <sup>(139)</sup>. O TPTZ é um reagente que interaccua com os átomos de Ferro, quando estes se encontram livres em solução. A quantificação é feita através do método colorimétrico e, para tal, é necessário preparar uma curva de calibração com uma solução padrão de Ferro (18.53 nmol/μl, diluído 200 vezes):

**Tabela 8** - Reacções padrão contendo uma concentração de Ferro padrão conhecida, para a determinação do coeficiente de absorvidade característico ( $\epsilon$ ).

Tubo	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Volume padrão μl	0	43.2	64.8	86.4	107.9	129.5	151.1	172.7	194.3
nmol Fe	0	4	6	8	10	12	14	16	18
H <sub>2</sub> O	400	356.8	335.2	313.6	292.1	270.5	248.9	227.3	205.7

Além da recta padrão, foram preparadas as amostras de proteína a analisar (cada uma com um volume final de 400 μl), em que se utilizou volumes correspondentes a 1, 2 e 3 nmol de proteína.

A cada reacção adicionou-se 50 μl de uma solução de HCl 8N, agitou-se e deixou-se incubar as reacções 10 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se 50 μl de solução de TCA (ácido tri-cloro acético) a 80%, agitou-se e, as amostras de proteína foram centrifugadas numa centrífuga Sigma® Eppendorf durante 5 minutos a uma velocidade de 12 470 g; após este tempo foram transferidos 400 μl do sobrenadante de cada amostra para novos tubos. De seguida, adicionaram-se 100 μl de acetato de amónia 75% e 40 μl de cloreto de hidroxilamina 10%, agitou-se, adicionou-se 40 μl da solução de TPTZ 4 mM e ficou a incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Após o período de incubação, efectuou-se a leitura das absorvâncias a um comprimento de onda de 593 nm, num espectrofotómetro de feixe duplo Shimadzu® (UV-160A), cujos valores foram depois representados em função do Ferro padrão em nmol.

## **7 – CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA**

### **7.1 – ESPECTROSCOPIA DE UV/ VISÍVEL**

Os mutantes da Fuscoredoxina obtidos foram também caracterizados por espectroscopia de UV/visível e comparados com o espectro da Fuscoredoxina não mutada.

As amostras de proteínas mutadas foram caracterizadas através de um espectrofotômetro UV/visível de feixe duplo Shimadzu® (UV-160A), em células de quartzo de espessura de 1 cm. As linhas de base foram feitas com as soluções tampão utilizadas na purificação.

### **7.2 – ESPECTROSCOPIA DE RPE**

A RPE é uma técnica de espectroscopia que permite caracterizar os mutantes obtidos, do ponto de vista estrutural. Os espectros de RPE obtidos foram realizados no espectrómetro Bruker EMX 6/1 de Banda X equipado com a cavidade ER4116DM e com um criostato de fluxo contínuo Oxford ESR900. As medições foram efectuadas a uma temperatura de 12K e 35K, com uma frequência de microondas igual a 9.65 GHz, potência de microonda de 6.4 mW, amplitude de modulação de 10Gpp e ganho de  $2 \times 10^5$ .

### **7.3 – ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER DA FUSCOREDOXINA RECOMBINANTE (RD1)**

A espectroscopia de Mössbauer permite obter uma informação estrutural das proteínas contendo ferro na composição dos seus cofactores, fornecendo informação acerca do número de ligandos dos átomos de ferro e a natureza química dos mesmos. Esta técnica acaba por ser complementar da espectroscopia de RPE uma vez que esta detecta qualquer estado redox e de spin, ao contrário da anterior que apenas detecta espécies paramagnéticas.

Para realizar o espectro de Mössbauer da proteína recombinante RD1 foi necessário realizar um crescimento e indução da proteína com enriquecimento de  $^{57}\text{Fe}$  (concentração final de 2 mg/L). O crescimento foi realizado nas mesmas condições do já anteriormente mencionado, mas para este caso em particular foi utilizado como meio de cultura LB (Sigma®) e, na

indução para além do IPTG foi adicionado ao meio a solução de Fe<sup>57</sup> a pH 3. Todas as etapas seguintes foram as mesmas realizadas para as proteínas recombinantes mutadas e não mutada.

O espectrómetro de Mössbauer utilizado permite a aplicação de um campo magnético fraco (0,6 kG) quer paralelo quer perpendicular ao feixe de radiação gama. O espectrómetro foi equipado com um crióstato modelo SHI-850 da JANIS, o arrefecimento foi efectuado por um Refrigerador de Circuito Fechado (CCR), modelo CKW-21 da Sumitomo (4.2K).



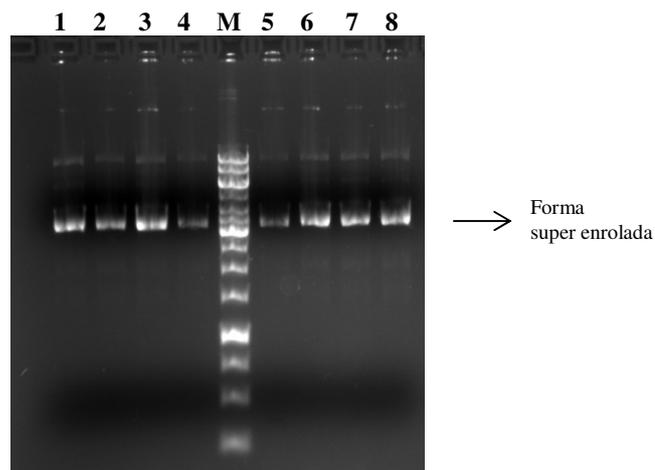
---

## **CAPÍTULO III**

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 1 – OBTENÇÃO DO PLASMÍDEO RD1

O ponto de partida deste estudo foi o plasmídeo RD1 que contém o gene que codifica a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. O plasmídeo foi inserido em células de *E. coli* DH 5  $\alpha$  (Invitrogen®) através de uma transformação efectuada por choque térmico, para permitir a clonagem e consequente aumento da quantidade de ADN plasmídico. As células foram incubadas nas condições adequadas ao seu crescimento e o plasmídeo foi isolado utilizando o Kit JETQUICK *Plasmid Miniprep* (Genomed GmBH®). A electroforese em gel de agarose permitiu verificar o isolamento do ADN plasmídico e confirmar se este se encontrava puro, verificando-se a presença das três formas de ADN plasmídico, linear, circular e super enrolado, estando esta última forma em maior quantidade (mais de 80%) (Figura 8).



**Figura 8** – Electroforese em gel de agarose para verificação do ADN plasmídico isolado e purificado a partir de células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , utilizando o kit *JETQUICK Plasmid Miniprep* (Genomed GmBH®). Condições: 0.8% Agarose, 1X TAE, 85mV, 45 minutos. (M – Marcador de pesos moleculares (1kb); 1 a 8 - ADN plasmídico isolado)

O ADN isolado foi quantificado por espectroscopia de UV, a partir da **Equação 2**, tendo-se obtido uma concentração de 72 ng/ $\mu$ l.

$$C_{ADN} = 50 \times 10 \times 0,144 = 72 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Este cálculo serviu para depois calcular o volume necessário a utilizar nas reacções de mutagénese.

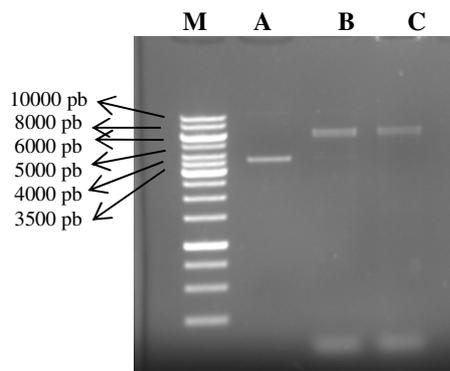
## 2 – PRODUÇÃO DO MUTANTE AR2

O mutante AR2 foi produzido por substituição do resíduo de aminoácido de cisteína que se encontra na posição 400, o que irá implicar a alteração da esfera de coordenação do Fe(8), do centro 2 da Fuscoredoxina [ $\text{Fe}_4\text{S}_3\text{O}_2\text{X}$ ]. O resíduo de cisteína 400 encontra-se ligado ao átomo de enxofre S(7), que por sua vez estabelece ligação com o átomo de ferro Fe(8). A mutação permite evidenciar a importância da ligação que existe entre o resíduo de Cys400 e o S(7) e respectiva influência no Fe(8), permitindo uma melhor caracterização deste centro misto.

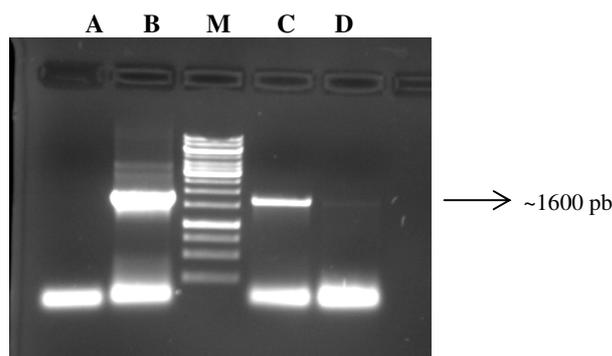
A estrutura do centro 2 sugere que este possa desempenhar um papel catalítico em reacções de oxidação-redução devido aos potenciais de redução que o centro apresenta <sup>([6], [14])</sup>. Este centro Fe-S é alvo de extrema curiosidade, uma vez que foi pela primeira vez identificado na Fuscoredoxina, pensando-se por isso que possa desempenhar um papel fundamental na estrutura e consequentemente na função desta proteína.

Como esta é uma mutação pontual, foi utilizada a técnica de mutagenese dirigida para a sua execução, tendo sido adoptado o kit *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* – Stratagene <sup>([26])</sup>. A incorporação dos iniciadores contendo a mutação pretendida nas cadeias do plasmídeo, deu origem a um plasmídeo mutado AR2. Para verificar a amplificação e digestão do ADN foi realizada uma electroforese em gel de agarose 0.8%, visualizando-se uma banda corresponde a aproximadamente 6500 pares de bases, ou seja o plasmídeo mutado possui o mesmo tamanho que o plasmídeo molde, uma vez que se realizou uma substituição, o que significa que o plasmídeo foi clonado e possivelmente a mutação foi induzida (**Figura 9**).

O próximo passo foi a transformação de células super competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  e incubação em meio nutritivo nas condições adequadas à formação de colónias. Obtiveram-se 2 colónias, as quais foram submetidas a uma reacção de PCR de colónia de modo a confirmar se as colónias desenvolvidas continham o plasmídeo com o fragmento de interesse, ou seja, o gene que codifica a Fuscoredoxina mas com a mutação induzida. Para tal, foram utilizados iniciadores oligonucleotídicos que flanqueiam este mesmo gene (Fus1 e Fus2). Das 2 colónias, apenas uma teve resultado positivo, ou seja, ocorreu a amplificação do gene, comparativamente ao pRD1 utilizado como controlo positivo (**Figura 10**).



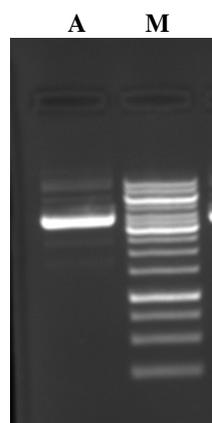
**Figura 9** – Electroforese em gel de agarose 0.8%; 1X TAE; 90mV; 45min, para verificar os produtos de PCR obtidos após amplificação do ADN para realização da mutagénese dirigida. (M – Marcador de pesos moleculares (1kb); A – pRD1 (45 ng); B – Produto do PCR antes da digestão com *DpnI*; C – Produto do PCR depois de digerido).



**Figura 10** – Electroforese em gel de agarose 0.8%; 1X TAE; 90 mV; 30 minutos; produto do PCR de colónia para confirmar se o ADN plasmídico contém o fragmento de interesse. (M – Marcador de pesos moleculares (1kb); A – controlo negativo; B – controlo positivo; C e D – ADN das colónias analisado).

### 3 – SEQUENCIAÇÃO E EXPRESSÃO DOS GENES

A mutação pretendida foi induzida no gene que codifica a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. Isolou-se o ADN plasmídico da colónia com o fragmento de interesse, com recurso ao Kit JETQUICK *Plamid Miniprep* (Genomed GmGB®) (**Figura 11**) e submeteu-se a uma sequenciação (clone 1), requisitada ao laboratório STAB Vida, e traduzidos com recurso a uma base de dados encontrado no site de Internet [www.expasy.com](http://www.expasy.com) <sup>(41)</sup>, verificando-se que o clone possui a mutação induzida no gene que codifica a Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774.



**Figura 11** – Electroforese em gel de agarose 0.8%; 1X TAE; 90mV; 45 minutos. Gel de verificação do ADN plasmídico recombinante isolado da colônia com o fragmento de interesse. (**M** – Marcador de pesos moleculares (1kB); **A** – ADN Plasmídico isolado)

### Sequência do plasmídeo AR2 com Substituição do resíduo de aminoácido Cisteína 400

**Fusco:** I E S G E I I G G F A H N Q V L A L A D(380)

**RD1:** I E S G E I I G G F A H N Q V L A L A D

**AR2** I E S G E I I G G F A H N Q V L A L A D

**Fusco:** K V I D A V K S G A I K K F V V M A G **C**(400)

**RD1:** K V I D A V K S G A I K K F V V M A G **C**

**AR2:** K V I D A V K S G A I K K F V V M A G **A**

**Fusco:** D G R A K S R S Y Y T D F A E G L P K D(420)

**RD1:** D G R A K S R S Y Y T D F A E G L P K D

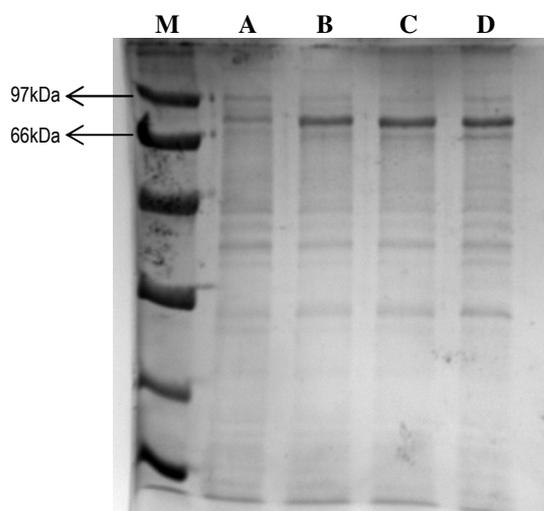
**AR2:** D G R A K S R S Y Y T D F A E G L P K D

#### 4 – EXPRESSÃO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTE E RECOMBINANTES MUTADAS EM LARGA ESCALA

Os plasmídeos recombinantes RD1, SC1, RD2, AR1 e AR2 foram transformados em células de *E. coli* BL21 (Novagen®), para permitir a expressão dos genes. Estas células possuem uma baixa produção de proteases evitando o risco de proteólise das proteínas de fusão e, permitem maximizar a expressão destas proteínas. Para cada mutante, foi seleccionada uma colónia para fazer o pré-inóculo em meio de cultura esterilizado LB com Ampicilina (100 µg/ml), o crescimento e indução foi feito em meio de cultura esterilizado YT 2X e, a expressão da proteína de interesse foi induzida com 0.1 mM de IPTG a densidade óptica  $\approx 2$ . A expressão das proteínas encontra-se sob controlo do promotor *lac* que é induzido pelo análogo da lactose, o IPTG. O vector possui também um gene *lacI<sup>q</sup>*, que codifica para uma proteína repressora que se liga à região operadora do promotor *lac*, evitando a expressão das proteínas até que estas sejam induzidas pelo IPTG, permitindo assim controlar a expressão dos fragmentos de interesse <sup>(136)</sup>.

Para confirmar se a expressão dos genes desejados ocorreu, ou seja, se a adição de IPTG ao meio de cultura induziu a síntese de proteínas e para verificar se as condições utilizadas para a expressão do gene foram adequadas, foram efectuadas análises por electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12.5%, utilizando o lisado celular de amostras recolhidas do meio de cultura antes e após a indução da expressão com IPTG.

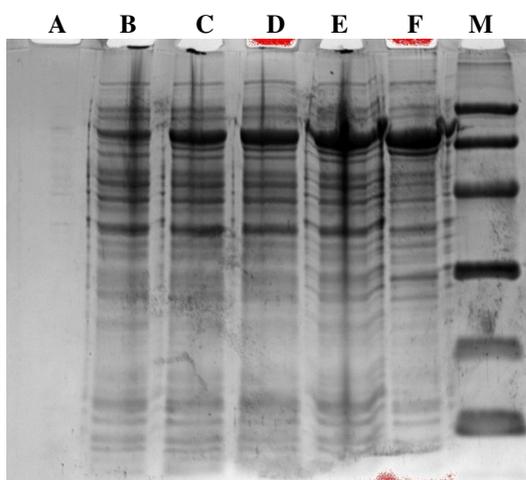
As **Figuras 12 a 16** mostram as fotografias dos géis de SDS-PAGE da indução da expressão das proteínas recombinantes RD1, RD2, SC1, AR1 e AR2 juntamente com a GST, antes e após a indução com IPTG. Por comparação com o marcador de massa molecular confirmou-se que as proteínas expressas em maior quantidade foram de facto as proteínas de fusão apresentando uma massa molecular aproximada de 84 kDa (RD1+GST), 80 kDa (RD2+GST), 83 kDa (SC1+GST), 82 kDa (AR1+GST e AR2+GST). É possível verificar que em todos os casos a indução da expressão da proteína de fusão apenas ocorreu após a adição do IPTG, comparativamente à amostra antes da indução, sendo a banda mais larga correspondente à proteína de fusão GST (~26kDa) e proteína de interesse (RD1, SC1, AR1 e AR2 com ~58.5kDa e RD2 ~55kDa), as restantes bandas que são visualizadas correspondem a outras proteínas de diferentes massas moleculares sintetizadas em menor escala.



**Legenda:**

- M – Marcador de baixo peso molecular (LMW)
- A – Lisado celular antes da indução
- B – Lisado celular 1 hora depois da indução
- C – Lisado celular 3 horas após a indução
- D – Lisado celular 19 horas após a indução

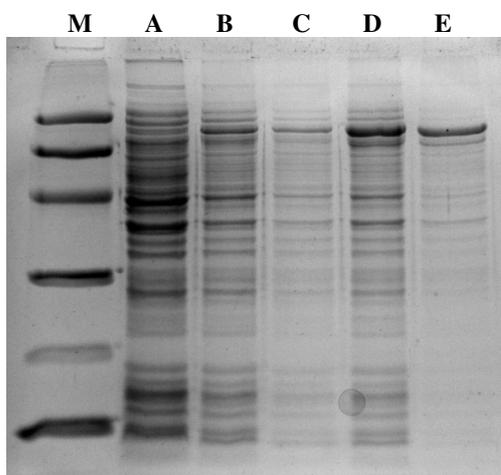
**Figura 12** – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína recombinante RD1 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.



**Legenda:**

- M – Marcador de baixo peso molecular (LMW)
- A – Lisado celular antes da indução
- B – Lisado celular 1 horas após a indução
- C – Lisado celular 2 horas após a indução
- D – Lisado celular 3 horas após a indução
- E – Lisado celular 4 horas após a indução
- F – Lisado celular 18 horas após a indução

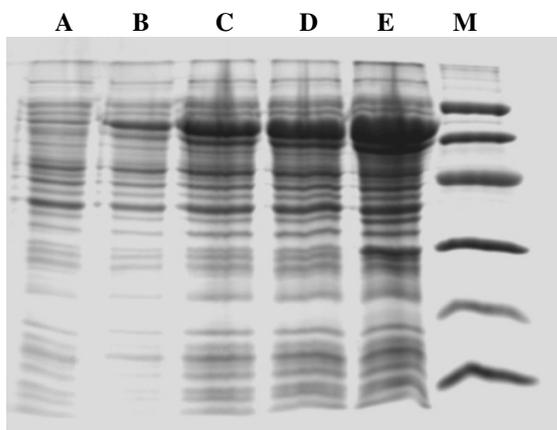
**Figura 13** – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante RD2 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.



**Legenda:**

- M – Marcador de baixo peso molecular (LMW)
- A – Lisado celular antes da indução
- B – Lisado celular 1 horas após a indução
- C – Lisado celular 2 horas após a indução
- D – Lisado celular 3 horas após a indução
- E – Lisado celular 16h30 horas após a indução

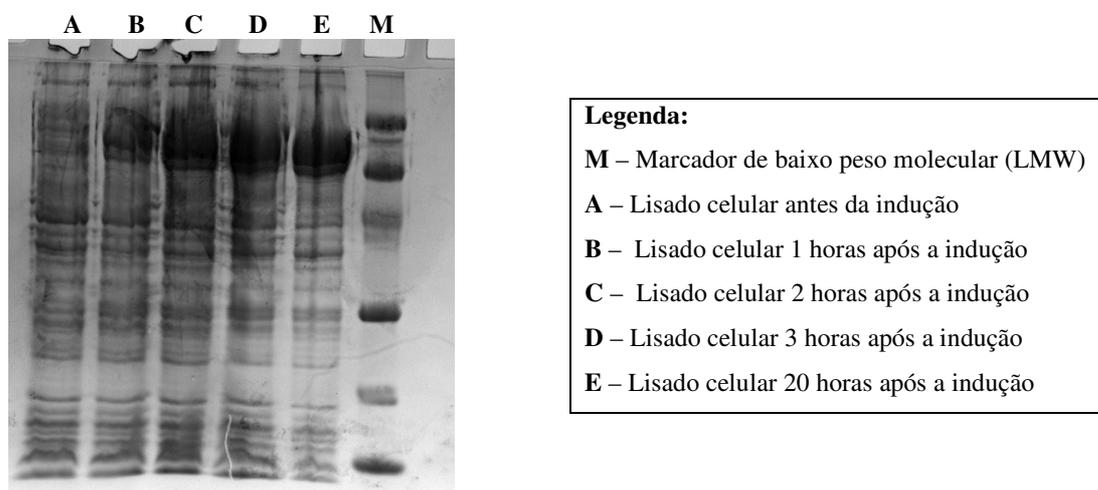
**Figura 14** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante SC1 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.



**Legenda:**

- M – Marcador de baixo peso molecular (LMW)
- A – Lisado celular antes da indução
- B – Lisado celular 1 horas após a indução
- C – Lisado celular 2 horas após a indução
- D – Lisado celular 3 horas após a indução
- E – Lisado celular 18 horas após a indução

**Figura 15** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante AR1 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.

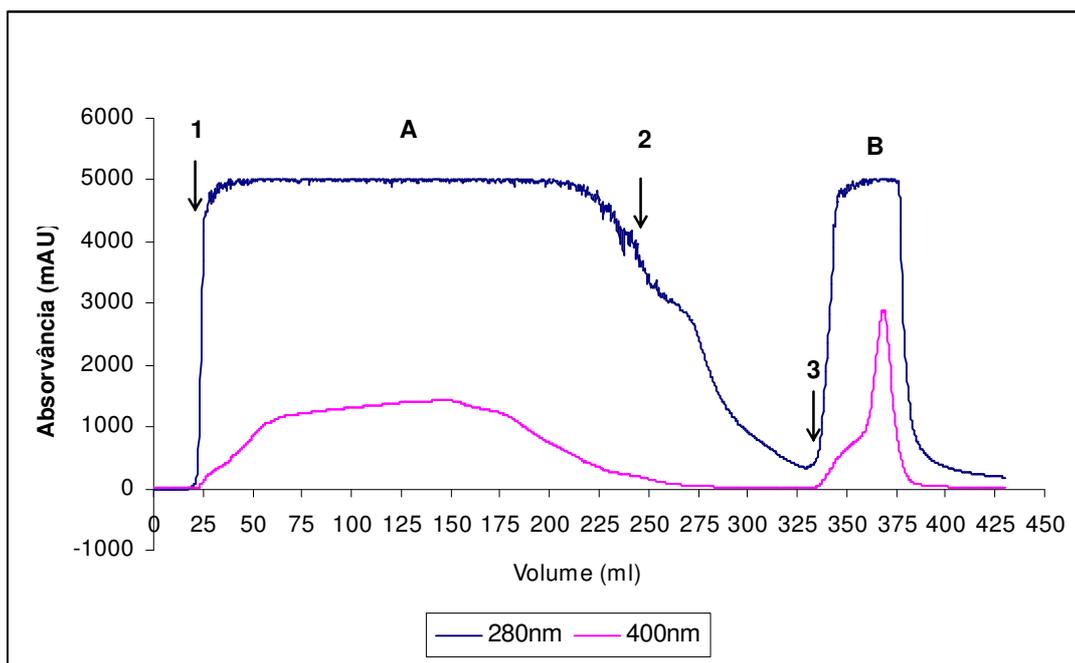


**Figura 16** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína mutante AR2 juntamente com a GST, antes e após a indução da produção da proteína com IPTG.

## 5- EXTRACÇÃO/ ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO, PROTEÓLISE E CONCENTRAÇÃO DA PROTEÍNA GST/ FUSCOREDOXINA RECOMBINANTE E RECOMBINANTE MUTADA

A utilização de um sistema de HPLC permitiu o registo e monitorização da purificação, bem como a um aumento no rendimento desta. A absorvância das amostras injectadas foi detectada a 280 e 400 nm, uma vez que é a estes comprimentos de onda que a Fuscoredoxina apresenta os seus picos de absorvância. Através do cromatogram a (**Figura 17**) é possível verificar os diversos passos da purificação, tais como, a adição da mistura proteica (**1**) à coluna de afinidade, a sua lavagem com solução-tampão PBS 1X (**2**) de modo a que somente a proteína de fusão fique retida na resina, e a adição da solução de eluição (**3**) que permite a obtenção da proteína pura.

Os cromatogramas das proteínas recombinantes mutadas SC1, RD2, AR1 e AR2 são semelhantes a este e apresentam as mesmas características, não sendo por isso necessário mostrá-los.

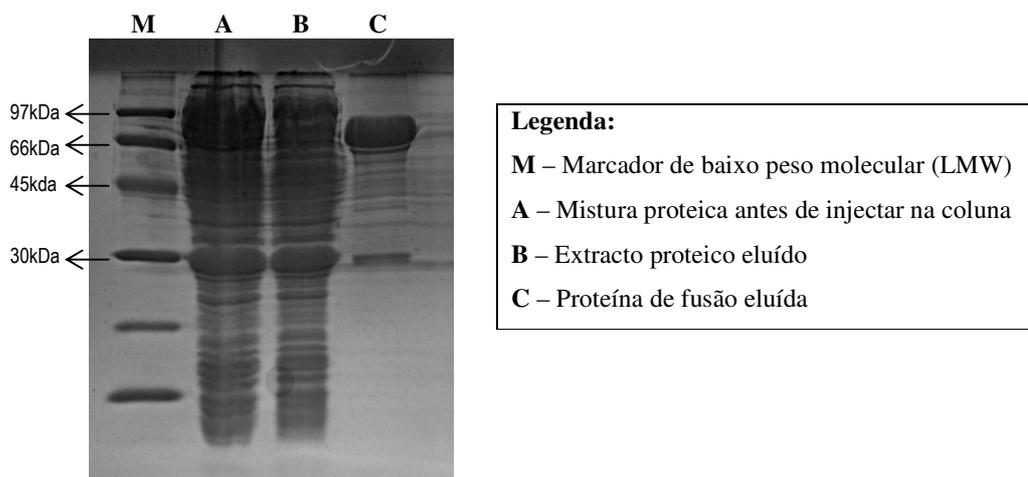


**Figura 17** – Cromatograma obtido durante a purificação da proteína de fusão RD1, com a Absorvância (mAU) em função do volume de eluído (ml). (A – O que não fica agarrado à coluna; B – Proteína de fusão eluída)

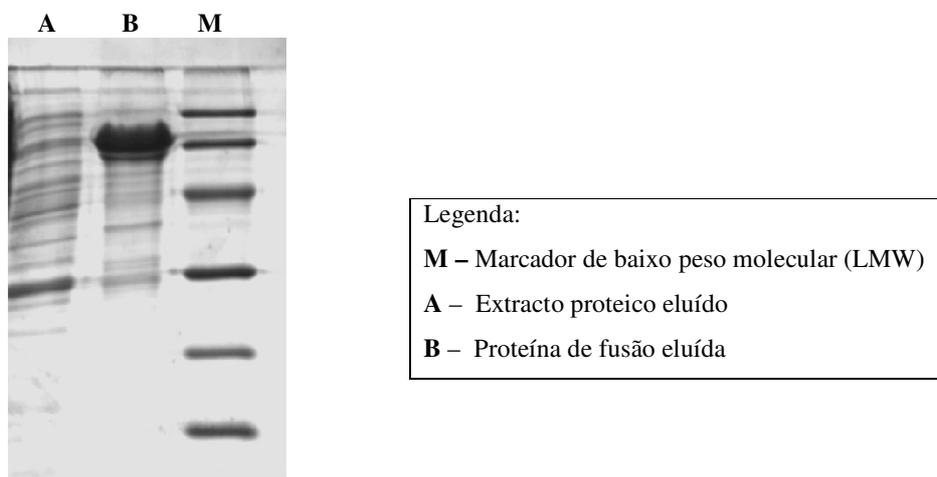
Para confirmar se a purificação ocorreu como esperado foi realizado uma análise em electroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12.5%, através da qual se verificou a presença das proteínas de fusão separadas de praticamente todas as outras proteínas que não interessam e, determinou-se igualmente a massa molecular correspondente a 84 kDa (RD1), 80 kDa (RD2), 83 kDa (SC1), 83 kDa (AR1) e 82 kDa (AR2) .

As **Figuras 18 a 22** mostram as fotografias dos géis de SDS-PAGE da purificação das proteínas de fusão, RD1, RD2, SC1, AR1 e AR2 juntamente com a GST. Por comparação com o marcador de massa molecular confirmou-se que as proteínas purificadas são de facto as proteínas de fusão apresentando uma massa molecular aproximada de 84 kDa (RD1+GST), 80 kDa (RD2+GST), 83 kDa (SC1+GST e AR1+GST), 82 kDa (AR2+GST). Em todas as fotografias é também possível visualizar uma banda com massa molecular próxima dos 30kDa que corresponde à GST livre (~26kDa). Nas **Figuras 20, 21 e 22** para além das proteínas de fusão e da GST livre é também possível observar uma banda que corresponde à proteína de

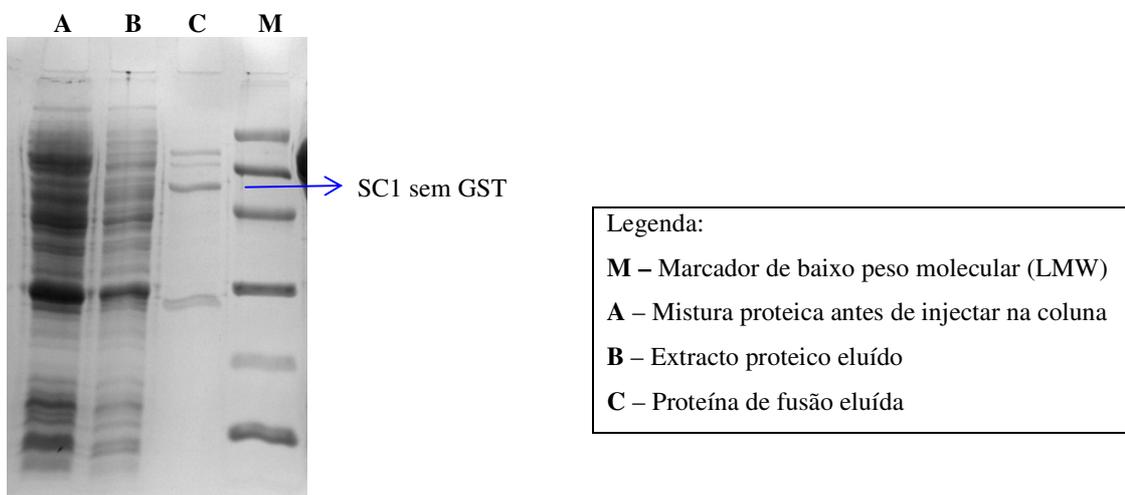
interesse sem GST, que em todos os casos apresenta uma massa molecular aproximadamente igual a 59kDa (SC1 e AR1) e 58kDa (AR2).



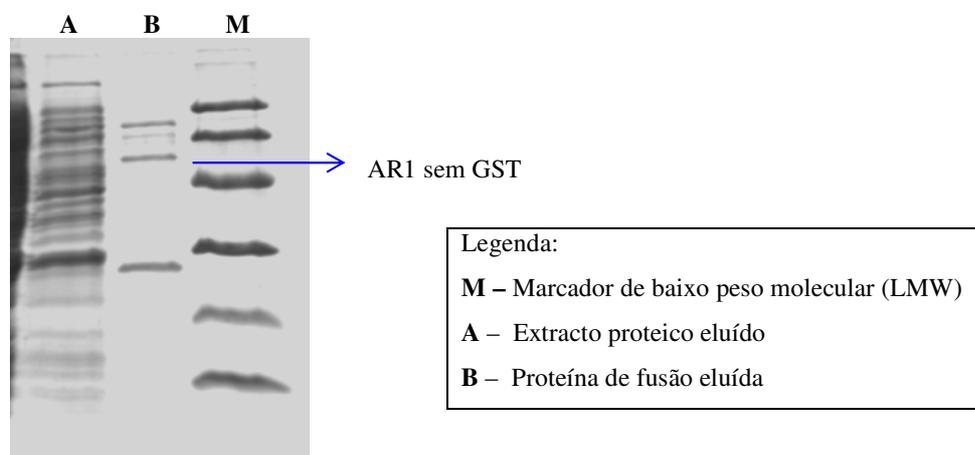
**Figura 18** – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão RD1 juntamente com a GST.



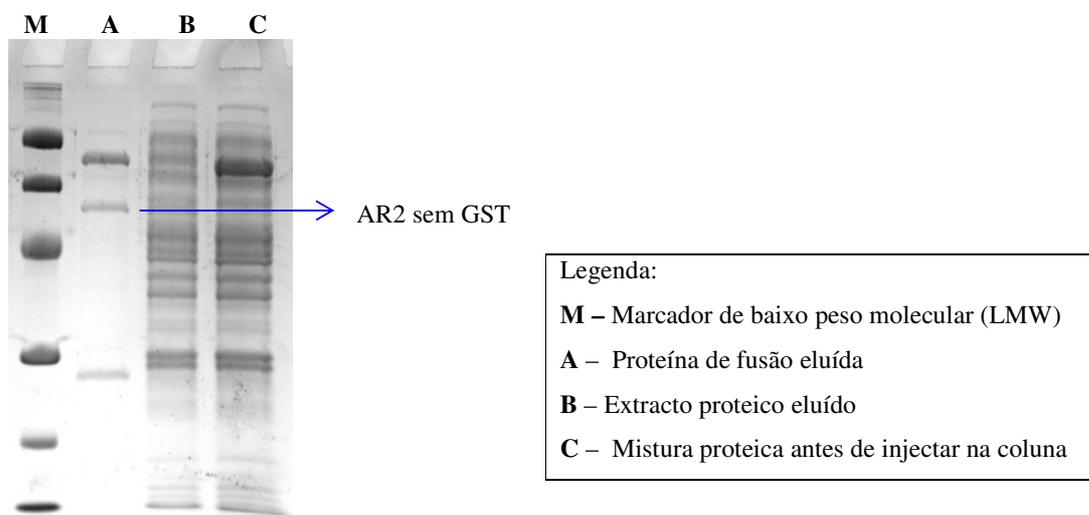
**Figura 19** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão RD2 juntamente com a GST.



**Figura 20** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão SC1 juntamente com a GST.



**Figura 21** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão AR1 + GST.



**Figura 22** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Amostras da purificação da proteína de fusão AR2 com a GST.

## 6 – ESPECTROSCOPIA DE UV/ VISÍVEL

As proteínas recombinantes, não mutada e mutadas, purificadas foram alvo de caracterização por espectroscopia de UV/ Visível.

A Fuscoredoxina apresenta um espectro de absorção de radiação electromagnética na zona do UV e do visível, típico de uma proteína Fe-S, com um máximo de absorção a 280 nm e absorção a 400 nm, típica de centros com Fe-S, tal como se pode observar no espectro da Fuscoredoxina recombinante (RD1) (**Figura 23**).

Os espectros de UV/ Visível das proteínas recombinantes mutadas apresentam máximo de absorção a um comprimento de onda aproximadamente igual a 280nm. A 400 nm observa-se algumas diferenças de absorção entre as proteínas mutadas, nomeadamente e através do espectro ampliado é possível verificar que apenas os mutantes RD2 e AR1 apresentam maior absorção a este comprimento de onda, o que pode ser indicativo da não conservação dos centros de Fe-S (**Figura 24**).

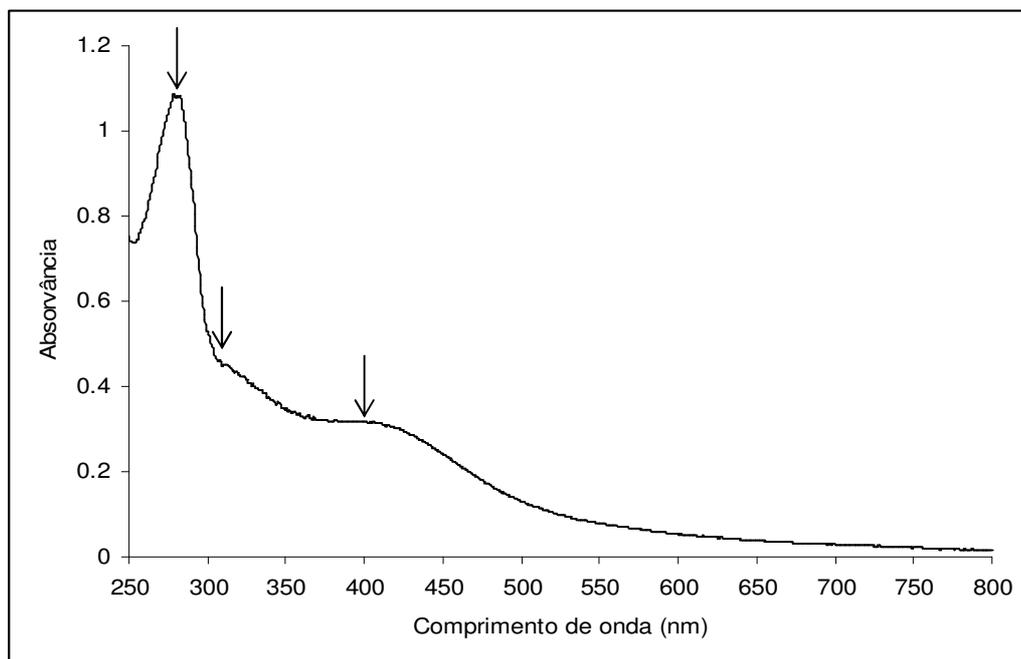


Figura 23 – Espectro de UV/ Visível da amostra de Fuscuredoxina recombinante (RD1) no estado oxidado.

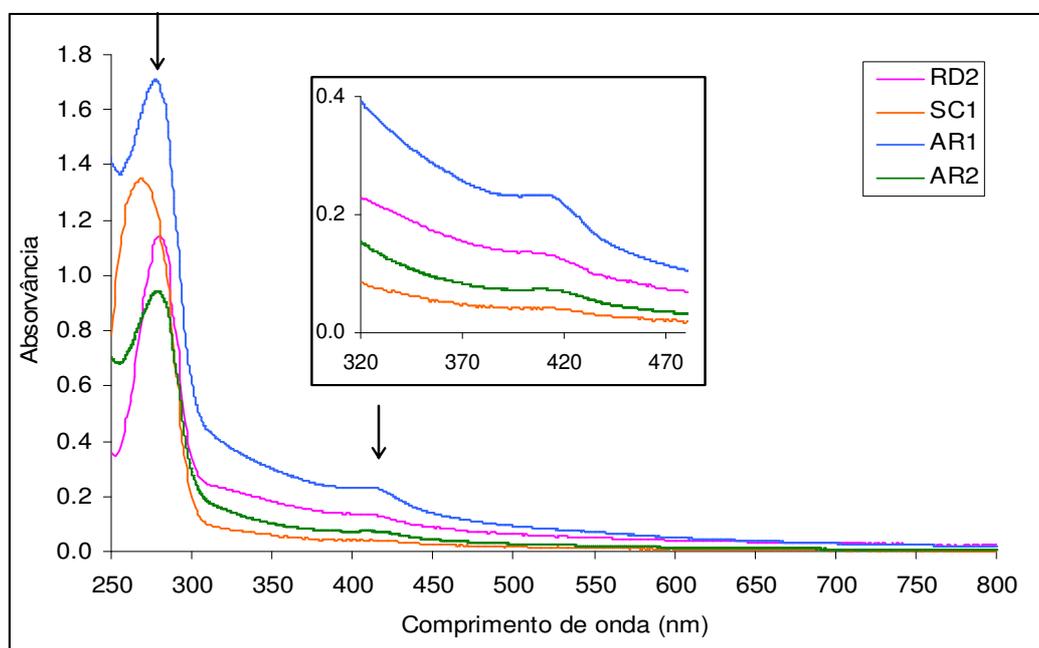
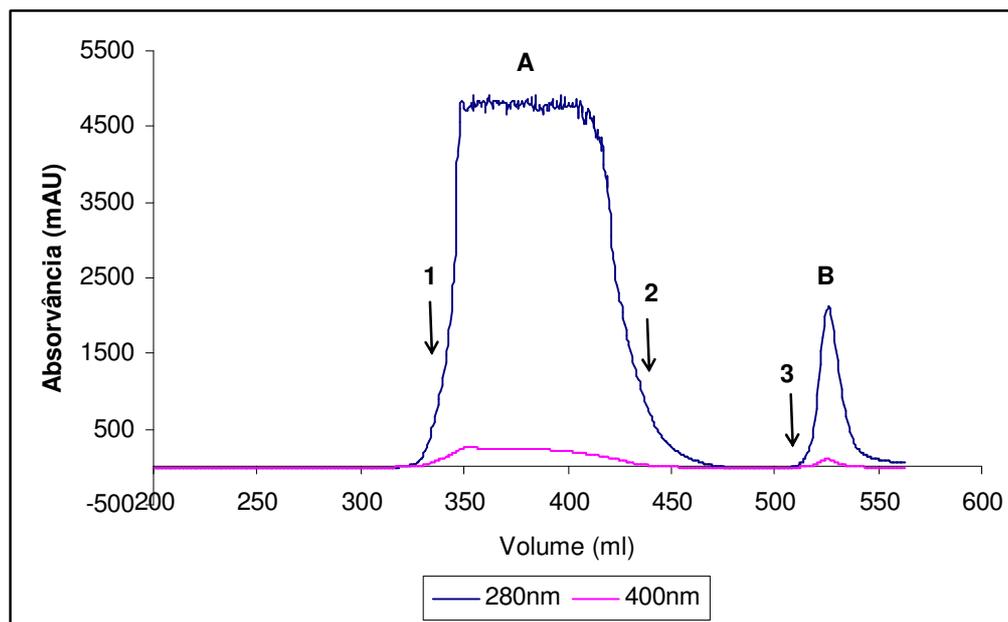


Figura 24 – Espectro de UV/ visível das amostras de Fuscuredoxina recombinantes mutadas nos seus estados oxidados.

## 7– HIDRÓLISE DAS PROTEÍNAS DE FUSÃO COM A PRESCISSION

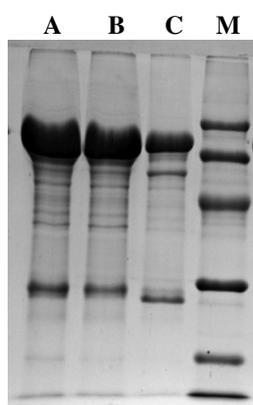
A hidrólise das proteínas de fusão com a PreScission tinha como objectivo a separação da proteína de interesse da GST. No processo de hidrólise foi necessário trocar a solução tampão em que se encontram as proteínas de interesse para uma solução tampão própria para a acção da enzima. A adição e incubação da enzima e posterior purificação no mesmo sistema de HPLC deveriam ser suficientes para a obtenção das proteínas sem GST. Num primeiro ensaio, utilizou-se PreScission com uma concentração de 1.135 mg/ml e após incubação com a proteína de fusão RD1+GST efectuou-se a purificação recorrendo à mesma coluna que contém resina com Glutathiona imobilizada. O cromatograma da **Figura 25** mostra mais uma vez que a monitorização da purificação foi feita aos comprimentos de onda de 280 e 400 nm, bem como os diversos passos da purificação, nomeadamente a eluição da proteína recombinante (1) e a eluição da GST juntamente com a PreScission (3).



**Figura 25** - Cromatograma obtido durante a purificação da proteína recombinante RD1 após hidrólise, com a Absorvância (mAU) em função do volume de eluído (ml). (A – Proteína recombinante eluída; B – Eluição da GST e PreScission)

Para confirmar se na hidrólise e posterior purificação conseguiu-se separar a Fuscoredoxina recombinante da GST procedeu-se a uma análise através de uma electroforese em gel de poliacrilamida. A **Figura 26** apresenta a fotografia tirada ao gel com as amostras analisadas, na qual é possível verificar que o processo não ocorreu como o esperado, uma vez que o primeiro eluído não apresenta diferenças relativamente à amostra injectada na coluna. A quantidade de PreScission adicionada, 300  $\mu$ l (0.3405 mg) pode não ter sido suficiente para hidrolisar as proteínas de fusão.

Uma vez que havia muita proteína de fusão por cortar, voltou-se a incubar a mistura, mas desta vez adicionou-se 3 ml de PreScission (3.405 mg), 10X mais que o ensaio anterior. Mais uma vez e, por análise em SDS-PAGE (**Figura 27**) verificou-se que a hidrólise não foi eficaz, pois no primeiro eluído encontra-se alguma proteína por hidrolisar, bem como no segundo eluído se encontra a maior parte da Fuscoredoxina recombinante, juntamente com a GST e a PreScission.



**Legenda:**

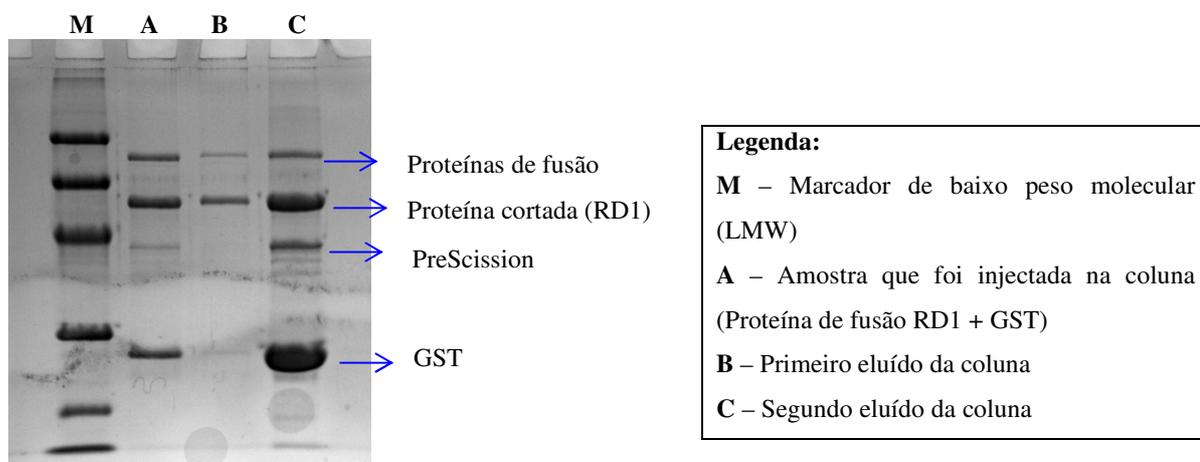
**M** – Marcador de baixo peso molecular (LMW)

**A** – Amostra que foi injectada na coluna (Proteína de fusão RD1 + GST)

**B** – Primeiro eluído da coluna

**C** – Segundo eluído da coluna

**Figura 26** – SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras da purificação da proteína recombinante RD1 após a hidrólise (primeiro ensaio).

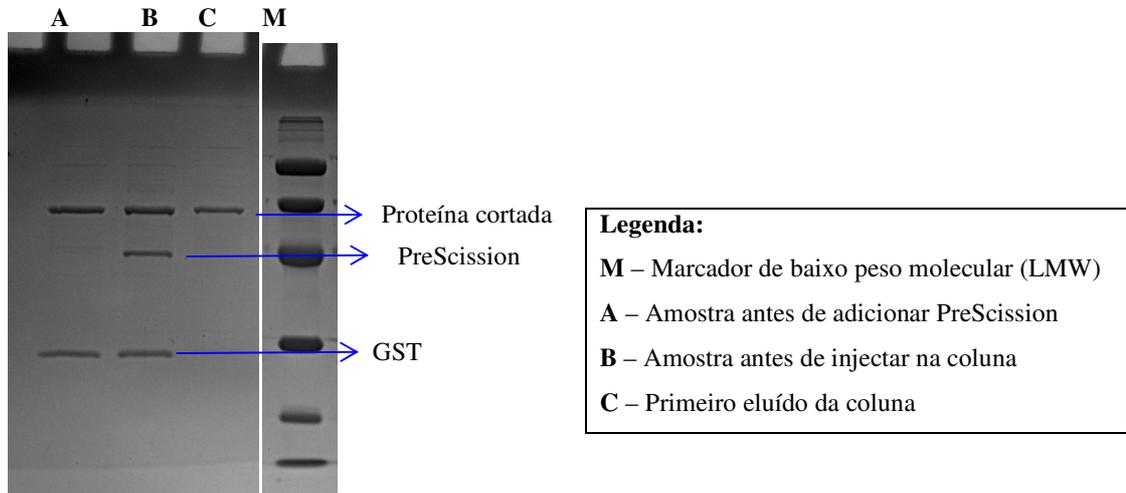


**Figura 27** - SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras da purificação da proteína recombinante RD1 após a hidrólise (segundo ensaio).

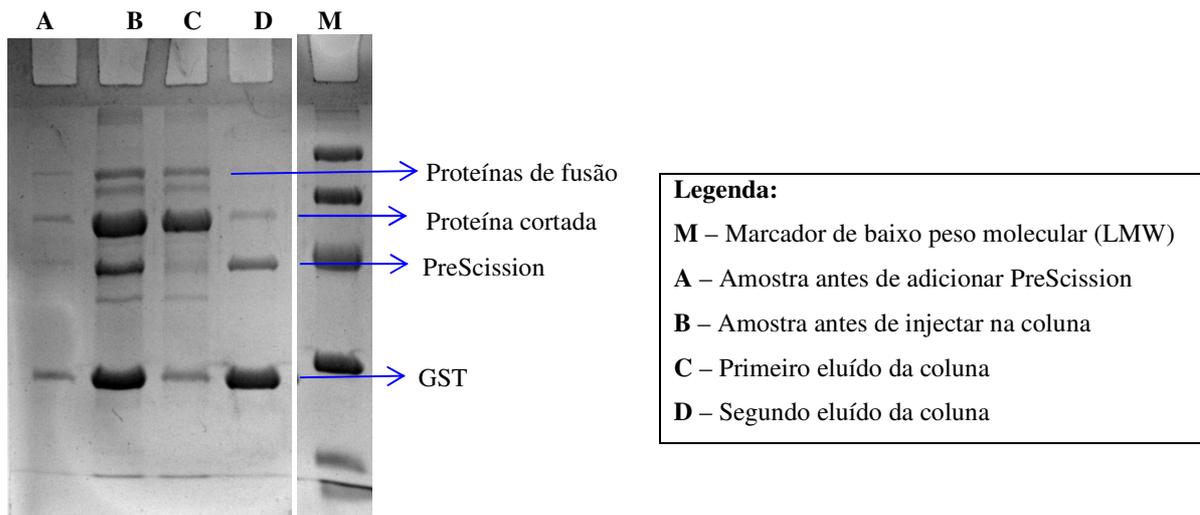
Uma vez que a protease utilizada até então poderia ter perdido a eficácia, para um terceiro ensaio fez-se um novo crescimento da PreScission (**Apêndice A**). A PreScission purificada apresentava uma concentração de 7.4 mg/ml e foi novamente incubada com a proteína de fusão RD1 e também com a proteína de fusão mutada AR2.

A **Figura 28** mostra o SDS-PAGE no qual se analisou as amostras da purificação da proteína recombinante RD1 após hidrólise com 1 ml de protease. É possível verificar por comparação das massas moleculares do marcador, que antes de adicionar a protease, a proteína recombinante RD1 já se encontra sem a GST e desta forma não é possível comprovar a eficácia da protease purificada. Neste ensaio no entanto conseguiu-se obter a proteína recombinante sem GST.

A **Figura 29** apresenta o SDS-PAGE com amostras da purificação da proteína recombinante AR2 após hidrólise com a PreScission (1 ml). Neste caso verificou-se que antes de incubar com a protease, a proteína recombinante AR2 apresenta-se com a GST (~82 kDa) e sem a GST (~58 kDa), e no primeiro eluído da coluna, encontra-se para além da proteína recombinante mutada outros contaminantes (GST e proteína não cortada).



**Figura 28** – SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras analisadas da proteína recombinante RD1 após nova hidrólise (terceiro ensaio).

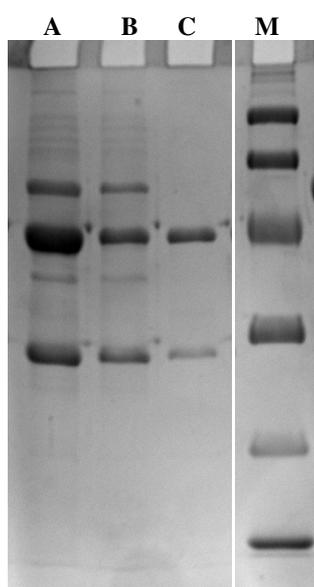


**Figura 29** - SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, 1h. Amostras da purificação da proteína recombinante mutada AR2, antes e após hidrólise com PreScission.

De uma forma geral, após a hidrólise com a PreScission continuou a existir em solução proteína por hidrolisar e contaminação com GST livre. Para remediar a presença de GST livre em solução, algumas fracções foram ainda purificadas por HPLC utilizando uma coluna pré-empacotada de Sepharose com Glutationa imobilizada (*GSTrap<sup>TM</sup> FF columns* – GE Healthcare Life Sciences )<sup>(122)</sup>. Esta coluna funciona de forma semelhante à coluna utilizada

para a primeira purificação nomeadamente as mesmas soluções tampão, apenas apresenta dimensões mais reduzidas (1 cm<sup>3</sup>) e é ideal para volumes mais pequenos. Neste passo de purificação a GST livre em solução ficaria retida na coluna sendo eluídas as proteínas de interesse. Para verificar se na purificação conseguiu-se ou não separar a GST livre da proteína de interesse, analisou-se as amostras em SDS-PAGE. A **Figura 30** mostra a purificação feita à proteína recombinante mutada AR1, na qual é possível verificar que antes da purificação a amostra se encontra contaminada com PreScission (~46 kDa) e com GST livre (~26 kDa). No primeiro eluído seria de esperar só a proteína de interesse (~58 kDa), mas ainda foram detectado os mesmos contaminantes.

Com este último passo de purificação pretendia-se remover os contaminantes em solução com a proteína de interesse. Apesar de se conseguir remover parte destes, não se conseguiu eliminá-los na totalidade. Uma vez que este problema levava a perdas contínuas de proteína, a qual é essencial às caracterizações desejadas e, como a GST não possui átomos de ferro na sua estrutura, optou-se por não efectuar a hidrólise das proteínas de fusão.



**Legenda:**

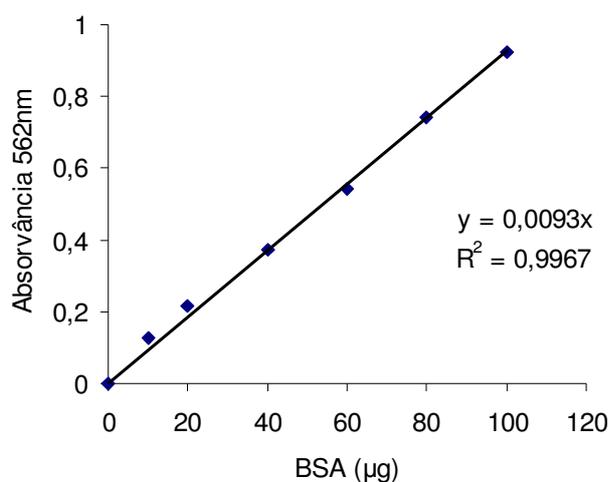
- M** – Marcador de baixo peso molecular (LMW)
- A** – Amostra antes da coluna
- B** – Primeiro eluído da coluna
- C** – Segundo eluído da coluna

**Figura 30** –SDS-PAGE, 12.5% Acrilamida, 150V, ~1h. Amostras da purificação da proteína de fusão mutada AR1 na coluna cromatográfica GSTrap<sup>TM</sup> FF.

## 8 – CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DA FUSCOREDOXINA

### 8.1 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A concentração das proteínas foi determinada de acordo com as instruções do manual do kit adoptado, (Bicinchronic Acid Protein Assay Kit – SIGMA®) <sup>(40)</sup>, segundo a recta de calibração representada, obtida através das soluções-padrão de BSA.



**Figura 31** – Recta de calibração e respectiva equação, obtida a partir da representação dos valores de absorvância a 562 nm em função da quantidade de BSA (µg).

A partir da equação da recta obtida e atendendo à **Equação 3** foi possível calcular as concentrações das proteínas recombinantes, a partir dos valores de absorvância registados:

$$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot c \Leftrightarrow y = 0.0093x$$

**Equação 3** - Equação para calcular a concentração das proteínas recombinantes

**Tabela 9** – Valores de absorvância obtidos e de concentração calculados a partir da **Equação 4** para a proteína recombinante RD1.

Volume RD1 (µl)	Absorvância	Concentração (µg/µl)	Concentração média(µg/µl)
5	0.127	2.731	
10	0.173	1.860	1.860
15	0.227	1.627	

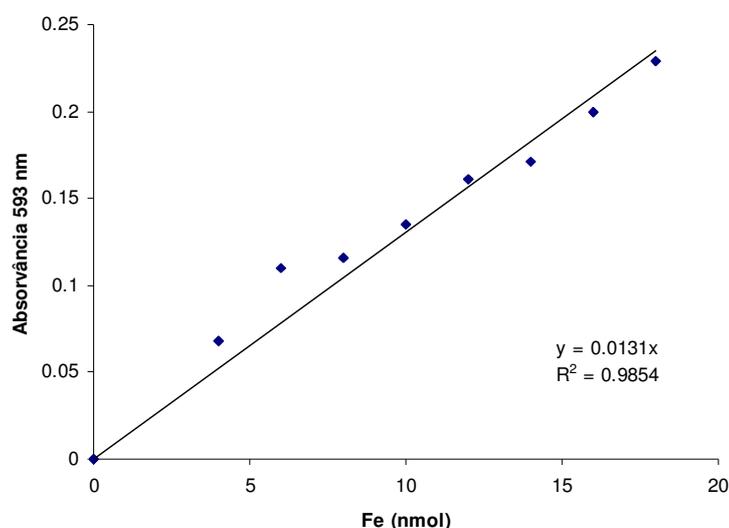
À semelhança da proteína recombinante RD1, foi também calculado a concentração das restantes proteínas recombinantes mutadas:

**Tabela 10** – Valores de concentração média obtidos para as proteínas recombinantes mutadas SC1, RD2, AR1 e AR2.

Proteína	Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
SC1	1.823
RD2	1.355
AR1	0.616
AR2	1.204

## 8.2 – DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FERRO NÃO HÉMICO

O conteúdo em ferro não hémico foi determinado de acordo com o protocolo adoptado <sup>(139)</sup>, utilizando o reagente TPTZ e a recta de calibração representada, foi obtida com uma solução padrão de Ferro com concentração de 18.53 nmol/L, diluído 200X.



**Figura 32** – Recta de calibração e respectiva equação, obtida a partir da representação dos valores de absorvância a 593 nm em função da quantidade de Ferro (nmol), a qual serve para determinar o coeficiente de absorvidade característico ( $\epsilon$ ).

Com a equação da recta obtida e a partir da **Equação 3** encontra-se a seguinte relação:

$$Abs = \varepsilon \cdot b \cdot c \Leftrightarrow y=0.0131x$$

**Equação 4** - Equação para calcular o conteúdo em Ferro das proteínas recombinantes.

**Tabela 11** - Valores de absorvância e de quantidade de Ferro por proteína obtidos para a proteína recombinante RD1.

RD1 (nmol)	Absorvância	nmol Fe /nmol Proteína
2	0.181	6.908

O conteúdo em ferro das proteínas recombinantes mutadas RD2, SC1, AR1 e AR2 foi calculado de forma semelhante tendo-se obtido os seguintes resultados:

**Tabela 12** - Quantidade de Ferro por proteína obtidos para as proteínas recombinantes mutadas.

Proteína	nmol Fe /nmol Proteína
RD2	1.039
SC1	0.744
AR1	1.169
AR2	1.072

A quantificação de Ferro não hémico nas proteínas é importante para o estudo efectuado aos mutantes da Fuscoredoxina, pois permite verificar se os centros de Fe-S contém o número de átomos de Ferro esperado para cada mutante. Os resultados obtidos pelo método do TPTZ em comparação com os valores da literatura mostram que os centros de Ferro das proteínas mutantes não terão sido parcial ou totalmente conservados.

**Tabela 13** – Número de ferros esperados e obtidos pela quantificação por TPTZ.

Proteína	Teórico	TPTZ
RD1	8	6.908
RD2	4	1.039
SC1	6	0.744
AR1	6	1.169
AR2	6	1.072

A proteína recombinante RD1 apresenta cerca de 7 átomos de Ferro por molécula, o que é indicativo que os dois centros de Fe-S da proteína não sofreram alterações significativas no processo de purificação, tal como havia sido verificado pela espectroscopia de UV-Vis.

No caso da proteína mutante RD2, a deleção dos quatro primeiros resíduos de cisteína pode ter tido como consequência a não conservação do centro 2 da Fuscoredoxina, o qual se pretendia caracterizar com esta mutação uma vez que era esperado no máximo 4 átomos de Ferro, mas apenas foi quantificado cerca de 1 Ferro por molécula. As proteínas recombinantes mutadas SC1, AR1 e AR2 foram alvo de mutações pontuais no centro 2, e como tal seria de esperar no mínimo 4 átomos de Ferro por molécula correspondentes ao centro 1 da Fuscoredoxina. Em qualquer dos casos foi apenas quantificado um átomo de Ferro por proteína, o que significa que os centros não terão sido parcial ou totalmente conservados. As proteínas podem ter sido afectadas durante o processo de purificação ou as próprias mutações poderão ter sido responsáveis pela alteração da estrutura da proteína e consequentemente dos centros.

### **8.3 – ESPECTROSCOPIA DE RPE**

A espectroscopia de RPE permite igualmente caracterizar a proteína recombinante e recombinantes mutadas, nomeadamente os centros característicos desta proteína. As primeiras caracterizações espectroscópicas realizadas nesta proteína levaram a interpretações erradas em relação à composição dos seus centros metálicos. Em 1998, a estrutura tridimensional da proteína foi determinada por cristalografia de raios X, e pela primeira vez as características espectroscópicas puderam ser devidamente interpretadas. A correcta interpretação dos dados revelou características magnéticas invulgares, tal como o centro de coordenação mista da própria proteína. A Fuscoredoxina possui um centro de  $[4\text{Fe-4S}]^{2+/1+}$ , que quando reduzido apresenta propriedades magnéticas raras, com uma mistura de estados de spin ( $S=3/2$  e  $S=1/2$ ) nunca antes detectado num sistema biológico. O centro 2 da proteína apresenta uma mistura de ligandos invulgares, bem como possui ligações com pontes de oxigénio e de enxofre (pontes

dissulfureto) e os próprios resíduos de proteína a que se encontra ligados são pouco usuais. Este centro possui quatro estados de oxidação, que vão desde o estado totalmente oxidado com quatro Fe(III) até ao estado totalmente reduzido com três Fe(II) e um Fe(III). Os estados de oxidação resultam em quatro estados de spin:  $S=0$ , para o estado totalmente oxidado;  $S=9/2$  e  $S=1/2$ , quando reduzido com um electrão;  $S=0$  e  $S=4$ , após redução com dois electrões; e  $S=1/2$  no estado totalmente reduzido <sup>(14), [5] e [14])</sup>.

As **Figuras 33, 34 e 35** apresentam os espectros de RPE realizados às proteínas recombinante (RD1) e recombinantes mutadas (RD2, SC1, AR1 e AR2) tal como foram purificadas (**Figura 33 e 34**) e após redução com ditionito (**Figura 35**).

A **Figura 33** mostra os espectros obtidos para as diferentes proteínas tal como foram isoladas a 12K. O espectro do RD1 (**A**), apresenta dois grupos de picos de ressonância, nas regiões de campo alto e campo baixo, respectivamente. A campo alto é possível observar sinais que apresentam valores de  $g$  aproximadamente iguais a 2, característico de sistemas com  $S=1/2$ . A campo baixo é possível observar um grupo de ressonâncias para valores de  $g$  entre 9.3 e 5.4, e é também detectada uma ressonância a  $g \sim 15$  devido a espécies com  $S=9/2$ . Estas características permitem confirmar que a proteína recombinante purificada é de facto a Fuscoredoxina, e pode-se atribuir os sinais detectados ao centro 2 da proteína após redução com um electrão.

As proteínas recombinantes mutadas SC1, AR1 e AR2 apresentam espectros muito semelhantes entre si e distintos da proteína recombinante RD1, com sinais a campo alto com  $g=2$  e a campo baixo apresentam um pico a  $g=5.9$ . Estes sinais são distintos daqueles apresentados pela proteína recombinante e parecem ser devidos à presença de Fe(III) com  $S=5/2$ . Estes dados parecem apoiar a ideia de que terá havido uma alteração estrutural nas proteínas mutadas que não permitiram a conservação dos centros destas.

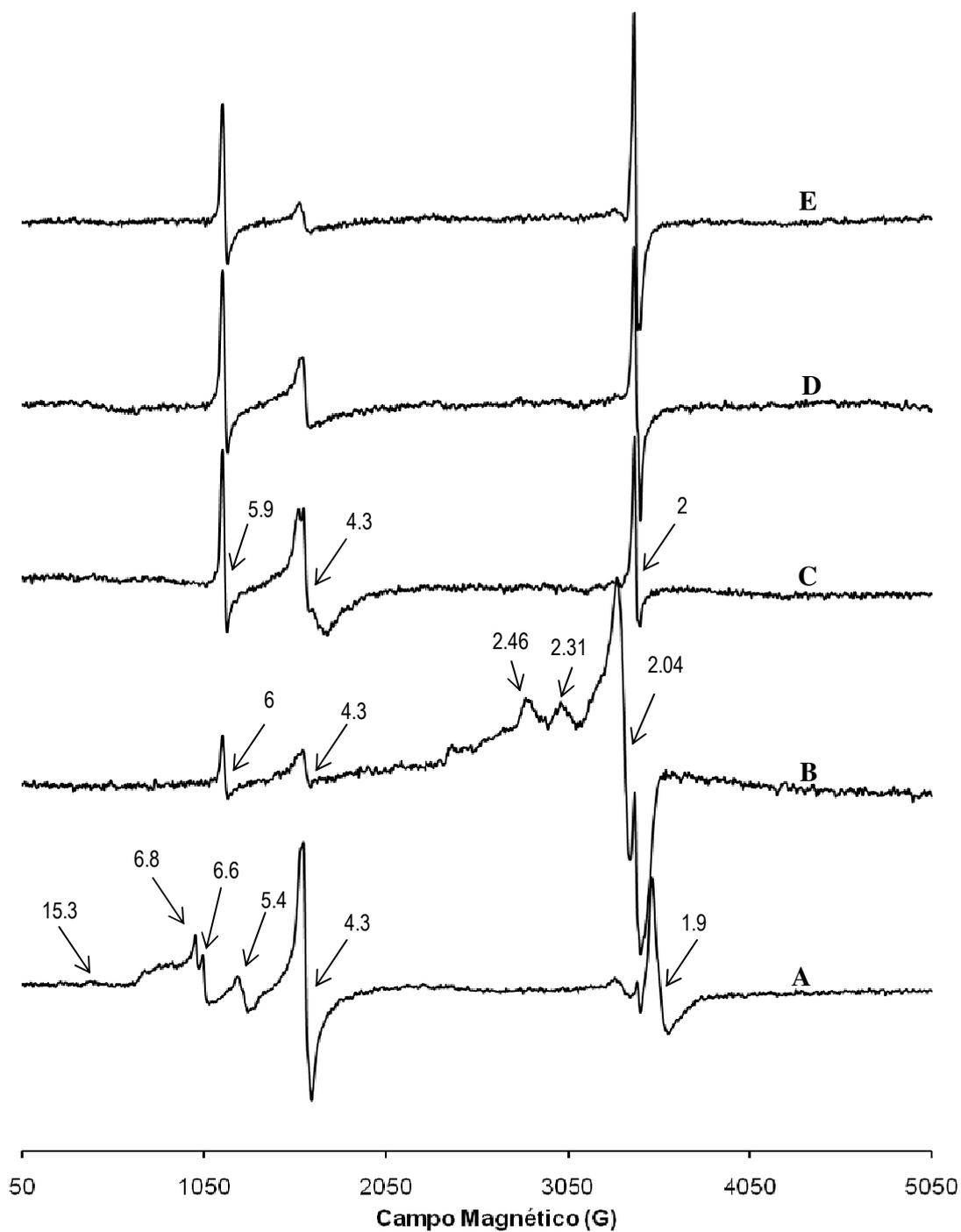
A proteína recombinante RD2 apresenta a campo baixo uma semelhança com as outras proteínas recombinantes, mas a campo alto surgem algumas diferenças no sinal que podem ser devidas à alteração da vizinhança do centro ou então a uma contaminação de cobre devido à presença de água na cavidade. Essa contaminação é também detectada na mesma região de campo alto no espectro da proteína reduzida com ditionito (**Figura 35**). Pode-se assim

assimuir que esta apresenta uma semelhança com as restantes proteínas mutadas e que tal como estas, o centro 2 da proteína não foi conservado na estrutura.

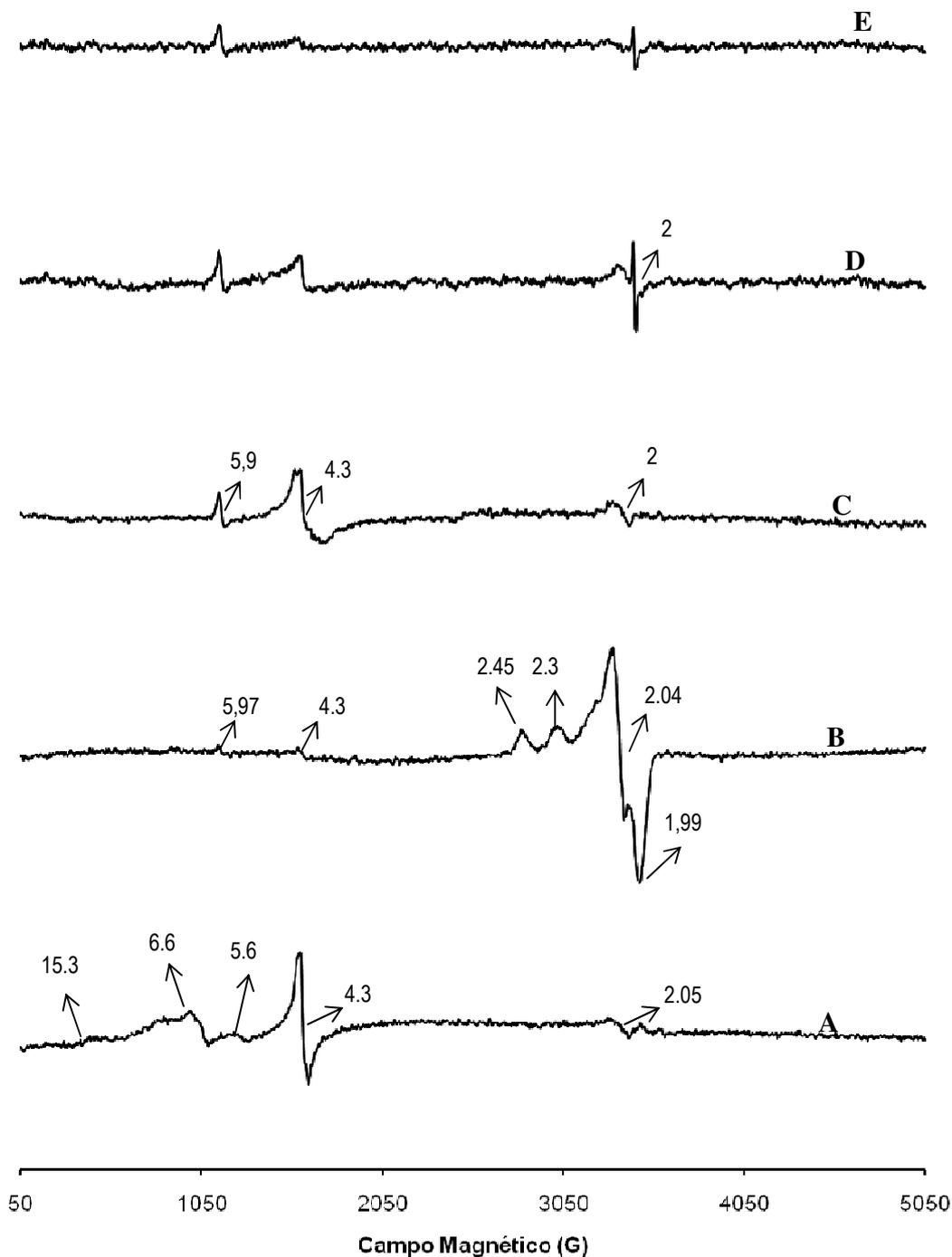
A **Figura 34** mostra os espectros obtidos das amostras de proteína à temperatura de 35K, onde é visível a diminuição ou o total desaparecimento dos picos de ressonância, principalmente daqueles situados a campo alto (à excepção do RD2), o que revela a dependência da intensidade dos sinais com a temperatura.

Na **Figura 35** são apresentados os espectros de RPE das proteínas recombinante e recombinantes mutadas, após redução com ditionito a 12K. A proteína recombinante RD1 apresenta um intenso sinal rômboico a campo alto devido a espécies com  $S=1/2$  com valores de  $g$  iguais a 2 e 1.55, falta um terceiro valor a campo alto, mas que não foi incluído no intervalo de valores em que se efectuou os espectros. O espectro apresenta também uma ressonância a campo baixo com  $g=4.56$  que pode ser devida ao estado de spin  $S=3/2$  do centro 1, apresentando assim, a mistura dos estados de spin ( $S=3/2$  e  $S=1/2$ ) mencionada. As proteínas recombinantes mutadas apresentam novamente espectros (**C**, **D** e **E**) semelhantes entre si, com um sinal intenso a campo alto, mas sinal este que difere daquele apresentado pelo RD1. O sinal que é detectado a  $g=4.3$  em quase todos os espectros é devido à presença de ferro livre nas amostras analisadas que pode ter origem nas próprias proteínas ou de outra contaminação exterior.

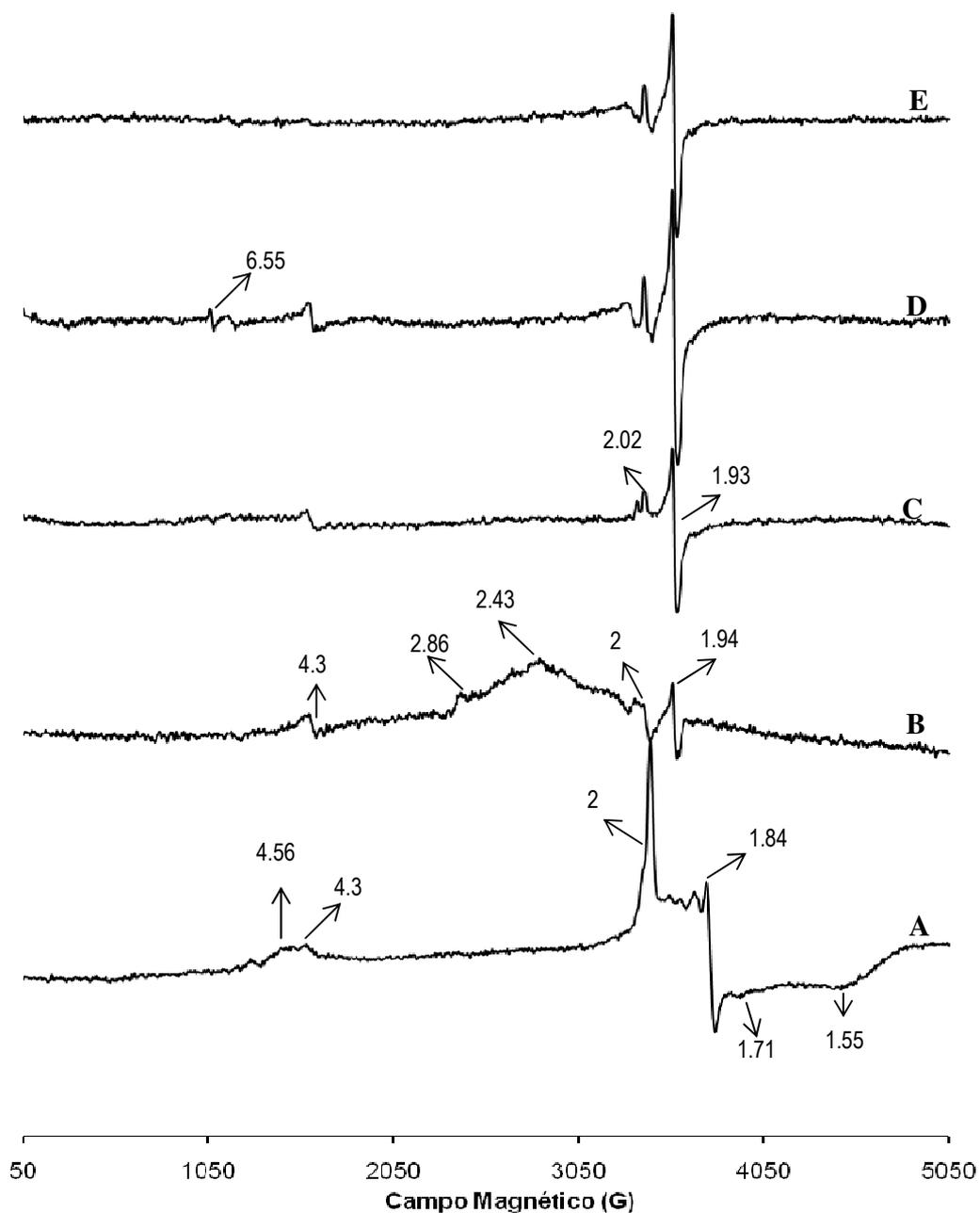
A espectroscopia de RPE permitiu verificar não só a obtenção da Fuscoredoxina recombinante, bem como confirmar que no caso das proteínas recombinantes mutadas, terá acontecido uma alteração estrutural nestas que não permitiu a correcta formação dos centros.



**Figura 33** – Espectros de RPE da Fuscoredoxina recombinante (RD1) (A) e das proteínas recombinantes mutadas RD2 (B), SC1 (C), AR1 (D) e AR2 (E). Temperatura:12K; Frequência de microonda: 9.65GHz; Potência de microonda: 6.4mW; Amplitude de modelação: 10Gpp; Ganho:2x10<sup>5</sup>.



**Figura 34** – Espectros de RPE da Fuscoredoxina recombinante (RD1) (A) e das proteínas recombinantes mutadas RD2 (B), SC1 (C), AR1 (D) e AR2 (E). Temperatura: 35K; Frequência de microonda: 9.65GHz; Potência de microonda: 6.4mW; Amplitude de modelação: 10Gpp; Ganho:  $2 \times 10^5$ .



**Figura 35** – Espectros de RPE das amostras reduzidas com ditionito da Fusedoxina recombinante (RD1) (A) e das proteínas mutadas RD2 (B), SC1 (C), AR1 (D) e AR2 (E). Temperatura: 12K; Frequência de microonda: 9.65GHz; Potência de microonda: 6.4mW; Amplitude de modelação: 10Gpp; Ganho:  $2 \times 10^5$ .

#### **8.4 – ESPECTROSCOPIA DE MÖSSBAUER DA PROTEÍNA RECOMBINANTE RD1**

A espectroscopia de Mössbauer é uma técnica complementar ao RPE pois permite detectar espécies diamagnéticas e permite também, a caracterização estrutural de proteínas que contém ferro na composição dos seus cofactores. Para este caso em particular apenas foi preparada uma amostra da proteína recombinante RD1, a qual foi sobreexpressa em meio enriquecido com Fe<sup>57</sup>. Não foi possível obter o espectro da amostra devido a um problema técnico com o espectrómetro, impedindo assim a caracterização da proteína neste tipo de espectroscopia.



---

**CAPÍTULO IV**  
**CONCLUSÕES E PROJECTOS FUTUROS**

Caracterizaram-se bioquímica e espectroscopicamente proteínas recombinantes mutadas de Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. A partir da Fuscoredoxina recombinante (RD1) já haviam sido efectuadas três mutações, que consistiram na deleção da região N-terminal (RD2) da proteína contendo os resíduos de aminoácido de cisteína que constituem o centro 1; na substituição (SC1) e na deleção (AR1) de um resíduo de aminoácido do centro 2. Neste estudo foi efectuada mais uma mutação, por mutagénese dirigida, no centro 2 da Fuscoredoxina, que consistiu na substituição de um resíduo de aminoácido de cisteína na posição 400 por um de alanina (AR2). A mutação foi depois confirmada através de sequenciação e respectiva análise da sequência.

O plasmídeo recombinante RD1 e os mutantes RD2, SC1, AR1 e AR2 foram inseridos em células hospedeiras nas condições ideais de modo a permitir a sobreexpressão das proteínas recombinantes, que foram posteriormente purificadas por cromatografia de afinidade com base num sistema de HPLC. As proteínas purificadas são constituídas pela proteína recombinante de interesse juntamente com a GST formando uma proteína de fusão. A remoção da GST tornou-se um problema pois não se conseguiu efectuar a correcta hidrólise da proteína, bem como havia constantes perdas de proteína neste processo de purificação. Uma vez que após a primeira purificação se obtinham amostras praticamente puras das proteínas de fusão, optou-se por não remover a proteína de fusão GST, uma vez que como esta não contém ferro na sua constituição, não deve interferir nas análises de RPE pretendidas.

As proteínas recombinantes purificadas foram caracterizadas bioquimicamente através da determinação da sua concentração, da massa molecular aparente e conteúdo de ferro não hémico (**Tabela 14**) e, espectroscopicamente por análise dos espectros de UV/Visível e de RPE. A quantificação de Ferro feita às proteínas e os espectros de UV/ Visível, revelaram que os centros Fe-S do RD2, SC1 e AR2 não terão sido parcial ou totalmente conservados. Em relação ao AR1, o espectro de UV/ Visível apresenta um pico a 400 nm, mas a quantificação do Ferro sugere que terá acontecido alguns alteração na estrutura proteica que contribui para a não conservação dos centros.

Os espectros de RPE obtidos para as proteínas recombinantes mutadas apresentam uma grande semelhança entre si, e comparando com os espectros obtido para a proteína RD1, que apresentam as mesmas características da Fuscoredoxina nativa, pode-se inferir que durante o

processo de purificação poderá ter ocorrido um problema que terá originado a não formação dos centros, apesar de ser detectado ferro nas amostras.

Para trabalhos futuros envolvendo as proteínas recombinantes mutadas da Fuscoredoxina, existem uma série de propostas. A primeira consiste em otimizar o corte com a protease PreScission, para se conseguir remover a GST e assim poder caracterizar correctamente as proteínas. A realização de espectros de RPE das amostras oxidadas e reduzidas com outras temperaturas, diferentes das apresentadas, bem como a realização de titulações de RPE, de forma a explorar melhor as características do centro 2 da Fuscoredoxina.

Pretende-se o crescimento das proteínas recombinante e recombinantes mutadas em meio mínimo para poderem ser realizados espectros de Mössbauer dos mutantes, garantindo o enriquecimento do meio com Fe<sup>57</sup>, esta espectroscopia em conjunto com os dados obtidos por RPE servirão para obter mais informação estrutural das proteínas mutadas.

Outra ideia interessante a longo prazo será a determinação da estrutura tridimensional das proteínas mutadas por cristalografia de raios-X, de forma a verificar que alterações as mutações causaram na estrutura proteica. Esta informação será bastante útil, pois tal como se verificou, foi essencial na descoberta dos centros que caracterizam esta proteína. Por fim, e como forma de explorar o centro 2 da Fuscoredoxina seria interessante a construção de mutantes de mutantes. Por exemplo, aproveitar o mutante RD2 e induzir substituições/delecções de resíduos de aminoácidos, à semelhança do que foi feito para os outros mutantes.

**Tabela 14** – Resultados experimentais obtidos na caracterização bioquímica das proteínas recombinante e recombinantes mutadas.

<b>Proteína</b>	<b>Massa Molecular Proteína de Fusão (kDa)</b>	<b>Concentração (µg/µl)</b>	<b>Nmol Fe/ nmol Proteína</b>
<b>RD1</b>	84	1.860	6.908
<b>RD2</b>	80	1.823	1.039
<b>SC1</b>	83	1.355	0.744
<b>AR1</b>	82	0.616	1.169
<b>AR2</b>	82	1.204	1.072



## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] – Muyzer, G.; Stams, A.J.M.; (2008) *The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria*; Microbiology, Nature Reviews; Vol. 6, 441-454
- [2] – Matias, P.M.; Pereira, I.A.C.; Soares, C.M.; Carrondo, M.A.; (2005) *Sulphate respiration from hydrogen in Desulfovibrio bacteria: a structural biology overview*; Progress in Biophysics and Molecular Biology; Vol.89, 292-329
- [3] – Microbe Wiki; *Desulfovibrio*, Retrieved July 2008 from <http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Desulfovibrio>.
- [4] – Moura, I.; Tavares, P.; Moura, J.J.G.; Ravi, N.; Huynh, B.H.; Liu, M.; & LeGall, J. (1992); *Direct Spectroscopic Evidence for the Presence of a 6Fe Cluster in an Iron-Sulfur Protein Isolated from Desulfovibrio desulfuricans (ATCC 27774)*. The Journal of Biological Chemistry, 267, 4489-4496
- [5] – Tavares, P.; Pereira, A.S.; Krebs, C.; Ravi, N.; Moura, J.J.G.; Moura, I.; & Huynh, B. H. (1998) *Spectroscopic Characterization of a Novel Tetranuclear Fe Cluster in a iron-Sulfur Protein Isolated from Desulfuvibrio desulfuricans*. Biochemistry, 37, 2830-2842
- [6] – Pereira, A. S.; Tavares, P.; Krebs, C.; Huynh, B.H.; Rusnak, F.; Moura, I.; & Moura, J.J.G. (1999) *Biochemical and Spectoscopic Characterization of Overexpressed Fuscoredoxin from Escherichia coli*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 260, 209-215.
- [7] – Johnson, M.K.; (1998) *Iron-Sulfur proteins: new roles for old clusters*. Current Opinion in Chemical Biology, 2, 173-181

- [8] – Beinert, H.; Holm, R.H.; & Münck, E.; (1997) *Iron-Sulfur Clusters: Nature's Modular Multipurpose Structures*; Science, 277, 653-659
- [9] – Kiley, P.J.; & Beinert, H.; (2003) *The role of Fe-S protein in sensing and regulation in bacteria*; Current Opinion in Microbiology, 6, 181-185
- [10] – Beinert, H.; (2000) *Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises*. Journal of Biologic Inorganic Chemistry, 5, 2-15
- [11] – Lill, R.; Mühlenhoff, U. (2005); *Iron-Sulfur-Protein biogenesis in eukaryotes*. TRENDS in Biochemical Sciences, 30, 133-141
- [12] – Lill, R.; Gerber, J.; (2002) *Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology*. Mitochondrion, 2, 71-86
- [13] – Hagen, W.R.; Pierik, A.J., & Veerger, C. (1989) *Novel Electron paramagnetic signals from a Fe/S protein containing six iron atoms*. Journal of the Chemical Society Faraday Transactions, 85, 4083-4090
- [14] – Arendsen, A.F.; Hadden, J.; Card, G.; McAlpine, A.S.; Bailey, S.; Zaitsev, V.; Duke, E.H.M.; Lindley, P.F.; Kröckel, M.; Trautwein, A.X.; Feiters, M.C.; Charnock, J.M.; Garner, C.D.; Marritt, S.J.; Thomson, A.J.; Kooter, I.M.; Johnson, M.K.; Van den Berg, W.A.M.; Van Dongen, W.M.A.M.; & Hagen, W.R.; (1998) *The "prismane protein" resolved: X-ray structure at 1.7Å and multiple spectroscopic of two novel 4Fe clusters*. Journal of Biologic Inorganic Chemistry, 3, 81-95
- [15] - Filenko, N.A.; Browning, D.F.; Cole, J.A.; (2005) *Transcriptional regulation of a hybrid cluster (prismane) protein*; Biochemical Society Transactions; Vol. 33, 195-197

- [16] – Wolfe, M.T.; Heo, J.; Garavelli, J.S.; Ludden, P.W.; (2002) *Hydroxylamine Reductase Activity of the Hybrid Cluster Protein from Escherichia coli*; Journal of Bacteriology; Vol.184, 5898-5902
- [17] - Almeida, C.C.; Romão, C.V.; Lindley, P.F.; Teixeira, M.; Saraiva, L.M.; (2006) *The role of the Hybrid Cluster Protein in oxidative stress defense*; Journal of Biologic Chemistry; Vol. 281; Issue 43; 32 445-32 450
- [18] – Cooper, S.J.; Garner, C.D.; Hagen, W.R.; Lindley, P.F.; & Bailey, S. (2000); *Hybrid-Cluster Protein (HCP) from Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough) at 1.6 Å resolution*; Biochemistry, 39, 15 044-15 054
- [19] – Harvey, L.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J.; (2000) *Molecular cell Biology* (4th ed.); Nem York: W.H. Freeman & Co.
- [20] - Vieira, A.; (2001) *Engenharia Genética: Princípios e Aplicações*, LIDEL
- [21] - Reece, R.J.;(2004) *Analysis of Genes and Genomes*; Jonh Wiley & Sons
- [22] – Amersham Biosciences (2002). *GST Gene Fusion System: Handbook*
- [23] – Duarte, R.O.; Costa, S.; Ramos, A.R.; Pereira, A.S.; Tavares, P.; Moura, I.; Moura, J.J.G.; *Mutagenesis studies on the iron sulfur centers of the D. desulfuricans ATCC 27774 Fuscoredoxin*; (2006), Eurobic8, Aveiro, Portugal
- [24] - Universidade Técnica de Lisboa, E-Escola; *mutagénesse Dirigida*, Retrieved March 2007 from [www.e-escola.pt/site/ftema.asp?tema=152&canal=5](http://www.e-escola.pt/site/ftema.asp?tema=152&canal=5)
- [25] - Costa, S.; (2006) *Produção e caracterização de mutantes da fuscoredoxina*, Instituto Politécnico de Lisboa, Escola Superior de Tecnologia da saúde de Lisboa

- [26] – Stratagene (2007). *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit: Instruction Manual*
- [27] – Faculdade de Ciências de Tecnologia: *Noções Básicas de EPR*; Lisboa: Author
- [28] – Pantana, A.C; Ramos, A.R.; Santos, J.; Carvalho, M.S.; Galhofas, S.; Projecto de QFII (2005) *Aplicação da espectroscopia de RPE a moléculas com interesse biológico. Teoria do Campo Ligandos aplicado a duas Metaloporfirinas*; FCT-UNL
- [29] – Desrosiers, M.; Schauer, D.A. (2001); Electron paramagnetic resonance (EPR) biosimetry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 184, 219-228
- [30] – Bruker BioSpin; *CW EPR Theory*; Retrieved March 2007 from [http://www. bruker-biospin.com/cwtheory.html](http://www.bruker-biospin.com/cwtheory.html)
- [31] – Isabel Moura, *Aplicações Biológicas da Espectroscopia de Mössbauer: correlação com a espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica*; Boletim de Biotecnologia, Biologia Estrutural, pp 19 - 32
- [32] – Wikipédia; *Espectroscopia de Mössbauer*, Retrieved April 2008 from [http://pt.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia\\_de\\_M%C3%B6ssbauer](http://pt.wikipedia.org/wiki/Espectroscopia_de_M%C3%B6ssbauer)
- [33] – GENOMED GmBH® (2006). *JETquick Plasmid Miniprep*.
- [34] – QUIAGEN (2001). *Bench Guide: Protocols, hints and tips for molecular biology labs*.
- [35] – Bruce, A.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002); *Molecular biology of the cell* (4th ed.); New York and London: Garland Science
- [36] – Harvey, L.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J.; (2000) *Molecular cell Biology* (4th ed.); New York: W.H. Freeman & Co.

- [37] – Laemmli; (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*; Nature, 227, 680-685
- [38] – Gonçalves, M. (2001) *Métodos Instrumentais para a análise de soluções: Análise Quantitativa* (pp. 1-95); (4ª Ed.) Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian
- [39] – Ficher, D.S.; Price, D.C.; (1964) *A simple serum iron method using the new sensitive chromogen tripyridyl-s-triazine*; Clinical Chemistry, 10, 21-31
- [40] – Sigma®. *Biocinchronic Acid Protein Assay Kit*
- [41] – Expasy. *Protein Sequence*, Retrieved, November 2007, from [www.expasy.com](http://www.expasy.com)
- [42] – GE Healthcare, *pGEX Vectors (GST Gene Fusion System)*; Retrieved April 2007 from <http://www1.gelifesciences.com/pdfs/970004M2-01.pdf>
- [43] – Universidade Técnica de Lisboa, E-Escola, *PCR – Amplificação de DNA in vitro/ Básico*; Retrieved May 2007 from <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=339>
- [44] - Universidade Técnica de Lisboa, E-Escola, *Electroforese de ácidos nucleicos – Fundamentos |Intermédio*; Retrieved May 2007 from <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=323&ordem=1&canal=5>
- [45] - Universidade Técnica de Lisboa, E-Escola; *Electroforese e imunodeteção de proteínas /Básico*; Retrieved May 2007 from <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=246&ordem=1&canal=5>
- [46] – Bioinformatics Website: Biological Basics; *SDS-PAGE*, Retrieved May 2007 from [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html)

[47] - Sambrook, J.; Russel, D. W.; (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup>), New York: Cold Spring Harbor Laboratory

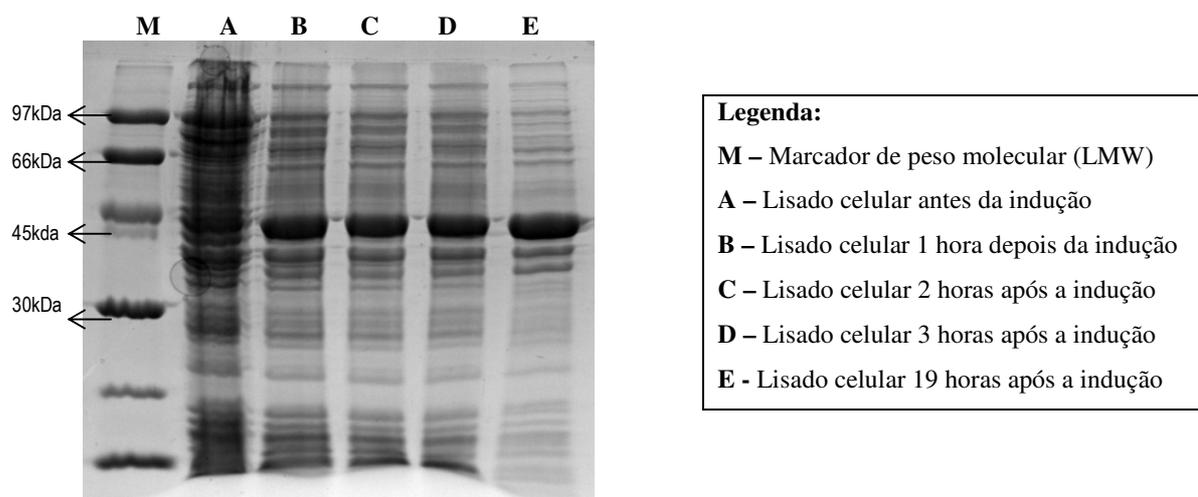
[48] – Macedo, S; Mitchell, EP; Romão, CV; Cooper, SJ; Coelho, R; Liu, MY; Xavier, AV; LeGall; J; Bailey, S; Garner, CD; Hagen, WR; Teixeira, M; Carrondo, MA; Lindley, P; *Hybrid cluster proteins (HCPs) from Desulfovibrio desulfuricans ATCC 27774 and Desulfovibrio vulgaris (Hildenborough): X-ray structures at 1.25 Å resolution using synchrotron radiation*; J. Biol. Inorg. Chem; (2002), Vol.7; 514-525

---

## APÊNDICES

## APÊNDICE A - PURIFICAÇÃO DA PROTEASE PRESSION

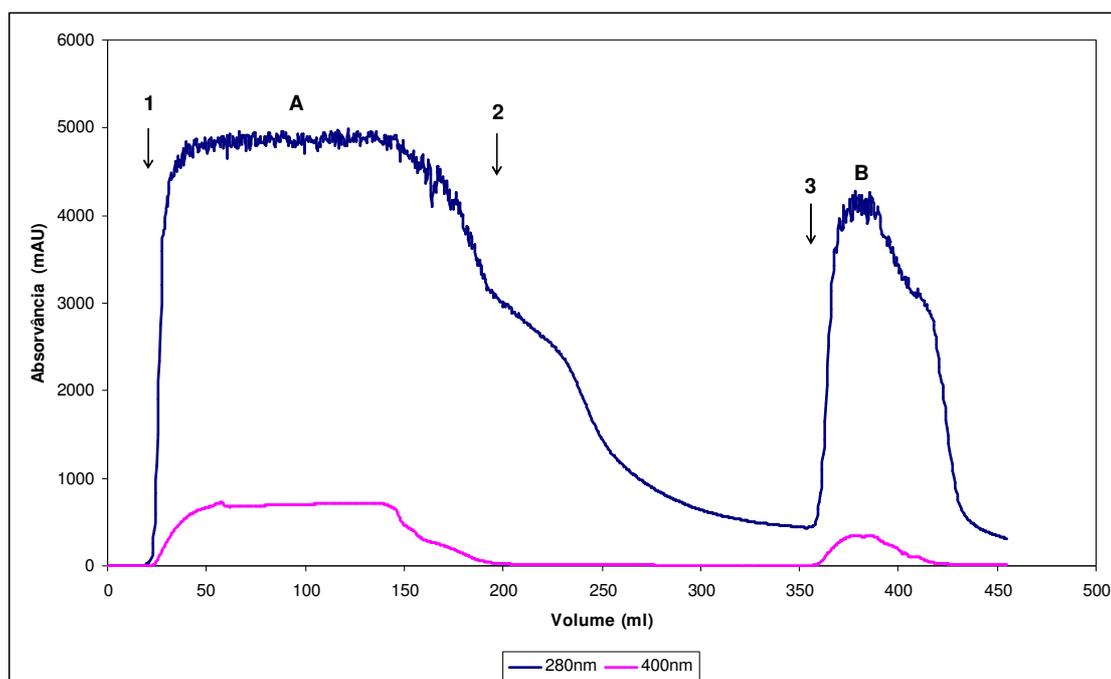
A PreScission é uma proteína de fusão que possui afinidade com a glutatona, à semelhança das proteínas purificadas para este estudo. O crescimento, indução, extração e purificação desta protease foi semelhante ao efectuado para as proteínas recombinantes. Após o crescimento e sobreexpressão da PreScission analisaram-se as amostras por SDS-PAGE (**Figura 36**), para confirmar a indução da expressão do gene de fusão que codifica a proteína recombinante PreScission juntamente com a GST. Por comparação com o marcador de peso molecular pode-se confirmar que a proteína expressa em maior quantidade é de facto a proteína de fusão apresentando uma massa molecular aproximadamente de 46 kDa.



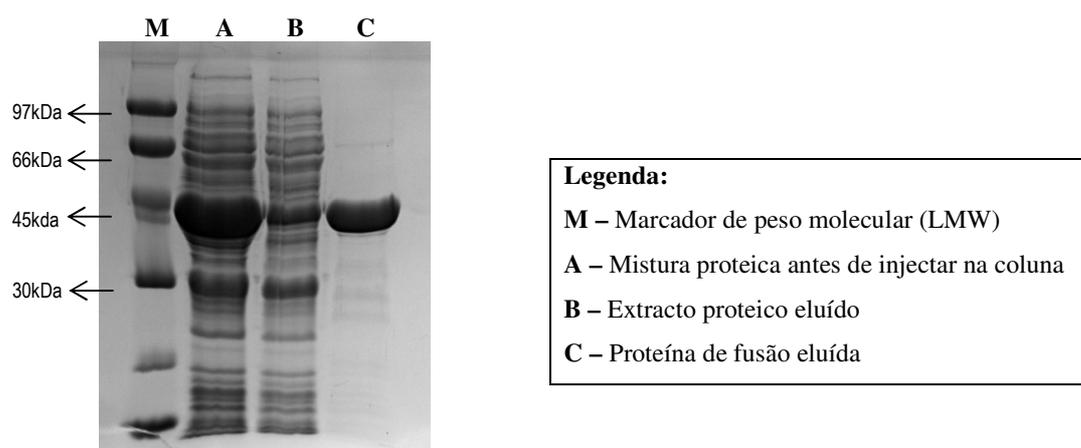
**Figura 36** – SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. Gel de verificação da indução da expressão do gene de fusão que codifica a PreScission juntamente com a GST.

O extracto proteico foi purificado no mesmo sistema de HPLC das proteínas alvo de interesse, e cuja monitorização foi feita aos mesmos comprimentos de onda (280 e 400 nm). A **Figura 37** mostra o perfil da purificação efectuada, o qual é muito semelhante ao cromatograma apresentado na **Figura 17**. As amostras obtidas foram sujeitas a análise por SDS-PAGE (**Figura 38**), que permitiu confirmar a purificação da proteína de fusão, cuja massa molecular é de aproximadamente 46 kDa. A amostra que foi eluída da coluna com o tampão com Glutaciona encontra-se sem qualquer contaminante, estando por isso pronta a ser utilizada. A proteína eluída foi depois dialisada em tampão PBS 1X para remover o excesso de Glutaciona

presente em solução e, para proceder à quantificação da proteína. A quantificação foi feita com recurso ao mesmo método de quantificação das outras proteínas de fusão - *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* – SIGMA®) <sup>(139)</sup> – e em que se obteve uma concentração de 7.4 mg/ml de PreScission.



**Figura 37** - Cromatograma obtido durante a purificação da proteína de fusão PreScission, com a Absorvância (mAU) em função do volume de eluído (ml).



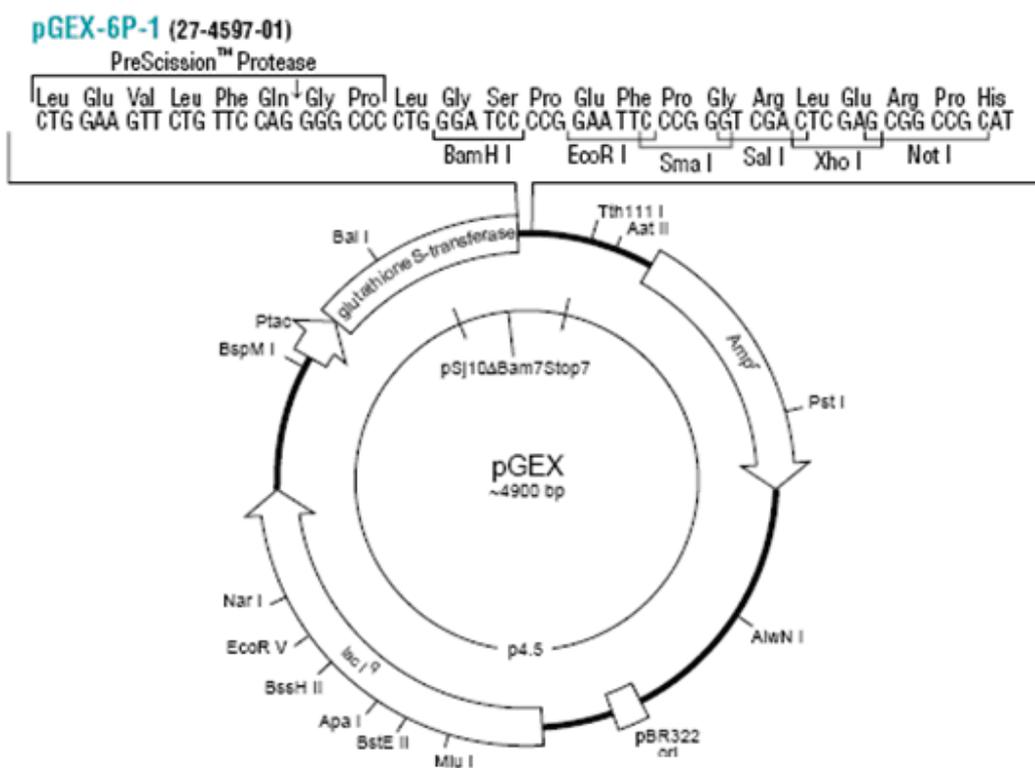
**Figura 38** - SDS-PAGE 12.5% Acrilamida, 150V, 1 hora. O gel obtido permite verificar a purificação da proteína de fusão PreScission juntamente com a GST.



---

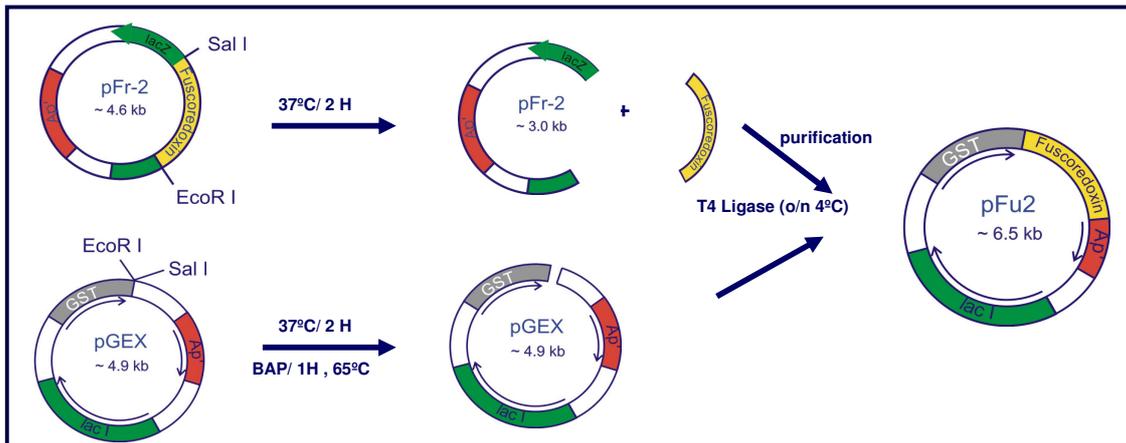
## ANEXOS

## ANEXO I – pGEX-6P-1



**Figura 39** – Esquema representativo do vetor de expressão pGEX-6P-1, no qual é possível verificar os principais constituintes do vetor, tais como, um gene de resistência à Ampicilina ( $Amp^r$ ), um gene que codifica a GST (glutathione S-transferase), locais onde cortam enzimas de restrição e um promotor passível de ser induzido para sobre expressar a proteína de fusão ( $lac I^q$ ). **Fonte:** Adaptado de [42].

## ANEXO II - CLONAGEM DO RD1



**Figura 40** – O plasmídeo recombinante RD1 (~6500 pares de bases) foi obtido a partir da inserção do gene da Fuscoredoxina de *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 no vector plasmídico de expressão pGEX-6P-1. **Fonte:** Adaptado de [23].

### ANEXO III – SEQUENCIAS DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MUTADAS SC1, RD2 E AR1

Sequência do Plasmídeo SC1 com Substituição do Resíduo de Glutamato 265 por um de Alanina

**Fusco:** H D L R D L E M L L K Q T E G T G V D V(260)  
**RD1:** -  
**SC1:** H D L R D L E M L L K Q T E G T G V D V

**Fusco:** Y T H S E M L P A H Y Y P A F K K Y A H(280)  
**RD1:** -  
**SC1:** Y T H S A M L P A H Y Y P A F K K Y A H

**Fusco:** F K G N Y G N A W W K Q K E E F E S F N(300)  
**RD1:** -  
**SC1:** F K G N Y G N A W W K Q K E E F E S F N

Sequência do plasmídeo RD2, com Deleção da Região que contém os 4 Resíduos de Aminoácido Cisteína que coordenam o Centro 1 da Fuscoredoxina

**Fusco:** M S N A M F C Y Q C Q E T V G N K G C T (20)  
**RD1:** M S N A M F C Y Q C Q E T V G N K G C T  
**RD2:** -

**Fusco:** Q V G V C G K K P E T A A L Q D A L I Y (40)  
**RD1:** Q V G V C G K K P E T A A L Q D A L I Y  
**RD2:** - - - - - - - - - S T A A L Q D A L I Y

**Fusco:** V T K G L G Q I A T R L R A E G K A V D(60)  
**RD1:** V T K G L G Q I A T R L R A E G K A V D  
**RD2:** V T K G L G Q I A T R L R A E G K A V D

Sequência do plasmídeo AR1 com Delecção do resíduo de Glutamato 488

**Fusco:**V I A L K L K E V F G L E D V N D L P I(480)

**RD1:** V I A L K L K E V F G L E D V N D L P I

**AR1:** V I A L K L K E V F G L E D V N D L P I

**Fusco:**V Y N I A W Y E Q K A V I V L L A L L S(500)

**RD1:** V Y N I A W Y E Q K A V I V L L A L L S

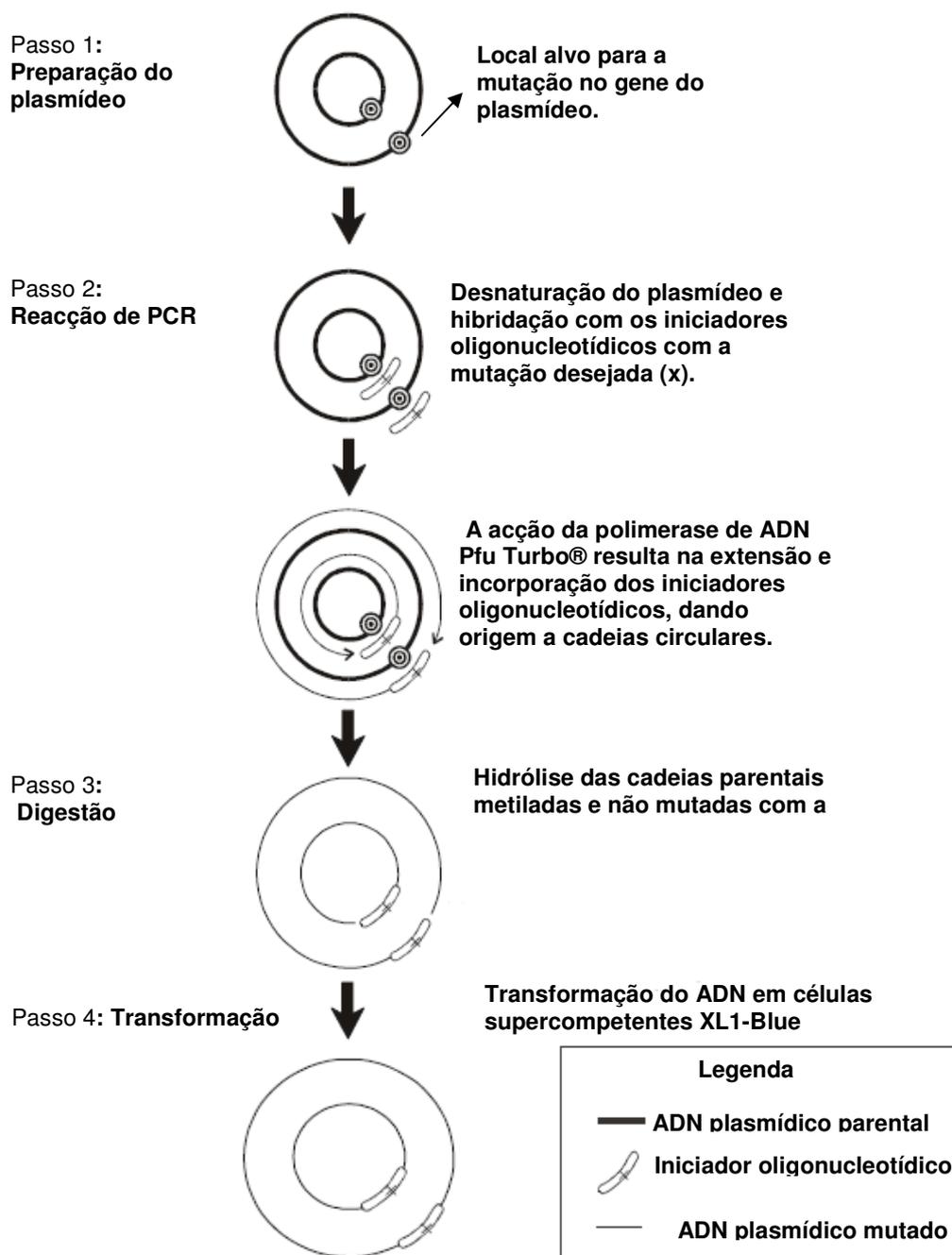
**AR1:** V Y N I A W Y - Q K A V I V L L A L L S

**Fusco:**L G V K N I H L G P T L P A F L S P N V(520)

**RD1:** L G V K N I H L G P T L P A F L S P N V

**AR1:** L G V K N I H L G P T L P A F L S P N V

## ANEXO IV –MUTAGÉNESE DIRIGIDA



Fonte: Adaptado de [26].

## **ANEXO V - PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. COLI***

1. Preparar um pré-inóculo de véspera em meio LB com uma colónia de células competentes de *E. coli* (DH5  $\alpha$  da Invitrogen® e BL21 da Novagen®). Deixar a incubar a 37°C e com agitação contínua de 230rpm durante a noite.
2. Transferir cerca de 500 $\mu$ l do pré-inóculo para um erlenmayer com 50ml de meio LB. Deixar incubar a cultura durante 3h a 37°C e com agitação contínua de 230-250rpm. Controlar o crescimento através da monitorização da densidade óptica, a um comprimento de onda de 600 nm, até se registar um valor de  $\approx 0.3$ .
3. Transferir as culturas bacterianas para tubos de centrífuga estéreis, previamente arrefecidos em gelo e, deixar as culturas arrefecerem em gelo durante 10 minutos.
4. Centrifugar as culturas para a obtenção das células a 1935 g, a 4°C durante 8 minutos.
5. Decantar o sobrenadante e deixar os tubos por alguns momentos invertidos sobre papel absorvente para eliminar eventuais vestígios de meio de cultura.
6. Ressuspender as células suavemente no gelo, numa solução de 30ml de MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> (80mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM CaCl<sub>2</sub>), previamente arrefecida.
7. Centrifugar a solução para a obtenção das células a 1935 g, a 4°C durante 8 minutos.
8. Decantar o sobrenadante e certificar-se que não ficam restos de sobrenadante.
9. Ressuspender as células no gelo, com muito cuidado, em 1.5ml de MgCl<sub>2</sub> 0.1M + 225 $\mu$ l de glicerol.
10. Aliquotar as células em volumes de 50 $\mu$ l (BL21) ou 100 $\mu$ l (DH5  $\alpha$ ). A partir deste ponto as células estão prontas a serem utilizadas para transformação, ou então podem ser guardadas a -80°C.

NOTA: É muito importante que todo o manuseamento das células seja feito em condições perfeitas de assepsia para não ocorrer contaminações indesejáveis.

**Fonte:** Adaptado de [47].

## **ANEXO VI - PROTOCOLO DE TRANSFORMAÇÃO CÉLULAS COMPETENTES**

- 1.** A uma alíquota de células competentes adicionar uma quantidade suficiente de ADN (não mais que 50 ng em 10 µl ou menos). Misturar e deixar incubar durante 30 minutos no gelo.
- 2.** Aquecer as reacções a 42 °C durante exactamente 90 segundos. Não agitar os tubos
- 3.** Transferir rapidamente as reacções para o gelo para arrefecer, durante 2 minutos.
- 4.** Adicionar 800 µl de meio LB pré-aquecido a 42 °C. Deixar incubar as reacções durante 45 minutos a 37 °C com agitação contínua 225 rpm.
- 5.** Plaquear volumes apropriados das reacções em meio sólido de LB-Agar com o antibiótico. Deixar o liquido absorver e incubar as placas durante 16-18 h a 37 °C.

**Fonte:** Adaptado de [47].

## **ANEXO VII – PROTOCOLO DA MINIPREP DO KIT DA JETQUICK (GENOMED GMBH®)**

1. As células de *E. coli* são obtidas a partir de centrifugação a partir de um meio de cultura bacteriano. Remover todo e qualquer vestígio de sobrenadante dos tubos.
2. Adicionar 250 µl de solução **G1** para ressuspender as células (com o vortex ou com a pipeta) até obter uma solução homogénea.
3. Adicionar 250 µl de solução **G2** e misturar suavemente invertendo várias vezes o tubo. Não utilizar o vortex! Incubar à temperatura ambiente durante 5 min.
4. Adicionar 350 µl de solução **G3** e misturar suavemente, invertendo o tubo várias vezes até se obter uma solução homogénea. Não utilizar o vortex. Centrifugar a mistura à velocidade máxima, à temperatura ambiente, durante 10 min.
5. Colocar uma coluna JETQUICK num tubo de recolha de 2 ml. Carregar a coluna com o sobrenadante do passo 4. Centrifugar a >10 625 g durante 1 min.
6. Esvaziar o tubo colector e recolocar a coluna JETQUICK. Adicionar 500 µl da solução **G4** e centrifugar a > 10 625 g durante 1min. Descartar o líquido do tubo colector e recolocar a coluna. Voltar a centrifugar à velocidade máxima durante 1 min.
7. Colocar a coluna JETQUICK num tubo de 1.5 ml e adicionar 75 µl de água destilada estéril no centro da sílica da coluna. Centrifugar a >10 625 g durante 2 min.

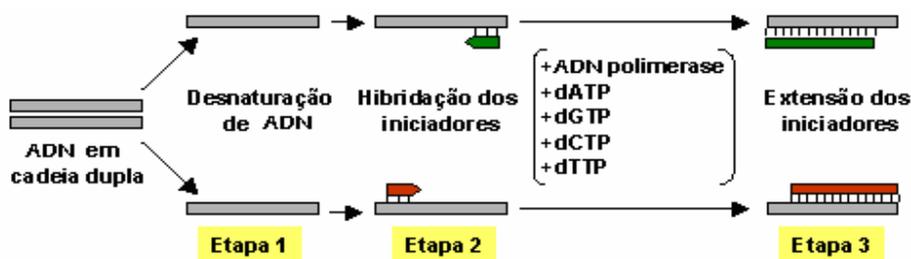
**Fonte:** Adaptado de [33].

**ANEXO VIII – SEQUÊNCIA/ESTRUTURA PRIMÁRIA DA FUSCOREDOXINA**

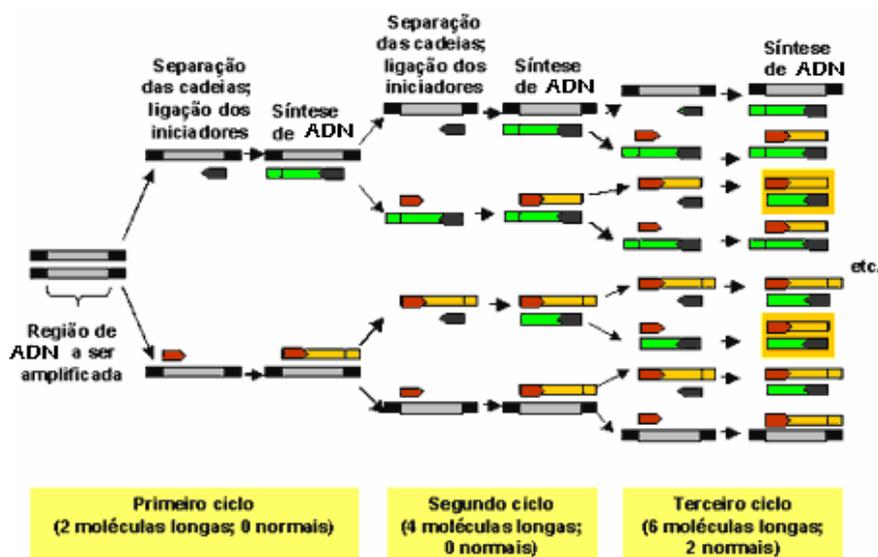
atgagtaatgccatggttctgctaccagtgccaggaaaccgtgggtaacaaaggctgcacc  
M S N A M F C Y Q C Q E T V G N K G C T  
caggtaggcgtgtgcggaacaaagcctgaaacagccgcccttcaggacgcgctgatctat  
Q V G V C G K K P E T A A L Q D A L I Y  
gtgaccaagggcctcggccagatcgccacgcgcctgcgcgccgaaggcaaggccgttgac  
V T K G L G Q I A T R L R A E G K A V D  
cacaggatagaccgctggttaccggcaacctgtttgccaccatcaccaatgccaacttt  
H R I D R L V T G N L F A T I T N A N F  
gacgacgacatccttgccgagcgtgtgcgcatgacctgtgccgcaaaaaggaactggcc  
D D D I L A E R V R M T C A A K K E L A  
gcgtcccttaccgacaagagcggcctcagcgatgcagccttgtgggaagcatccgaaaag  
A S L T D K S G L S D A A L W E A S E K  
tccgccatgctggccaaggccggaaccgtaggcgttatggccaccaccgatgatgatgtg  
S A M L A K A G T V G V M A T T D D D V  
cgctccctgcgctggctcatcacctttgggctcaaggcatggcgccctacgccaacat  
R S L R W L I T F G L K G M A A Y A K H  
gcggatgtgcttggcaagcatgaaaacagccttgacgccttcatgcaggaagcccttgcc  
A D V L G K H E N S L D A F M Q E A L A  
aaaaccctggatgacagcctgagcgtggccgaccttgtggccctgacccttgaaacgggc  
K T L D D S L S V A D L V A L T L E T G  
aagttcggcgtatcggccatggccctgctggatgctgccaataccggtacctacggccac  
K F G V S A M A L L D A A N T G T Y G H  
ccagaaattaccaaggtcaacatcggcgtgggcagcaatcccggcatcctcatttccggg  
P E I T K V N I G V G S N P G I L I S G  
catgacctgcgacacctgaaatgctgctcaagcagaccgaaggcacaggcgttgacgtg  
H D L R D L E M L L K Q T E G T G V D V  
tacaccactctgaaatgctgcccgccattactaccttgccttcaagaagtacgcgcac  
Y T H S E M L P A H Y Y P A F K K Y A H  
ttcaagggcaactacggcaatgcatggtggaacagaaagaagaatttgaaagctttaac  
F K G N Y G N A W W K Q K E E F E S F N  
ggccccgtgctgctgaccaccaactgccttgtgccgccaaggacagctacaaggaccgc  
G P V L L T T N C L V P P K D S Y K D R  
gtgtacaccaccggcatcgtgggttttacgggctgcaagcatatccccggtgaaatcggc  
V Y T T G I V G F T G C K H I P G E I G  
gaacacaaggacttcagcgccatcatcgcccatgccaagacctgtcccgcgacctacggaa

E H K D F S A I I A H A K T C P A P T E  
atcgaatccggcgaaatcatcggcggcttcgcgcacaatcaggtactggccctggccgac  
I E S G E I I G G F A H N Q V L A L A D  
aaggtgattgacgcggtcaaatccggcgccatcaaaaagtctcgtggtcatggccggctgc  
K V I D A V K S G A I K K F V V M A G C  
gacggccgcgccaagtcccgcagctactacaccgactttgcccgaaggcctgcccgaagac  
D G R A K S R S Y Y T D F A E G L P K D  
acggtcaccttaccgcccgttgcgcccgaatcgcgtacaacaagctcaacctgggtgac  
T V I L T A G C A K Y R Y N K L N L G D  
atcggcggcatcccgcgctactggacgccgggcagtgcaacgactcctactccctggcc  
I G G I P R V L D A G Q C N D S Y S L A  
gtcatcgcctcaagctcaaggaagtattcggcctcgaggacgtcaacgacctgcccac  
V I A L K L K E V F G L E D V N D L P I  
gtctacaatatcgcctggtacgagcagaaggccggttatcgtgctgctggccctgctgagc  
V Y N I A W Y E Q K A V I V L L A L L S  
ctcggcgtgaagaatatccacctcggaccgacgctgcccgccttcctttcgcccacgtg  
L G V K N I H L G P T L P A F L S P N V  
gccaaggtgctggtggaacagttcaacatcggcggcatcaccagtcgcgaggacgacctc  
A K V L V E Q F N I G G I T S P Q D D L  
aaggcgttcttcggctaa  
K A F F G -

ANEXO IX - REACÇÃO DE PCR

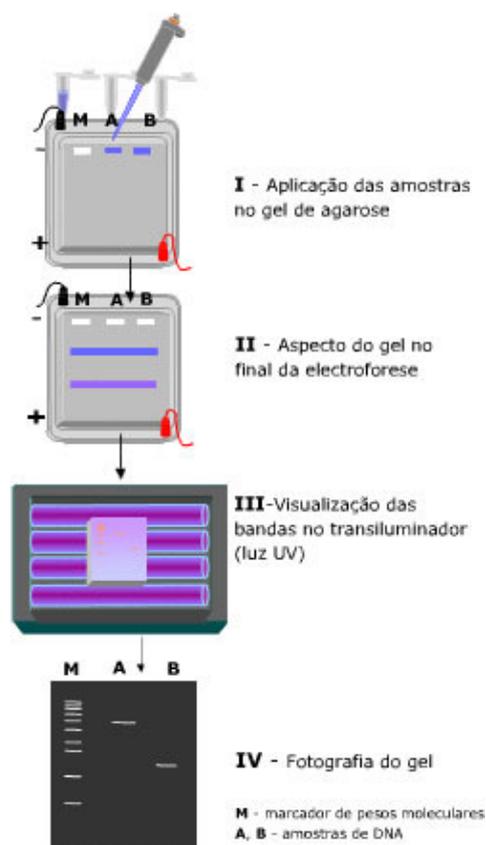


**Figura 41** – A reacção de PCR baseia-se no processo de replicação de ADN que ocorre *in vivo*. Durante uma reacção de PCR ocorrem 3 etapas fundamentais: **Etapa 1** - Desnaturação do ADN alvo pelo calor de modo a separar as duas cadeias; **Etapa 2** - Associação dos iniciadores por ligações de hidrogénio ao ADN alvo em cadeia simples; **Etapa 3** - Extensão dos iniciadores através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela ADN polimerase. **Fonte:** Adaptado de [43].



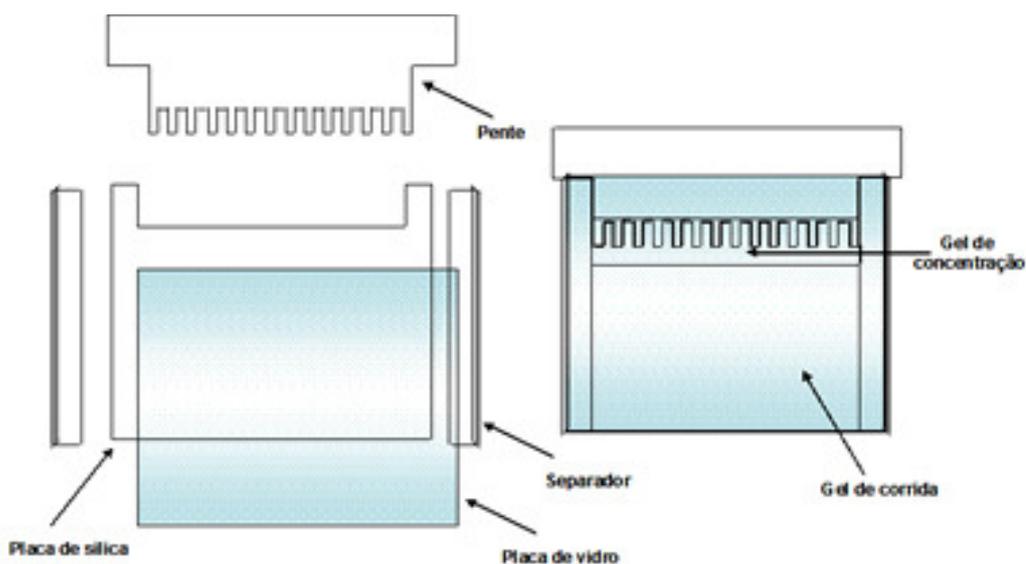
**Figura 42** – A reacção de PCR que envolve as três etapas fundamentais da **Figura 41**, pode ser repetido várias vezes (25 a 30 ciclos) sendo possível aumentar, em cada ciclo, duas vezes a concentração de ADN pré-existente. **Fonte:** Adaptado de [43].

## ANEXO X – ELECTROFORESE EM GEL DE AGAROSE

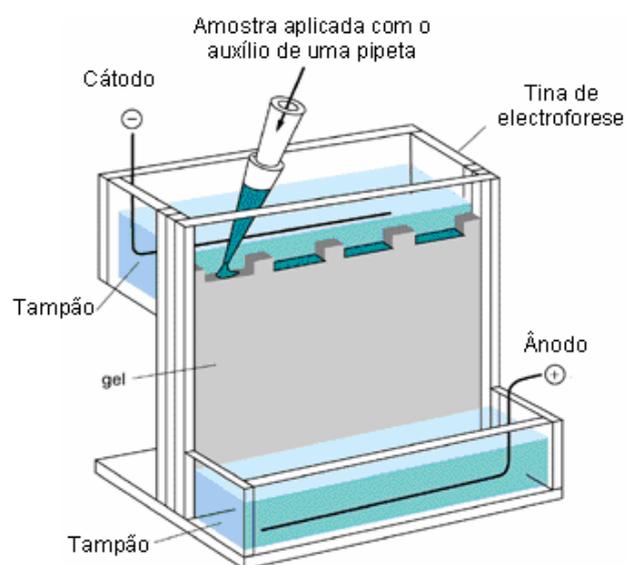


**Figura 43** – Procedimentos experimentais de uma eletroforese em gel de agarose. Após a preparação do gel, este é imerso numa tina de eletroforese com uma solução tampão que estabelece a condução eléctrica com a fonte de alimentação. Uma vez aplicadas as amostras de ADN e o padrão de pesos moleculares (M) nos poços, inicia-se a eletroforese (I). A aplicação do campo eléctrico é efectuada através de 2 eléctrodos situados paralelamente à fileira de poços. Quando a separação electroforética termina, o gel é exposto à luz ultravioleta e as bandas de ADN são visualizadas (III). As bandas são visíveis devido à presença de brometo de etídeo no gel, este corante fluorescente intercala-se com as bases da dupla cadeia de ADN e quando irradiado por luz UV emite fluorescência, permitindo a visualização do ADN no gel. **Fonte:** Adaptado de [44].

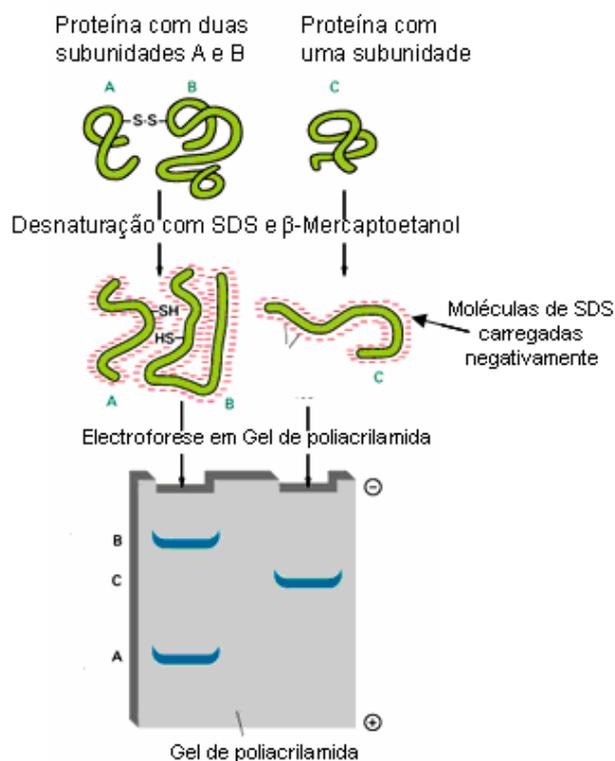
## ANEXO XI – ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA



**Figura 44** – Esquema de preparação de um gel de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida são preparados em duas fases (gel de corrida e gel de concentração) entre duas placas de vidro por polimerização de monómeros de acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) e N-metilenobisacrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}-\text{CH}_2$ ) em cadeias de poliacrilamida, formando poros numa matriz sólida. O tamanho dos poros pode ser ajustado de acordo com as necessidades, pela variação da concentração dos dois reagentes referidos. A polimerização desta solução é iniciada pelo persulfato de amónio (PSA) e catalisada pelo TEMED (N'-tetrametilenodiamina). **Fonte:** Adaptado de [45].



**Figura 45** – Esquema de uma electroforese em gel de poliacrilamida. Após a polimerização do gel, as amostras são colocadas nos poços do gel e é aplicada corrente eléctrica, que permite a migração das amostras de acordo com a sua carga e massa molecular. A velocidade de migração é influenciada pelo tamanho dos poros e pela corrente eléctrica aplicada. **Fonte:** Adaptado de [46].



**Figura 46** – Representação do que sucede a duas amostras sujeitas a SDS-PAGE. As duas amostras, uma com suas subunidades (A e B) e a outra com uma única subunidade (C), são desnaturadas formando um complexo carregado negativamente com as moléculas de SDS. As subunidades A e B são dissociadas pela acção do β-mercaptoetanol. As amostras carregadas negativamente migram para o pólo positivo por acção da corrente eléctrica; como a subunidade A é mais pequena migra mais rapidamente que as outras. **Fonte:** Adaptado de [46].