
Piezoelectric biosensors for molecular analysis in biomedical applications

*Biossensores piezoeléctricos para análise molecular em
aplicações biomédicas*

Declaração de autoria de trabalho

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

(Rogério Manuel Mendes Rodrigues)

© Copyright

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero agradecer às várias pessoas e entidades que tornaram esta tese possível:

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador Professor Guilherme Ferreira pelo apoio, orientação e paciência.

A todos os meus colegas que sempre me ajudaram e com os quais tive o prazer de trabalhar, em especial: João Encarnação, Raul Baltazar, Luís Rosa, Brigitte Tomé, David Rodrigues, Cláudia Vistas, Carina Silva, Sandra Soares e Jorge Carvalho. Obrigado pelo vosso apoio e companheirismo.

Ao Professor Peter Stallinga pela ajuda nos programas de aquisição de dados.

Ao Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural, CBME/IBB, LA.

À Fundação e Tecnologia pelo suporte financeiro, SFRH/BD/38136/2007.

(Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projeto ref^a PEst-OE/EQB/LA0023/2013).

Finalmente, mas não em último, quero agradecer às pessoas mais importantes da minha vida. À minha família, em especial aos meus pais e irmão por todo o auxílio e carinho. A ti, Luísa, um obrigado muito especial.

Resumo

A tecnologia de biossensores *label-free* trouxe grandes vantagens ao estudo de interacções biomoleculares, principalmente a biomoléculas sem actividade enzimática, que requerem métodos experimentais não directos ou complexos. Os sensores piezoeléctricos são sensores acústicos capazes de detectar eventos biológicos em tempo real e de forma selectiva.

Este trabalho apresenta algumas das potencialidades destes sensores como sensores microgravimétricos, nomeadamente na construção de imunosensores. Microbalanças de cristal de quartzo (QCM), com frequência de ressonância de 10 MHz, foram utilizadas para detectar o factor de infecciosidade viral (Vif) do HIV-1 através de um anticorpo recombinante de fragmento variável (scFv) imobilizado. A cinética de interacção foi analisada e comparada com valores obtidos com sensores de menor frequência.

As outras aplicações estudadas baseiam-se no estudo de interacções proteína-DNA através da análise de impedância em tempo real. RXR e Haa1 são factores de transcrição que regulam a expressão de genes por ligação a sequências específicas do DNA. As sequências alvo foram imobilizadas nos sensores de 10 MHz. O estudo cinético da interacção sugere que a ligação de homodímeros de RXR à sequência de DNA específica é dependente da força iónica do meio.

Por outro lado, o estudo das propriedades reológicas da interacção de Haa1 e a sua sequência específica, HRE, demonstrou que uma simples mutação por

substituição, no DNA, pode alterar as propriedades físicas do complexo, sugerindo diferenças conformacionais entre mutantes.

Este tipo de sensores piezoelétricos demonstrou ser uma ferramenta útil e versátil no estudo de interações macromoleculares, principalmente se associado a técnicas de impedância e modelação.

Palavras chave: Microbalança de Cristal de Quartzo; Imunossensor; Interações proteína–DNA; Vif; RXR; Haa1; Análise de Impedância.

Abstract

The study of biomolecular interactions experienced an improvement with label-free biosensor technology development, particularly to the biomolecules with non-enzymatic activity. The piezoelectric sensors are acoustic sensors capable of detecting biological events in a real time and selective way.

This thesis presents some of the potential of these sensors such as microgravimetric sensors, namely in immunosensors. The quartz crystal microbalance (QCM) with 10 MHz resonance frequency was used to detect HIV-1 viral infectivity factor (Vif) by a single-chain variable fragment antibody (scFv) immobilized on sensor surface. The interaction kinetics was analyzed and compared with values obtained from lower resonance frequency sensors.

Applications based on protein-DNA interactions was studied by real time impedance analysis. The protein models used were RXR and Haa1, transcription factors (TF) that regulate gene expression by binding to specific DNA sequences. The target DNA sequences were immobilized on sensor 10 MHz and the interaction with transcription factor was promoted. The results of kinetic study suggests that the binding of RXR homodimers to the specific DNA sequence is salt dependent.

On the other hand, a single base substitution mutation in specific DNA sequence of Haa1 transcription factor changed the rheological properties of the complex TF-DNA, suggesting conformational differences.

The QCM proved to be an useful and versatile tool in the study of macromo-

lecular interactions, especially if associated with impedance analysis and physical models techniques.

Keywords: Quartz Crystal Microbalance; Immunosensor; Protein–DNA Interactions; Vif; RXR; Haa1; Impedance Analysis.

Conteúdo

Resumo	iii
Abstract	v
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
Abreviaturas	xiii
1 Introdução	1
1.1 Microbalança de cristal de quartzo	1
1.1.1 QCM como sensor microgravimétrico	2
1.1.2 QCM em meio líquido	5
1.2 QCM: Modelos eléctricos e de análise	6
1.2.1 Circuito equivalente	6
1.2.2 Análise de impedância	8
1.2.3 Meio líquido	10
1.2.4 Análise do espectro da condutância	14
1.2.5 Outros dispositivos de medição	16
1.2.6 <i>Transmission line model</i>	17
1.3 Interferências experimentais na resposta da QCM	19
1.3.1 Temperatura	19
1.3.2 Efeito da força iónica	20
1.3.3 Resolução na aquisição de dados	21
2 Motivação e organização	25

3	Interação Anticorpo–Antigénio	27
3.1	Introdução	27
3.2	Material e Métodos	28
3.2.1	Reagentes	28
3.2.2	Clonagem do anticorpo anti–Vif scFv4BL	28
3.2.3	Expressão e purificação de anticorpo e antigénio	29
3.2.4	Imonossensor piezoeléctrico	30
3.3	Resultados e Discussão	33
3.3.1	Expressão e purificação de scFv4BL	33
3.3.2	Imobilização scFv4BL	34
3.3.3	Reconhecimento do antigénio	36
3.4	Conclusões	41
4	Interação RXR–DNA	42
4.1	Introdução	42
4.2	Material e Métodos	45
4.2.1	Reagentes e Materiais	45
4.2.2	Expressão e purificação de RXR α DBD	45
4.2.3	Oligonucleótidos	46
4.2.4	QCM: limpeza e funcionalização dos cristais	47
4.2.5	Caracterização da superfície	47
4.2.6	Interação proteína-DNA	48
4.2.7	Ensaio de alteração da mobilidade electroforética	49
4.2.8	QCM: aquisição de dados	49
4.3	Resultados e Discussão	50
4.3.1	Expressão e purificação de RXR α DBD	50
4.3.2	Varição de frequência correspondente a B_{min}	52
4.3.3	Activação da superfície do sensor com PEG–biotina	54
4.3.4	Imobilização de streptavidina e dsDNA biotilado	54
4.3.5	Interação RXR α DBD:DNA	56
4.3.6	Cinética de interacção RXR α DBD–DR1 e influência da força iónica	59
4.3.7	Conclusões	65

5	Interacção Haa1–DNA	66
5.1	Introdução	66
5.2	Material e métodos	67
5.2.1	Preparação do sensor e funcionalização	67
5.2.2	Medição de ângulos de contacto	68
5.2.3	Interacção Haa1–HRE	68
5.2.4	Aquisição dos parâmetros BVD e S_{11}	69
5.2.5	TLM: extracção das propriedades mecânicas	69
5.3	Resultados e discussão	70
5.3.1	Cinética de interacção	70
5.3.2	Propriedades físicas dos complexos Haa1–HRE	72
5.4	Conclusões	78
6	Conclusões gerais e perspectivas futuras	80
	Referências	90
	Anexo 1	91
	Anexo 2	99

Lista de Figuras

1.1	Esquema de QCM de 10 MHz	2
1.2	Esquema do cisalhamento e onda evanescente em meio líquido	6
1.3	Circuito equivalente BVD	7
1.4	Espectro de impedância de um sensor de 10 MHz	10
1.5	Espectros de $ Z $ e θ_Z para um cristal de 10 MHz	11
1.6	Diagrama da admitância	12
1.7	Modelo BVD modificado	12
1.8	Espectro de G e B	15
1.9	Esquema de um oscilador em série	16
1.10	Representação do modelo TLM	18
1.11	Efeito da temperatura na variação de frequência de QCM	20
1.12	Efeito da força iônica na resposta do sensor de 10 MHz	22
1.13	Gráfico paramétrico ΔR vs ΔX_L	23
1.14	Influência da aquisição de dados no diagrama da admitância	24
3.1	Esquema da imobilização do anticorpo	31
3.2	Purificação anticorpo scFv4BL	34
3.3	Imobilização do anticorpo scFv4BL	36
3.4	Especificidade do imunossensor	37
3.5	Transientes de interação scFv4BL–Vif	37
3.6	Parâmetros RLC para a interação scFv4BL–Vif	39
3.7	Dependência linear de τ^{-1} em função da concentração de Vif	40
3.8	Comparação entre imunossensor de 10 MHz e 5 MHz	41
4.1	Esquema da interação RXR α DBD com dsDNA	48
4.2	Cromatogramas e SDS–PAGE da purificação de RXR α DBD	51

4.3	Influência da viscosidade e força iónica na resposta de $\Delta f_{B_{min}}$	52
4.4	Adsorção de streptavidina monitorizada com $f_{B_{min}}$	53
4.5	Voltametria cíclica do sensor activado	55
4.6	Imobilização de dsDNA biotilado	57
4.7	Interações específica e não específica de RXR α DBD:DNA	59
4.8	Cinéticas de interacção RXR α DBD:DR1 em diferentes concentrações de NaCl	60
4.9	Transiente de dissociação de RXR α DBD e DR1	61
4.10	Interação de RXR α DBD com GST–RXR α DBD imobilizada	63
4.11	Ensaio de mobilidade electroforética para o complexo de RXR α DBD–DR1	64
5.1	Esquema do modelo de 3 camadas para um sensor QCM carregado com massa e líquido	70
5.2	Variações de frequência (Δf_s) e resistência (ΔR) da imobilização de streptavidina, dsHRE e Haa1DBD	71
5.3	Cinética de interacção Haa1DBD–HREwt	72
5.4	Parâmetros reológicos da imobilização de HREwt em função do tempo	76
5.5	Varição das propriedades físicas dos complexos Haa1DBD–HREs .	78
5.6	Ângulos de contacto para um cristal limpo e sucessivas modificações, HREwt e Haa1DBD	79

Lista de Tabelas

1.1	Propriedades típicas de um cristal de 10 MHz com corte AT	4
1.2	Valores típicos dos parâmetros RLC para uma QCM de 10 MHz . . .	14
3.1	Constantes cinéticas para a interacção scFV4BL–Vif	41
4.1	Constantes cinéticas para a interacção RXR α DBD–DNA	65
5.1	Constantes cinéticas para a interacção Haa1DBD–HRE	72
5.2	Propriedades físicas calculadas para dsHREs	74

Abreviaturas

A_s	Área superficial efectiva do eléctrodo
A_q	Área do cristal de quartzo
B	Condutância
BVD	<i>Butterworth van Dyke</i>
C_0	Capacitância em paralelo
C_{0*}	Capacitância total em paralelo
C_f	Factor de sensibilidade de Sauerbrey
C_q	Capacitância do quartzo em série
D	Factor de dissipação
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
dsDNA	DNA de cadeia dupla
DSU	Dithiobis-(succinimidil-undecanoato)
e_{26}	Constante piezoeléctrica
f_o	Frequência de oscilação na ressonância
f_a	Frequência correspondente ao ângulo de fase zero
f_p	Frequência de ressonância em paralelo
f_s	Frequência de ressonância em série
$f_{B_{min}}$	Frequência correspondente à susceptância mínima
$f_{B_{max}}$	Frequência de correspondente à susceptância máxima
$f_{G_{max}}$	Frequência correspondente à condutância máxima
$f_{G_{max}/2}$	Frequências correspondentes à meia altura do máximo da condutância
$f_{Z_{min}}$	Frequência correspondente à impedância mínima
$f_{Z_{max}}$	Frequência de correspondente à impedância máxima
G	Condutância

G^*	Módulo de cisalhamento complexo
G'	Módulo de armazenamento de energia
G''	Módulo de perda de energia
h	Espessura
h_q	Espessura do cristal de quartzo
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
Haa1	
HUT	11-hidroxi-1-undecanotiol
k_a	Constante de velocidade de associação
k_d	Constante de velocidade de dissociação
K_D	Constante de equilíbrio de dissociação
L	Indutância
PEG	Polietilenoglicol
PBS	Solução tampão de fosfato salino
Q	Factor de qualidade
QCM	Microbalança de cristal de quartzo
R	Resistência
RXR α	Receptor retinóide X alfa
S	Susceptância
SAM	<i>Self assembled monolayer</i>
scFv	Anticorpo recombinante de cadeia simples
TLM	<i>Transmission line model</i>
TSM	<i>Thickness shear mode</i>
Vif	Factor de infecciosidade viral
X	Reactância
X_L	Reactância indutiva
Y	Admitância
Z	Impedância
α	Fase complexa da onda acústica
γ	Factor de propagação da onda acústica
ε_{22}	Permissividade
η'	Viscosidade dinâmica
η_q	Viscosidade do quartzo

η_l	Viscosidade do líquido
θ	Ângulo de fase
θ_Z	Ângulo de fase da impedância
λ	Comprimento de onda
μ_q	Módulo de cisalhamento do quartzo
ν_q	Velocidade de propagação no quartzo
ρ_s	Densidade superficial
ρ_q	Densidade do quartzo
ρ_l	Densidade líquido
ω	Frequência angular

Capítulo 1

Introdução

1.1 Microbalança de cristal de quartzo

A microbalança de cristal de quartzo (*quartz crystal microbalance*, QCM) baseia-se no efeito piezoelétrico, princípio que foi descoberto em 1880 pelos irmãos Pierre e Jacques Curie. Eles verificaram que certos cristais (nomeadamente o quartzo) formavam cargas positivas e negativas na superfície quando aplicadas tensões mecânicas em diferentes direcções, segundo a sua simetria. Um ano depois Hankel propôs o nome de efeito piezoelétrico para este fenómeno [1] capaz de transformar energia mecânica em energia eléctrica através da deformação do material. A mesma expressão é usada para designar o efeito inverso, que consiste numa deformação mecânica induzida num cristal em resposta a um campo eléctrico polarizado. O efeito piezoelétrico inverso foi previsto em 1881 por Lippmann e verificado no mesmo ano pelos irmãos Curie [2]. No entanto, foram Marie Curie e o seu marido os primeiros investigadores a utilizarem o efeito piezoelétrico num sensor químico a que chamaram *quartz electric balance* [3].

A piezoelectricidade começou a ter um grande desenvolvimento décadas mais tarde. Devido ao seu comportamento piezoelétrico o quartzo pode armazenar e

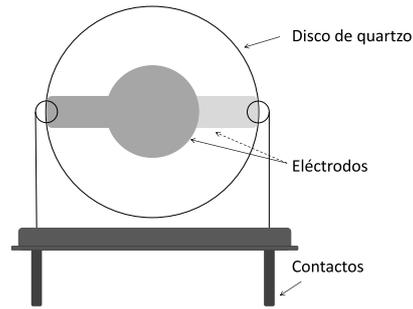


Figura 1.1: Esquema de uma microbalança de cristal de quartzo de 10 MHz. Disco de quartzo AT com dois eléctrodos metálicos depositados em ambos os lados.

devolver energia a partir de circuito eléctrico. Se a excitação eléctrica for oscilante, são geradas ondas acústicas dentro da massa do cristal e, conseqüentemente, algumas frequências de excitação dão origem a um estado ressonante, maximizando a transferência de energia. A frequência de menor valor capaz de gerar ressonância é designada frequência de ressonância fundamental enquanto que as múltiplas desta frequências são chamadas de harmónicas (*overtones*). O tipo de onda acústica produzida depende do ângulo utilizado no corte dos cristais de quartzo e a frequência de ressonância depende de outras propriedades da placa de quartzo como a geometria.

1.1.1 QCM como sensor microgravimétrico

A microbalança de cristal de quartzo, também referida como *thickness shear mode* (TSM) *resonator*, consiste tipicamente em discos de quartzo com corte AT com forma rectangular ou circular e com eléctrodos em ambos os lados (fig. ref). Os eléctrodos podem ser de vários metais, depositados sobre uma camada de metal de aderência, e podem ser polidos obtendo-se uma superfície pouco rugosa.

A aplicação de uma corrente alterna através dos eléctrodos resulta numa onda acústica transversal que se propaga através da espessura do cristal e se reflecte nas superfícies. A amplitude da deslocação de cisalhamento é paralela à superfície

do cristal e a deslocação máxima ocorre nas superfícies. Considerando que as dimensões laterais do disco de quartzo excederem largamente a espessura, h_q , a vibração de cisalhamento pode ser tratada numa única dimensão, que resulta na frequência de ressonância do cristal:

$$f_n = n \frac{\nu_q}{2h_q} \quad (1.1)$$

onde $n = 1, 3, 5, \dots$ é o número da harmónica e ν_q a velocidade de propagação da onda sem perdas através do cristal sendo função do comprimento de onda e da frequência de oscilação, $\nu_q = \lambda f$, e dependente apenas das propriedades do cristal:

$$\nu_q = \left(\frac{\mu_q}{\rho_q} \right)^{1/2} \quad (1.2)$$

ρ_q e μ_q são a densidade e o módulo de rigidez do cristal, respectivamente.

De acordo com a equação 1.1 a frequência de vibração fundamental de um material piezoeléctrico é dada por $f_o = \nu_q/2h_q$. Como resultado a frequência depende das propriedades intrínsecas do material e da dimensão que determina o estado de vibração, que neste caso é a espessura. Se as propriedades físicas do material não se alterarem podem ser consideradas constantes, assim:

$$\frac{\Delta f}{f_o} = - \frac{\Delta h_q}{h_q} \quad (1.3)$$

A variação da espessura pode ser relacionada com a variação de massa de acordo com:

$$\Delta h_q = \frac{\Delta m}{\rho_q A_s} \quad (1.4)$$

sendo A_s a área superficial. Considerando a relação entre a espessura e a frequência a equação 1.3 pode ser reescrita como:

$$\Delta f = -\frac{f_o^2}{\rho_q \nu_q} \frac{\Delta m}{A_s} = -\frac{f_o^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{A_s} = -C_f \rho_s \quad (1.5)$$

onde C_f e ρ_s representam o factor de sensibilidade e densidade superficial, respectivamente. A equação 1.5 fornece uma forma de medir a densidade superficial através da variação de frequência do cristal. Esta relação foi demonstrada por Sauerbrey em 1959 através do estudo de deposição de camadas finas sobre quartzo com corte AT [4], ficando conhecida como equação de Sauerbrey (eq. 1.5).

Tabela 1.1: Propriedades típicas de um cristal de 10 MHz com corte AT. Adaptado de [1]

Parâmetros	Valor	Descrição
ε_{22}	$3.982 \times 10^{-11} \text{ A}^2 \text{ s}^4 \text{ Kg}^{-1} \text{ m}^{-3}$	permitividade
η_q	$9.27 \times 10^{-3} \text{ Pa s}$	viscosidade efectiva
μ_q	$2.947 \times 10^{10} \text{ N m}^{-2}$	módulo de cisalhamento
e_{26}	$9.657 \times 10^{-2} \text{ A s m}^{-2}$	constante piezoeléctrica
ρ_q	$2651 \times 10^{-3} \text{ Kg m}^{-3}$	densidade
A_s	$2.047 \times 10^{-5} \text{ m}^2$	área eléctrodo
h_q	$166.18 \times 10^{-6} \text{ m}$	espessura

Sensibilidade

Considerando um cristal de 10 MHz e as propriedades para um cristal de quartzo AT (tab. 1.1) a máxima sensibilidade poderá ser obtida pela expressão:

$$\Delta\rho_s = \frac{\sqrt{\rho_q\mu_q}}{2f_o^2}\Delta f \quad (1.6)$$

Assim, para um sensor com resolução de 1 Hz a menor massa detectada será de $\approx 4 \text{ ng/cm}^2$. Esta sensibilidade é milhares de vezes superior a uma balança convencional e 4 vezes superior a um cristal de 5 MHz com igual resolução.

1.1.2 QCM em meio líquido

A QCM foi utilizada inicialmente apenas para monitorizar deposições em vácuo e em meio gasoso. Em 1982 Nomura e Okuhara descobriram que a QCM era capaz de funcionar em meio líquido [5]. Três anos mais tarde Kanazawa e Gordon [6] desenvolveram o modelo que descreve a resposta da QCM em contacto com líquidos Newtonianos:

$$\Delta f = -f_o^{3/2} \sqrt{\frac{\rho_l\eta_l}{\pi\rho_q\mu_q}} \quad (1.7)$$

onde ρ_l e η_l são a densidade e a viscosidade do líquido, respectivamente. Como representado na figura 1.2 quando o líquido entra em contacto com uma das faces do cristal é gerada uma onda de cisalhamento evanescente na superfície, propagando-se para o líquido. A onda propaga-se através do líquido até uma certa distância (δ) que depende da frequência de ressonância do sensor e das propriedades do meio:

$$\delta = \sqrt{\frac{2\eta_l}{\omega\rho_l}} \quad (1.8)$$

onde $\omega = 2\pi f$ é a frequência angular.

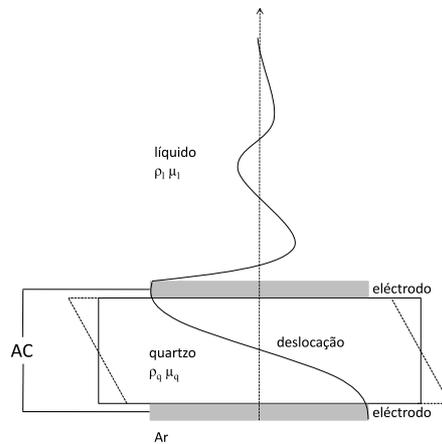


Figura 1.2: Representação da deformação de cisalhamento da microbalança de cristal de quartzo na harmônica fundamental e da dissipação da onda evanescente em meio líquido.

A equação 1.7 teve grande importância porque permitiu estender as aplicações da QCM a outras áreas como a biotecnologia, nomeadamente no desenvolvimento de biosensores para estudar interações biomoleculares em meio líquido [7].

1.2 QCM: Modelos eléctricos e de análise

1.2.1 Circuito equivalente

O sensor de quartzo quando estimulado electricamente, aceitando e devolvendo energia, pode ser considerado como um circuito puramente electrónico com componentes como resistências, indutores e capacitores. Assim, o cristal a oscilar em vácuo é equivalente a um circuito *Butterworth-Van Dyke* (BVD) constituído por dois ramos em paralelo, um conjunto de elementos em série devido ao movimento piezoeléctrico e um capacitor C_0 formado pelo material dieléctrico entre os eléctrodos [8]. Como representado na figura 1.3 a primeira parte do circuito em série pode ser decomposto em: resistência R_q (elemento dissipativo de energia), capacitância

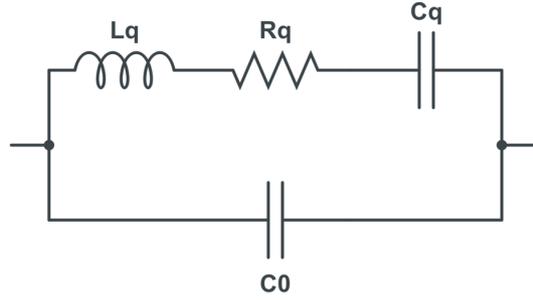


Figura 1.3: Circuito equivalente de *Butterworth-Van Dyke* que representa as características eléctricas da microbalança de cristal de quartzo perto da ressonância.

C_q (elemento de armazenamento) e uma indutância L_q (elemento de inércia).

A impedância eléctrica Z é definida como o rácio entre a voltagem V e a corrente I de oscilação. Por outras palavras a impedância é a oposição total que um circuito oferece à passagem de corrente alterna a uma determinada frequência. É representada como um número complexo cuja magnitude representa o rácio entre o pico da voltagem e o pico da intensidade, sendo θ a diferença de fase entre a voltagem e a corrente. Um vector de impedância consiste numa parte real (resistência, R) e uma parte imaginária (reactância, X):

$$Z = R + iX \quad (1.9)$$

$$\theta_Z = \tan^{-1} \left(\frac{X}{R} \right) \quad (1.10)$$

em que $i = \sqrt{-1}$.

Tendo em conta o circuito representado na figura 1.3 a impedância do ramo em série Z_m é descrita como a soma das impedâncias individuais:

$$Z_m = Z_{R_q} + Z_{L_q} + Z_{C_q} = R_q + i \left(L_q \omega - \frac{1}{C_q \omega} \right) \quad (1.11)$$

As equações que definem a relação entre as propriedades eléctricas (R_q , L_q e

C_q) e mecânicas do sistema são dadas pelas expressões [9]:

$$R_q = \frac{\pi^2 h_q \eta_q}{8e_{26}^2 A_q}; \quad L_q = \frac{h^3 \rho_q}{8e_{26}^2 A_q}; \quad C_q = \frac{8e_{26}^2 A_q}{\pi^2 h_q \mu_q} \quad (1.12)$$

A capacitância em paralelo C_0 , deriva da forma do sensor e da constante dielétrica:

$$C_0 = \frac{\varepsilon_{22} A_q}{h_q} \quad (1.13)$$

1.2.2 Análise de impedância

A impedância total do sensor de quartzo é representada pela soma do inverso das impedâncias dos dois ramos do circuito (fig. 1.3):

$$Z = \left(\frac{1}{Z_m} + \frac{1}{Z_{C_0}} \right)^{-1} = \left(\frac{1}{R_q + i \left(\omega L_q - \frac{1}{\omega C_q} \right)} + i C_0 \omega \right)^{-1} \quad (1.14)$$

A figura 1.4 mostra os espectros da magnitude e do ângulo de fase da impedância obtidos para um cristal de 10 MHz ao ar.

$$|Z| = \sqrt{Re(Z)^2 + Im(Z)^2}; \quad \theta_Z = \tan^{-1} \left(\frac{Im(Z)}{Re(Z)} \right) \quad (1.15)$$

A magnitude da impedância apresenta um mínimo e um máximo; o mínimo representa a frequência à qual a amplitude de corrente é máxima e o máximo a frequência em que a amplitude da corrente é mínima. Em relação ao ângulo de fase o seu valor é muito próximo de zero nos picos da magnitude, o que significa

que a voltagem e a corrente estão em fase.

Para o circuito equivalente (fig. 1.3) a admitância, Y , apresenta uma expressão mais simples e conveniente do que Z para derivar as frequências características na ressonância [1]. Por definição, a admitância Y é o inverso da impedância Z :

$$Y = \frac{1}{Z} = G + iB \quad (1.16)$$

onde a parte real G é designada por condutância e a parte imaginária B por susceptância:

$$G = \frac{R_q}{R_q^2 + \left(\omega L_q - \frac{1}{\omega C_q}\right)^2} \quad (1.17)$$

$$B = \frac{\left(\omega L_q - \frac{1}{\omega C_q}\right)}{R_q^2 + \left(\omega L_q - \frac{1}{\omega C_q}\right)^2} + \omega C_0 \quad (1.18)$$

A frequência de ressonância eléctrica é definida como a frequência em que a parte imaginária da impedância se anula, ou seja $\omega L_q = 1/(\omega C_q)$ [9]. Como se pode observar na figura 1.4 o cristal de quartzo apresenta duas frequências de ressonância, uma na impedância mínima designada frequência de ressonância em série f_s , e outra na impedância máxima designada frequência de ressonância em paralelo f_p . São expressas por:

$$f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{L_q C_q}}; \quad f_p = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{C_q + C_0}{L_q C_q C_0}} \quad (1.19)$$

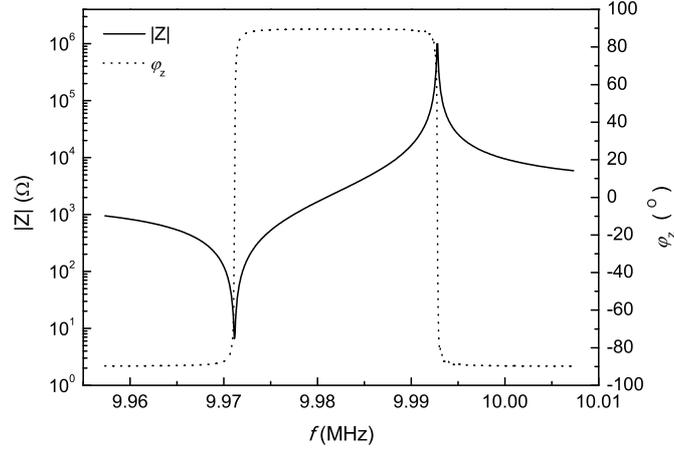


Figura 1.4: Espectro de impedância de um cristal de 10 MHz perto da frequência de ressonância com ambos os eléctrodos ao ar. Magnitude da impedância (linha contínua) e ângulo de fase da impedância (linha pontuada).

A frequência f_s representa a frequência do circuito RLC em série, sem a contribuição da capacitância em paralelo C_0 . Assim, este parâmetro corresponde à frequência de oscilação mecânica do sistema:

$$f_s = \frac{1}{2\pi\sqrt{L_q C_q}} = \frac{n}{2h_q} \sqrt{\frac{\mu_q}{\rho_q}} \quad (1.20)$$

expressão semelhante à equação 1.1.

1.2.3 Meio líquido

Quando o cristal está em vácuo ou ao ar (como é o caso da fig. 1.4) a resistência é muito baixa e f_s e f_p são uma boa aproximação ao mínimo e máximo de $|Z|$, respectivamente. No entanto quando há aumento da dissipação ($Rq \gg 0$), como no caso do cristal em meio líquido (fig. 1.5), o espectro sofre um alargamento nas regiões dos picos e ocorre a divisão em seis frequências quantificáveis $f_{Z_{min}}, f_s, f_r, f_a, f_p, f_{Z_{max}}$, onde f_r e f_a são as frequências em que o ângulo de fase

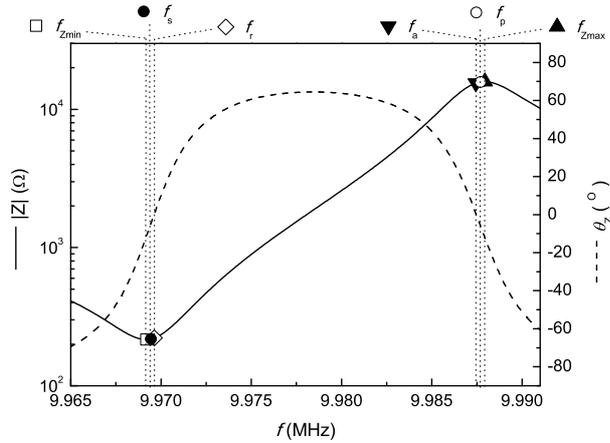


Figura 1.5: Espectros de impedância $|Z|$ e ângulo de fase da impedância θ_Z para um cristal de 10 MHz com um dos eléctrodos em meio líquido. No espectro estão assinaladas as diferentes frequências perto da ressonância: f_{Zmin} , f_s , f_r e f_a , f_p , f_{Zmax} .

é zero.

O diagrama da admitância, ou seja, a representação de B e G num plano complexo demonstra a origem e relação entre as frequências perto da ressonância (fig. 1.6).

O circuito eléctrico que descreve o sensor em meio líquido e/ou a adsorção de massa em meio líquido tem de ser modificado com novos elementos de modo a descrever as frequências perto da ressonância (fig. 1.7). O líquido causa um aumento nos elementos em série resistência e indutância, correspondendo a R_l e L_l , respectivamente. A massa contribui somente com o aumento da indutância L_m , no entanto, pode ocorrer aumento da resistência R_m caso a massa contribua para a dissipação da onda acústica [10]. Para um líquido Newtoniano $R_l = \omega L_l$, ou seja, a resistência iguala a componente indutiva da reactância, geralmente designada por X_L .

Matin et al. [9] derivaram as expressões analíticas para a admitância do circuito equivalente, resultando nas expressões para o sensor perturbado com líquido e

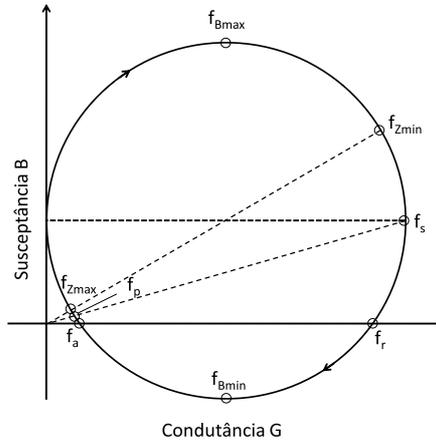


Figura 1.6: Diagrama da admitância para um cristal em meio líquido nas frequências perto da ressonância.

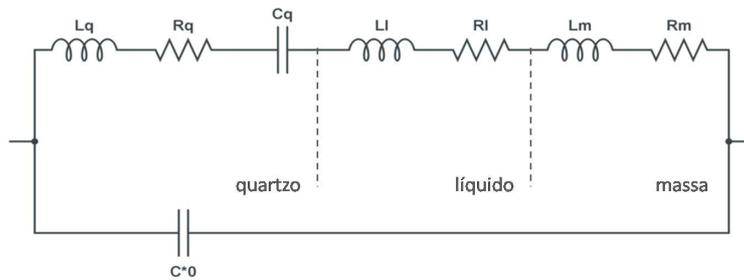


Figura 1.7: Modelo BVD modificado para contemplar a interação do sensor com líquido e adsorção de massa. R_l e L_l são os elementos associados ao líquido enquanto L_m R_m estão associados à massa. C_0^* representa a soma de C_0 com as capacitâncias parasitas associadas ao sensor perturbado. Adaptado de [8, 10].

massa:

$$L_l = \frac{\omega_0 L_q}{n\pi} \sqrt{\frac{2\rho_l \eta_l}{\omega \mu_q \rho_q}}; R_l = \frac{\omega_0 L_q}{n\pi} \sqrt{\frac{2\omega \rho_l \eta_l}{\mu_q \rho_q}}; L_m = \frac{2\omega_0 L_q \rho_s}{n\pi \sqrt{\mu_q \rho_q}} \quad (1.21)$$

onde ω_0 é a frequência angular para o sensor não perturbado.

Tendo em conta a aplicação geral dos sensores QCM como biossensores, é normal que a detecção se efectue em meio líquido. Assim, assumindo a deposição de uma fina camada de massa rígida a contribuição das propriedades do líquido e da camada adsorvida podem ser consideradas aditivas. Neste contexto pode ser aplicada a equação de Martin [9]:

$$\Delta f_s = -\frac{2f_s^2}{n\sqrt{\mu_q \rho_q}} \left[\rho_s + \sqrt{\frac{\rho_l \eta_l}{4\pi f_s}} \right] \quad (1.22)$$

$$\Delta f_s = \Delta f_m + \Delta f_l \quad (1.23)$$

que combina ambos os efeitos na variação de frequência, o efeito da massa do filme adsorvido e o efeito da massa de líquido. O primeiro termo da equação 1.22 é equivalente à expressão de Sauerbrey (eq. 1.5), enquanto o segundo termo é equivalente à expressão de Kanazawa e Gordon (eq. 1.7). Ainda segundo Martin et al. [9] a variação de frequência devido ao líquido pode ser relacionada com os parâmetros RLC segundo a expressão:

$$\frac{|\Delta f_s|}{f_0} = \frac{R_l}{2\omega_0 L_q} \quad (1.24)$$

onde o índice “0” representa o estado não perturbado.

A tabela 1.2 apresenta os parâmetros RLC típicos obtidos ao ar e em meio

líquido para uma QCM de 10 MHz.

Tabela 1.2: Valores típicos dos parâmetros do circuito equivalente para uma microbalança de cristal de quartzo de 10 MHz, ao ar e em água ultra-pura

Parâmetros	Ar †	Líquido †
R_q (Ω)	12.58	229.4
L_q (mH)	7.51	8.01
C_q (fF)	28.74	28.74
C_0 (pF)	6.57	9.95

† cristal montado na célula de fluxo e constrangido por dois *o-rings*

1.2.4 Análise do espectro da condutância

Uma alternativa à determinação da frequência em série f_s através dos parâmetros RLC é a monitorização da frequência correspondente ao máximo do espectro da condutância G , $f_{G_{max}} \approx f_s$. Esta estratégia é utilizada por vários autores [11–15] não só para determinar a frequência mas também a dissipação D , calculada a partir da metade da largura à meia altura da condutância, Γ , sendo $D = \frac{2}{f_s} \Gamma \propto R$ [11].

A figura 1.8 apresenta os espectros de G e B para um sensor de 10 MHz em meio líquido. A largura do pico a meia altura de G corresponde a duas frequências $f_{G_{max}/2}$, uma no máximo de B , $f_{B_{max}}$, e outra no mínimo, $f_{B_{min}}$. O aumento da densidade do líquido provoca um desvio de $f_{G_{max}}$ e $f_{B_{max}}$ para as baixas frequências enquanto $f_{B_{min}}$ não se altera [16]. $\Delta f_{B_{min}}$ é equivalente à correcção de Martin (eq. 1.24) [16], não sendo afectada pela viscosidade do meio:

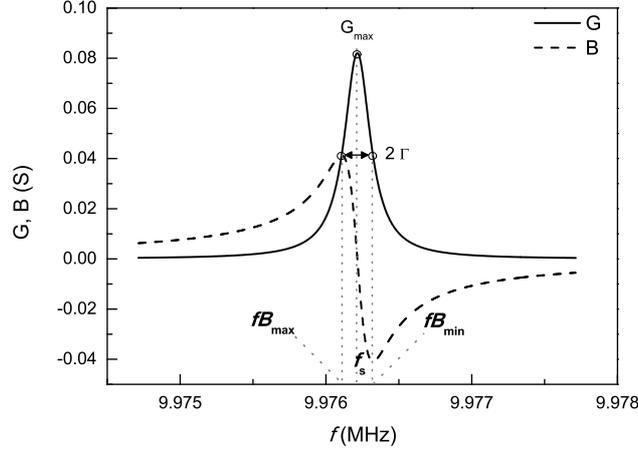


Figura 1.8: Espectro da parte real G e imaginária B da admitância Y perto da frequência de ressonância. QCM de 10 MHz em meio líquido.

$$\Delta f_{B_{min}} \approx \frac{R_l}{4\pi L_q} + \Delta f_s \quad (1.25)$$

e representa apenas a variação de massa:

$$\Delta f_{B_{min}} = \Delta f_m = -\frac{2f_s^2}{\sqrt{\rho_q \mu_q}} \frac{\Delta m}{A} \quad (1.26)$$

com variação idêntica à expressão de Sauerbrey.

Do ponto de vista prático a condutância do sensor não é afectada pela capacitância parasita em paralelo, o que segundo vários autores torna este método mais robusto e menos sujeito a alterações devido a influências externas, nomeadamente a erros de calibração [13, 17].

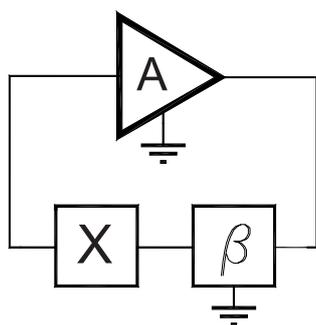


Figura 1.9: Esquema de um circuito oscilador para operação em série. Adaptado de [18].

1.2.5 Outros dispositivos de medição

Osciladores

Na análise de impedância o cristal de quartzo tem um papel passivo uma vez que é “interrogado” numa gama de frequências por um equipamento de medição externo (Network Analyser).

Por outro lado, o princípio de operação por oscilador implica uma interacção activa do cristal com os outros componentes do circuito, de modo a manter a oscilação na frequência perto de f_s ou f_p . A estrutura base de um oscilador consiste numa unidade ressonante β responsável por fixar a frequência e um amplificador A responsável pela manutenção da amplitude de oscilação (fig. 1.9).

A frequência de oscilação é medida por dispositivos externos, sendo que alguns circuitos osciladores permitem também a monitorização do ganho requerido para manter a amplitude de oscilação. Este último é possível de ser medido através de um sistema incorporado no circuito, designado *automatic gain control* (AGC), e permite uma estimativa da dissipação de energia [18], equivalente ao parâmetro R_q .

Os osciladores mais comuns utilizados em QCM operam na frequência perto do ângulo de fase zero, em que o cristal de quartzo X é conectado em série entre o amplificador e o circuito de controlo da frequência (fig. 1.9). O sistema funciona

de modo a manter a fase do ressonador perto de zero (na impedância mínima). Como discutido anteriormente a frequência de ressonância f_s não depende da capacitância em paralelo, e para valores baixos de dissipação estas frequências são muito próximas. O grande desafio dos osciladores é trabalhar em meio líquido uma vez que, dependendo do tipo de oscilador, o ângulo de fase pode sofrer desvios consideráveis [18]. Assim, um oscilador vai funcionar o mais próximo possível da frequência de ressonância f_s quanto melhor o circuito conseguir compensar a capacitância em paralelo C_0 .

As principais vantagens dos osciladores comparativamente à análise de impedância é o seu baixo custo e a sua portabilidade. Osciladores com circuitos mais avançados têm vindo a ser desenvolvidos [18], como é o caso de técnicas baseadas em *phase-locked loop* e *lock-in* f_{Gmax} . Na primeira o oscilador bloqueia a frequência da fase zero após compensação de C_0 ; na segunda o oscilador encontra e bloqueia a f_{Gmax} . Uma vez que a condutância do sensor não é afectada por C_0 , esta técnica evita a necessidade da compensação.

Apesar da sua simplicidade de uso os sistemas de osciladores ainda não conseguem competir com o maior rigor e versatilidade da análise de impedância.

1.2.6 *Transmission line model*

O modelo TLM (*transmission line model*) é um modelo mais completo e complexo que o BVD. Descreve a transformação entre a vibração eléctrica e mecânica bem como a analogia entre a propagação das ondas acústicas e eléctricas no sistema sensor/filme/meio [19]. Este modelo assume camadas uniformes sobre o sensor e não apresenta número limite de camadas. A linha de transmissão começa com um modelo de três portas para o cristal piezoeléctrico com duas portas acústicas e uma eléctrica. As portas acústicas de entrada e saída representam as duas superfícies

respectivamente; Z_2 é a impedância do meio e Z_1^c é a impedância característica da camada:

$$Z_1^c = \sqrt{\rho_1 G_1^*} \quad (1.29)$$

onde G_1^* é o módulo de cisalhamento complexo da camada.

1.3 Interferências experimentais na resposta da QCM

Para além da massa vários elementos podem influenciar a resposta da QCM. Aqui iremos considerar alguns dos elementos práticos que podem contribuir para uma resposta menos precisa do sensor.

1.3.1 Temperatura

Embora os sensores de QCM feitos de quartzo com corte AT tenham um baixo coeficiente de variação de frequência com a temperatura [] nas gamas de variação de frequência para interações biomoleculares, pequenas variações na temperatura podem influenciar a resposta ou o ruído.

Na figura 1.11 está representada a influência da variação da temperatura (20–40°C), gama geralmente utilizada em bio-reconhecimento, na resposta de um sensor de 10 MHz. Enquanto que o sensor ao ar teve uma influência da temperatura de 4.2 Hz/°C, essa influência aumentou para aproximadamente 30 Hz/°C em meio aquoso. Estas variações representam sobretudo a resposta do sensor às variações de densidade e viscosidade. Com o aumento da temperatura a densidade diminui, o que justifica o aumento da frequência. Isto demonstra a importância no controlo de temperatura e como exemplo, a variação de 1°C, durante um ensaio de reconhecimento, pode representar uma variação superior à adsorção de um determinado

analito.

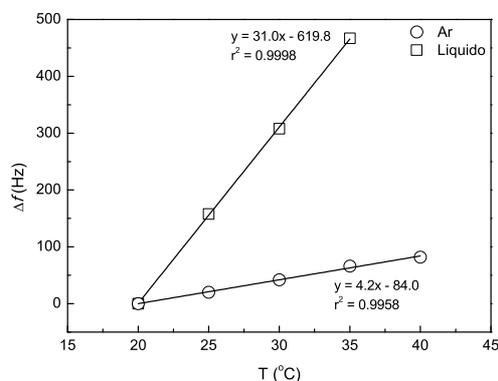


Figura 1.11: Efeito da temperatura na variação de frequência de QCM de 10 MHz, ao ar e em meio líquido. Variação de frequência monitorizada através de sistema de oscilador. Controle de temperatura obtido por sistema de módulo termoeletrico com precisão de 0.1°C.

1.3.2 Efeito da força iónica

A alteração da força iónica (I) de uma solução influencia a resposta da QCM. Os iões tendem a formar uma dupla camada difusa junto à interface do electrodo/líquido, apresentando viscosidade e elasticidade muito superiores às características da solução [20, 21].

Segundo Encarnação *et al.* [8] o aumento de electrólitos levam ao aumento da capacitância em paralelo, o que leva à modificação do modelo BVD (fig. 1.7) com $C_0^* = C_0 + C_l + C_m$, em que C_l e C_m são as capacitâncias devido às cargas eléctricas do tampão e da massa adsorvida, respectivamente.

A figura 1.12 apresenta a influência de um sal monovalente (NaCl) e um sal divalente ($MgCl_2$) na resposta de um sensor de 10 MHz. Forças iónicas superiores a 10^{-3} provocaram alterações nos parâmetros RLC, com aumento da capacitância (fig. 1.12(b)) e da parte indutiva da reactância, $X_L = \omega L$ (fig. 1.12(d)), o que provoca a diminuição de f_s (fig. 1.12(a)). Segundo a figura 1.12(c) a resistência

teve um aumento positivo para $I < 0.0075$, seguido de uma variação negativa para $0.0075 < I < 0.3$.

A formação da dupla camada difusa caracteriza-se pela dependência não linear e em forma de curva da representação paramétrica de R vs. X_L , com $R \gg X_L$ [21]. Segundo a figura 1.13(a) a dupla camada difusa atinge o máximo de rigidez a $I = 0.05$, tanto para NaCl como para $MgCl_2$. A partir de $I > 0.3$ a dependência de R com X_L passa a ser linear, com declive próximo de 1 (fig. 1.13(b)), o que é característica dos fluidos newtonianos e a variação da resposta do sensor pode ser descrita pela densidade e viscosidade da solução como descrito pela equação de Kanazawa.

1.3.3 Resolução na aquisição de dados

O diagrama ideal da admitância complexa, medida em torno da frequência de ressonância, tem uma forma circular como esquematizado na figura 1.8. Como demonstrado na figura 1.14 é importante recolher o máximo possível de pontos e ter um *span* de frequência adequado de forma a garantir uma forma circular. Para um sensor de QCM de 10 MHz ao ar um baixo número de pontos ou um *span* muito elevado (fig. 1.14(a) e 1.14(b)) traduz-se num diagrama de admitância com um formato longe de uma circunferência. Assim, um formato aceitável, sem grandes perdas de informação, foi obtido com 801 pontos (máximo permitido pelo equipamento de medição) e um *span* de 50 kHz. Em meio líquido, o diagrama reduz bastante de tamanho, o que permite o aumento do *span* para 100 kHz.

Um bom ajuste ao modelo BVD e posterior cálculo dos parâmetros RLC é alcançado se a zona de ressonância estiver bem descrita e caracterizada. Outro parâmetro que pode influenciar a resolução e o ruído dos parâmetros calculados é a *IF bandwidth* que de forma simplificada representa o tempo de leitura de cada ponto. Quanto menor a *IF* maior será a resolução mas maior será o tempo

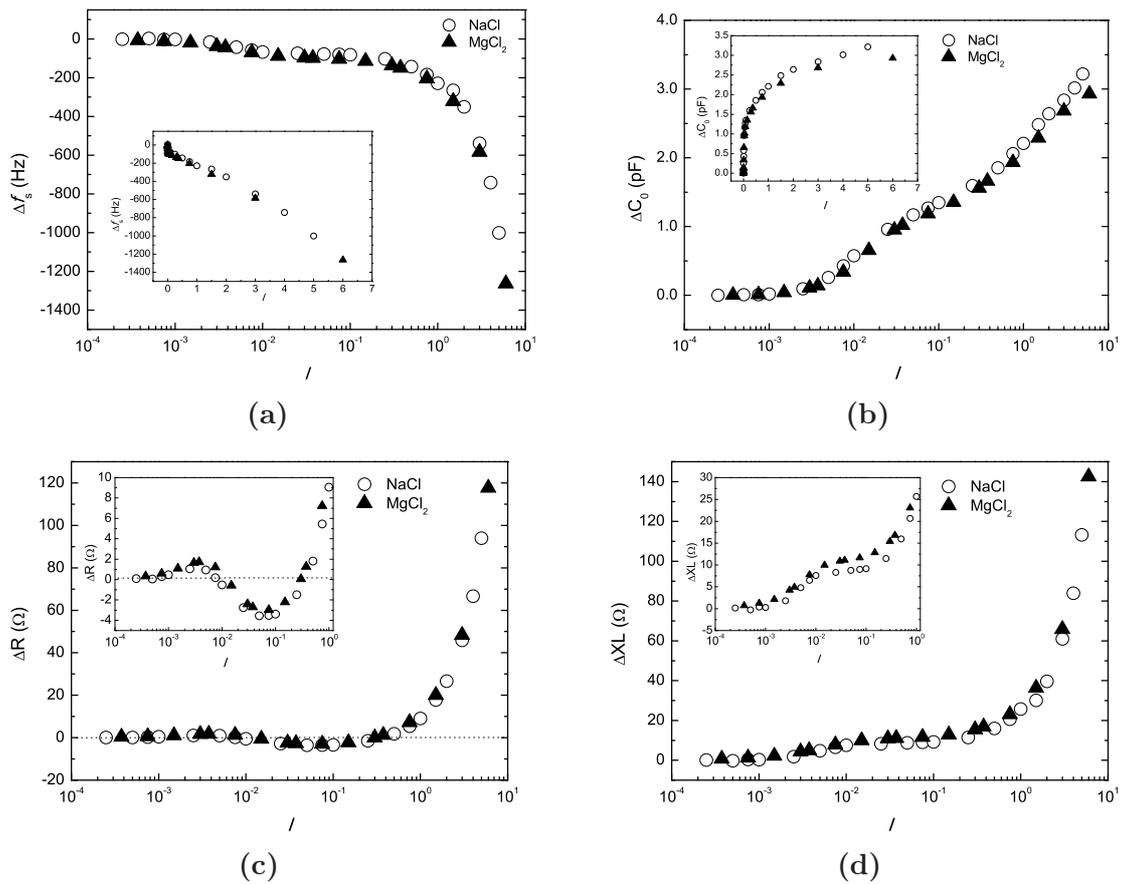
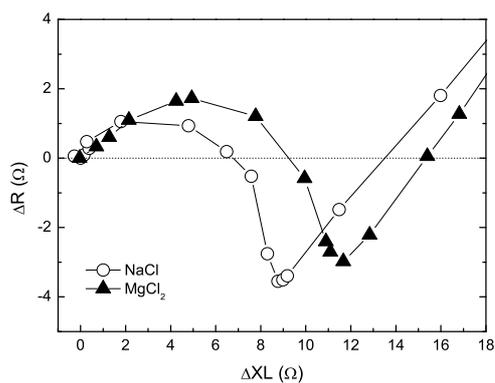
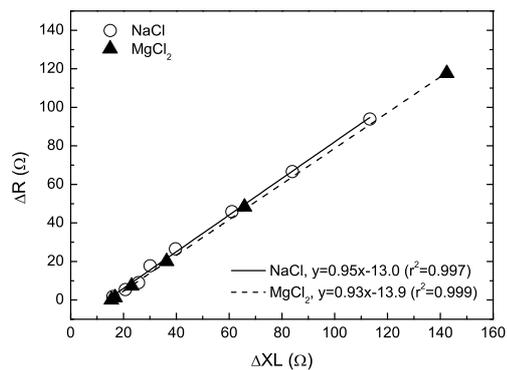


Figura 1.12: Efeito da força iônica na resposta do sensor de 10 MHz. (a) Δf_s ; (b) ΔC_0 ; (c) ΔR (d) e ΔX_L em função da força iônica para NaCl e $MgCl_2$.



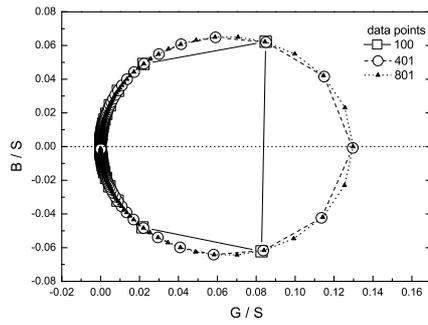
(a)



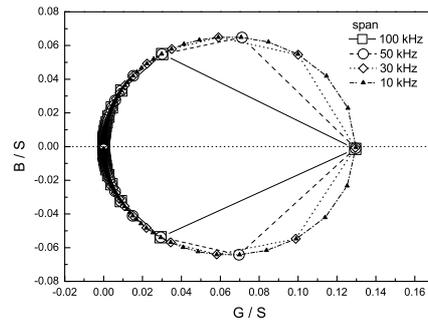
(b)

Figura 1.13: (a) Gráfico paramétrico ΔR vs ΔX_L para baixos valores de força iônica e (b) dependência linear para valores mais elevados de força iônica de NaCl e $MgCl_2$.

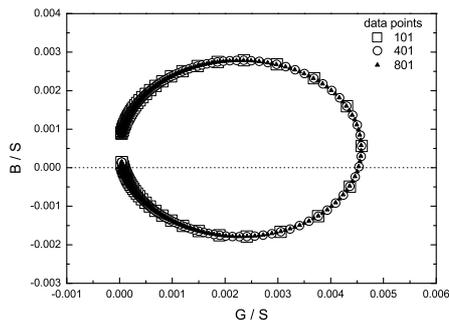
de varredura do espectro. Por outro lado, a análise de cinéticas de interação entre biomoléculas requer uma rápida aquisição de dados, sendo necessário um compromisso entre as definições de aquisição de dados.



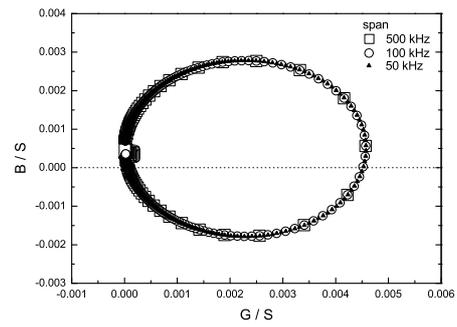
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1.14: Influência dos parâmetros de aquisição de dados no diagrama da admitância. Variação de: número de pontos ao ar (a) e em líquido (c); *span* de frequência ao ar (b) e em líquido (d). Dados obtidos com *IF Bandwidth* de 300 Hz (≈ 3.4 ms/ponto) e com *span* de 10 kHz (a); *span* de 100 kHz (c); e 801 pontos (b) e (d).

Capítulo 2

Motivação e organização

As interacções macromoleculares desempenham um papel fundamental em processos biológicos essenciais, como a divisão e transcrição do DNA, produção proteica, reconhecimento celular, resposta imune, entre muitas outras.

Com o desenvolvimento de várias metodologias baseadas em métodos de transdução de sinal muitos destes processos podem ser estudados de uma forma *label-free*. Neste contexto os sensores piezoeléctricos têm vindo a assumir um papel importante em estudos de reconhecimento e caracterização biomolecular.

Esta tese é o seguimento dos trabalhos anteriormente desenvolvidos com sensores piezoeléctricos (ver anexos), tendo como principais objectivos: *i*) aplicação de sensores mais sensíveis a imunossensores; *ii*) estudo cinético de interacções moleculares; *iii*) estabelecer sistemas de análise de impedância em tempo real de modo a analisar e corrigir sinais interferentes; *iv*) aplicação dos sensores piezoeléctricos ao estudo de interacções entre factores de transcrição–DNA; *v*) estudo dos princípios físicos envolvidos na interacção proteína–DNA através dos sensores piezoeléctricos.

Assim, nos capítulos seguintes aplicamos os princípios e modelos descritos na introdução, estando organizada:

⇒ O capítulo 3 descreve a aplicação da QCM de 10 MHz como imunossensor

na detecção e análise cinética da proteína Vif do HIV-1. Aqui a frequência de ressonância é medida e comparada com a análise de impedância e circuito equivalente;

⇒ No Capítulo 4 é analisada a interação proteína-DNA com o estudo cinético da formação do complexo RXR-DR1. É também discutida a influências da força iónica na ligação da proteína ao DNA e o papel das ligações não específicas;

⇒ No capítulo 5 é analisada a cinética de interação entre o factor de transcrição Haa1 e as sequências de DNA específica e mutadas, bem como as diferenças nas propriedades físicas das interações determinadas a partir do modelo de TLM.

⇒ As conclusões gerais e perspectivas futuras são apresentadas na última secção, Capítulo 6.

Capítulo 3

Interacção Anticorpo–Antigénio

3.1 Introdução

Vif (factor de infecciosidade viral) é uma proteína fosforilada [22] com massa molecular de 23kDa (192 aminoácidos), é codificada por um gene acessório essencial do HIV-1 e tem um papel importante na produção de viriões altamente infecciosos. A Vif encontra-se localizada maioritariamente no citoplasma das células infectadas actuando nos últimos estádios do ciclo de replicação viral, aumentando a infecciosidade das partículas virais [23]. Na ausência de Vif, os vírus têm a capacidade de iniciar a transcrição reversa, no entanto, não conseguem completar a síntese do DNA proviral e apresentam alterações na conformação do seu invólucro maduro.

Com a melhor compreensão do mecanismo da proteína Vif no ciclo de infecção do HIV-1, esta proteína tornou-se num possível alvo terapêutico [24]. Goncalves *et al.* desenvolveram um anticorpo scFv específico para a Vif (scFv 4BL anti-Vif) expresso no citoplasma. A inibição da Vif, através de expressão intracelular em células produtoras de vírus, conduziu a partículas virais incapazes de completar a transcrição reversa e conseqüentemente de se replicarem. Os resultados demonstraram que a replicação e a infecciosidade do HIV-1 foram drasticamente reduzidas,

em células não-permissivas, pela expressão do anticorpo scFv 4BL [25]. Posteriormente anticorpos intracelulares mais pequenos e robustos, contra a mesma proteína, foram construíram anticorpos recombinantes contendo apenas o domínio da cadeia pesada (VH) [26].

Com o objectivo de aplicar estes anticorpos em imunossensores capazes de detectar e analisar a interacção anticorpo-Vif foram desenvolvidos sensores piezo-eléctricos de 5 MHz capazes de analisar a ligação e detectar o antigénio mesmo em amostras complexas [10][8].

Neste trabalho aplicou-se a mesma metodologia mas com cristais mais sensíveis, 10 MHz, de modo a verificar se uma maior sensibilidade do sensor se traduz numa maior sensibilidade na determinação das constantes cinéticas entre scFv-4BL e Vif.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Reagentes

Os compostos dithiobis-(succinimidil-undecanoato) (DSU) e 11-hidroxi-1-undecanotiol (HUT) foram adquiridos à Dojindo. O isopropil-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) foi comprado à Nzytech, os *primers* de oligonucleótidos comprados à Sigma e o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) à Applichem Lifescience. Todos os restantes reagentes utilizados tinham grau de pureza analítico ou biológico.

3.2.2 Clonagem do anticorpo anti-Vif scFv4BL

O anticorpo scFV4BL foi clonado de modo a produzir uma proteína de fusão entre o anticorpo e a Glutathione-S-Transferase (GST) em N-terminal. Esta

proteína de fusão foi produzida de modo a aumentar os níveis de expressão e de solubilidade em *E. coli* anteriormente obtidos [10] bem como facilitar a purificação da mesma. O gene foi inicialmente amplificado por PCR a partir do vector pComb3X-4BL [25] com os oligonucleótidos 5' -GGAAGGATCCGAGCTCCTGCTGACCCAGA-3' e 5'-GGGGCTCGAGTCAATGGTGATGGTGATGGTG-3' como primers *forward* e *reverse*, respectivamente. O fragmento amplificado foi digerido e inserido no vector pGEX4T (GE healthcare) entre os locais de restrição BamHI/XhoI (Fermentas) formando o plasmídeo pGEX4T-4BL. O vector foi inserido em *E. coli* TOP10, através de transformação por choque térmico, para propagação e armazenamento. A clonagem foi analisada por PCR colónia e posteriormente por sequenciação para confirmar a ausência de erros introduzidos por PCR.

3.2.3 Expressão e purificação de anticorpo e antigénio

O vector pGEX4T-4BL foi purificado por *mini* ou *midi-prep* e utilizado para transformar *E. coli* BL21(DE3). As células transformadas foram seleccionadas em meio sólido de agar suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. Uma colónia seleccionada foi crescida em 200 mL de meio líquido *Terrific broth* (TB) em Erlenmeyer durante a noite, a 37°C e com agitação. O pré-inóculo foi utilizado para inocular um biorreactor de 2L (BioFlo 110, New Brunswick) contendo meio TB e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina. A temperatura inicial de crescimento foi de 37°C com fluxo de ar a 1 vvm e agitação variável entre 250–600 rpm de modo a manter um nível de oxigénio dissolvido (dO_2) de pelo menos 35 %. Durante a fase exponencial de crescimento a expressão proteica foi induzida com 1 mM de IPTG. Após indução a agitação foi reduzida para 100–400 rpm para manter o nível de (dO_2) nos 5% e a temperatura diminuída para 18°C de modo a diminuir o metabolismo celular e aumentar a solubilidade da proteína expressa. Após 24 h de cultura as células foram recuperadas por centrifugação e armazenadas a -80°C , ressuspensas em

solução tampão de lise (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA e inibidores proteases) e lisadas por sonicação. O lisado foi clarificado por centrifugação e o sobrenadante contendo a proteína solúvel foi recuperado para posterior purificação. Para a purificação foi utilizada uma coluna XK16 empacotada com 6 mL de resina Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow (GE healthcare) e pré-equilibrada com solução tampão PBS/EDTA/PMSF. A coluna foi carregada com o extracto solúvel a 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$, lavada com PBS/EDTA a 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a proteína de fusão GST-Vif eluída com glutathione reduzida (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 10 mM glutathione reduzida). As fracções proteicas foram analisadas por SDS-PAGE e quantificadas colorimetricamente pelo método de Bradford.

A proteína Vif foi expressa e purificada como anteriormente descrito [10]. Brevemente, a proteína foi expressa através do plasmídeo pD10-vif em *E. coli* TOP10F e purificada por cromatografia de metal-afinidade (IMAC) a partir de corpos de inclusão.

3.2.4 Imonossensor piezoeléctrico

Cristais de quartzo

Cristais de quartzo de 10 MHz com 1.4 cm de diâmetro foram adquiridos à *International Crystal Manufacturing* (ICM, USA). Cada cristal possui um eléctrodo com 0.2 cm^2 de ouro em ambos os lados depositados sobre titânio. Antes de cada utilização os cristais foram limpos com UV/Ozono durante 10 min seguido de 15 min de solução piranha (3:1, $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$ 30 % v/v), água Milli-Q e por fim secos com azoto.

Activação e funcionalização dos cristais

Os cristais limpos foram colocados em suportes de activação construídos em Teflon. A activação foi realizada por incubação de um dos eléctrodos de ouro de cada cristal com 100 μL de 1 mM de DSU em solução de etanol absoluto. Os cristais foram incubados durante um período máximo de 4 h, lavados com etanol absoluto e incubados por mais 1 h com uma solução etanólica de 1 mM de HUT. Após serem lavados com etanol absoluto e secos com azoto os cristais activados foram funcionalizados. O anticorpo recombinante scFV4BL foi imobilizado covalentemente à monocamada mista de DSU/HUT por incubação de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS durante 2 h. Os cristais funcionalizados foram incubados durante 1 h com 1 M de etanolamina para bloquear os grupos funcionais do DSU que não reagiram.

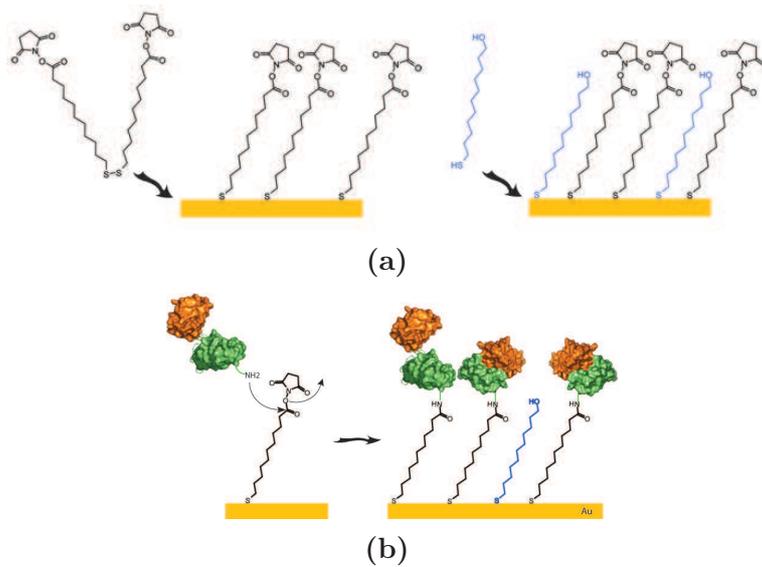


Figura 3.1: Esquema da imobilização do anticorpo. Activação da superfície do sensor com SAM mista de DSU/HUT (a). Reacção do anticorpo com os grupos funcionais succinimidil do DSU (b).

Sistema de fluxo

Os sensores foram instalados numa célula de fluxo em acrílico de 70 μL (ICM, USA) com o eléctrodo funcionalizado em contacto com o líquido. A célula de fluxo foi conectada a uma microbomba piezoelétrica (DE) e a uma célula de injeção através de tubos em Teflon formando um circuito de recirculação fechado com 1.5 mL de volume total. Diferentes concentrações de antigénio (Vif) foram injetadas no circuito através da célula de injeção e bombeadas para o imunossensor a um fluxo de 100 $\mu\text{L}/\text{min}$. A temperatura foi controlada e mantida a $25\pm 0.1^\circ\text{C}$ através de um módulo termoelétrico (Ferrotec, USA) conectado a um controlador PID (Oven industries, USA).

Medições de frequência e impedância

A medição da frequência de ressonância foi efectuada com um circuito oscilador de 10 MHz (ICM, USA) conectado a um frequencímetro UZ2400 (Digimess Instruments, UK). As características eléctricas do sensor foram analisadas por espectroscopia de impedância como anteriormente descrito [8] utilizando um Network Analyser RF HP8712C. A análise de impedância foi registada alternadamente com as leituras de frequência através de um interruptor mecânico. Os equipamentos foram conectados a um computador e utilizado um programa em PASCAL para extrair os dados experimentais. Os espectros de impedância foram obtidos com um *span* de 50 KHz e centrados na frequência de ressonância. Os dados foram interpretados com base no modelo de circuito equivalente (Butterworth—Van Dyke).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Expressão e purificação de scFv4BL

O anticorpo scFv4BL foi expresso em *E. coli* sob a forma de proteína recombinante com a GST em N-terminal. A solubilidade da proteína produzida em biorreactor aumentou com o decréscimo de temperatura após indução com IPTG, obtendo-se uma solubilidade máxima a 18°C. No entanto, mesmo a temperaturas baixas uma grande quantidade de proteína foi expressa na forma insolúvel (fig. 3.2(b)). Apesar da proteína GST ser bastante solúvel (facilmente se consegue purificar a cima de 30 mg/L) e aumentar claramente a solubilidade do anticorpo scFv4BL, este possui cisteínas que podem fazer ligações intra-moleculares que levam à insolubilidade e precipitação.

A purificação do anticorpo foi realizada a partir da fracção solúvel por cromatografia de afinidade (fig. 3.2(a)). O principio baseia-se na interacção da GST com a glutationa imobilizada na resina Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow. A fracção eluída foi analisada por SDS-PAGE (fig. 3.2(b)) revelando uma banda principal com aproximadamente 55 kDa que está de acordo com o previsto para a fusão da GST (≈ 26 kDa) com o scFv4BL (≈ 29 kDa). Uma segunda proteína com ≈ 45 kDa co-purificou com a proteína de fusão. Verificou-se que estas duas proteínas interagem fortemente, uma vez que através de vários passos cromatográficos posteriores (troca iónica, IMAC(Ni) e exclusão molecular) não se mostraram eficientes na sua separação. Através de análise por *western-blot* verificou-se que ambas as proteínas apresentam afinidade pela Vif, o que sugere que a de menor massa molecular é uma proteína incompleta devido a mal processamento durante a expressão e que provavelmente formam dímeros [25].

Com um único passo cromatográfico obteve-se um rendimento de 13 mg/L de meio de cultura com um grau de pureza $> 95\%$, muito acima do anteriormente

alcançado [8].

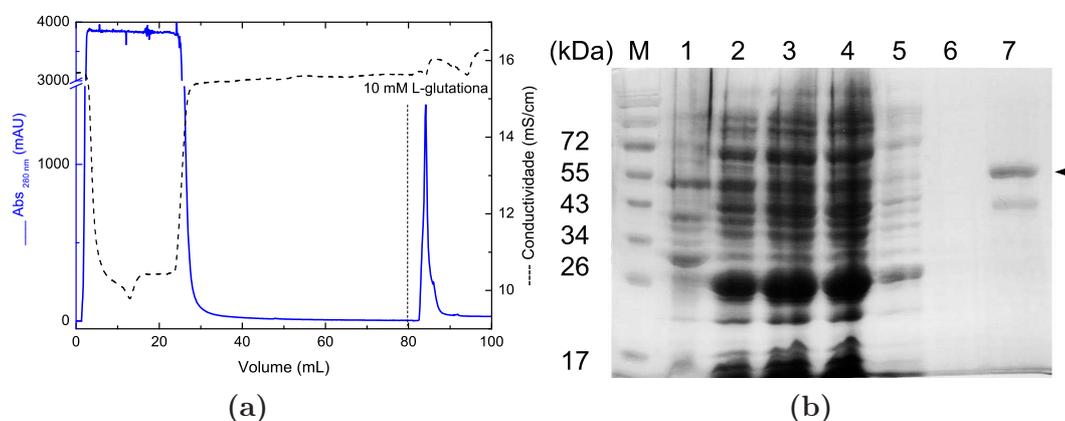


Figura 3.2: Purificação do anticorpo recombinante GST-scFv4BL. (a) Cromatografia de afinidade. (b) Análise SDS-PAGE. Fracções insolúvel, 1, solúvel ,2, *flow through*, 3 e 4, *washout*, 5 e 6, e fracção eluída, 7. Gel revelado com Comassie blue.

3.3.2 Imobilização scFv4BL

O anticorpo foi imobilizado na superfície do sensor através de ligação sobre a SAM mista de DSU e HUT (fig. 3.1). O princípio da imobilização baseia-se na reacção entre aminas das proteínas e o grupo funcional succinimidil do DSU, formando ligações amida que são bastante estáveis. De acordo com resultados anteriores [10], obtidos com técnicas de microscopia de força atómica e voltametria cíclica, a mistura de DSU e HUT forma SAMs bem compactas e orientadas, cobrindo a totalidade do ouro exposto. As moléculas de HUT ajudam na compactação da monocamada e os grupos hidroxilo aumentam o carácter hidrofílico da interface da SAM com o meio líquido, reduzindo as interações não específicas [27].

Cristais modificados com DSU/HUT foram montados na célula e a imobilização de GST-scFv4BL foi monitorizada em fluxo. Diferentes concentrações de anticorpo em PBS (0 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram recirculadas sobre os sensores activados (fig. 3.3)

e como demonstrado pela curva de saturação (fig. 3.3(a)) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo foram suficientes para saturar os grupos reactivos da SAM.

A quantidade de proteína imobilizada pode ser determinada se a relação de Sauerbrey for válida. Como referido anteriormente a frequência de ressonância é afectada por efeitos viscoelásticos tanto do meio líquido como do filme adsorvido [9]. A análise por espectroscopia de impedância permite quantificar essas interferências, sendo possível aplicar correcções à frequência de ressonância de modo a obter a massa real adsorvida. A imobilização de GST-scFv4BL levou ao aumento de resistência com dependência da concentração de anticorpo (fig. 3.3(b)). Este resultado está de acordo com o anteriormente obtido em sensores de 5 MHz [10], sugerindo que o filme proteico apresenta um carácter viscoelástico e que a frequência de ressonância foi sobrestimada. A figura 3.3(a) apresenta os valores de variação de frequência de ressonância obtidos com oscilador e os valores de frequência corrigidos (eq. 1.22) tendo em conta a variação de resistência para cada concentração (fig. 3.3(b)). A viscoelasticidade do filme influenciou a resposta do oscilador com aumentos da variação de frequência na ordem dos 20 – 30%, o que significa que para a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de anticorpo a massa real adsorvida é 30% menor. Assim, é possível estimar a massa a equação de Sauerbrey à frequência corrigida o valor de massa de anticorpo imobilizado foi de 1.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Este valor é 2.8 vezes superior ao obtido para o sensor de 5 MHz [10] no entanto anteriormente não se atingiu a saturação e a massa molecular da proteína GST-scFv4BL é superior ao anticorpo isolado.

A isotérmica de Langmuir 1:1 apresenta um bom ajuste a ambas as variações de frequência (fig. 3.3(a)) o que sugere que a adsorção do anticorpo segue

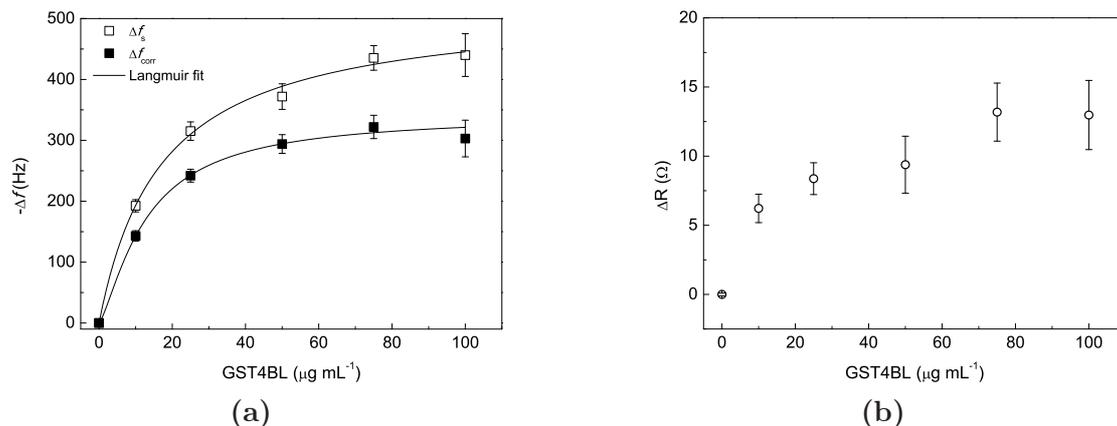


Figura 3.3: Imobilização do anticorpo. (a) Resposta do sensor às diferentes concentrações de scFv4BL. \square Variação de frequência de ressonância; \blacksquare variação de frequência corrigida tendo em conta a variação de resistência. (b) Variação de resistência em função da concentração de anticorpo.

3.3.3 Reconhecimento do antígeno

Especificidade

O sensor de 10 MHz demonstrou responder especificamente à proteína Vif em meio líquido (fig. 3.4), não havendo interação entre o anticorpo e outras proteínas como é o caso da BSA. O controlo da interação de Vif com GST imobilizada em vez do anticorpo recombinante GST–scFv4BL resultou numa interação não-específica na ordem dos 5%, ver figura.

Sensibilidade

A ligação da Vif ao anticorpo originou transientes de variação de frequência dependentes da concentração de Vif (fig. 3.5(a)). À semelhança do obtido anteriormente com o sensor de 5 MHz esta dependência teve um perfil linear para a gama de concentrações testadas (fig. 3.5(b)). Isto sugere que a saturação do sensor não foi alcançada e que seria necessário maior concentração de Vif para saturar todo o anticorpo disponível. No entanto, uma vez que a proteína Vif precipita facilmente

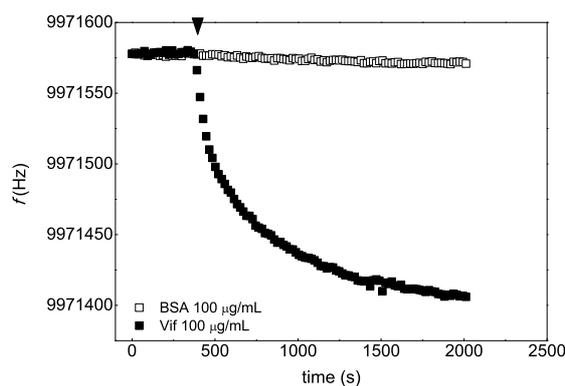


Figura 3.4: Especificidade do sensor scFv4BL imobilizado. Injeção de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA (\square) e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Vif (\blacksquare). Momento da injeção \blacktriangledown .

devido à sua estrutura aleatória [28] foi impossível obter soluções suficientemente concentradas para, após diluição, superar os 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

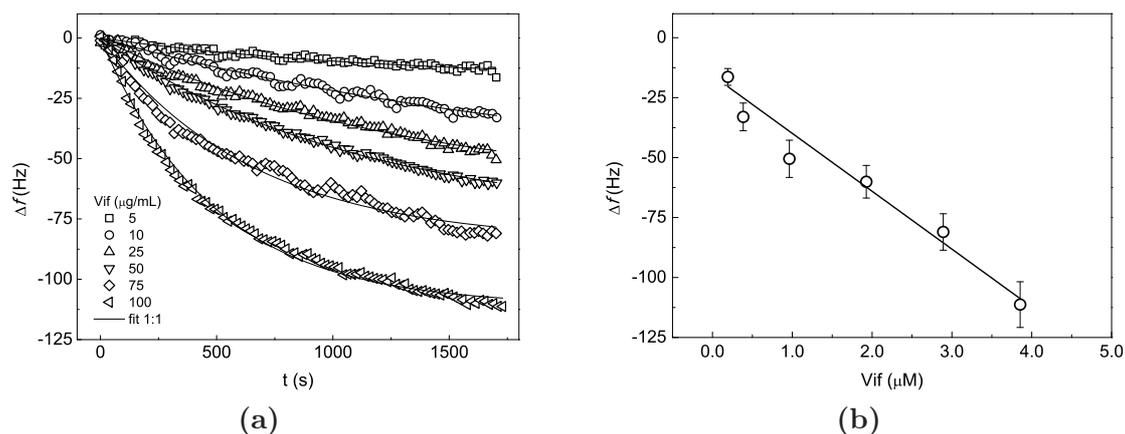


Figura 3.5: Interação scFv4BL–Vif. (a) Resposta do sensor de 10 MHz à interação de diferentes concentrações de Vif sobre o anticorpo scFv4L imobilizado. Ajuste ao modelo de interação 1:1 pelo método de mínimos quadrados com significância de $p < 0.001$. (b) Variação de frequência em função de concentração de Vif. Média e desvio padrão para $n=3$.

Afinidade de ligação

De modo a obter as constantes de afinidade entre a Vif e o scFv é necessário analisar se existem perdas de energia introduzidas no sistema oscilatório devido

deformação do filme A análise de impedância foi aplicada, como foi anteriormente à imobilização do scFv, de forma a verificar a validade da relação de Sauerbrey. Os parâmetros eléctricos do modelo BVD estão apresentados na figura 3.6. A variação positiva de ΔXL (fig. 3.6(a)) sugere que há deposição de massa de Vif na superfície do sensor e que esta deposição é dependente da concentração de Vif. Este resultado mostra uma dependência linear, o que está de acordo com o observado na variação de frequência (fig. 3.5(b)). Por outro lado, tanto ΔR (fig. 3.6(b)) como ΔC_0 (fig. 3.6(c)) não apresentaram variações significativas (ΔR e $\Delta C_0 \approx 0$) para a gama de concentrações de Vif testadas. A análise de impedância demonstrou assim que a ligação de Vif ao anticorpo não provocou alterações significativas na viscoelasticidade ou nas alterações de cargas da superfície, sugerindo a formação de um complexo com comportamento rígido.

Uma vez comprovada a validade da equação de Sauerbrey a variação de frequência pode ser correlacionada com a massa depositada e retirada informação cinética da ligação anticorpo–antigénio. O modelo de interacção de 1:1 [29] apresenta um bom ajuste aos transientes de ligação dependentes do tempo (fig. 3.5(a)). A equação 3.1 é obtida pela integração da equação de velocidade de uma reacção anticorpo–antigénio e descreve a dependência temporal da resposta do sensor:

$$\Delta f = \frac{\Delta f_{max} C}{C + k_d/k_a} [1 - e^{-(k_a C + k_d)t}] \quad (3.1)$$

$$\tau^{-1} = k_a C + k_d \quad (3.2)$$

onde Δf_{max} representa a variação de frequência para a cobertura superficial máxima,, τ o tempo de relaxação do sinal após perturbação com uma determinada

concentração de Vif em solução C , e k_a e k_d representam as constantes de velocidade das reacções directa e inversa, respectivamente. As curvas para as diferentes concentrações de Vif foram usadas para calcular τ^{-1} por ajuste não linear da equação 3.1. As constates temporais foram representadas em função da concentração, de acordo com a equação 3.2, de modo a obterem-se as constantes de velocidade (fig. 3.7). Os valores obtidos foram $k_a = (412 \pm 32)\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $k_d = (3.3 \pm 0.7) \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$. A constante de equilíbrio de associação, K_A , que é igual ao rácio k_a/k_d , foi estimada em $1.3 \times 10^6\text{M}^{-1}$.

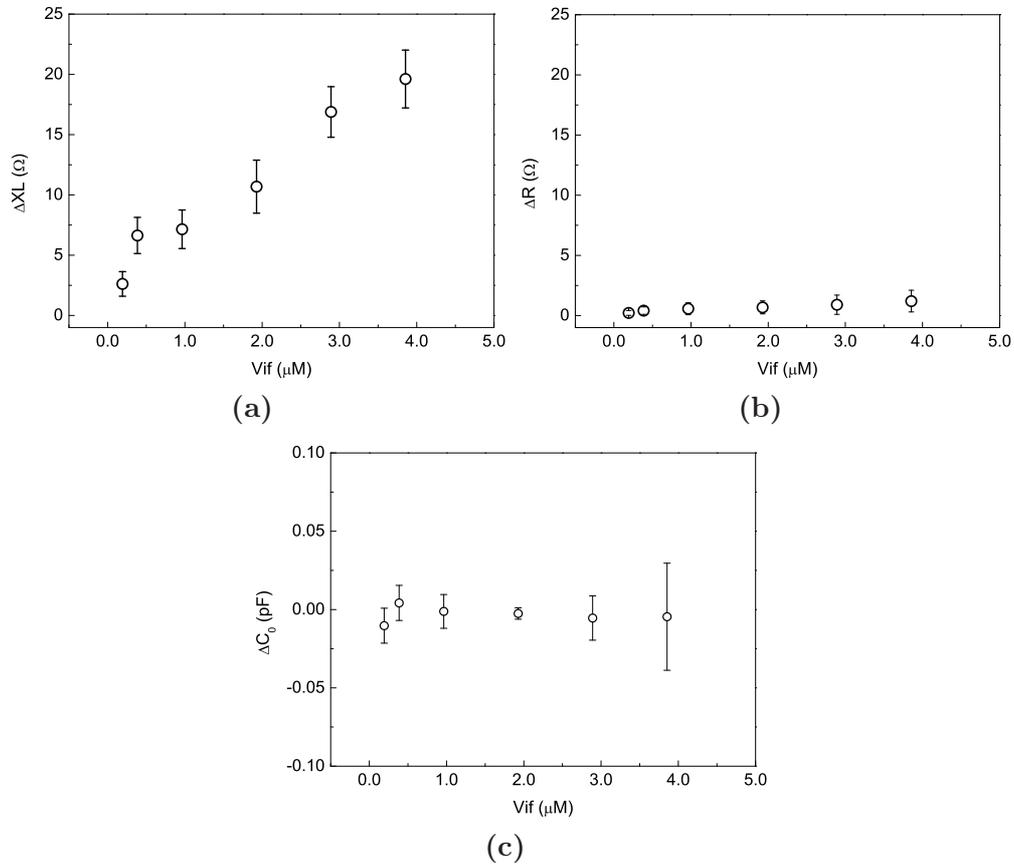


Figura 3.6: Parâmetros do modelo Butterworth van Dyke obtidos para a interacção scFV4BL–Vif através de QCM de 10 MHz. (a) ΔXL , (b) ΔR e (c) ΔC_0 . Média de $n=3$.

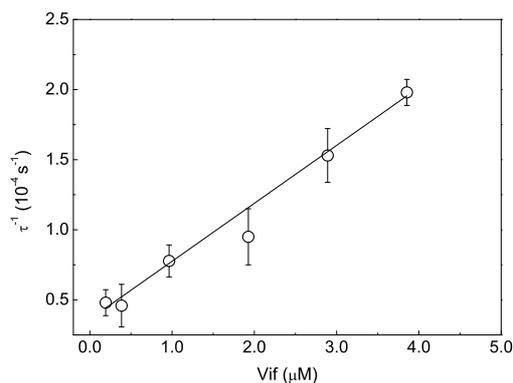


Figura 3.7: Dependência linear da constante τ^{-1} , calculada pelo modelo de interação 1:1, em função da concentração de Vif. Correlação linear: $\tau^{-1} = (412 \pm 32) \times C + (3.3 \pm 0.7) \times 10^{-4}$, $r=0.988$, $p=0.0002$.

Comparação com sensor de 5 MHz

O sinal medido pelo sensor QCM 10 MHz modificado com scFv4BL foi consideravelmente maior daquele registado a 5 MHz (fig. 3.8). A variação de frequência normalizada à quantidade de anticorpo imobilizada por unidade de área foi em média 3.5 vezes superior, considerando todas as concentrações de Vif testadas, o que sugere uma maior sensibilidade do sensor de 10 MHz. Por outro lado o limite de detecção foi estimado em ≈ 100 nM, o que representa um decréscimo de 3 vezes comparativamente ao conseguido pelo de 5 MHz [10].

Os valores das constantes cinéticas calculadas para a interação scFv4BL-Vif foram comparados com os determinados anteriormente com um sensor de 5 MHz (tab. 3.1). Embora os valores de k_a calculados pelos dois sensores sejam muito próximos, na mesma ordem de grandeza ($10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), o valor de K_D obtido com o sensor de 10 MHz foi uma ordem de grandeza inferior. Isto deve-se unicamente à estimativa de k_d , que foi $\approx 3 \times$ inferior ao estimado com 5 MHz. Esta maior estabilidade do complexo pode ser devida à natureza do anticorpo, que foi produzido em forma de proteína de fusão com a GST, ou simplesmente à maior sensibilidade do sensor de 10 MHz e maior resolução a baixas concentrações de Vif.

Tabela 3.1: Constantes cinéticas obtidas para a interacção scFV4BL–Vif com sensores de 5 e 10 MHz

Sensor	$k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d(10^{-3}\text{s}^{-1})$	$K_D(10^{-6}\text{M})$
5 MHz [†]	305 ± 47	1.1 ± 0.1	3.6 ± 0.8
10 MHz [‡]	412 ± 32	0.33 ± 0.07	0.80 ± 0.18

[†] resultados obtidos por [10]

[‡] este trabalho

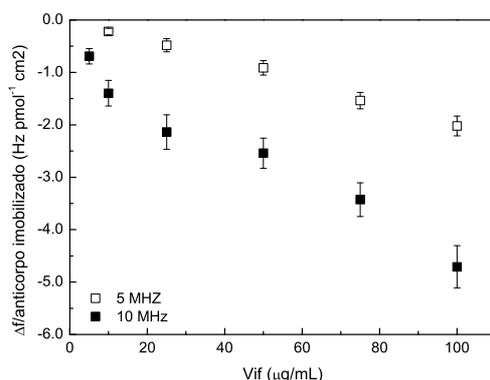


Figura 3.8: Comparação da variação de frequência do sensor de 10 MHz com o de 5 MHz [10] em função da concentração de Vif. Resposta normalizada tendo em consideração o anticorpo imobilizado (scFv4BL) e a área do sensor.

3.4 Conclusões

Neste trabalho foi construído um sensor piezoelétrico de 10 MHz para reconhecimento da proteína Vif do HIV-1. O sensor demonstrou responder bem ao antigénio, sem distorção do sinal de frequência devido a alterações de viscoelasticidade.

O aumento da frequência de ressonância (sensor de 10 MHz) utilizado no imuno-sensor aumentou a sensibilidade e diminuiu o limite de detecção, comparativamente a sensores de 5 MHz. Esta maior sensibilidade permitiu estimar o K_D uma ordem de grandeza a baixo do anteriormente calculado para a interacção scFV4BL–Vif.

Capítulo 4

Interacção RXR–DNA

4.1 Introdução

Os receptores nucleares formam uma superfamília de factores de transcrição que usam um domínio de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*) bastante conservado para reconhecerem as suas sequências alvo. O receptor retinóide X alfa (RXR α) é um membro central desta superfamília e desempenha um papel essencial na regulação das vias de sinalização de retinóides e não-esteróides [30, 31]. É composto principalmente por dois domínios, característicos dos receptores nucleares, um responsável pela interacção ao ligando e outro responsável pela interacção ao DNA. Em resposta ao seu ligando, ácido 9 cis retinóico liga-se e transactiva-se como um homodímero [32, 33]. Na ausência de ligando o RXR α também regula a transcrição formando heterodímeros com outros receptores, incluindo PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*), TR (*thyroid receptor*), VDR (*vitamin D receptor*) e RAR (*retinoic acid receptor*).

O domínio DBD do RXR reconhece o seu elemento de resposta (RE) que é composto por duas cópias da sequência AGGTCA organizada em repetição directa. Enquanto os homodímeros de RXR transactivam através um elemento de

resposta espaçado por uma única par de bases (bp) entre as duas cópias (DR1), os heterodímeros de RXR com PPAR, VDR, TR transactivam através de REs com 1, 3, 4 e 5 bp entre sequências, respectivamente [34]. A função de ligação ao DNA é composta por cerca de 70 aminoácidos, com alto grau de homologia com a superfamília de receptores, e inclui dois domínios *zinc finger*.

A regulação da transcrição é uma área importante de investigação em domínios como a bio-medicina aplicada e as ómicas em geral. Novas abordagens baseadas em bio-sensores têm sido recentemente aplicadas à caracterização das interações proteína-DNA [35]. A técnica de QCM é tradicionalmente aplicada em microgravimetria uma vez que detecta massa aderida na sua superfície. No entanto, processos biológicos mais complexos como a hibridização de DNA [36] e a interacção de proteína-DNA também podem ser monitorizados e caracterizados com sensores acústicos [37]. Porém, a aplicação de QCM em estudos cinéticos de biomoléculas em tempo real não tem sido muito utilizada. Isto deve-se ao facto das alterações nas propriedades viscoelásticas dos biofilmes adsorvidos interferirem na resposta do sensor [14].

Neste trabalho aplicaram-se correcções à frequência de ressonância de modo a diminuir os efeitos viscoelásticos resultantes da interacção proteína-DNA e obter valores cinéticos menos afectados por essa dissipação de energia.

A QCM pode desempenhar um papel importante na compreensão dos princípios biofísicos do reconhecimento molecular, uma vez que permite inferir acerca de propriedades mecânicas dos filmes biológicos [13, 38, 39]. Entre o grande número de aplicações possíveis, a compreensão das propriedades físicas dos biopolímeros, como o DNA, ancorados a uma superfície tem recebido um interesse considerável [37, 40–44]. Neste trabalho, utilizou-se a microbalança de cristal de quartzo com análise de impedância para caracterizar a interacção RXR α DBD com o seu RE DR1. As constantes cinéticas de ligação e as propriedades viscoelásticas do com-

plexo proteína–DNA foram estudadas a diferentes concentrações de sal, de modo a diferenciar entre interacções específicas e não–específicas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Reagentes e Materiais

Os cristais de quartzo de 10 MHz com eléctrodos de ouro foram comprados à ICM. Todos os oligonucleótidos utilizados foram sintetizados pela Sigma. O inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) foi adquirido à Sigma e o ditioneitol (DTT) à Nzytech. 11-mercapto-1-undecanotiol foi comprado à Dojindo e biotina-PEG-dissulfeto (PEG-biotina) à LCC Engineering.

4.2.2 Expressão e purificação de RXR α DBD

O domínio DBD do RXR α humano (130–212) foi clonado no plasmídeo de expressão pGEX4T utilizando inicialmente o vector pGEX2TK–hRXR α DBD [] como modelo para a amplificação por PCR. Foram utilizados os *primers* 5'-GGCGGGA-TCCTTCACCAAGCACATCTGCGCCATC-3' e 5'-GGAAGTTCGAGTCAGCCACGCTGC-CGCTCCTCC-3' para amplificação e inserção dos locais de restrição BamHI e XhoI, respectivamente. Células de *E. coli* BL21-pLysS foram transformadas com o plasmídeo construído (pGEX4T-RXR α). A proteína de fusão, GST–RXR α DBD, foi expressa em meio líquido LB (*Luria Broth*) num biorreactor de 2 L BioFlo 110 (New Brunswick) na presença de 100 μ g/mL de ampicilina e 34 μ g/mL de cloranfenicol. A expressão proteica foi induzida com 1 mM de IPTG e 100 μ M de ZnCl₂ a 25°C durante 6 horas. Após expressão as células foram recolhidas e lisadas por sonicação em tampão de lise (50 mM Tris, 250 mM NaCl, 10 mM DTT and 1 mM PMSF, pH 8.0). A fracção solúvel foi recolhida após centrifugação (18000 g, 1 hora, 4°C) e aplicada numa coluna de cromatografia XK–16 contendo 6 mL de resina *glutathione sepharose 4 fast flow* (GE healthcare) pré-equilibrada com PBS pH 7.4. A proteína de fusão foi clivada em coluna com 10U de trombina humana (Sigma) durante 7 horas à temperatura ambiente. Após incubação com trombina o

fragmento RXR α DBD foi simplesmente arrastado da coluna com PBS e a clivagem enzimática inibida com 0.3 mM de PMSF e estabilizado com 10 mM de DTT. A GST ligada à coluna foi posteriormente eluída com 15 mM de glutathiona reduzida em tampão 50 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 8. A trombina foi removida da solução de RXR α DBD através de uma coluna de 1 mL de *benzamidine sepharose 4 fast flow* empacotada numa coluna Tricorn (GE healthcare). Por último, foi obtido o fragmento RXR α DBD com elevado grau de pureza através de cromatografia de troca catiónica [34]. Este passo foi realizado com uma coluna pré-empacotada de 1 mL Resource S (GE healthcare) e equilibrada com tampão 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7.5. A eluição da proteína foi efectuada com gradiente linear para tampão 20 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7.5. A fracção final de RXR α DBD foi dialisada para tampão 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 50 μ M ZnCl₂, pH 7.5 e armazenada a -80°C.

4.2.3 Oligonucleótidos

Os oligonucleótidos específicos e não específicos foram sintetizados com 30-mer e modificados com uma biotina na posição 5' nas sequências sentido. As sequências complementares foram sintetizadas sem qualquer modificação. A sequência específica 5'-biotin-GGCGATAGGCAGGTCAAAGGTCACATAGAT-3' incluiu o motivo de reconhecimento DR1 (*direct repeat* com um nucleótido de intervalo) a sublinhado, enquanto que a não específica foi uma sequência aleatória sem a presença de DR1. As duas cadeias complementares foram hidridadas em tampão 10 mM Tris pH 8.0 à concentração final de 20 μ M. O processo consistiu em aquecer a solução a 95°C durante 5 minutos e arrefece-la muito lentamente até ser atingida a temperatura ambiente. Os oligos de cadeia dupla foram arrefecidos a 4°C e armazenados a -20°C até serem imobilizados no sensor.

4.2.4 QCM: limpeza e funcionalização dos cristais

Os cristais antes de serem activados foram limpos com UV/ozono (fotorreator PSDT-UVT, Novascan), 60°C, durante 10 minutos. Seguiu-se 10 minutos de lavagem com solução piranha 3:1 (3 H₂SO₄:1 H₂O₂), lavagem abundante com água ultra-pura (18 MΩ) e secagem com fluxo de azoto. Os cristais foram montados num suporte de Teflon e incubados pelo menos durante 24 horas com uma mistura de 1 mM de HUT e PEG-biotina, 9:1, em etanol absoluto. Os cristais foram lavados com etanol absoluto e água e secos com azoto. A imobilização do DNA biotinilado foi feita por intermédio de streptavidina [36, 45]. Para isso os cristais foram montados numa célula de fluxo em acrílico, com volume interno de 25 μL, e uma solução de 3 μg/mL de streptavidina recombinante (Roche) em tampão PBST (PBS com 0.005% de tween 20, pH 7.4) foi injectada a 100 μL/min durante 10 minutos. O fluxo contínuo de tampão foi feito através de duas bombas de seringa de alta precisão (Cetoni) e a injeção da proteína através de uma válvula de 10 portas (Vici). Finalmente o DNA previamente hibridado foi injectado sobre a camada de streptavidina à concentração de 0.1 μM sob as mesmas condições.

4.2.5 Caracterização da superfície

A deposição da monocamada mista de HUT e PEG-biotina foi monitorizada por voltametria cíclica de modo a otimizar o tempo de adsorção. Foi utilizado eléctrodo de ouro, um eléctrodo de referência de Ag/AgCl e um contra eléctrodo de platina. O eléctrodo de ouro foi polido com óxido de alumínio e lavado com solução piranha antes de ser incubado com a mistura de HUT/PEG-biotina. A voltametria cíclica foi realizada com um potenciostato (PalmSense) entre -0.5 e 0.8 V a uma velocidade de varrimento de 0.1 V/s. Tampão PBS com 4 mM de K₃[Fe(CN)₆] foi utilizado como electrólito e foi desgaseificado com azoto gasoso

durante 10 min antes de cada varrimento.

4.2.6 Interação proteína-DNA

A interação entre proteína-DNA foi realizada através da injeção de diferentes concentrações de RXR α DBD (0.05 a 2.0 μ M) sobre o DNA imobilizado. Para os ensaios de interação foi utilizado o tampão HEPEST (20 mM HEPES, 0.005% tween-20, pH 7.5) com diferentes concentrações de NaCl (100, 150 e 250 mM) e um fluxo constante de 100 μ L/min. As soluções de RXR α DBD foram injectadas durante 10 minutos seguidas de lavagem com tampão HEPEST durante 25 minutos, permitindo obter assim os transientes de associação e dissociação. Após cada ciclo de ligação de proteína a superfície de DNA imobilizado foi regenerada com 0.5 M de NaCl em tampão HEPEST durante 1 min. Este método dissocia a proteína da superfície e permite que o DNA fique livre para se ligar novamente ao RXR α DBD num novo ciclo.

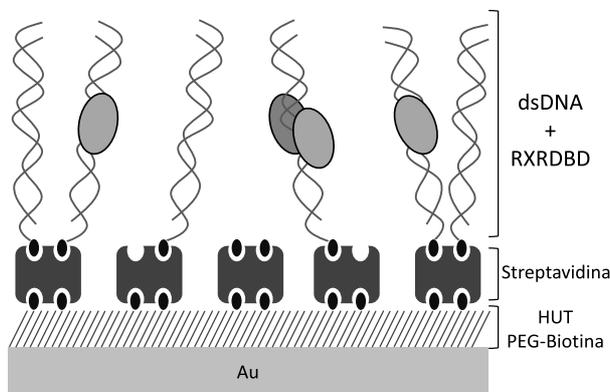


Figura 4.1: Esquema da superfície do sensor modificada com dsDNA e a da interação do RXR α DBD. Imobilização do dsDNA biotilado em 5'-terminal via streptavidina, adsorvida sobre monocamada mista de pEG-biotina:HUT.

4.2.7 Ensaio de alteração da mobilidade electroforética

A interacção de RXR α DBD com dsDNA (DR1 ou negativo) foi promovida em solução para ensaio de alteração da mobilidade electroforética (EMSA). Para isso foram misturados 10 nmol de cada em tampão de ligação (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.005% Tween 20, 10% de glicerol, pH 8.0) e a mistura incubada à temperatura ambiente durante 3 horas, de modo a se garantir o estado de equilíbrio. Como controlo foram incubados sob as mesmas condições amostras contendo apenas dsDNA ou proteína. As amostras foram aplicadas num gel nativo de acrilamida 6% contendo 2.5% de glicerol (pré-corrído a 100 V durante 1 h) e o gel resolvido em tampão TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico e 1 mM EDTA) a 90 V, durante 45 min a 4°C. Após corrida o gel foi corado pelo método de nitrato de prata.

4.2.8 QCM: aquisição de dados

As medições obtidas foram baseadas na impedância do sensor na região espectral perto da frequência de ressonância, como descrito anteriormente [8]. Os dados em tempo real foram adquiridos a partir de um computador conectado a um Network/Impedance Analyzer 4395A (Agilent Technologies). O espectro da conductância, G , foi obtido usando um *span* de 50 kHz centrado na frequência correspondente ao máximo de G (frequência próxima da frequência de ressonância do cristal). O modelo de circuito equivalente Butterworth–Van Dyke (BVD) foi utilizado para calcular a frequência de ressonância em série, f_s , e a resistência, R . Variações de capacitância parasita, (C_0), devido a possíveis efeitos de carga na superfície do sensor [8, 39, 46] também foram registadas. A frequência correspondente ao mínimo da susceptância, B , e que corresponde à frequência do pico a meia altura de G (do lado das menores frequências) [16] foi adquirida directamente do espectro.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Expressão e purificação de RXR α DBD

O domínio de ligação ao DNA do RXR α) humano foi clonado no vector pGEX4T e expresso em bio-reactor na forma de proteína de fusão com a GST. Esta estratégia teve como objectivo maximizar a expressão proteica na forma solúvel e facilitar a purificação. O processo cromatográfico consistiu numa primeira parte na cromatografia de afinidade para a GST e clivagem em coluna da proteína de fusão GST-RXR α DBD com trombina. Numa segunda parte, aumentar a pureza do fragmento RXR α DBD através de cromatografia de permuta catiónica. A figura 4.2 apresenta os processos de purificação de RXR α DBD bem como a análise por SDS-PAGE. Inicialmente foi testada a clivagem da proteína de fusão em coluna de afinidade (fig. 4.2(a)). 5.7 mg de proteína total GST-RXR α DBD pré-purificada foram injectadas numa coluna de 1 mL, quantidade suficiente para saturar a coluna. A clivagem da proteína de fusão (\approx 36 kDa) com 11.5 U de trombina (rácio trombina:proteína, 1:500) teve um rendimento superior a 95%, obtendo-se o fragmento RXR α DBD com massa molecular próximo de 10 kDa (fig. 4.2(b), lanes 4 a 6) e a GST com 26 kDa (fig. 4.2(b), lanes 7). De modo a maximizar o grau de pureza do fragmento clivado procedeu-se a um segundo passo cromatográfico. Como RXR α DBD tem um ponto isoeléctrico teórico de 9.5 optou-se pela cromatografia de troca catiónica. A proteína interagiu com a matriz cromatográfica sendo eluída com 400 mM de NaCl (fig. 4.2(c) e 4.2(d)). Este passo permitiu a separação de algumas impurezas restantes, como é o caso de ácidos nucleicos (1^o pico fig. 4.2(c)). Por outro lado confirmou a carga global positiva da proteína a pH 7.5, uma vez que ligou-se à matriz de carga negativa, e não interagiu com a matriz com carga positiva (troca aniónica) nas mesmas condições (dados não apresentados). O rendimento final de RXR α DBD solúvel e com elevado grau de pureza (>98%) foi de

aproximadamente 20 mg/L de meio de crescimento inicial.

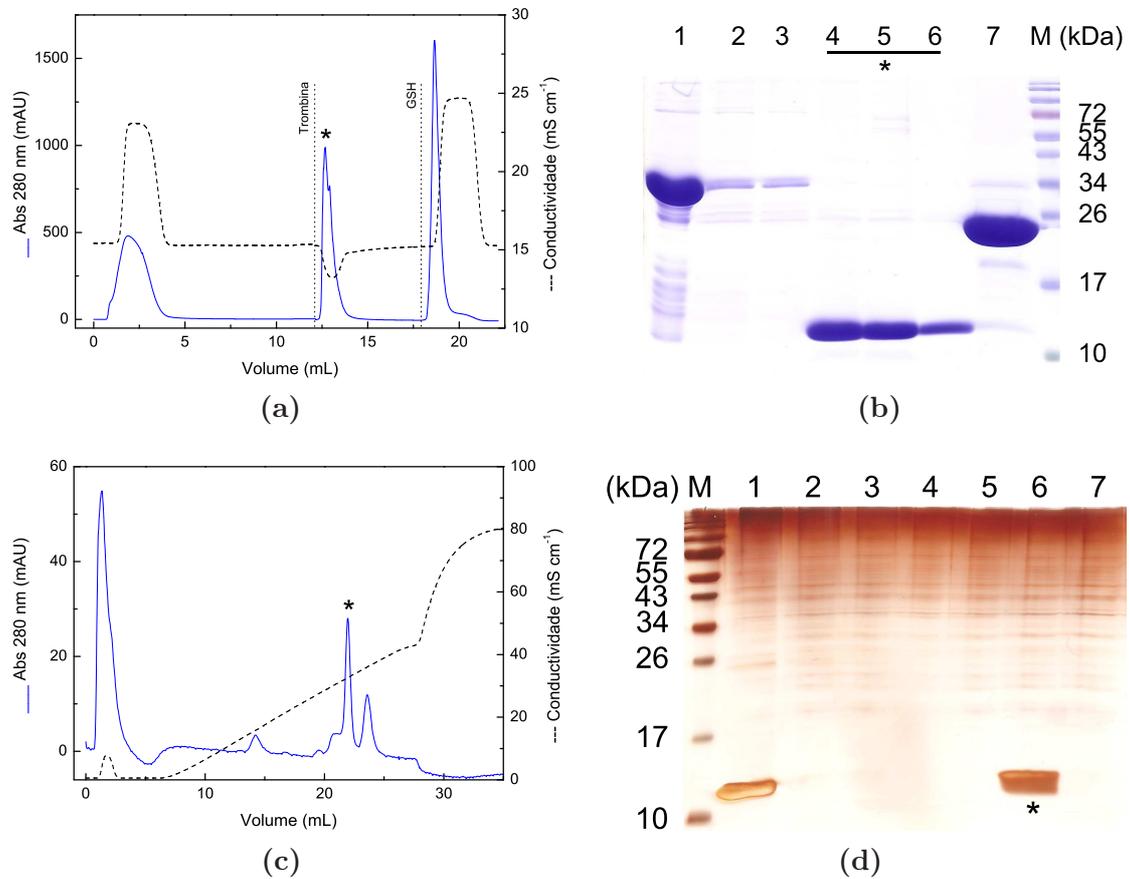


Figura 4.2: Optimização da purifica o da proteína RXRDBD. (a) Cromatografia de afinidade com clivagem em coluna. A proteína de fusão GST-RXRDBD foi clivada com 11.5 U de trombina (incuba o durante 3 horas) e elui o final de GST com 15 mM de GSH. (b) Análise SDS-PAGE da cromatografia de afinidade; lane 1: frac o solúvel; lanes 2 e 3: *flow-through*; lanes 4, 5 e 6: RXRDBD clivado; lane 7: GST. Gel corado pelo método de Coomassie Brilliant Blue. (c) Cromatografia de troca cati nica. Coluna de 1 mL (resource S). Gradiente linear de 0-500 mM de NaCl e não-linear de 500-1000 mM. (d) SDS-PAGE da cromatografia de troca cati nica. Lane 1: RXRDBD após clivagem em coluna; lanes 2 e 3: frac es excluídas (pico 1); lanes 4 e 5: *washout*; lane 6: frac o eluida com 400 mM de NaCl, contendo RXRDBD (pico 2*); lane 7: frac o correspondente ao pico 3. Gel corado pelo método de cloreto de prata.

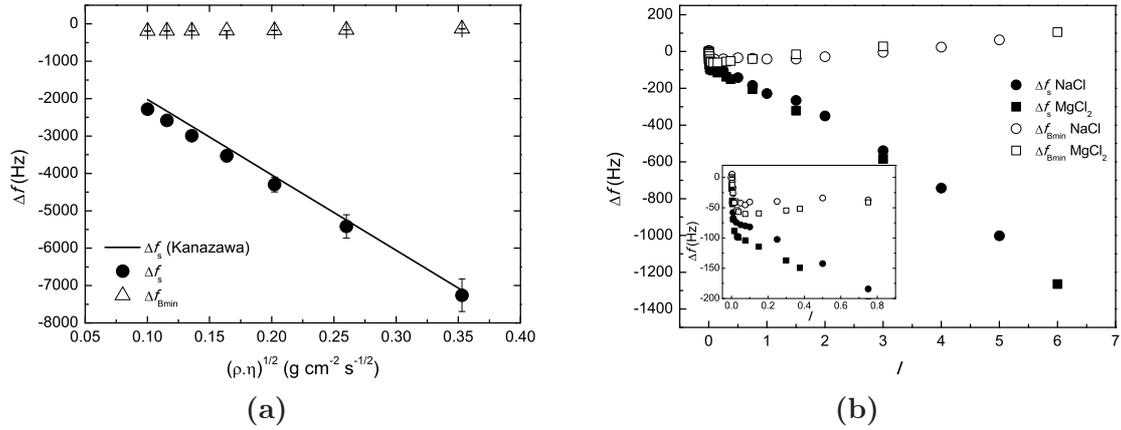


Figura 4.3: (a) Efeito de diferentes concentrações de glicerol, 0–60%, e (b) de diferentes concentrações de sal (NaCl e MgCl₂) na resposta de Δf_s e Δf_{Bmin} .

4.3.2 Variação de frequência correspondente a B_{min}

Segundo o que foi apresentado na introdução a frequência f_{Bmin} apresenta uma variação teórica independente da densidade e viscosidade da solução (eq. 1.26). Em termos práticos essa variação não é totalmente nula mas como se pode observar na figura 4.3(a) a sua resposta a concentrações elevadas de glicerol, comparativamente a Δf_s e à variação teórica, foi praticamente desprezável.

O aumento da força iónica também afectou muito menos Δf_{Bmin} do que Δf_s , praticamente não se alterando para $0.1 < I < 0.8$ (fig. 4.3(b)). A variação mais acentuada para $I < 0.1$ deve-se com a deposição de massa, como anteriormente discutido.

Para se comprovar a aplicabilidade de Δf_{Bmin} em estudos cinéticos procedeu-se ao estudo de adsorção de uma proteína, streptavidina, sobre uma monocamada de biotina imobilizada na superfície do sensor. O sensor de 10 MHz foi inserido numa célula de fluxo e estabilizado em água ultra-pura. Uma solução de $3 \mu\text{g/mL}$ de streptavidina em solução contendo sais e glicerol foi injectada sobre a superfície do sensor (fig. 4.4). Como se pode observar pela figura 4.4(a) o transiente de ligação

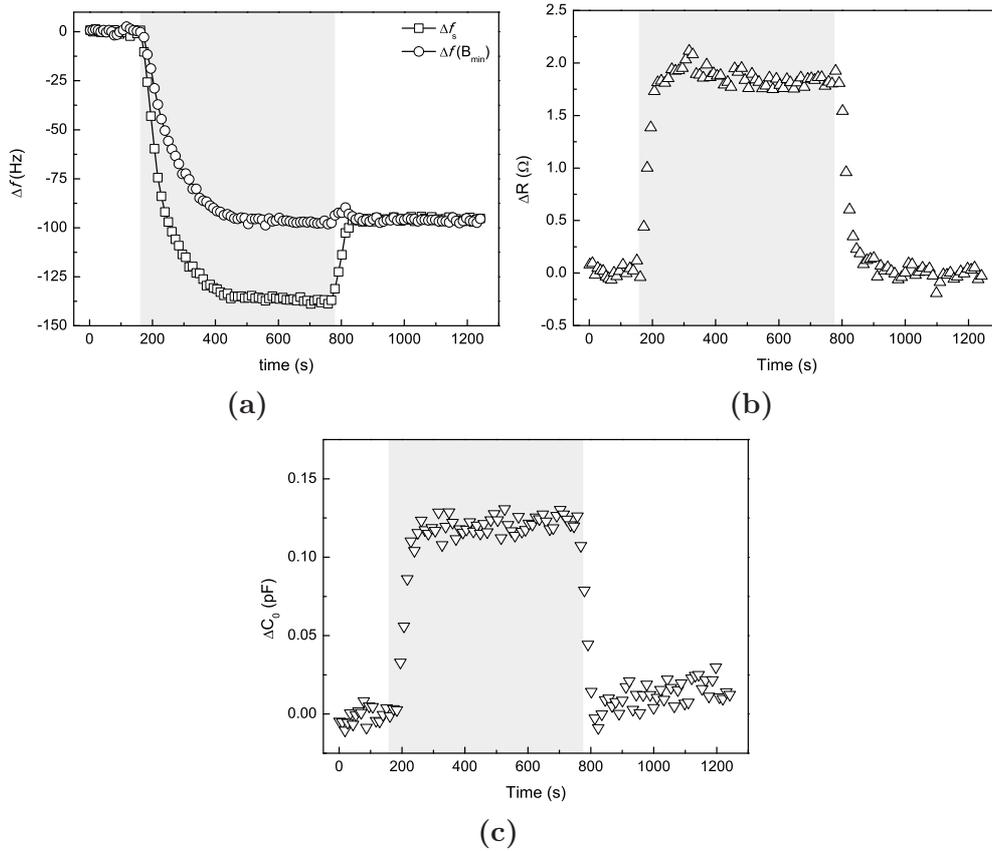


Figura 4.4: Adsorção, em água ultra-pura, de streptavidina sobre biotina imobilizada num sensor de 10 MHz. Variação de f_s (a), R (b) e C_0 (c) após injeção de 1 mL de streptavidina (zona a cinzento).

da streptavidina à biotina apresenta um valor de Δf_s afectado pela densidade e viscosidade do tampão. A alteração das propriedades do líquido provocaram um aumento de R e C_0 (figs. 4.4(b) e 4.4(c)), que foram desprezadas por Δf_{Bmin} . Sempre que se verificaram aumentos de resistência em transientes cinéticos optou-se pela análise de f_{Bmin} para o cálculo de constantes cinéticas, de modo a reduzir as interferências no sinal de frequência.

4.3.3 Activação da superfície do sensor com PEG–biotina

A superfície de ouro dos cristais de quartzo foram activados com monocamada mista de HUT e PEG–biotina. O rácio de HUT:PEG-biotina utilizado foi de 9:1 de modo a maximizar a ligação posterior da streptavidina à biotina [47], evitando impedimentos estereoquímicos devido a uma grande concentração de biotinas na superfície [48].

A adsorção espontânea ocorre através dos grupos tiol e dissulfeto presentes em HUT e PEG–biotina, respectivamente. Embora o processo de adsorção de compostos tiolados ao ouro seja termodinamicamente favorável, $\Delta G^\circ \approx -36$ kJ/mol [49], a cinética de adsorção e rearranjo da superfície pode levar várias horas ou até mesmo dias, dependendo da estrutura, substrato e solvente utilizado [50]. A adsorção de HUT:PEG–biotina foi monitorizada electroquimicamente por voltametria cíclica (fig. 4.5). Considerando que a transferência de electrões através de uma monocamada de alcanotióis com 11 carbonos é muito baixa [51] pode-se considerar que essa transferência ocorre maioritariamente devido a defeitos na monocamada. Ao fim de 26 horas o voltamograma apresenta uma considerável atenuação nos picos de oxidação/redução, comparativamente ao ouro limpo, indicando uma reduzida transferência de electrões entre o ouro e o ferricianeto de potássio em solução. Após as 26 horas não se verificou grandes diferenças no voltamograma, sugerindo que a monocamada está completamente formada e uniforme.

4.3.4 Imobilização de streptavidina e dsDNA biotinilado

A imobilização do DNA foi realizada via streptavidina sobre os eléctrodos activados com PEG-biotina. A ligação entre a streptavidina e a biotina é bastante forte e estável com tempo de meia vida bastante longo, $t_{1/2} \approx 3$ dias [52], o que

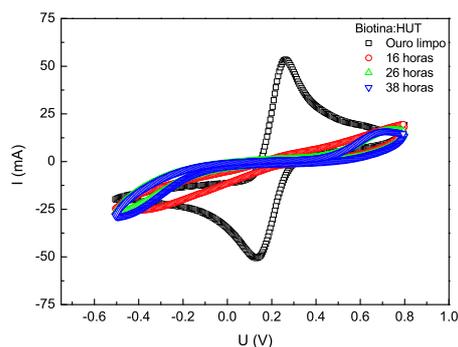


Figura 4.5: Voltamogramas cíclicos do sensor não modificado e sensor modificado com monocamada mista de PEG–biotina:HUT após 16, 26 e 38 horas. Velocidade de varrimento de 100 mV/s.

torna este método de imobilização bastante robusto para estudos cinéticos relativamente rápidos. Por outro lado a imobilização de streptavidina (em QCM) origina filmes bastante rígidos [53] sem perdas de energia por dissipação da onda acústica. Como se pode observar na figura 4.6 a adsorção de streptavidina não provoca qualquer alteração de resistência nem de capacitância. Isto significa que a frequência não tem influência de alterações viscoelásticas nem de cargas superficiais, e que a variação de frequência está directamente relacionada com deposição de massa de acordo com a relação de Sauerbrey. A concentração utilizada de $3 \mu\text{g/mL}$ foi suficiente para saturar toda a superfície de biotina (fig. 4.6) levando menos de 250 s para a variação de frequência chegar ao equilíbrio. Entre ensaios a adsorção de streptavidina originou uma variação de frequência de 75 ± 5 Hz, o que corresponde a uma densidade superficial de 6.4 pmol/cm^2 , valor muito próximo do valor que obtido anteriormente com cristais de 5 MHz [53]. Considerando que o tetrâmero de streptavidina tem aproximadamente 5 nm de diâmetro (pdb:1SWB) pode-se estimar uma cobertura superficial de $75 \pm 5\%$.

O tetrâmero de streptavidina pode interagir com a monocamada de biotina no máximo por dois dos seus quatro locais de ligação, sendo provável que nem todos fiquem ligados devido a cooperatividade negativa [53]. Considerando que no má-

ximo podem-se ligar duas moléculas de dsDNA por cada molécula de streptavidina a estimativa máxima de dsDNA que pode interagir é de 2.6 pmol.

A concentração de 0.1 μ M de dsDNA(DR1) saturou a superfície de streptavidina (fig. 4.6) com uma variação de frequência de 100 Hz. Se se fizer a conversão directa para massa obtém-se 4.8 pmol o que é quase 2 vezes mais do que o máximo estimado. A razão para esta diferença deve-se à variação de frequência sobrestimada devido a efeitos viscoelásticos. Ao contrário da imobilização da streptavidina o DNA provocou um aumento de resistência. Tanto para o DNA DR1 como para o de sequência controlo observou-se uma variação positiva de resistência de $3.0 \pm 0.2 \Omega$. Estas variações positivas de resistência estão directamente relacionadas com o aumento da dissipação do filme. As cadeias de DNA devido ao seu tamanho e flexibilidade diminuem a rigidez do filme, aumentando a dissipação da onda acústica e consequentemente sobrestimando Δf_s [8].

Outro factor que pode ter contribuído para Δf_s é a água de hidratação, uma vez que apresenta um valor considerável na massa adsorvida. A água interage fortemente com as cadeias de DNA e quando este é imobilizado a água pode representar grande parte do filme. De facto, estudos anteriores utilizando as técnicas de SPR e QCM sugerem que uma monacamada de dsDNA, com 34 bp, apresenta um conteúdo de água na ordem dos 80% [54]. Tendo em conta este valor o rácio de streptavidina:DNA obtido será muito menor embora, com os resultados apresentados na figura 4.6, não se possa obter um valor preciso para a massa de DNA imobilizado.

4.3.5 Interacção RXR α DBD:DNA

As interacções de RXR α DBD com o DR1 e DNA não-específico foram monitorizadas através das variações de frequência e resistência (fig. 4.7). Em ambos os casos a interacção de RXR α DBD com o DNA imobilizado resulta num decréscimo

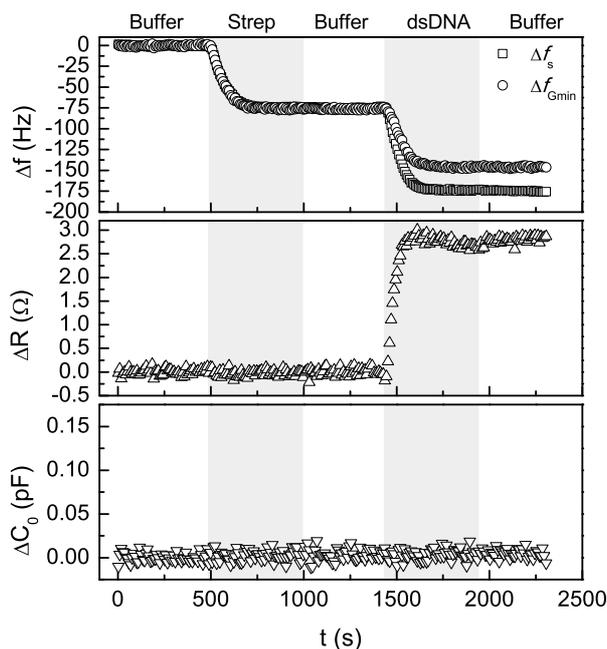


Figura 4.6: Variações de frequência (Δf_s), resistência (ΔR) e capacitância (ΔC_0) devido à imobilização de $3 \mu\text{g/mL}$ de streptavidina e posteriormente de $0.1 \mu\text{M}$ de dsDNA. Injecções em fluxo e lavagem com tampão PBS entre injecções.

de frequência acompanhado de um decréscimo de resistência. Este facto sugere que a interacção da proteína promove um aumento da rigidez da monocamada de DNA. Um maior empacotamento das moléculas à superfície, a restrição da mobilidade das cadeias de DNA e a exclusão de moléculas de água associadas às cadeias de nucleótidos por ligações de hidrogénio [54] são alguns dos fenómenos envolvidos.

O RXR α DBD ligou-se de forma semelhante ao motivo específico DR1 (fig. 4.7(a)) e ao controlo negativo (fig. 4.7(b)) apresentando valores próximos de variação de frequência. Como RXR α DBD apresenta carga global positiva (pI=9.5) a pH 7.5, o que é característico da maioria dos factores de transcrição [55], a afinidade pelo DNA não-específico (figura 2B) sugere uma interacção com o DNA maioritariamente electrostática.

Segundo vários estudos recentes [56–58] o mecanismo pelo qual os factores de transcrição reconhecem o DNA baseia-se inicialmente na interacção não espe-

cífica através de interações electrostáticas. Vários mecanismos são actualmente aceites no processo de reconhecimento específico [59, 60], sendo o principal o *sliding* [58]. Este mecanismo baseia-se no deslizamento da proteína ao longo da sequência de DNA até encontrar a sequência específica e formar uma ligação mais estável, principalmente pela formação de ligações de hidrogénio [58]. Este é um processo bastante rápido, podendo atingir $1 \mu m$ em apenas $1 s$ [61]. Tendo em conta o tamanho das sequências utilizadas ($30 \text{ bp} \approx 10 \text{ nm}$) e o tempo entre aquisição de dados, $9 s$, é praticamente impossível distinguir entre a fase de associação específica e não-específica para RXR α DBD:DNA (fig. 4.7).

Apesar das fases de associação serem muito semelhantes, com variações de frequência da mesma ordem, as fases de dissociação foram bastante distintas. A interacção específica demonstrou ser muito mais estável (fig. 4.7(a)) uma vez que o transiente de dissociação é muito mais lento do que o verificado na ligação não-específica (fig. 4.7(b)). O RXR α DBD dissocia-se do DNA não-específico rápida e totalmente em menos de 1000 segundos somente com a passagem de tampão.

No caso da interacção com DR1 a regeneração do sensor foi feita através da injeção de 0.5 M de NaCl em tampão HEPEST. Após a regeneração ambos os valores de frequência e resistência retomaram aos valores iniciais. Isto sugere não só que o RXR α DBD se dissociou totalmente de DR1 como também as propriedades viscoelásticas do DNA permaneceram intactas. Este método de regeneração demonstrou ser eficiente e reprodutível e evita o uso de compostos agressivos, como detergentes ou soluções com pH extremos. Por outro lado a regeneração diminuiu bastante o tempo das experiências e o permitiu manter o número de locais de ligação constante entre ensaios, o que é bastante favorável para estudos cinéticos.

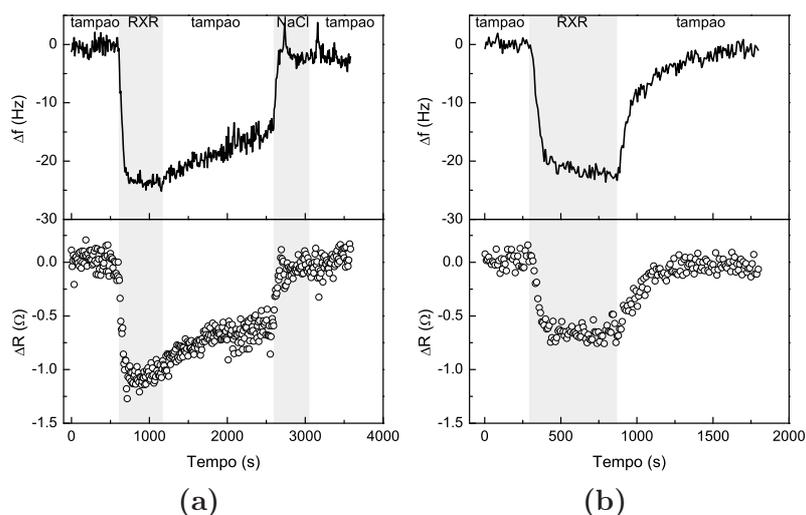


Figura 4.7: Gráficos de variação de frequência (Δf_s) e resistência (ΔR) devido à interacção de $0.25 \mu\text{M}$ RXR α DBD com DNA imobilizado DR1 (a) e não-específico (b) na presença de tampão HEPEST com 150 mM de NaCl, pH 7.5. A regeneração do sensor para a interacção específica foi feita com 0.5 M de NaCl. Os transientes mostram as fases de associação e dissociação da proteína ao DNA imobilizado.

4.3.6 Cinética de interacção RXR α DBD–DR1 e influência da força iónica

O estudo cinético foi realizado através da análise de impedância em tempo real. Foi utilizado o modelo de interacção 1:1 para determinar as constantes cinéticas de interacção entre RXR α DBD e o DNA imobilizado. A dependência temporal da cobertura superficial do sensor é descrita pelas equações 3.1 e 3.2.

Como foi referido anteriormente a variação total de frequência é a soma das contribuições de massa, líquido, viscoelasticidade e cargas superficiais ($\Delta f_T = \Delta f_m + \Delta f_L + \Delta f_V + \Delta f_C$). A variação de cargas pela interacção da proteína foi nula uma vez que $\Delta C_0 = 0$ para todas as concentrações e condições testadas. Por outro lado e ao contrário do que se observou na imobilização do DNA (fig. 4.6) a variação de resistência foi negativa, com variações máximas na ordem de -1Ω (fig. 4.7). A diminuição de ΔR tem implicações directas em Δf , subestimando a

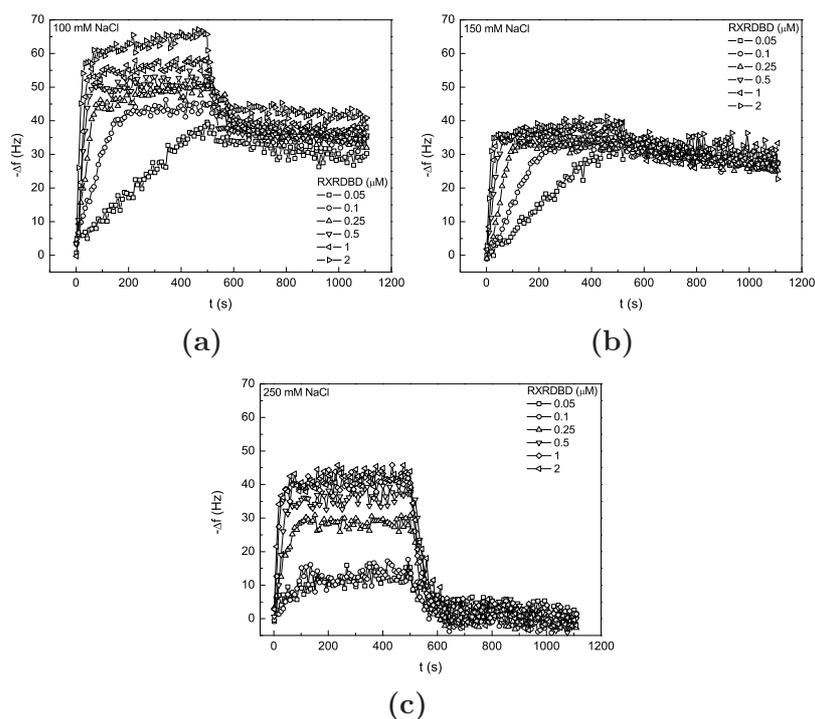


Figura 4.8: Transientes das cinéticas de interacção entre RXR α DBD e a sequência motivo específica DR1 na presença de diferentes concentrações de NaCl, (a) 100, (b) 150 e (c) 250 mM de NaCl. Concentrações crescentes de RXR α DBD (0.05–2.0 μ M) foram injectadas sobre a mesma superfície de DR1 após regeneração. Cada transiente representa a média de 3 ensaios.

sua variação total e conseqüentemente o cálculo de massa adsorvida.

Considerando a relação de Martin [9], $\Delta R = -4\pi L\Delta f$, é possível corrigir os transientes de Δf de modo a diminuir os efeitos de viscoelasticidade. Também como discutido num capítulo anterior esta variação de frequência corrigida Δf_{corr} é idêntica a Δf_{Gmin} (f para susceptância mínima), e foi esta frequência que foi monitorizada directamente a partir dos espectros de impedância. Na figura 4.8 estão representados os transientes de Δf_{Gmin} para a interacção entre várias concentrações de RXR α DBD e o motivo DR1. O efeito do sal na interacção de ambos foi investigada pela presença de três concentrações de NaCl (100, 150 e 250 mM de NaCl).

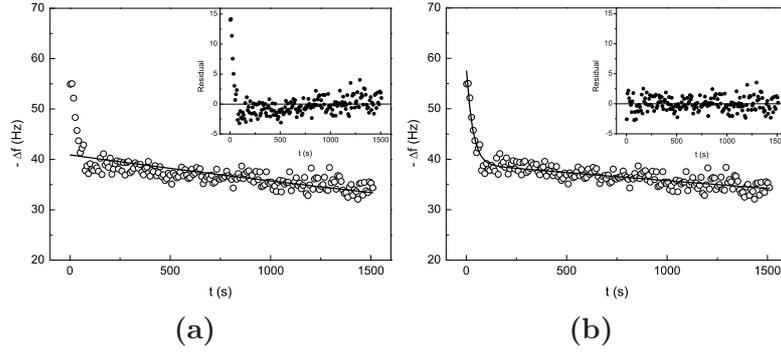


Figura 4.9: Transiente de dissociação entre 1 μM de RXR α DBD e DR1 na presença de 100 mM de NaCl. Ajustes não lineares pelo método dos mínimos quadrados para o modelo de interação 1:1 (a) e para o modelo de dois passos ou dupla exponencial (b). Os *inserts* nos gráficos representam os resíduos dos ajustes aos respectivos modelos de dissociação.

Os resultados apresentados na figura 4.8 sugerem que o sal tem um papel importante tanto na fase de associação como na dissociação. Enquanto que para os transientes de interação na presença de 150 e 250 mM de NaCl (fig. 4.8(b) e 4.8(c)) o modelo de interação 1:1 apresentou um bom ajuste aos dados experimentais o mesmo não se verificou para a interação a 100 mM de NaCl (fig. 4.8(a)), uma vez que os transientes apresentam claramente duas fases distintas. A dissociação de RXR α DBD para a concentração mais baixa de sal pode ser descrito como um decaimento de dupla exponencial:

$$\Delta f = \Delta f_1 e^{-k_{d1}t} + \Delta f_2 e^{-k_{d2}t} \quad (4.1)$$

onde k_{d1} e k_{d2} são as primeira e segunda constantes de velocidade de dissociação, respectivamente, e $\Delta f_1 + \Delta f_2 = \Delta f$ (observado). O ajuste a um decaimento simples resulta em resíduos não aleatórios (fig. 4.9(a)), enquanto que o ajuste a um exponencial duplo resulta em resíduos significativamente menores e aleatórios (fig. 4.9(b)), com um χ^2 muito menor.

Uma vez que o RXR α DBD pode interagir com o motivo DR1 na forma de homodímero [32–34] os resultados das figuras 4.8(a) e 4.9 sugerem que os dois passos reflectem a dissociação do monómero e do dímero do DNA. Estes dois passos de dissociação foram previamente verificados para outros receptores nucleares, como é o caso de homo e heterodímeros de VDR [62]. Assim considerou-se um modelo que descreve dois analitos (A_1 e A_2) a interagir com o mesmo local de ligação:

$$A_1 + B \xrightleftharpoons[k_{d1}]{k_{a1}} A_1B \quad A_2 + B \xrightleftharpoons[k_{d2}]{k_{a2}} A_2B \quad (4.2)$$

onde B representa o DNA imobilizado. As constantes de velocidade de dissociação aparentes, k_{d1} e k_{d2} foram determinadas a partir da eq. 4.1 e as constantes de velocidade de associação foram calculadas através de ajuste não linear como descrito anteriormente em [62].

De modo a determinar se o RXR α DBD consegue formar homodímeros em solução determinou-se a afinidade de RXR α DBD com GST–RXR α DBD. Para isso a proteína GST–RXR α DBD foi imobilizada na superfície de forma orientada através do anticorpo anti–GST previamente imobilizado (ver materiais e métodos) e promovida a interacção com RXR α DBD purificado. A interacção proteína–proteína resultou na formação de um complexo rígido, sem alterações de ΔR , e com uma cinética que segue o modelo simples de interacção (fig. 4.10). RXR α DBD sobre uma superfície só com anti–GST imobilizada não resultou em interacção significativa (<10%), o que sugere interacção específica. Através dos transientes cinéticos (fig. 4.10) obteve-se a constante de equilíbrio de dissociação, $KD = 8.5 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, valor utilizado para o cálculo de k_{a1} e k_{a2} (expressão 4.2) e que confirma a existência de monómeros e dímeros de RXR α DBD em solução.

A hipótese de haver duas espécies de complexos a serem formadas foi confir-

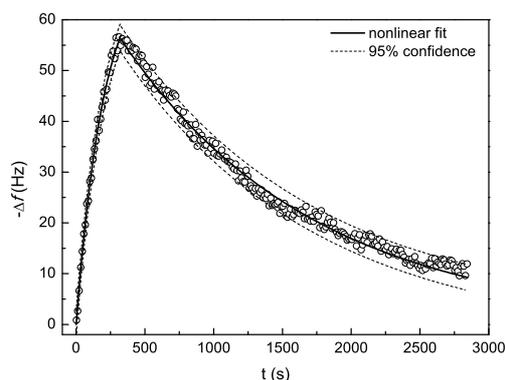


Figura 4.10: Interação de RXR α DBD com GST-RXR α DBD imobilizada. Transientes de Δf_s correspondentes à associação e dissociação. Ajuste não-linear ao modelo de interação 1:1 (linha sólida) com intervalo de confiança de 95% (linha a tracejado).

mada por alteração da mobilidade electroforética (EMSA). De facto observou-se a formação de dois complexos entre RXR α DBD e dsDNA DR1 (fig. 4.11), enquanto que para a interação não específica se verificou um arrastamento de proteína mas não a formação de nenhuma banda específica. O RXR α DBD na ausência de DNA não mostrou qualquer migração.

Na tabela 4.1 estão resumidos os valores das constantes obtidas para as diferentes concentrações de sal. O efeito da força iónica não teve grande influência nas constantes de velocidade de associação, k_a , tanto para DR1 como para o DNA de sequência aleatória, com valores na mesma ordem de grandeza e muito próximos. Por outro lado, o sal influenciou principalmente a velocidade de dissociação do complexo, k_d , aumentando o seu valor e consequentemente K_D . A interação não-específica apresentou sempre maiores valores para k_d para as mesmas condições não se verificando ligação quantificável a 250 mM de NaCl. Estes resultados estão de acordo com o observado em estudos anteriores, onde foi também demonstrado que a menor afinidade em soluções com maior força iónica deve-se principalmente a um aumento significativo das velocidades de dissociação [63].

A constante de equilíbrio de dissociação, K_D , calculada por QCM foi duas

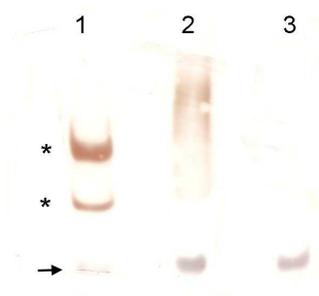


Figura 4.11: Ensaio de mobilidade electroforética, EMSA; para o complexo de RXR α DBD com DR1 (1) e com DNA não-específico (2); apenas dsDNA (3). 0.2 nmol de proteína para 0.2 nmol de dsDNA. Complexos proteína:DNA (*) e dsDNA livre (seta). Gel de acrilamida 6% em condições nativas, corado pelo método de nitrato de prata.

ordens de grandeza menor comparada com o valor anteriormente determinada por anisotropia de fluorescência, indicando uma maior afinidade. Esta diferença pode ser explicada pelo comprimento da cadeia de DNA e pela concentração de sal da solução tampão. No presente trabalho foram usadas cadeias de DNA com 30 bp e a concentração mais baixa de sal utilizada foi de 100 mM, enquanto que na referência citada foram usados 50 mM de NaCl e uma cadeia de DNA com 15 bp [64]. De acordo com Record et al. [65] a energia de Gibbs de ligação é composta por uma parte dependente de sal definida como a componente electrostática e que é inteiramente entrópica. Esta dependência da concentração de sal é directamente relacionada com o número de contactos presentes no complexo. Por isso, será de esperar que as interacções não-específicas tenham maior contribuição quanto maior o número de fosfatos presentes numa cadeia de DNA [66].

Tabela 4.1: Constantes cinéticas para a interacção RXR α DBD–DNA a diferentes concentrações de NaCl.

NaCl (mM)	dsDNA	$k_a(10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d(10^{-4}\text{s}^{-1})$	$K_D(10^{-9}\text{M})$
100	DR1(†)	3.2 ± 0.4	380 ± 61	1180 ± 240
	DR1(‡)	3.7 ± 0.7	1.2 ± 0.2	3.2 ± 0.8
	Neg	3.0 ± 0.6	9.6 ± 1.2	31 ± 7.3
150	DR1	3.2 ± 0.4	3.2 ± 0.6	9.9 ± 2.0
	Neg	2.4 ± 0.2	61 ± 5.5	252 ± 31
250	DR1	2.9 ± 0.5	227 ± 62	768 ± 250
	Neg	n.d.	n.d.	n.d.

† Interacção com DR1 em forma de monómero;

‡ Interacção com DR1 em forma de dímero.

n.d. Não detectado, sem interacção.

4.3.7 Conclusões

A técnica de QCM em conjugação com espectroscopia de impedância demonstrou ser uma ferramenta útil na caracterização de interacções proteína–DNA. Neste trabalho foram caracterizadas as ligações do RXR α DBD a DNA específico e não-específico, sendo possível calcular as constantes cinéticas utilizando os transientes de variação de frequência corrigidos. Foi a primeira vez que os valores das constantes de velocidade de associação e dissociação foram calculadas para o complexo RXR α DBD:DR1. A análise destas constantes a diferentes concentrações de sal demonstrou que soluções tampão com elevada força iónica previnem a formação de interacções não-específicas e que a concentrações de mais baixas a dissociação de RXR α DBD:DR1 ocorre em duas fases. Por outro lado a interacção com o motivo DR1 forma complexos muito mais estáveis e resistentes ao aumento da concentração de sal.

Capítulo 5

Interacção Haa1–DNA

5.1 Introdução

A forma tridimensional das moléculas biológicas (proteínas, DNA e RNA), é determinada por interacções não covalentes (iónicas, hidrofóbicas, van der Waals e ligações de hidrogénio), cada uma das quais pode ser quebrada por flutuações térmicas, levando à constante mudança de acessibilidade às macromoléculas. Estas flutuações conformacionais são fundamentais para o reconhecimento molecular. A interacção de duas ou mais macromoléculas depende das conformações complementares e das distribuições de carga, formando múltiplas ligações intermoleculares que levam a complexos altamente organizados.

A interacção específica proteína–DNA, como é o caso dos factores de transcrição, resulta geralmente em alterações estruturais. O DNA é frequentemente dobrado no complexo [66][67], no entanto a proteína também pode ajustar a sua conformação para facilitar a interacção [68]. Estes rearranjos na conformação das proteínas e do DNA são consideradas importantes na compreensão dos mecanismos responsáveis pelo reconhecimento do sítio de ligação específico.

Haa1 é um factor de transcrição responsável pela regulação de vários genes na

levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Desempenha um papel muito importante na adaptação da levedura a concentrações tóxicas de ácidos carboxílicos de cadeia curta, como é o caso do ácido acético [69–71] e do ácido láctico [72]. Haa1 regula, directa ou indirectamente, a transcrição de aproximadamente 80% dos genes activados pelo ácido acético [70].

O Haa1 liga-se ao DNA na região do promotor através do seu domínio DBD que reconhece a sequência específica HRE 5'-(G/C)(A/C)GG(G/C)G-3' [71]. Mutações neste motivo levam à diminuição da afinidade entre Haa1 e HRE.

A principal aplicação do estudo deste factor de transcrição prende-se com o desenvolvimento de novas estratégias de preservação de alimentos, na industria alimentar, e com o possível interesse na criação de novas estirpes resistentes a elevadas concentrações de ácido acético, em bioprocessos [73].

Neste trabalho utilizou-se o factor de transcrição Haa1 como modelo. O objectivo é quantificar as propriedades mecânicas da interacção Haa1–HRE, em termos de elasticidade e viscosidade, e tentar perceber se mutações no motivo HRE alteram essas propriedades. Para isso utilizou-se a técnica de QCM para o estudo cinético de interacção e para extracção das propriedades viscoelásticas através do modelo TLM.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Preparação do sensor e funcionalização

Os cristais de quartzo de 10 MHz e com eléctrodos de ouro foram limpos, activados com HUT:PEG–biotina, funcionalizados com streptavidina e imobilizados com dsDNA de forma semelhante ao descrito no capítulo anterior. A principal diferença foi o tampão utilizado. A solução tampão Tris (10mM Tris, 10 mg/ml BSA, 100 mM KCl, 0.005% Tween20, pH 8.0) foi utilizada em todos os passos, desde

a imobilização da streptavidina até à interacção proteína-DNA, para minimizar os efeitos da troca de tampão no sensor.

5.2.2 Medição de ângulos de contacto

Os ângulos de contacto dos eléctrodos de ouro funcionalizados foram medidos com um goniómetro (KRÜSS). Uma gota de água ultra-pura foi depositada sobre o eléctrodo, após os diferentes passos de imobilização, e os ângulos de contacto comparados com os obtidos para a superfície de ouro limpa. O ângulo interno da gota foi determinado em modo estático e calculado por *software* do fabricante, utilizando a equação de Young-Laplace para ângulos superiores a 30° e a equação da circunferência para valores menores. Cada medição resultou da média de três ensaios independentes.

5.2.3 Interacção Haa1-HRE

O fragmento Haa1DBD foi expresso, purificado [71] e gentilmente cedido pelo grupo de investigação da Prof. Isabel Sá-Correia (Instituto Superior Técnico de Lisboa). Os ensaios de interacção foram realizados entre Haa1DBD e diferentes elementos de resposta ao Haa1, designado HRE (motivo selvagem, HREwt, dois mutantes, HREm6 e HREm7 e um controlo negativo). O motivo HRE corresponde à sequência GGCGAGGGG e as mutações m6 e m7 correspondem à troca da guanina na posição 8 por uma citosina e adenina, respectivamente. Todos os oligonucleótidos utilizados tinham 38 bp com as sequências motivo localizadas na parte central. Várias concentrações, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 nM de Haa1DBD em tampão Tris foram injectadas em fluxo, a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre os diferentes HRE imobilizados. Os sensores foram regenerados, após cada ciclo de concentração, com NaCl em tampão Tris.

5.2.4 Aquisição dos parâmetros BVD e S_{11}

Os parâmetros RLC foram obtidos por medição da impedância em tempo real através de um network/impedance analyzer (Agilent 4395A), como anteriormente descrito. A variação de frequência de ressonância em série, Δf_s foi calculada a partir dos parâmetros RLC, enquanto que Δf_{Gmin} foi obtida directamente do espectro da condutância.

Os espectros do coeficiente de reflexão, S_{11} , foram adquiridos continuamente, para a gama de frequências medidas. Estes espectros serviram para a aplicação do TLM. O espectro de admitância $Y(\omega_i)$ do sensor foi calculado a partir do inverso da impedância utilizando S_{11} , onde $i = 1$ a N , em que N é número de pontos de frequência. S_{11} está correlacionado com a impedância segundo a equação:

$$Z(\omega_i) = Z_0 \left(\frac{1 + S_{11}(\omega_i)}{1 - S_{11}(\omega_i)} \right) \quad (5.1)$$

onde Z_0 é a impedância de referência de 50Ω .

5.2.5 TLM: extracção das propriedades mecânicas

O sensor com DNA e Haa1DBD1 imobilizados foi assumido como um modelo de três camadas (fig. 5.1) e de acordo com o modelo TLM (eqs. 1.28, 1.27 e 1.29).

O cálculo dos diversos parâmetros desconhecidos (fig: 5.1) foi feito através de um método iterativo. Foi utilizado um algoritmo Matlab baseado em [74] e descrito em [75]. Através do algoritmo obteve-se os parâmetros h_1 , G'_1 e G''_1 .

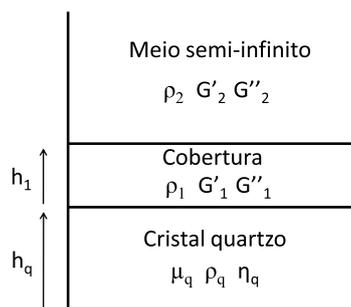


Figura 5.1: Esquema do modelo de 3 camadas para um sensor QCM constituído por um cristal de quartzo e uma camada viscoelástica em contacto com um meio semi-infinito.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Cinética de interacção

A imobilização da streptavidina formou um filme rígido, enquanto o DNA biotinilado (HRE) ao adsorver aumentou a dissipação do filme (fig. 5.2), com um aumento de $\approx 4 \Omega$. À semelhança do que ocorreu com o RXR α DBD (capítulo 4) a interacção de Haa1DBD com o HRE imobilizado resultou numa descida simultânea de frequência e resistência. Ambos os valores voltaram ao patamar anterior após dissociação completa do Haa1DBD do DNA através de 0.5 M de NaCl.

Uma vez que houve alterações nas propriedades viscoelásticas com a ligação de Haa1DBD ao DNA a variação de frequência em série Δf_s apresenta invariavelmente contribuição de ΔR . Assim, para os cálculos cinéticos utilizou-se a variação de frequência corrigida, Δf_{Gmin} , de modo a minimizar as contribuições viscoelásticas. Os transientes de associação e dissociação do complexo Haa1DBD–HRE foram analisados segundo o modelo de interacção 1:1 (eq. 3.1 e 3.2). Na figura 5.3 está representada a cinética de interacção para o complexo Haa1DBD–HREwt e os resultados das cinéticas para cada tipo de DNA (HREwt, HREm6, HREm7 e controlo negativo) estão resumidos na tabela 5.1.

A constante de equilíbrio de dissociação, K_D , permite avaliar a afinidade da

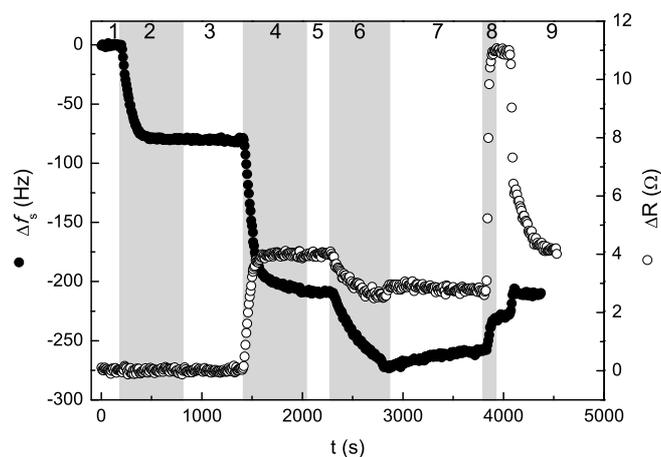


Figura 5.2: Variações de frequência (Δf_s) e resistência (ΔR) referentes aos diferentes passos em fluxo: imobilização de $3 \mu\text{g/mL}$ de streptavidina (2) e $0.1 \mu\text{M}$ de dsHREwt (4); interação de com 400 nM de Haa1DBD (6); regeneração do sensor com 0.5 M de NaCl. Os restantes passos referem-se a lavagens com solução tampão Tris pH 8.0 (1, 3, 5, 7 e 9).

proteína para o DNA, indicando a concentração de proteína requerida para obter 50% de saturação do sensor. Comparando os valores obtidos, Haa1DBD apresentou afinidades semelhantes para os três HREs, com K_D na ordem dos nM. O valor relativamente menor de K_D para a interação com HREwt deve-se um valor mais baixo da constante de velocidade de dissociação, k_d , comparativamente às outras sequências motivo.

Em termos de afinidade relativa os valores calculados por QCM estão de acordo com o anteriormente determinado por SPR (*surface plasmon resonance*) [71]. No entanto, a diferença entre a ligação de Haa1DBD e os três HRE não foi tão evidente quanto o determinado por SPR, onde HREm7 apresentou um K_D 3000 vezes superior a HREwt. Estas diferenças podem ser intrínsecas das duas técnicas ou simplesmente devido ao método de imobilização utilizado. Neste trabalho optou-se pela imobilização do DNA enquanto no trabalho de SPR foi utilizado a proteína imobilizada.

Haa1DBD apresentou uma afinidade ≈ 8 vezes menor para o controlo negativo,

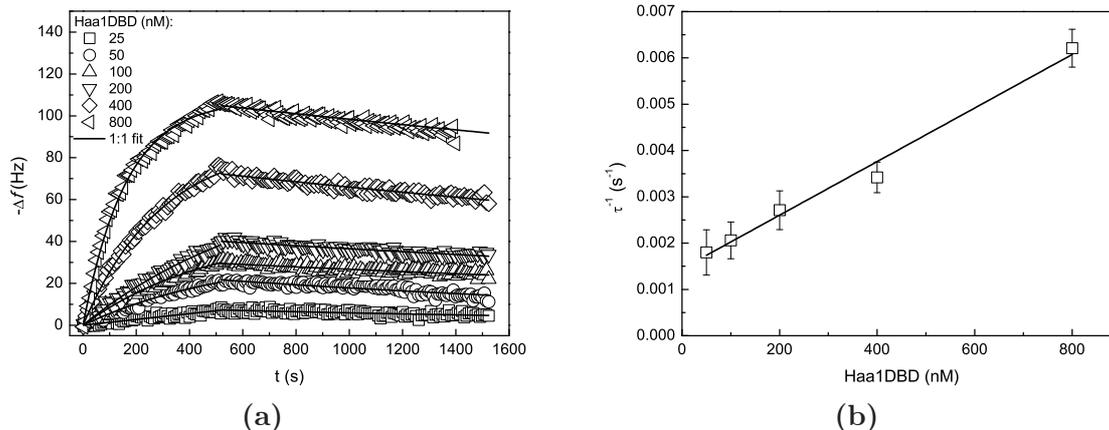


Figura 5.3: Interação Haa1DBD–HREwt. (a) Variação de frequência (Δf_{Gmin}) durante as fases de associação e dissociação do complexo e ajuste ao modelo 1:1. (b) Regressão linear de τ^{-1} em função do tempo para determinação de k_a . $k_a = 5.784 \pm 0.267 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $r^2 = 0.984$.

comparativamente aos HREs, devido a um k_a menor e um k_d superior. Este resultado sugere um complexo menos estável e que as ligações não específicas representam uma parte importante na interação entre a proteína e o DNA.

Tabela 5.1: Constantes cinéticas para a interação Haa1DBD–HRE

HRE	motivo HRE	$k_a(10^3\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d(10^{-4}\text{s}^{-1})$	$K_D(10^{-9}\text{M})$
wt	GGCGAGGGG	5.8 ± 0.3	1.8 ± 0.2	32 ± 3.8
m6	GGCGAGG <u>CG</u>	6.6 ± 0.2	2.5 ± 0.2	37 ± 3.2
m7	GGCGAGG <u>AG</u>	4.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2	51 ± 4.7
neg	seq controlo	3.2 ± 0.3	7.9 ± 0.4	247 ± 26

5.3.2 Propriedades físicas dos complexos Haa1–HRE

Os resultados obtidos para a medição das constantes cinéticas mostraram uma diferença clara entre as interações específicas e não-específicas. No entanto, a fim de se obter informação estrutural quantitativa relacionada com a interação do fac-

tor de transcrição e o DNA utilizou-se o modelo de TLM para extrair propriedades reológicas dos diferentes complexos.

A onda acústica formada pelo sensor piezoelétrico gera uma deformação na camada adsorvida e no meio envolvente. A forma como o material adsorvido responde a essa deformação depende das suas características mecânicas. O módulo de cisalhamento dinâmico complexo (G^* ou *complex shear modulus*) representa a resistência total de um material a uma deformação aplicada.

$$G^* = G' + jG'' \quad \Leftrightarrow \quad |G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (5.2)$$

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (5.3)$$

onde G' e G'' são os módulos de armazenamento (*shear storage*) e de perda (*shear loss*) de energia, respectivamente, e δ é o ângulo de perda. A natureza sólida de um material pode ser medida através do módulo G' . Quanto maior for o valor de G' , maior é a característica sólida do material, apresentando um comportamento maioritariamente elástico [76]. Por outro lado, G'' indica a característica líquida do material. Para um líquido puramente viscoso $G' = 0$, e toda a energia é liberada sob a forma de calor [44]. Materiais viscoelásticos apresentam características intermediárias entre um sólido e um líquido. Assim, um composto apresenta um comportamento elástico se $\tan \delta \ll 1$, viscoso se $\tan \delta \gg 1$ e viscoelástico se $\tan \delta \approx 1$.

Através de G'' é possível determinar a viscosidade dinâmica,

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \quad (5.4)$$

onde ω é a frequência angular.

Imobilização de HRE

A análise das propriedades físicas foi realizada através de um algoritmo Matlab desenvolvido baseado no modelo de TLM, tendo como base o trabalho de Jiménez *et al.* [74]. Após calibração da QCM em meio líquido foram extraídos os parâmetros mecânicos, para a imobilização da streptavidina e para o DNA. Os valores de G' e G'' obtidos para a imobilização da streptavidina sobre biotina foram de 1.9×10^6 Pa e 8.2×10^3 Pa, respectivamente, confirmando o comportamento elástico da monocamada e a forte interação [77].

O comportamento mecânico da adsorção do DNA ao longo do tempo está representado na figura 5.4. Ao contrário da streptavidina a imobilização do DNA apresentou características principalmente viscoelásticas, com um valor final de $\tan \delta \approx 5.6$. O comportamento para os diferentes tipos de HRE imobilizados foram semelhantes e a média dos parâmetros calculados encontram-se na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Valores médios dos parâmetros físicos para todos os tipos de DNA imobilizados.

G' (kPa)	G'' (kPa)	h (nm)	$\tan \delta$	η' (mPa · s)
20.2 ± 9.5	99.3 ± 16.7	11.8 ± 3.4	5.6 ± 1.7	1.5 ± 0.2

O modulo G' variou de forma interessante ao longo do tempo (fig. 5.4(a)). Nos primeiros 100 s houve um rápido aumento até próximo dos 30 kPa seguido de uma descida em transiente até ao valor final de ≈ 18 kPa. Isto sugere que numa primeira fase o DNA aumenta a elasticidade ao aproximar-se da superfície uma vez que está a ocorrer deposição de massa. Na segunda fase a diminuição da elasticidade deve-se provavelmente à reorganização e hidratação características das cadeias de DNA imobilizadas [36, 78]. G'' aumentou (fig. 5.4(b)) seguindo a

tendência da espessura (fig. 5.4(c)) e estabilizou ao fim de 200 s. A viscosidade dinâmica subiu até ≈ 1.5 mPa·s, valor próximo do observado por Lu et al. [79] na adsorção de DNA sobre suporte de sílica.

Uma cadeia completamente estendida de DNA com 38 bp tem um comprimento de ≈ 12.92 nm (≈ 0.34 nm por bp). Segundo modelação [80, 81] (<http://www.lfd.-uci.edu/~gohlke/dnacurve/>) das estruturas das sequências de DNA utilizadas a curvatura máxima ronda os 20° , com comprimento de 12.3 nm (fig 5.4(d)). Um valor muito próximo foi obtido para os diferentes DNAs (tab. 5.2), o que sugere que as cadeias estão bem empacotadas e não estão inclinadas.

Complexos Haa1DBD–HREs

O mesmo procedimento foi utilizado para o estudo das propriedades mecânicas durante a fase de associação do Haa1DBD ao DNA. As medições tiveram como base a monocamada de streptavidina de modo a se obterem valores em relação a todo o complexo proteína–DNA. Para se perceber melhor as alterações impostas pela ligação de Haa1DBD optou-se por representar as variações dos parâmetros em vez dos valores absolutos (fig. 5.5).

G' tem um ligeiro aumento quando Haa1DBD interage com HREwt (fig. 5.5(a)), enquanto que para os outros complexos verificou-se uma descida com maior incidência em HREm6 e controlo. Um parâmetro que teve um comportamento interessante foi a espessura do filme que diminuiu ao longa da interacção de Haa1DBD com HREwt, HREm6 e HREm7. A principal variação ocorreu na interacção com HREwt (-2.5 nm) e HREm7 (-1.5 nm) que em combinação com as maiores variações de G'' (fig. 5.5(b)) sugerem que estes dois complexos apresentam maior empacotamento e restrição conformacional comparativamente a HREm6. A ligação de Haa1DBD com o DNA controlo resultou numa diminuição de G' , manteve os valores de G'' e espessura do DNA sugerindo uma natureza menos compacta

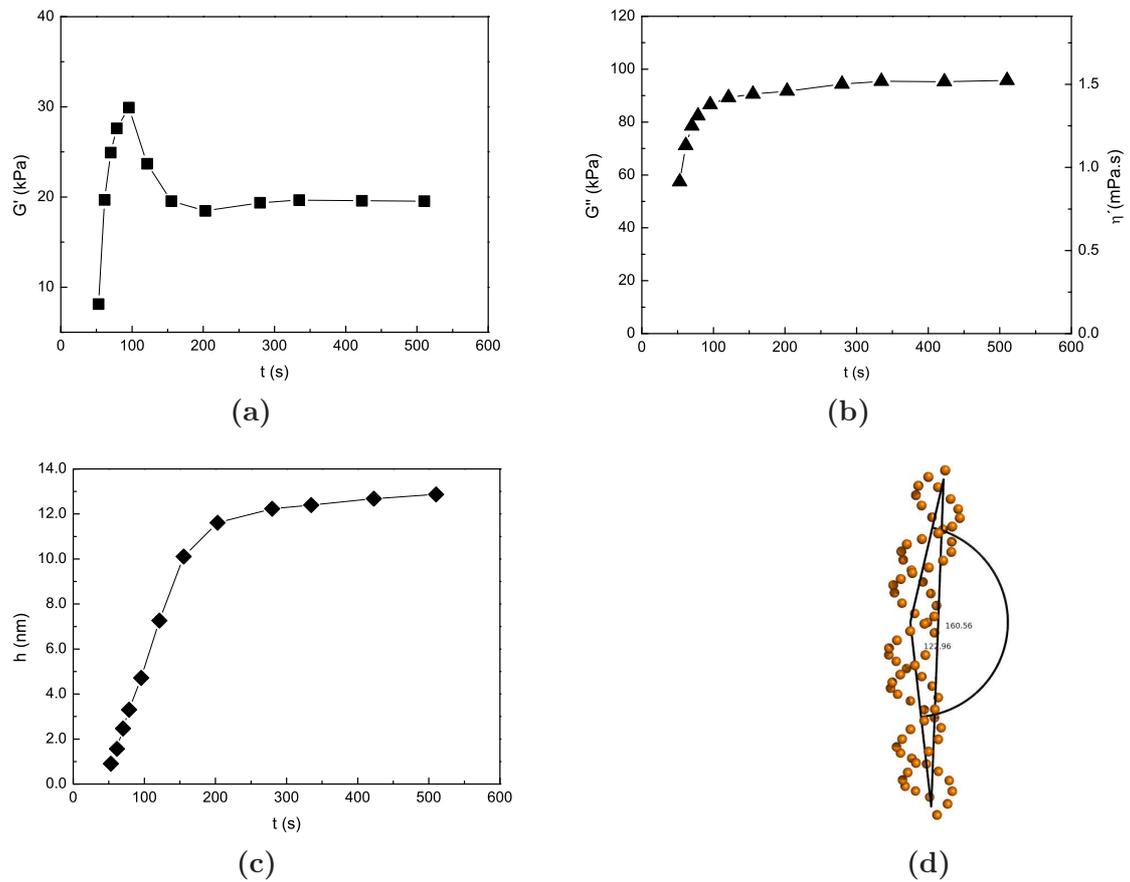


Figura 5.4: Parâmetros reológicos da imobilização de HREwt em função do tempo. (a) *Shear storage*; (b) *shear loss* e viscosidade dinâmica; (c) espessura do filme de DNA; (d) modelo estrutural da curvatura e comprimento do DNA com 38 bp. A calibração inicial foi feita tendo em conta a monocamada de streptavidina.

do filme.

A diminuição da espessura do filme é uma indicação que a ligação da proteína promove uma alteração nas propriedades do DNA. Essa alteração pode ser conformacional, levando a alterações estruturais do complexo ou a alteração da inclinação do DNA [66]. Em ambos os casos é provável que ocorra diminuição do conteúdo de água do filme, como verificado anteriormente para interações proteína–DNA [54]. De facto, analisando a molhabilidade da superfície através de ângulo de contacto verificou-se que existe uma alteração depois da ligação de Haa1DBD (fig. 5.6). Esta técnica é bastante sensível à hidrofobicidade da superfície. Enquanto que um cristal limpo apresenta um carácter hidrofóbico com um ângulo de contacto de aproximadamente 66° , a mesma superfície com HUT:PEG–biotina aumenta bastante a sua molhabilidade (fig. 5.6(a)), diminuindo o ângulo para 21.9° . Esta diminuição deve-se aos grupos hidroxilo do HUT e às cadeias de polietilenoglicol da PEG–biotina que são mais hidrofílicos que o ouro.

A imobilização da streptavidina e do dsDNA não provocaram alterações significativas no ângulo de contacto o que indica que o perfil hidrofílico da superfície não sofreu alterações. No entanto, após ligação de Haa1DBD ao DNA o ângulo de contacto sofreu um aumento significativo de aproximadamente 4.3° (fig. 5.6(b)) o que sugere que o Haa1DBD induziu a formação de uma superfície mais hidrofóbica.

Segundo os resultados obtidos por TLM e medição dos ângulos de contacto a ligação do Haa1DBD ao DNA promove uma alteração estrutural no complexo com aumento da viscosidade e diminuição da espessura, alterando o perfil hidrofílico provavelmente devido à diminuição do conteúdo de água do filme.

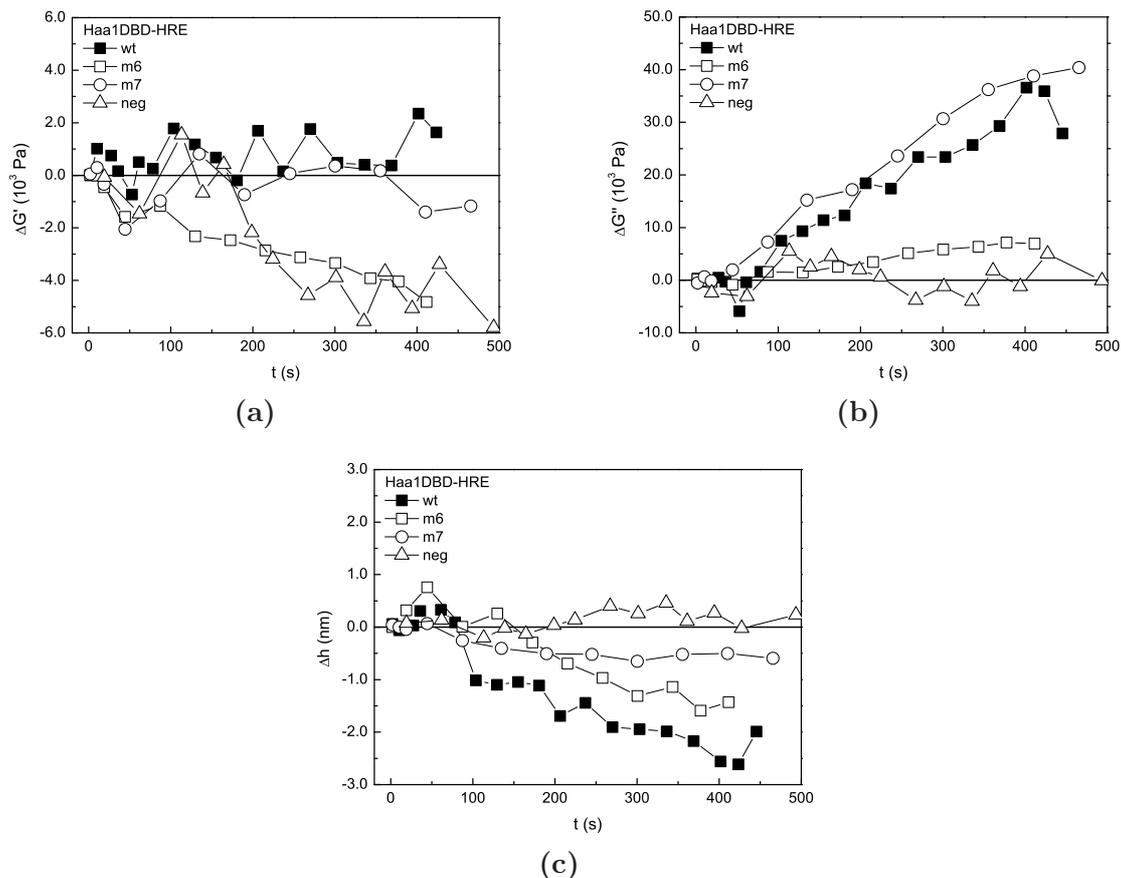


Figura 5.5: Variação das propriedades físicas dos complexos Haa1DBD–HREs. Variações de *shear storage* (a), *shear loss* (b) e espessura do filme (c) em função do tempo. Interação entre Haa1DBD (50 nM) e os diferentes DNAs imobilizados (wt, m6, m7 e controlo negativo). O tempo zero representa o início da interacção e as curvas a fase de associação.

5.4 Conclusões

A formação do complexo proteína–DNA pode ser totalmente caracterizada por QCM assistido por espectroscopia de impedância. Apesar das mutações G→C (m6) e G→A (m7) na posição 8 do HRE não terem afectado significativamente a afinidade por Haa1DBD, uma análise com modelo mais complexo demonstrou diferenças claras nas propriedades mecânicas dos complexos. Os valores obtidos

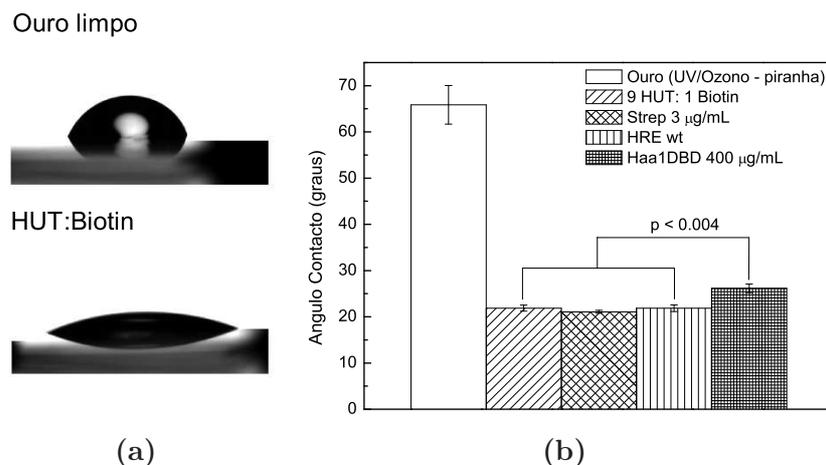


Figura 5.6: (a) Ângulo de contacto entre uma gota de água e a superfície do eléctrodo de ouro limpo e a mesma superfície após 24 h de exposição a HUT:Biotin, 9:1. (b) Variação do ângulo de contacto para as modificações sucessivas da superfície de ouro: não modificada, HUT:Biotin, streptavidina, DNA biotilado de cadeia dupla e Haa1DBD.

de G' e G'' sugerem que o motivo HREwt interage com Haa1DBD de forma mais elástica e viscosa, originando um complexo mais compacto comparativamente aos mutantes. Por outro lado a ligação não específica apresentou uma estrutura menos rígida e com menor interacção com Haa1DBD. Os resultados apresentados neste capítulo indicam que esta técnica de análise pode aplicada a outros complexos e biomoléculas na caracterização das propriedades físicas de interacção.

Capítulo 6

Conclusões gerais e perspectivas futuras

Neste trabalho foi desenvolvido um sistema de QCM de 10 MHz para o estudo em fluxo de interacção de macromoléculas, de forma directa e *label-free*.

Numa primeira fase a QCM de 10 MHz foi aplicada como imunossensor para o estudo da interacção do anticorpo scFv4BL ao antigénio Vif do HIV-1. Como método de análise foi utilizado um circuito oscilador para monitorizar a frequência de ressonância e alternadamente analisada a impedância para validação da relação de Sauerbrey. O immunossensor apresentou uma sensibilidade superior ao antigénio que o anteriormente determinado por sensores de 5 MHz e uma maior afinidade de scFv4BL pelo antigénio Vif, com um K_D estimado uma ordem de grandeza inferior. Este resultado reforça o potencial destes tipo de anticorpos intracelulares como possíveis agentes capazes de neutralizar a proteína Vif.

Seguidamente utilizou-se o mesmo tipo de sensores no estudo da interacção proteína-DNA com uma estratégia de medição em tempo real da impedância perto da frequência de ressonância. Este método demonstrou ser mais versátil, permitindo o cálculo em tempo real dos parâmetros RLC. O método de imobilização

utilizado baseou-se na interacção entre a streptavidina imobilizada no sensor e a biotina presente no DNA. Este método além de permitir uma melhor distribuição e orientação dos oligonucleótidos e demonstrou ser bastante eficiente uma vez que a monocamada de streptavidina tem um comportamento bastante rígido, não dissipando energia da onda acústica.

A interacção entre o factor de transcrição RXR e o seu motivo de ligação ao DNA, DR1, apresentou uma cinética de interacção com K_D na ordem dos nM. As ligações não-específicas demonstraram que têm uma grande importância numa primeira interacção da proteína com o DNA, variando a sua influência com o aumento da força iónica do meio. Por outro lado, o efeito do sal também apresentou influência na interacção do RXR com DR1 na forma de homodímero. Dada a variedade de receptores que interagem com o RXR a QCM poderá ser uma ferramenta útil no estudo destes heterodímeros.

Por último foi estudada a interacção de outro factor de transcrição, Haa1, com a sua sequência específica e mutada pela substituição de uma base. Em termos cinéticos as mutações não apresentaram grandes variações na resposta da QCM, no entanto, a análise de impedância associada com o modelo de TLM demonstraram variações nas propriedades físicas da ligação. A sequência não mutada apresentou um comportamento mais elástico e viscoso, com uma diminuição da espessura do filme de DNA imobilizado, sugerindo uma alteração conformacional superior às sequências mutantes. Como perspectivas futuras este método apresenta potencialidades no estudo e caracterização das propriedades físicas envolvidas na interacção de biomoléculas, nomeadamente na análise de factores de transcrição e sequências de DNA de regiões promotoras.

Referências

- [1] Antonio Arnau and David Soares. *Piezoelectric transducers and applications*, chapter Interface electronic systems for AT-cut QCM sensors: a comprehensive review, pages 1–38. Springer, Berlin, 2nd edition, 2008.
- [2] G. Lippmann. Sur le principe de la conservation de l'électricité ou second principe de la theorie des phénomènes électriques. *Acad. Sci. Paris*, 92:1049–1051, 1881.
- [3] L Hayward and Michael Thompson. Acoustic waves and the study of biochemical macromolecules and cells at the sensor – liquid interface Critical Review. 1999.
- [4] Gunter Sauerbrey. Verwendung von Schwingquarzen zur Wagung dünner Schichten und zur Mikrowagung. *Zeitschrift für Physik*, 155:206–222, 1959.
- [5] T. Nomura and M. Okuhara.
- [6] K. Keiji Kanazawa and Joseph G. Gordon. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Analytical Chemistry*, 57:1770–1771, 1985.
- [7] a Janshoff, HJ Galla, and C Steinem. Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors? *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 39(22):4004–4032, November 2000.
- [8] João M Encarnação, Peter Stallinga, and Guilherme N M Ferreira. Influence of electrolytes in the QCM response: discrimination and quantification of the interference to correct microgravimetric data. *Biosensors & bioelectronics*, 22(7):1351–8, February 2007.
- [9] Stephen J Martin, Victoria Edwards Granstaff, and Gregory C Frye. A Quartz Crystal Microbalance with Simultaneous Mass and Liquid Loading. *Analytical chemistry*, 2281(26):2272–2281, 1991.

-
- [10] João M Encarnação, Luis Rosa, Rogério Rodrigues, Luisa Pedro, Frederico Aires da Silva, João Gonçalves, and Guilherme N M Ferreira. Piezoelectric biosensors for biorecognition analysis: application to the kinetic study of HIV-1 Vif protein binding to recombinant antibodies. *Journal of biotechnology*, 132(2):142–8, October 2007.
- [11] Diethelm Johannsmann and Lars-Oliver Heim. A simple equation predicting the amplitude of motion of quartz crystal resonators. *Journal of Applied Physics*, 100(9):094505, 2006.
- [12] Diethelm Johannsmann, Ilya Reviakine, Elena Rojas, and Marta Gallego. Effect of sample heterogeneity on the interpretation of QCM(-D) data: comparison of combined quartz crystal microbalance/atomic force microscopy measurements with finite element method modeling. *Analytical chemistry*, 80(23):8891–9, December 2008.
- [13] Diethelm Johannsmann. Viscoelastic, mechanical, and dielectric measurements on complex samples with the quartz crystal microbalance. *Physical chemistry chemical physics*, 10(31):4516–34, August 2008.
- [14] Diethelm Johannsmann, Ilya Reviakine, and Ralf P Richter. Dissipation in films of adsorbed nanospheres studied by quartz crystal microbalance (QCM). *Analytical chemistry*, 81(19):8167–76, October 2009.
- [15] Diethelm Johannsmann, Wendelin Bücking, Berthold Bode, and Judith Petri. Simple frequency-based sensing of viscosity and dielectric properties of a liquid using acoustic resonators. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 57(3):677–83, March 2010.
- [16] Atsushi Itoh and Motoko Ichihashi. A frequency of the quartz crystal microbalance (QCM) that is not affected by the viscosity of a liquid. *Measurement Science and Technology*, 19(7):075205, July 2008.
- [17] Ilya Reviakine, Diethelm Johannsmann, and Ralf P Richter. Hearing What You Cannot See and Visualizing What You Hear: Interpreting Quartz Crystal Microbalance Data from Solvated Interfaces. *Analytical Chemistry*, 83:8838–8848, 2011.
- [18] Antonio Arnau, Vittorio Ferrari, David Soares, and Hubert Perrot. *Piezoelectric transducers and applications*, chapter Interface electronic systems for AT-cut QCM sensors: a comprehensive review, pages 117–186. Springer, Berlin, 2nd edition, 2008.

-
- [19] Ralf Lucklum, David Soares, and Kay Kanazawa. *Piezoelectric transducers and applications*, chapter Models for resonant sensors, pages 63–96. Springer, Berlin, 2nd edition, 2008.
- [20] Roberto Etchenique and Thomas Buhse. Anomalous behaviour of the quartz crystal microbalance in the presence of electrolytes. *Analyst*, 125:785–787, 2000.
- [21] Roberto Etchenique and Thomas Buhse. Viscoelasticity in the diffuse electric double layer. Electronic supplementary information (ESI) available: QCM impedance measurements. See <http://www.rsc.org/suppdata/an/b2/b206305k/>. *The Analyst*, 127(10):1347–1352, October 2002.
- [22] X. Yang, J. Goncalves, and D. Gabuzda. Phosphorylation of vif and its role in hiv-1 replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:10121–1012, 1996.
- [23] K. Strebel, D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks, and M. A. Martin. The hiv a (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*, 328:728–730, 1987.
- [24] W J Fessel. A new approach to an aids vaccine: creating antibodies to hiv vif will enable apobec3g to turn hiv-infection into a benign problem. *Medical Hypotheses*, 64:261–263, 2005.
- [25] J. Goncalves, F. Silva, A. F. Vieira, M. Santa-Marta, R. Malho, X. Yang, D. Gabuzda, and C. Barbas III. Functional neutralization of hiv-1 vif protein by intracellular immunization inhibits reverse transcription and viral replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:32036–32045, 2002.
- [26] F. A. da Silva, M. Santa-Marta, A. F. Vieira, P. Mascarenhas, I. Barahona, J. M. Pereira, D. Gabuzda, and J. Goncalves. Camelized rabbit-derived vif single-domain intrabodies against vif strongly neutralize hiv-1 infectivity. *Journal of Molecular Biology*, 340:525–542, 2004.
- [27] J Christopher Love, Lara a Estroff, Jennah K Kriebel, Ralph G Nuzzo, and George M Whitesides. *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology.*, volume 105. April 2005.
- [28] Wei Lv, Zhenming Liu, Hongwei Jin, Xianghui Yu, Liangren Zhang, and Lihe Zhang. Three-dimensional structure of HIV-1 VIF constructed by comparative modeling and the function characterization analyzed by molecular dynamics simulation. *Organic & biomolecular chemistry*, 5(4):617–26, February 2007.

-
- [29] T a Morton, D G Myszk, and I M Chaiken. Interpreting complex binding kinetics from optical biosensors: a comparison of analysis by linearization, the integrated rate equation, and numerical integration., May 1995.
- [30] D J Mangelsdorf and R M Evans. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, 83(6):841–50, December 1995.
- [31] Philippe Lefebvre, Yacir Benomar, and Bart Staels. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(11):676–83, November 2010.
- [32] David M. Heery, Benoit Pierrat, Hinrich Gronemeyer, Pierre Chambon, and Régine Losson. Homo- and heterodimers of the retinoid X receptor (RXR) activate transcription in yeast. *Nucleic Acids Research*, 22(5):726–731, 1994.
- [33] Annemieke Ijpenberg, Soon Tan, Laurent Gelman, Josiane Seydoux, Jianming Xu, Daniel Metzger, Laurence Canaple, and Pierre Chambon. In vivo activation of PPAR target genes by. *The EMBO journal*, 23(April):2083–2091, 2004.
- [34] S M Holmbeck, M P Foster, D R Casimiro, D S Sem, H J Dyson, and P E Wright. High-resolution solution structure of the retinoid X receptor DNA-binding domain. *Journal of molecular biology*, 281(2):271–84, August 1998.
- [35] Jia Xu, Kai-Wei Liu, Kathleen S Matthews, and Sibani L Biswal. Monitoring DNA binding to Escherichia coli lactose repressor using quartz crystal microbalance with dissipation. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 27(8):4900–5, April 2011.
- [36] Xiaodi Su, Ying-Ju Wu, Rudolf Robelek, and Wolfgang Knoll. Surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance study of streptavidin film structure effects on biotinylated DNA assembly and target DNA hybridization. *Langmuir*, 21(1):348–53, January 2005.
- [37] Xiaodi Su, Rudolf Robelek, Yingju Wu, Guangyu Wang, and Wolfgang Knoll. Detection of point mutation and insertion mutations in DNA using a quartz crystal microbalance and MutS, a mismatch binding protein. *Analytical chemistry*, 76(2):489–94, January 2004.
- [38] Yolanda Jim. A Contribution To Solve the Problem of Crystal Microbalance Applications. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 53(5):1057–1072, 2006.

-
- [39] Guilherme N M Ferreira, Ana-Carina Da-Silva, and Brigitte Tomé. Acoustic wave biosensors: physical models and biological applications of quartz crystal microbalance. *Trends in biotechnology*, 27(12):689–97, December 2009.
- [40] Wei Tang, Dingzhong Wang, Yi Xu, Na Li, and Feng Liu. A self-assembled DNA nanostructure-amplified quartz crystal microbalance with dissipation biosensing platform for nucleic acids. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 48(53):6678–80, July 2012.
- [41] Garret C DeNolf, Larry Haack, Joe Holubka, Ann Straccia, Kay Blohowiak, Chris Broadbent, and Kenneth R Shull. High frequency rheometry of viscoelastic coatings with the quartz crystal microbalance. *Langmuir*, 27(16):9873–9, August 2011.
- [42] George Papadakis, Achilleas Tsortos, Konstantinos Mitsakakis, and Electra Gizeli. Characterization of DNA-Hv1 histone interactions; discrimination of DNA size and shape. *FEBS letters*, 584(5):935–40, March 2010.
- [43] Achilleas Tsortos, George Papadakis, Konstantinos Mitsakakis, Kathryn a Melzak, and Electra Gizeli. Quantitative determination of size and shape of surface-bound DNA using an acoustic wave sensor. *Biophysical journal*, 94(7):2706–15, April 2008.
- [44] Hongbo Su and Michael Thompson. Rheological and interfacial properties of nucleic acid films studied by thickness shear mode sensor and network analysis - shear mode sensor and network analysis. *Canadian journal of chemistry*, 358:344–358, 1996.
- [45] Kuniharu Ijio, Helmut Ringsdorf, Eckhard Birch-hirschfeld, Siegfried Hoffmann, Ute Schilken, and Michael Strube. Protein-DNA Double and Triple Layers : Interaction of Biotinylated DNA Fragments with Solid Supported Streptavidin Layers WED. *Langmuir*, 7463(21):2796–2800, 1998.
- [46] Guilherme N M Ferreira, João M Encarnação, Luis Rosa, Rogério Rodrigues, Roberta Breyner, Sara Barrento, Luisa Pedro, Frederico Aires da Silva, and João Gonçalves. Recombinant single-chain variable fragment and single domain antibody piezoimmunosensors for detection of HIV1 virion infectivity factor. *Biosensors & bioelectronics*, 23(3):384–92, October 2007.
- [47] M Wilchek and E A Bayer. Avidin–biotin immobilization systems. In T. Cass and F. S. Ligler, editors, *Immobilized Biomolecules in Analysis*, The Practical Approach Series, pages 15–34, New York, 1998. Oxford University Press.

-
- [48] F J Schmitt L Haussling, H Ringsdorf and W Knoll. Biotin–functionalized self–assembled monolayers on gold: Surface plasmon optical studies of specific recognition reactions. *Letters*, 9:1837–1840, 1991.
- [49] H D Abruna T F Paulo and I C N Diogenes. Thermodynamic, kinetic, surface pka, and structural aspects of self- assembled monolayers of thio compounds on gold. *Langmuir*, 28:17825–1783, 2012.
- [50] D K Schwartz. Mechanisms and kinetics of self-assembled monolayer formation. *Annu. Rev. Phys. Chem*, 52:107–137, 2001.
- [51] T Lee W Wang and M A Reed. Mechanism of electron conduction in self-assembled alkanethiol monolayer devices. *Phys. Rev. B*, 68:035416–035422, 2003.
- [52] N Green. Avidin and streptavidin. *Meth. Enzymol.*, 184:51–67, 1990.
- [53] P Stallinga J M Encarnacao, R Baltazar and G N M Ferreira. Piezoelectric biosensors assisted with electroacoustic impedance spectroscopy:a tool for accurate quantitative molecular recognition analysis. *J. Mol. Recognit.*, 22:129–137, 2009.
- [54] Wendy Y X Peh, Erik Reimhult, Huey Fang Teh, Jane S Thomsen, and Xiaodi Su. Understanding ligand binding effects on the conformation of estrogen receptor alpha-DNA complexes: a combinational quartz crystal microbalance with dissipation and surface plasmon resonance study. *Biophysical journal*, 92(12):4415–23, June 2007.
- [55] Dana Vuzman and Yaakov Levy. Intrinsically disordered regions as affinity tuners in protein-DNA interactions. *Molecular bioSystems*, 8(1):47–57, January 2012.
- [56] Anatoly B Kolomeisky. Physics of protein-DNA interactions: mechanisms of facilitated target search. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, 13(6):2088–95, February 2011.
- [57] Huan-Xiang Zhou. Rapid search for specific sites on DNA through conformational switch of nonspecifically bound proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(21):8651–6, May 2011.
- [58] Amir Marcovitz and Yaakov Levy. Frustration in protein – DNA binding influences conformational switching and target search kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:17957–17962, 2011.

-
- [59] Mario a Díaz de la Rosa, Elena F Koslover, Peter J Mulligan, and Andrew J Spakowitz. Dynamic strategies for target-site search by DNA-binding proteins. *Biophysical journal*, 98(12):2943–53, June 2010.
- [60] Amir Marcovitz and Yaakov Levy. Obstacles may facilitate and direct DNA search by proteins. *Biophysical journal*, 104(9):2042–50, May 2013.
- [61] Leonid Mirny, Michael Slutsky, Zeba Wunderlich, Anahita Tafvizi, Jason Leith, and Andrej Kosmrlj. How a protein searches for its site on DNA: the mechanism of facilitated diffusion. *Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical*, 42(43):434013, October 2009.
- [62] B Cheskis and L P Freedman. Modulation of nuclear receptor interactions by ligands: kinetic analysis using surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 35(10):3309–3318, March 1996.
- [63] Darren J Hart, Robert E Speight, Matthew A Cooper, John D Sutherland, and Jonathan M Blackburn. The salt dependence of DNA recognition by NF- κ B p50 : a detailed kinetic analysis of the effects on affinity and specificity. *Nucleic acids research*, 27(4):1063–1069, 1999.
- [64] Q Zhao, S a Chasse, S Devarakonda, M L Sierk, B Ahvazi, and F Rastinejad. Structural basis of RXR-DNA interactions. *Journal of molecular biology*, 296(2):509–20, February 2000.
- [65] M. Thomas Record Jr. Pieter L. DeHaseth, Timothy M. Lohman. Nonspecific interaction of lac repressor with dna: an association reaction driven by counterion release. *Biochemistry*, 16:4783–4790, 1977.
- [66] Peter L Privalov, Anatoly I Dragan, and Colyn Crane-Robinson. Interpreting protein/DNA interactions: distinguishing specific from non-specific and electrostatic from non-electrostatic components. *Nucleic acids research*, 39(7):2483–91, April 2011.
- [67] Benjamin Bouvier, Krystyna Zakrzewska, and Richard Lavery. Protein-DNA recognition triggered by a DNA conformational switch. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 50(29):6516–8, July 2011.
- [68] Charalampos G Kalodimos, Nikolaos Biris, Alexandre M J J Bonvin, Marc M Levandoski, Marc Guennuegues, Rolf Boelens, and Robert Kaptein. Structure and flexibility adaptation in nonspecific and specific protein-DNA complexes. *Science (New York, N. Y.)*, 305(5682):386–9, July 2004.

-
- [69] a R Fernandes, N P Mira, R C Vargas, I Canelhas, and I Sá-Correia. Saccharomyces cerevisiae adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 337(1):95–103, November 2005.
- [70] Nuno P Mira, Jorg D Becker, and Isabel Sá-Correia. Genomic expression program involving the Haa1p-regulon in Saccharomyces cerevisiae response to acetic acid. *Omics : a journal of integrative biology*, 14(5):587–601, October 2010.
- [71] Nuno P Mira, Sílvia F Henriques, Greg Keller, Miguel C Teixeira, Rute G Matos, Cecília M Arraiano, Dennis R Winge, and Isabel Sá-Correia. Identification of a DNA-binding site for the transcription factor Haa1, required for Saccharomyces cerevisiae response to acetic acid stress. *Nucleic acids research*, 39(16):6896–907, September 2011.
- [72] Derek a Abbott, Erwin Suir, Antonius J a van Maris, and Jack T Pronk. Physiological and transcriptional responses to high concentrations of lactic acid in anaerobic chemostat cultures of Saccharomyces cerevisiae. *Applied and environmental microbiology*, 74(18):5759–68, September 2008.
- [73] Miguel C Teixeira, Nuno P Mira, and Isabel Sá-Correia. A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in Saccharomyces cerevisiae. *Current opinion in biotechnology*, 22(2):150–6, April 2011.
- [74] Róbinson Torres Yolanda Jiménez, Román Fernández and Antonio Arnau. A Contribution To Solve the Problem of Crystal Microbalance Applications. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 53(5):1057–1072, 2006.
- [75] Carina Silva. *Acoustic Biosensors for Biomedical and Biotechnology Applications*. PhD thesis, Instituto Superior Tecnico, 2012.
- [76] A Berker. *The mechanics of adhesion*, chapter Rheology for adhesion science and technology, pages 443–498. Adhesion science and engineering – I. Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [77] J Wong, a Chilkoti, and V T Moy. Direct force measurements of the streptavidin-biotin interaction. *Biomolecular engineering*, 16(1-4):45–55, December 1999.
- [78] Charlotte Larsson, Michael Rodahl, and Fredrik Höök. Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization on a 2D arrangement of

streptavidin on a biotin-modified lipid bilayer supported on SiO₂. *Analytical chemistry*, 75(19):5080–7, October 2003.

- [79] Nanxi Lu, Julie L Zilles, and Thanh H Nguyen. Adsorption of extracellular chromosomal DNA and its effects on natural transformation of *Azotobacter vinelandii*. *Applied and environmental microbiology*, 76(13):4179–84, July 2010.
- [80] a Bolshoy, P McNamara, R E Harrington, and E N Trifonov. Curved DNA without A-A: experimental estimation of all 16 DNA wedge angles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6):2312–6, March 1991.
- [81] D S Goodsell and R E Dickerson. Bending and curvature calculations in B-DNA. *Nucleic acids research*, 22(24):5497–503, December 1994.

Anexo 1

Anexo 2