



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Estudo de novos ligandos para purificação de ácidos nucleicos

**Cyrille Feijó**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas  
**Ciências Biomédicas**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Carla Cruz

**Covilhã, outubro de 2014**



**Este trabalho é dedicado  
aos meus pais e ao meu irmão.**



# Agradecimentos

Em primeiro queria agradecer à minha orientadora Professora Carla Cruz, por toda a ajuda que me deu no desenrolar deste trabalho.

Aos meus pais e ao meu irmão por todo o suporte, sacrifício e apoio incondicional que me deram desde sempre.

À minha namorada por toda ajuda e paciência que teve comigo ao longo deste tempo.

A todos os meus amigos e colegas de curso pelo apoio e companheirismo ao longo destes anos.

Aos meus colegas de laboratório por toda ajuda fornecida no decorrer deste trabalho.



# Resumo

A cromatografia de afinidade (AC) baseada em aminoácidos apresenta-se como uma abordagem promissora para purificar DNA de plasmídico (pDNA), uma vez que combina a seletividade de uma interação que ocorre naturalmente, com a simplicidade de um ligando de baixo peso molecular. Este estudo irá concentrar-se na síntese química de dipeptídeos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina, seguida da sua imobilização na matriz sefarose previamente ativada para explorar a possibilidade de utilizar estes suportes na purificação plasmídico do pDNA. Também o aminoácido L-triptofano e o suporte sefarose-L-triptofano foram estudados como estratégia de ligando de afinidade. A síntese química dos dipeptídeos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina foi realizada através da condensação do dicarbonato de di-terc-butila (BOC) com L-triptofano metil éster ou L-arginina metil éster na presença de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Os grupos metilo e BOC foram desprotegidos com hidróxido de sódio e ácido trifluoroacético, respetivamente. As interações específicas entre os suportes sintetizados sefarose L-triptofano, sefarose L-triptofano-L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina e os 5'-mononucleotídeos foram estudados por diferença de transferência de saturação (STD) - ressonância magnética nuclear (RMN). As constantes de dissociação de equilíbrio entre os ligandos L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina e as isoformas superenrolada (sc), circular aberta (oc) e linear (ln) do pVax-LacZ foram determinadas por ressonância de plasmónica de superfície (RPS) utilizando o biosensor ótico Biacore T200 equipado com um *sensor chip* CM5. A imobilização dos ligandos L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina no *sensor chip* CM5 foi efetuada utilizando o método de acoplamento do grupo amina. Por RPS, verifica-se que apenas o ligando L-triptofano-L-triptofano em Tris-HCl tem sinal de RPS com a isoforma circular aberta apresentando afinidade alta ( $K_D = 3,04 \times 10^{-9}$  M). Enquanto que o L-triptofano-L-arginina tem maior afinidade em Hepes a  $T = 10^\circ\text{C}$  com a isoforma linear com  $K_D = 2,51 \times 10^{-9}$  M a isoforma sc é a que apresenta a menor afinidade ( $10^{-7}$  M) com os ligandos a ambas as temperaturas, nomeadamente com o L-triptofano-L-arginina. Por RMN-STD verifica-se que o 5'-TMP interage com os suportes pelo grupo metilo, enquanto que o 5'-AMP interage com os dipeptídeos pela desoxirribose. O 5'-GMP e o 5'-CMP interagem preferencialmente com L-triptofano e L-triptofano-L-triptofano pelos protoes adajcentes ao grupo fosfato. Desta modo, a utilização das técnicas STD-RMN e SPR permitiu fazer o *screening* das interações dos ligandos-5' mononucleótidos e determinar a afinidade do ligando:plasmideo para a purificação do pDNA em AC.

## Palavras-chave

L-triptofano, dipeptídeos, DNA plasmídico, Ressonância magnética nuclear, Ressonância Plasmónica de Superfície



# Abstract

Amino acid-based affinity chromatography appears as a promising approach to purify plasmid DNA since it combines the selectivity of a naturally occurring interaction with the simplicity of a single small ligand. This study will focus on the chemical synthesis of the dipeptides L-tryptophan-L-tryptophan and L-tryptophan-L-arginine, follow by their immobilization on activated Sepharose to explore the possibility of using these supports in plasmid purification. The amino acid L-tryptophan and their support are also studied as affinity ligand. The synthesis of the L-tryptophan-tryptophan and L-tryptophan-arginine were performed by condensation of N-tertbutoxycarbonyl (BOC) tryptophan with L- tryptophan or L-arginine methyl esters in the presence of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). The deprotection of methyl group and BOC is done with sodium hydroxide and trifluoroacetic acid, respectively. The specific interactions between the supports L-tryptophan, L-tryptophan-tryptophan and L-tryptophan-arginine, previously synthesized, and 5'-mononucleotides are accomplished by saturation transfer difference (STD)-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. The binding affinity of L-tryptophan, L-tryptophan-L-tryptophan and L-tryptophan-L-arginine towards supercoiled (sc), open-circular (oc) and linear (ln) isoforms of pVax-LacZ is determined by measuring the equilibrium dissociation constants ( $K_D$ ) by surface plasmon resonance (SPR) using the biosensor T200 equipped with a CM5 sensor chip. The immobilization of L-tryptophan, L-tryptophan-L-tryptophan and L-tryptophan-L-arginine on CM5 surface was performed using the amine-coupling method. From SPR, in Tris-HCl only signals are finding to open-circular and the highest affinity is with L-tryptophan-L-tryptophan ( $K_D=3,04 \times 10^{-9}M$ ) at  $T=10^\circ C$ . While in Hepes, the L-tryptophan-L-arginine has the highest affinity with linear isoform ( $K_D= 2,51 \times 10^{-9}M$ ) at  $T=10^\circ C$ . The sc isoform show the lowest affinity ( $10^{-7}M$ ) with all ligands surface at both temperatures, namely with L-tryptophan-L-arginine. From STD-NMR, 5'-TMP interact namely through the methyl group of thymine, while 5'-AMP interact with the dipeptides through the deoxyribose. The 5'-GMP and 5'-CMP interact with L-tryptophan and L-tryptophan-L-tryptophan namely through protons adjacent to phosphat group. Thus, STD-NMR and SPR techniques allow us to screen the interactions of supports-5' mononucleotides and determine the binding affinity of these ligands to plasmid isoforms for application in AC.

## Keywords

L-tryptophan, dipeptides, plasmid DNA, Nuclear magnetic resonance, Surface plasmon resonance.



# Índice

Capítulo 1- Introdução .....	20
1. Terapia génica .....	20
1.1. Vetores virais e não virais.....	20
1.2. DNA plasmídico (pDNA) .....	21
1.2.1. Características do DNA plasmídico .....	22
1.3. Produção do DNA plasmídico.....	24
1.4. Purificação do DNA plasmídico .....	25
1.4.1. Técnicas cromatográficas .....	25
1.5. Técnicas de análise do reconhecimento molecular.....	29
1.5.1. Ressonância Plasmónica de Superfície (RPS) .....	29
1.5.2. RMN-STD (Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação) .....	30
1.5.3. Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS RMN) .....	32
Capítulo 2- Materiais e Métodos.....	33
1. Métodos .....	33
1.1. Síntese Química .....	33
1.2. Síntese e caracterização dos suportes sefarose L-triptofano- L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina .....	40
1.2.1. Caracterização dos suportes sefarose L-triptofano- L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina por HR-MAS .....	40
1.3. Produção de DNA plasmídico .....	40
1.3.1. Pré-fermentação .....	41
1.3.2. Fermentação .....	41
1.3.3. Lise celular do DNA plasmídico usando o kit Qiagen (Maxi) .....	41
1.4. Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação (RMN-STD) .....	42
1.5. Ressonância Plasmónica de Superfície (RPS) baseada no biosensor ótico .....	44
Capítulo 3- Resultados e Discussão .....	45
Síntese química dos ligandos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina .....	45

Análise da Interação entre os suportes e os 5´ mononucleótidos por RMN-STD.....	46
Análise da afinidade das isoformas do plasmídeo <i>pVax-LacZ</i> com os ligandos por Ressonância Plasmónica de Superfície (RPS) .....	50
Capítulo 4- Conclusão .....	55
Capítulo 5- Perspetivas futuras.....	56
Capítulo 6- Bibliografia .....	57



# Lista de Figuras

Figura 1– Esquema do pVax- <i>Lacz</i> .....	22
Figura 2- Representação das isoformas do DNA plasmídico: superenrolada (a), circular aberta (b) e linear (c) (adaptado da referência (10))......	23
Figura 3- Electroforese do pVax- <i>Lacz</i> .....	23
Figura 4- Representação do processo de produção do pDNA super enrolado para aplicações clínicas (adaptado de (11))......	24
Figura 5- Síntese química do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano. ....	29
Figura 6- Esquema do funcionamento da RPS (adaptado de (33)). ....	30
Figura 7- Representação esquemática da RMN-STD (adaptado de (34)). ....	31
Figura 8- Síntese do L-triptofano metil éster.....	33
Figura 9- TOF-MS do L-triptofano metil éster. ....	34
Figura 10- Reação de síntese Boc-L-triptofano. ....	35
Figura 11- TOF-MS do BOC L-triptofano. ....	36
Figura 12- Formação da ligação peptídica. ....	36
Figura 13- TOF-MS L-triptofano-L-triptofano. ....	37
Figura 14- Reação de hidrólise do grupo metilo. ....	37
Figura 15- Reação de acidificação com TFA do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano. ....	38
Figura 16- Reação de desproteção do dipeptídeo L-triptofano-L-arginina. ....	39
Figura 17- Estruturas químicas dos (a) L-triptofano-L-triptofano, (b) L-triptofano-L-arginina e (c) L-triptofano. ....	45
Figura 18- % de STD dos 5´-mononucleótidos com o suporte sefarose L-triptofano.....	47
Figura 19- % de STD dos 5´-mononucleótidos com o suporte sefarose L-triptofano-L-triptofano. ....	48
Figura 20- % de STD dos 5´-mononucleótidos com o suporte sefarose L-triptofano-L-arginina. ....	49
Figura 21- Sensogramas e curva resposta (RU) vs concentração da isoforma oc em Tris-HCl a T=10°C com o ligando L-triptofano-L-triptofano (A) e em (B) temperatura T= 25°C com o ligando L-triptofano.....	51
Figura 22- Sensogramas e curva resposta (RU) vs concentração em Hepes a T=25°C. (A) usando a isoforma circular aberto(oc) com o ligando L-triptofano-L-arginina, (B) isoforma linear (ln) e o ligando L-triptofano e (C) isoforma superenrolada (sc) e o ligando L-triptofano-L-arginina.....	53



## Lista de Tabelas

Tabela 1- Técnicas cromatográficas para purificação de pDNA (15). .....	25
Tabela 2- Métodos de cromatografia de afinidade para a purificação de ácidos nucleicos (15). .....	27
Tabela 3- Preparação das soluções para RMN-STD. ....	43
Tabela 4- <i>Constantes de dissociação (<math>K_D</math>) obtidas para os ensaios com o tampão Tris-HCl 10 mM a <math>T=10^\circ\text{C}</math> e <math>25^\circ\text{C}</math>. .....</i>	53
Tabela 5- <i>Constantes de dissociação (<math>K_D</math>) obtidas para os ensaios com o tampão Hepes ácido 10 mM a <math>T=10^\circ\text{C}</math> e <math>25^\circ\text{C}</math>. .....</i>	53



## Lista de Acrónimos

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Trp	L-Triptofano
pDNA	DNA plasmídico
sc	Isoforma super enrolada
oc	Isoforma circular aberto
ln	Isoforma linear
trp-trp	L-Triptofano-Triptofano
trp-arg	L-Triptofano-Arginina
RPS	Ressonância plasmônica de superfície
RMN-STD	Ressonância Magnética Nuclear - diferença de transferência de saturação



# Capítulo 1- Introdução

## 1. Terapia génica

A tecnologia do DNA recombinante e a sequenciação do genoma humano desenvolveram as áreas da terapia génica e das vacinas de DNA (1). Atualmente, a terapia génica, apresenta-se como uma estratégia promissora no tratamento e prevenção de doenças genéticas ou doenças adquiridas, tais como o cancro e SIDA (1). A metodologia geral envolve a substituição de um ou mais genes funcionais que codificam as proteínas deficientes, ou a introdução de genes específicos que codificam proteínas alvo e que podem estimular uma resposta imunitária - vacinas de DNA (2, 3). Em ambos os casos, o objetivo é a expressão estável e regulável, em termos temporais e quantitativos do transgene (4). Os genes podem ser introduzidos de duas formas: através de células específicas isoladas, modificadas geneticamente e reintroduzidas no organismo; ou transferência dos transgenes diretamente para o tecido alvo por intermédio de vetores. O papel destes vetores é introduzir o transgene no núcleo da célula-alvo, sem a afetar. A degradação do DNA por nucleases ou a sua eliminação pelo sistema imunitário, devem ser minimizadas para que a expressão da proteína seja máxima. Por outro lado, um vetor clinicamente relevante deverá apresentar baixos custos económicos e facilidade de produção e purificação em grande escala (1).

### 1.1. Vetores virais e não virais

Os vetores virais foram a primeira geração de vetores utilizados na terapia génica. Por engenharia genética, os genes responsáveis pela infecciosidade viral foram substituídos pelos genes de interesse. Assim, os vetores virais utilizados em terapia génica são capazes de transferir o seu material genético, mas não conseguem replicar-se e prosseguir o seu ciclo. A utilização de vetores virais na entrega de genes revelou desvantagens como a integração do vetor em regiões codificantes do genoma do hospedeiro, questões de segurança e de regulação devido à sua toxicidade e imunogenicidade, bem como a possibilidade de ativação e desativação de genes supressores de tumores (1). Devido a estas razões, vetores não-virais surgiram como uma segunda alternativa originando um aumento na utilização destes sistemas para entrega dos ácidos nucleicos às células alvo. Um vetor não-viral consiste numa molécula de DNA plasmídico (pDNA) contendo um ou mais genes terapêuticos que, uma vez expressos nas células hospedeiras, potenciam imunidade contra doenças infecciosas (3). As vacinas

baseadas em pDNA são mais seguras, não ativam as respostas imunitárias, são produzidas rapidamente e com maior facilidade e apresentam custos mais baixos do que outros tipos de vacinas (1). Para além disso, são estáveis, mesmo a temperaturas elevadas, o que pode ser vantajoso em regiões onde os sistemas de refrigeração escasseiam (1). As limitações das vacinas de DNA residem no facto de os plasmídeos não reconhecerem alvos específicos, como acontece na utilização de sistemas virais especializados, e no facto de serem especialmente suscetíveis à degradação por nucleases. Isto traduz-se na redução da quantidade de pDNA que atinge o núcleo das células-alvo, comprometendo assim, a expressão dos genes. Para ultrapassar estas limitações, têm sido desenvolvido estratégias que visam o aumento da eficiência de transfecção (2, 3).

## 1.2. DNA plasmídico (pDNA)

Um plasmídeo é uma molécula de DNA circular de dupla cadeia que contém: i) um gene que codifica a proteína de interesse e ii) elementos necessários para a sua expressão (5). Os plasmídeos são normalmente produzidos em larga escala por cultura de células de uma estirpe de *Escherichia coli* (*E. coli*) como, por exemplo, a *DH5a* (6). Existem vários plasmídeos disponíveis comercialmente, tais como pVax-LacZ. Muitos dos vetores plasmídicos contêm vários elementos comuns (Figura 1): um promotor eucariótico, normalmente de origem viral (promotor do citomegalovírus (CMV)); um local de clonagem a jusante do promotor, para inserção do gene; uma sequência de poliadenilação, que estabiliza os transcritos e aumenta a eficiência do promotor; uma marca de resistência a um antibiótico (e.g., canamicina); e uma origem de replicação que origina um elevado número de cópias (500-700 cópias por célula) (7).

O baixo conteúdo de pDNA (< 3%) nas células de *E. coli* e a sua similaridade relativamente às propriedades de carga e tamanho com os principais contaminantes (RNA e gDNA) tornam o processo de purificação complexo.

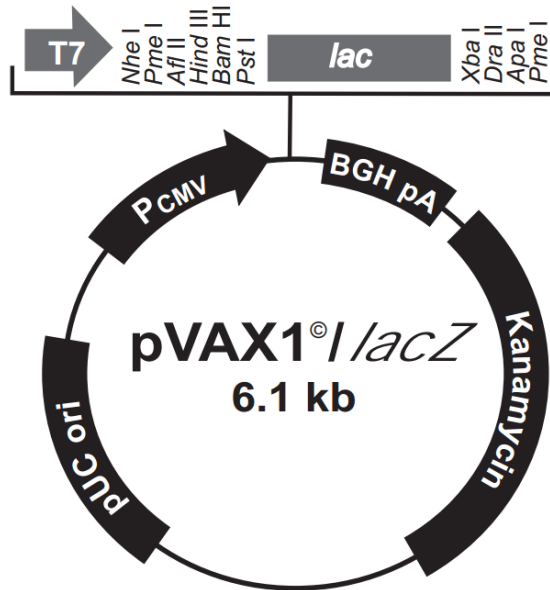


Figura 1- Esquema do pVax-Lacz.

### 1.2.1. Características do DNA plasmídico

O pDNA pode adquirir diferentes conformações (isoformas) nomeadamente a conformação superenrolada (sc), a conformação circular aberta (oc), linear (ln), e multímeros, que variam na sua estabilidade (8).

A conformação sc surge quando a molécula se enrola sobre si mesma. Quando há quebra, química ou enzimática, de uma ligação fosfodiéster origina a isoforma oc. Quando o corte ocorre em ambas as cadeias da dupla hélice, o pDNA adquire uma conformação linear (9). A elevada concentração de DNA em *E. coli* e a presença de topoisomerases permitem a formação de multímeros que são duas ou mais moléculas de DNA circular encadeadas umas nas outras (5).

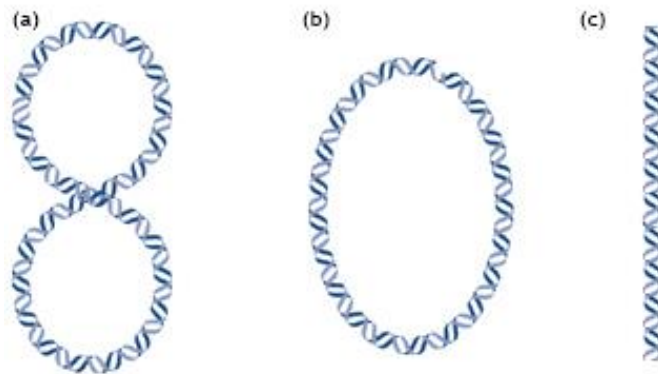


Figura 2- Representação das isoformas do DNA plasmídico: superenrolada (a), circular aberta (b) e linear (c) (adaptado da referência (10)).

É possível observar as isoformas do plasmídeo recorrendo a eletroforese em géis de agarose. Devido à sua natureza polianiónica, as moléculas de DNA migram em direção ao ânodo (carregado positivamente). Por outro lado, e uma vez que o gel de agarose é poroso, as moléculas mais compactas irão migrar mais rapidamente. Assim, a molécula sc, sendo a mais compacta, migra mais, seguida da isoforma ln, enquanto a conformação oc surge mais próxima do pólo negativo.

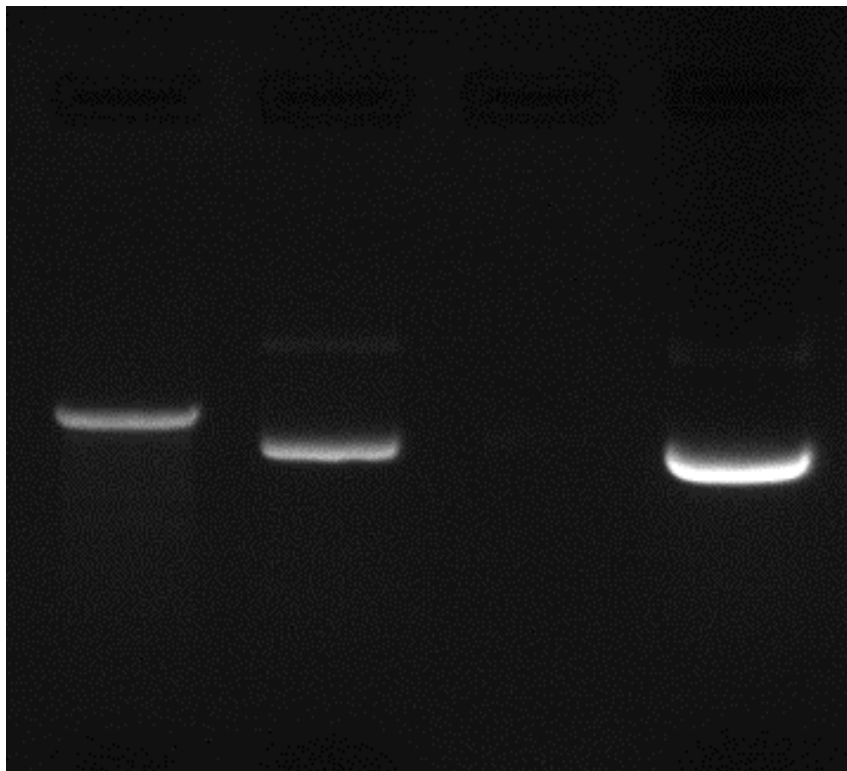


Figura 3- Electroforese do pVax-Lacz.

### 1.3. Produção do DNA plasmídico

A produção do pDNA inicia-se com a construção de vetores de expressão apropriada, em cultura de *E. coli*, por exemplo utilizando a estirpe *DH5a* seguido da otimização das condições de fermentação, crescimento celular e finalmente o isolamento e purificação.

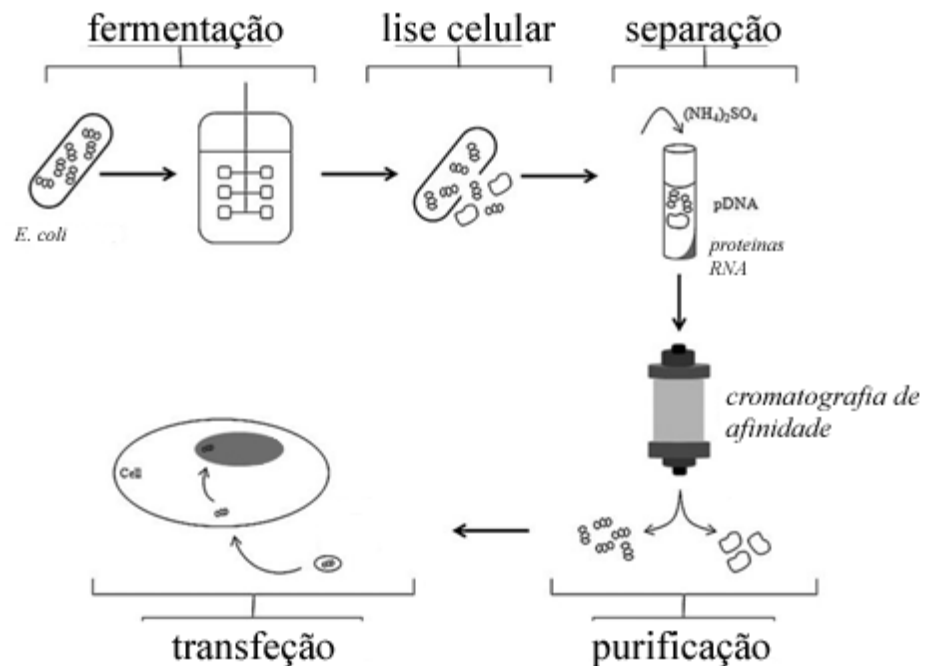


Figura 4- Representação do processo de produção do pDNA super enrolado para aplicações clínicas (adaptado de (11)).

A estratégia de fermentação deve ser estabelecida de forma a obter elevadas densidades celulares em condições que permitam a replicação e estabilidade plasmídica, aumentando-se deste modo o número de cópias durante o crescimento celular. Ao otimizar o rendimento do pDNA para uso terapêutico, há que ter em conta a densidade celular, número elevado de cópias de plasmídeos e qualidade do plasmídeo (6). A desintegração celular (ruptura da célula hospedeira para libertar o produto desejado) deve ser completa e com rendimentos de integridade do produto elevada de modo a que possa ser usado em escala industrial (12). Na desintegração os componentes pDNA, RNA, gDNA, endotoxinas e proteínas são libertados e a recuperação de grandes quantidades da isoforma sc do pDNA são cruciais a fim de se obterem elevados rendimentos. Contudo, verifica-se que parte da conformação sc sofre cortes de cadeia simples ou dupla, formando assim, espécies lineares e circulares abertas. A agência reguladora americana, FDA (Food and Drug Administration), recomenda que as vacinas de DNA contenham mais de 80% do plasmídeo na conformação sc (13). Isto porque a isoforma sc tem uma atividade biológica superior quando comparada com outras

isoformas. Deste modo, a otimização do processo de purificação torna-se importante para obedecer aos requisitos da FDA.

## 1.4. Purificação do DNA plasmídico

### 1.4.1. Técnicas cromatográficas

A cromatografia é uma das técnicas para a purificação do pDNA, (14, 15). Têm sido utilizados vários métodos cromatográficos para a purificação do pDNA, resumidos na tabela 1. A cromatografia de exclusão de tamanho efetua a separação dos componentes com base nos diferentes tamanhos de componentes presentes na amostra, a sua resolução é baixa e é difícil separar a isoforma sc num único passo, mas por outro lado permite separar o pDNA do ácido ribonucleico (RNA) (16, 17).

Tabela 1- Técnicas cromatográficas para purificação de pDNA (15).

Tipos de cromatografia	Vantagens	Desvantagens
Troca iónica	Separação de super enrolado (sc) do circular aberto (oc) pDNA	O RNA pode eluir com DNA; Resolução relativamente baixa entre pDNA e endotoxinas.
Interações hidrofóbicas	Aplicação a escalas industriais e analíticas; Separação eficiente de pDNA a partir de ácidos nucleicos e endotoxinas	Eluição a altas concentrações de sal; Interação não específica com o pDNA; Difícil separação das isoformas de pDNA.
Interações de Afinidade	Maior produtividade Menos etapas	Origem dos ligandos
Adsorção tiofílica	Separação do pDNA de impurezas; Separação das isoformas de pDNA.	Eluição a altas concentrações de sal.

A cromatografia de troca iónica é uma das técnicas mais usadas na purificação de pDNA, pela possibilidade de serem feitas análises e separações rápidas utilizando-se um eluente salino para promover a sua dissociação (15, 18, 19). Consegue-se separar a isoforma sc da circular aberta (oc) visto a primeira ser mais compacta e ter uma densidade de carga maior. No entanto os contaminantes como as endotoxinas, RNA e o DNA genómico (gDNA) são semelhantes em termos de carga o que dificulta a sua separação (18-20).

Na cromatografia baseada nas interações hidrofóbicas, a purificação da amostra baseia-se nas interações hidrofóbicas, nas quais as endotoxinas, pDNA e ácidos nucleicos de cadeia simples têm retenções diferentes (17, 21). Utiliza-se concentrações elevadas de sal, que em termos industriais são uma desvantagem (22, 23)

Na cromatografia de afinidade, os ligandos são ligados covalentemente a uma matriz, como por exemplo á agarose e têm estruturas químicas muito diferentes de modo a formarem um complexo específico e reversível com a biomolécula alvo, sendo a sua seleção importante no sucesso da purificação por afinidade. Podem ser compostos de elevado peso molecular, como inibidores de enzimas, e compostos de baixo peso molecular, como aminoácidos, peptídeos.

Na tabela 2 encontram-se exemplos de tipos de ligandos que podem ser utilizados na purificação de ácidos nucleicos utilizando a cromatografia de afinidade (15).

Na cromatografia de afinidade com metal imobilizado (IMAC), as matrizes utilizadas são carregadas com agentes quelantes e as suas interações podem ser quebradas com um agente competidor.

A inacessibilidade das bases azotadas aromáticas do pDNA imobilizado em iões metálicos dificulta a sua interacção com qualquer matriz de IMAC, ao passo que, a flexibilidade das endotoxinas induzem elevadas interações de afinidade para todos os metais de transição testados . Deste modo, a preferência de interacção de afinidade com o metal imobilizado segue a seguinte ordem: endotoxina > RNA > pDNA.(15, 24, 25).

A cromatografia de afinidade por hélice tripla (THAC) baseia-se na interação específica de um oligonucleótido de pirimidina que esta covalentemente ligado a uma matriz cromatográfica e se vai ligar ao DNA de cadeia dupla formando pontes de hidrogénio *Hoogsteen*. Para esta ligação se dar é necessário adicionar ao pDNA uma sequencia de homopurina. Estas ligações formam-se lentamente por isso torna esta técnica demorada. Estas triplas hélices só são estáveis cum uma solução ligeiramente acida, para ocorrer a rutura destas ligações basta que a solução fique alcalina Com esta técnica é possível separar sc pDNA no entanto tem rendimentos baixos.

A cromatografia de afinidade DNA - proteína explora as interações DNA-proteína para purificar pDNA. Para que as proteínas atuem como ligandos com especificidade para pDNA necessitam de se ligar a sequências específicas do DNA. O pDNA vai poder ser recuperado com uma eluição competitiva, esta técnica possui um rendimento baixo e tem a desvantagem da contaminação com gDNA (15, 26).

Tabela 2- Métodos de cromatografia de afinidade para a purificação de ácidos nucleicos (15).

Tipo de afinidade	Princípio	Ligação específica	Vantagens	Desvantagens
Imobilização metal-íon	Ligandos carregados com íons metálicos que interagem especificamente com átomos de nitrogénio aromáticos	Ácidos nucleicos de cadeia simples	Elimina endotoxinas; Separação de pDNA desnaturado.	Fluxo contínuo de pDNA; Eluição de todas as isoformas de DNA.
Hélix tripla	Sequências específicas presentes no DNA são reconhecidas por um oligonucleótido imobilizado, formando uma hélice tripla	DNA de dupla cadeia	Separação de sc pDNA de uma vez; Reduz os níveis de contaminação de RNA,	lavagem; Baixos rendimentos; Formação da tripla hélice lenta;
Proteína-DNA	Proteína(s) imobilizada(s) na matriz reconhece especificamente DNA	pDNA	com base na sua sequência; Separação de pDNA a partir de lisados tatados;	Rendimentos relativamente baixos; Contaminações com gDNA.
Amino ácido - DNA	Varias interações entre os aminoácidos imobilizados e os ácidos nucleicos	Sc pDNA	Purificação de sc pDNA em um passo; Capaz de purificar o pDNA de RNA, gDNA, proteínas e endotoxinas.	
Polimixina B	A polimixina B reconhece especificamente a estrutura de lípido das endotoxinas.	Endotoxinas	Elimina a contaminação de endotoxinas do pDNA	Interação não específica do ligando com o pDNA; Baixos rendimentos; Toxicidade provocada pela polimixina B

Alguns dos aminoácidos utilizados na AC foram a L-histidina e a L-arginina e interagem preferencialmente com bases específicas de ácidos nucleicos(15, 27, 28). No caso da L-histidina em AC verificou-se que ao utilizar um gradiente de sal adequado, a isoforma oc elui ao passo que a isoforma sc do pDNA interage com a L-histidina (29). No caso da L-arginina verificou-se que separa eficientemente as isoformas sc e oc do pDNA. E a eluição era realizada com sal. As interações envolvidas foram electroestáticas, hidrofóbicas e pontes de hidrogénio. Verificou-se que a arginina liga-se preferencialmente à guanina e a eluição era com concentração baixa de sal (28, 30).

Como os aminoácidos promovem interações específicas com os ácidos nucleicos, há a necessidade de utilizar outros aminoácidos para compreender melhor o reconhecimento molecular aminoácido-pDNA. O L-triptofano e os dipeptídeos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina foram utilizados nos estudos de reconhecimento molecular das isoformas do pVax-*LacZ* (6.05 kbp) e 5´-mononucleotídeos.

A síntese do dipeptídeo realizou-se em três etapas. Uma das limitações na síntese destes dipeptídeos é a escolha dos grupos protetores adequados. Atualmente os grupos do tipo carbamato são amplamente usados para proteger o grupo amina dos aminoácidos, no caso deste trabalho usou-se o dicarbonato de di-terc-butila (BOC) para a proteção do -NH<sub>2</sub>, enquanto que a proteção do grupo carboxílico do aminoácido foi um grupo alquílico. Os dois intermediários anteriormente sintetizados foram dissolvidos em tetrahidrofurano (THF) e a ligação peptídica foi formada na presença de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC). A remoção dos grupos protetores foi realizada por hidrólise com hidróxido de sódio e acidificação com ácido trifluoracético (TFA). Depois de sintetizados os dipeptídeos foram imobilizados na sefarose, para serem posteriormente utilizados em cromatografia de afinidade.

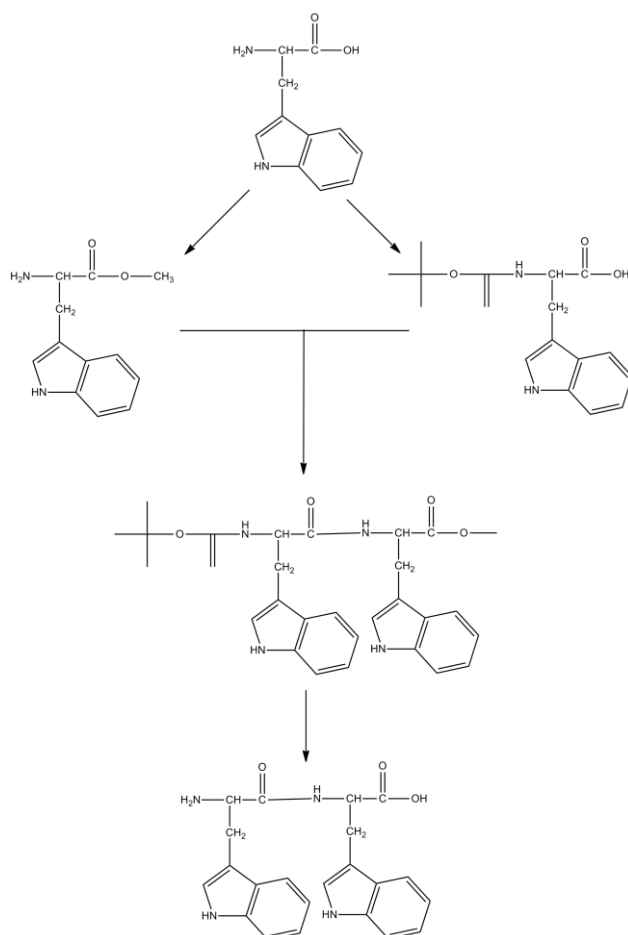


Figura 5- Síntese química do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano.

## 1.5. Técnicas de análise do reconhecimento molecular

### 1.5.1. Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS)

A ressonância plasmônica de superfície (RPS) baseada num biossensor ótico mede a variação do índice de refração no metal, onde vai incidir um feixe de luz com formando-se os plasmons. A variação do ângulo de refração é diretamente proporcional à massa de analito que interage com o ligando imobilizado. (31). A variação do angulo de refração pode ser analisada e convertida em constantes de associação e de dissociação de equilíbrio e coeficientes cinéticos. Na Figura 4 apresenta-se o princípio da RPS baseada no biossensor ótico (31). Esta técnica permite avaliar as interações que ocorrem entre o ligando e a molécula alvo como exemplo anticorpo-antigénio, ligando-recetor, proteína-acido nucleico, DNA-DNA, DNA-proteína, lípido-proteína, pDNA-aminoácido (32).

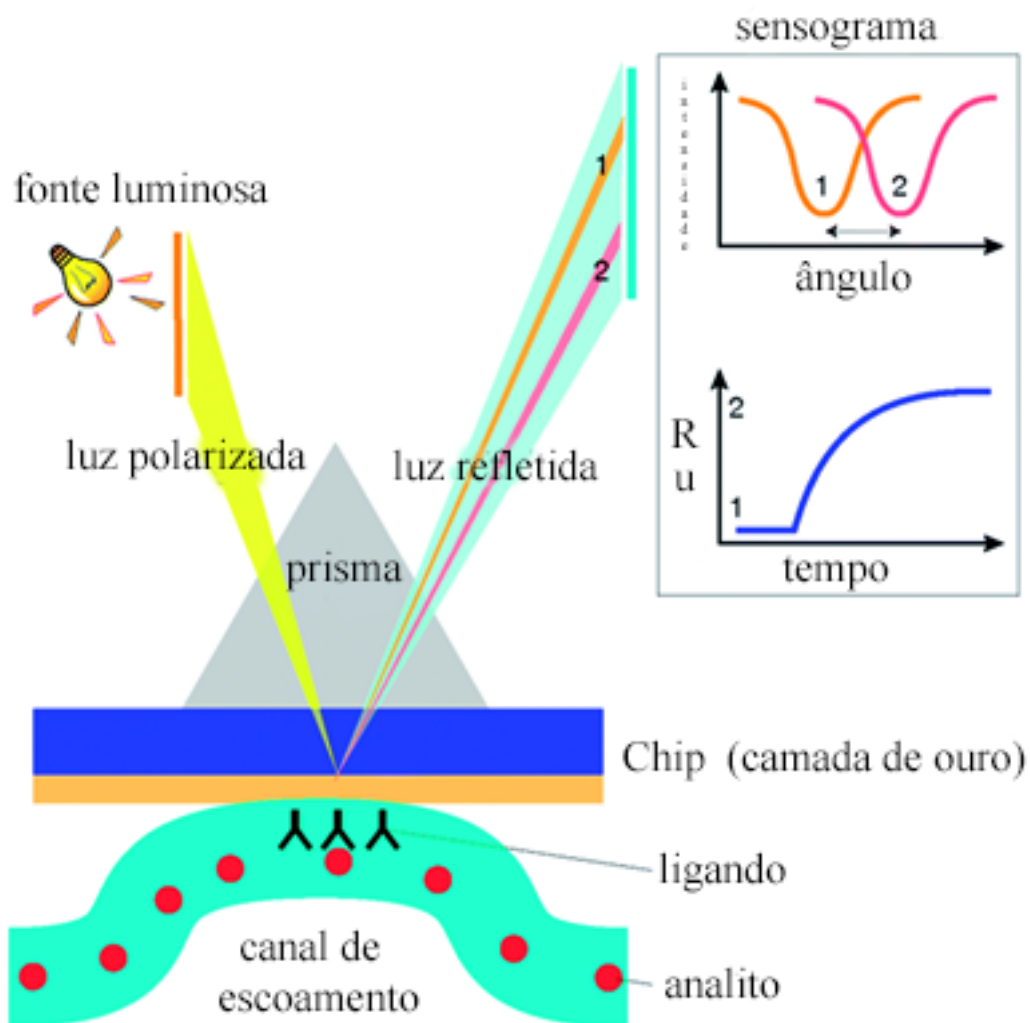


Figura 6- Esquema do funcionamento da RPS (adaptado de (33)).

### 1.5.2. RMN-STD (Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação)

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) - diferença de transferência de saturação (STD), baseia-se na transferência de magnetização de uma biomolécula para moléculas de baixo peso molecular, permitindo avaliar a existência de uma possível interação entre o ligando e a biomolécula. A técnica de RMN-STD resulta da diferença entre o espectro de transferência de saturação e o espectro de RMN usual. A uma solução de biomolécula é adicionado o ligando e recolhe-se um espectro de próton ( $^1\text{H}$  RMN), onde a biomolécula é seletivamente irradiada a uma frequência afastada do sinal mais próximo do ligando (pelo menos 700 Hz) - espectro *on-resonance*. Caso o composto esteja ligado à biomolécula, ocorre

transferência de saturação, dependente do tempo de contacto entre a biomolécula e o ligando. De seguida, realiza-se uma nova irradiação, para valores de frequência afastados de qualquer sinal (biomolécula ou ligando) - espectro *off-resonance*. Através da subtração do espectro *on-resonance* e o espectro *off-resonance* resulta um espectro contendo unicamente os sinais dos prótons do ligando que efetivamente se ligou à biomolécula designado por espectro de STD.

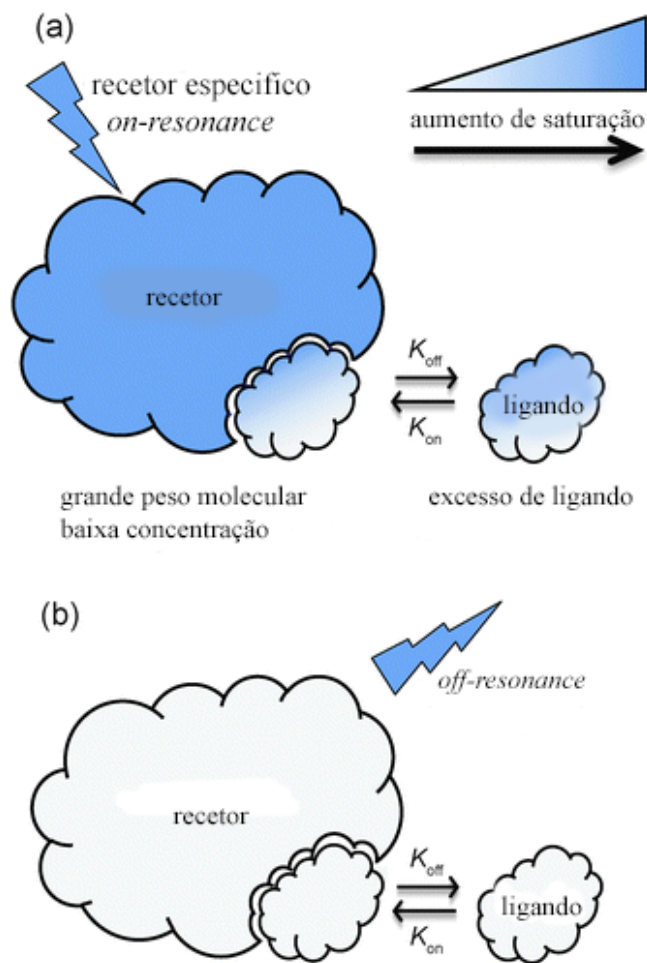


Figura 7- Representação esquemática da RMN-STD (adaptado de (34)).

Os ensaios de RMN-STD permitem estudar e caracterizar a natureza da interação entre os suportes sefarose L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina e os 5'-mononucleotídeos, seleccionados como modelos simples para compreender melhor o reconhecimento molecular do pDNA.

### 1.5.3. Ressonância Magnética de Alta Resolução de Ângulo Mágico (HR-MAS RMN)

A técnica de HR-MAS RMN permite estudar géis e /ou amostras entre estados líquido e sólido. Deste modo, permite estudar suportes. Nesta experiência a amostra é previamente sujeita a um *swelling* dentro do rotor com o solvente deuterado mais adequado. Este rotor é depois colocado segundo um ângulo de 54,7 graus (ângulo mágico) a girar a uma velocidade de cerca de 4000 Hz, resultando em sinais de RMN com elevada resolução (35). Deste modo aplicou-se a HR-MAS RMN para verificar se os ligandos L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina estavam covalentemente ligados à sefarose.

# Capítulo 2- Materiais e Métodos

## 1. Métodos

A síntese dos dipeptídeos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina foi efetuada através da proteção do grupo amina de um aminoácido e do grupo do ácido carboxílico do outro aminoácido seguido da formação da ligação peptídica através da dicilcohexacarbodimida (DCC). A desproteção dos dipeptídeos foi realizada por hidrólise com hidróxido de sódio e acidificação com TFA.

O plasmídeo pVax-LacZ foi produzido em *E. coli* e a afinidade entre as isoformas sc, oc e ln e os ligandos L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina foi determinada por RPS utilizando o biossensor ótico Biacore T200.

Ainda foram feitos estudos na ressonância magnética nuclear usando a técnica de diferença de transferência de saturação, onde se identificou os locais de ligação dos 5'-mononucleotídeos (5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP, 5'-TMP) aos três suportes sintetizados (sefarose L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina).

### 1.1. Síntese Química

#### A. Síntese do intermediário L-triptofano metil éster (esterificação)

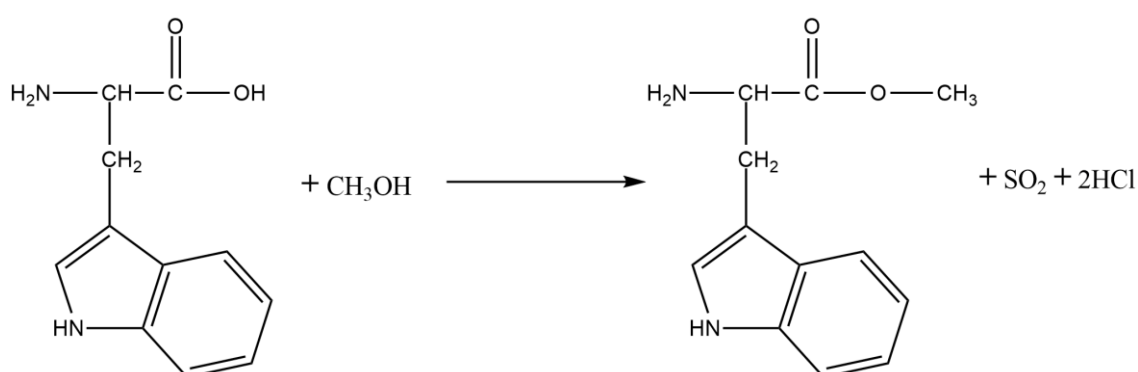


Figura 8- Síntese do L-triptofano metil éster.

O intermediário L-triptofano metil éster foi sintetizado de acordo com a literatura (36). À T=-8°C adicionou-se gota a gota de cloreto de tionila (752,5 µL, 10 mmol) em 25 mL de metanol e

deixou-se a agitar durante 15 minutos. Adicionou-se lentamente L-triptofano (1,080 g, 4,9 mmol) e deixou-se a agitar a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Após a adição deixou-se a mistura a agitar à temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente colocou-se a reação durante 19 horas a temperatura de  $80^{\circ}\text{C}$ . Evaporou-se o metanol e adicionou-se proporções decrescentes de éter etílico: etanol (40 mL, 1:1), (20 mL, 1:1) para lavar o sólido resultante. Secou-se na estufa e posteriormente dissolveu-se o precipitado em água destilada (15 mL) e acertou-se o pH com uma solução saturada de carbonato de sódio até atingir pH 8. Por fim extraiu-se com acetato de etilo (15 mL), evaporou-se o solvente e secou-se o sólido na estufa de vácuo ( $m = 1,01\text{g}$ ,  $\eta = 93,79\%$ ,  $^1\text{H}$  espectro RMN ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 1,84 s (3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,90-3,15 m (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,00 m (H, CH), 6,78 s (H, CH), 6,99 t (H, CH,  $J = 7,30$  Hz), 7,04 t (H, CH,  $J = 6,93$  Hz), 7,15 d (H, CH,  $J = 7,96$  Hz), 7,46 d (H, CH,  $J = 7,81$  Hz).  $^{13}\text{C}$  espectro RMN ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_c$ , ppm: 29,62, 51,02, 53,77, 109,27, 110,37, 117,50, 118,24, 120,85, 122,31, 126,31, 135,32, 174,62).

Na figura 9 apresenta-se o espectro de massa do composto onde se observa um pico a 219 g/mol que corresponde ao L-triptofano metil éster.

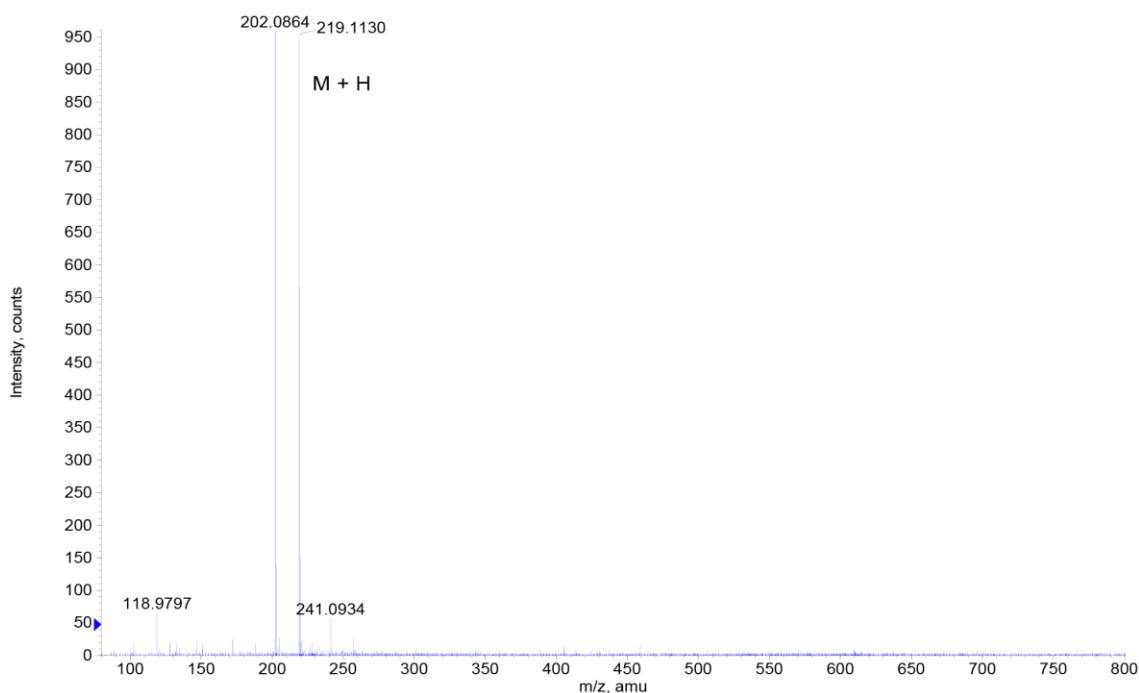


Figura 9- TOF-MS do L-triptofano metil éster.

## B. Síntese do intermediário Boc-L-triptofano

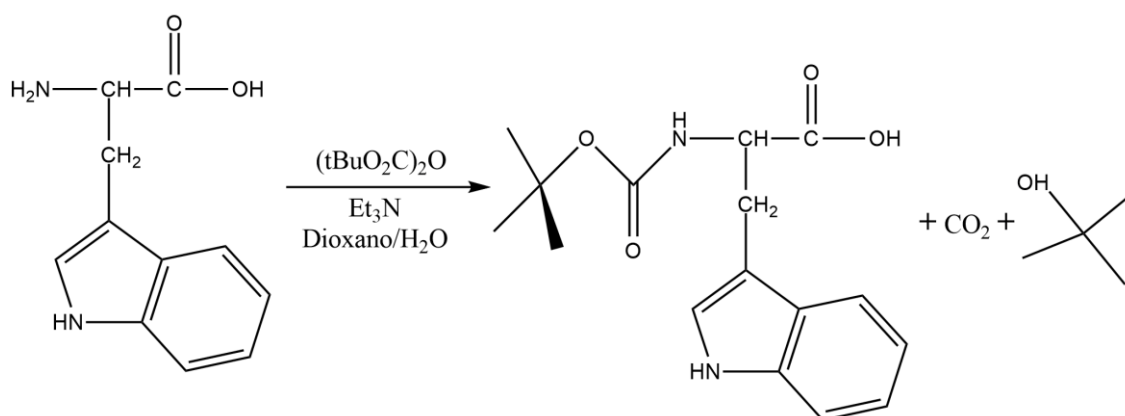


Figura 10- Reação de síntese Boc-L-triptofano.

A síntese da proteção do L-triptofano com dicarbonato de di-terc-butila foi baseada no protocolo descrito por Jung *et al.*, 1997. A mistura de água e dioxano (100 mL, 1:1) adicionou-se lentamente o L-triptofano (2,81g, 13,8 mmol) e de seguida adicionou-se gota a gota de trietilamina (2,9 mL, 20,7 mmol). A mistura ficou a agitar durante 15 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente colocou-se 30 minutos a  $T=0^{\circ}\text{C}$ . Adicionou-se de uma só vez o dicarbonato de di-terc-butila (3,3g, 15,2mmol) e deixou-se a agitar a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 41 h. De seguida evaporou-se o solvente. Seguidamente adicionou-se água até dissolver, solução HCl (1M) até pH 2. Seguidamente extraiu-se com acetato de etilo (7x30 mL). Por fim evaporou-se o solvente e lavou-se o óleo com brine, seguida de água quente. Evaporou-se e secou-se o sólido na estufa de vácuo (3,6 g,  $\eta = 91,37\%$   $^1\text{H}$  espetro RMN ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ , ppm: 1,38 s (9H,  $\text{CH}_3$ ), 3,06-3,31 m (2H,  $\text{CH}_2$ ), 4,87 m (H, CH), 6,96 s (H, CH), 7,06 t (H, CH,  $J= 7,40$  Hz), 7,14 t (H, CH,  $J= 7,77$  Hz), 7,30 d (H, CH,  $J= 8,28$  Hz), 7,50 d (H, CH,  $J= 7,84$  Hz).  $^{13}\text{C}$  espetro RMN ( $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_c$ , ppm: 27,42, 28,12, 54,35, 80,42, 109,35, 111,27, 117,45, 119,53, 121,75, 122,42, 126,57, 135,96, 154,65, 174,75).

Na figura 11 é apresentado o espetro de massa do composto boc-L-triptofano com peso molecular de 305,1496.

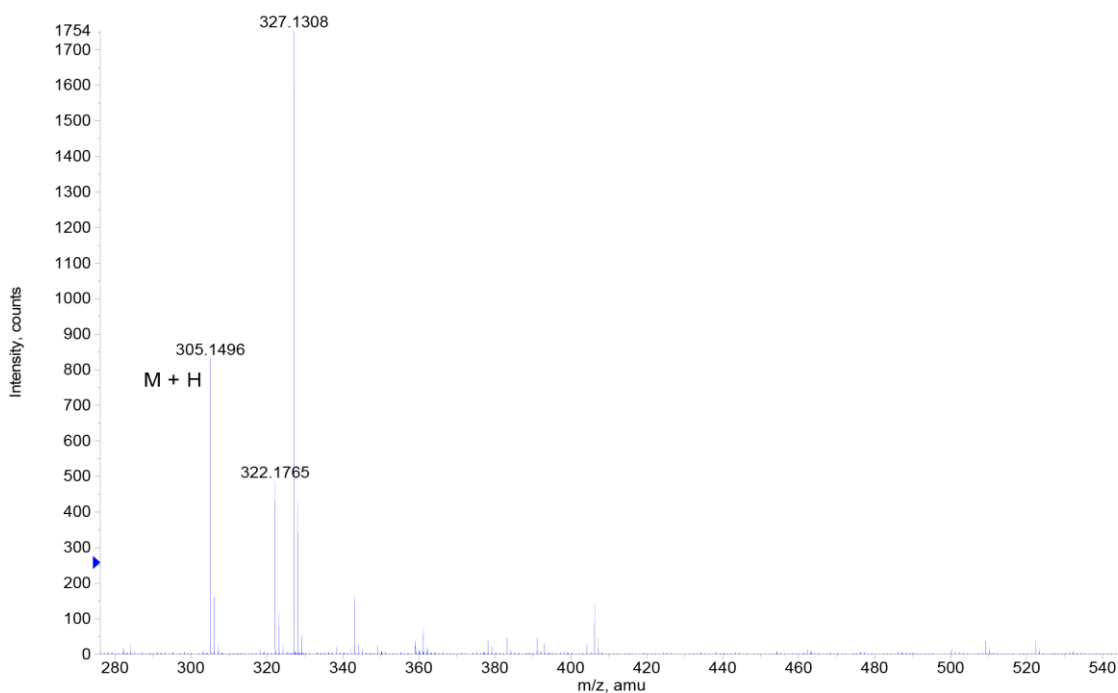


Figura 11- TOF-MS do Boc L-triptofano.

### C. Síntese do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano protegido

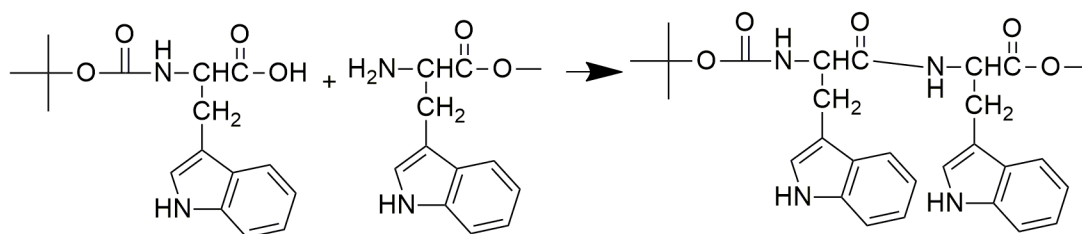


Figura 12- Formação da ligação peptídica.

A formação da ligação peptídica foi realizada de acordo com a literatura (37) onde descreve o acoplamento de aminoácidos. Colocou-se o balão a 0°C e adicionou-se Boc-L-triptofano (0,440g, 1,5 mmol) dissolvido em THF (10 mL) e de seguida adicionou-se gota a gota 1,3-diciclohexilcarbodiimida (0,308g, 1,5 mmol) em THF (5 mL). Posteriormente adicionou-se triptofano metil éster (0,325g, 1,5 mmol) e deixou-se a agitar durante 5 minutos a 0°C. A mistura ficou a agitar à temperatura ambiente durante 120 horas. No final filtrou-se a solução e evaporou-se. Lavou-se o óleo, com hexano, e extraiu-se 3x com dietil éter. Evaporou-se a solução, lavou-se a mistura com hexano e secou-se a baixa pressão. Finalmente para remover o diciclohexilureia (DCU), recristalizou-se com diclorometano, filtrou-se e evaporou-se,

obtendo-se o dipeptídeo (0,290g,  $\eta=40,90\%$ ,  $^1\text{H}$  espectro RMN ( $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1,42 s (9H,  $\text{CH}_3$ ), 3,14-3,24 m (2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,64 s (3H,  $\text{CH}_3$ ), 4,63 m (H, CH), 4,73 m (H, CH), 6,88 s (H, CH), 6,93 s (H, CH), 7,05 m (2H, CH), 7,13 m (2H, CH), 7,38 m (2H, CH), 7,57 m (2H, CH).  $^{13}\text{C}$  espectro RMN ( $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta_c$ , ppm: 24,93, 25,59, 25,78, 27,30, 33,81, 52,34, 53,83, 54,24, 67,48, 109,72, 109,92, 111,71, 111,89, 118,42, 118,66, 118,90, 119,03, 121,39, 121,47, 124,08, 124,27, 127,51, 127,82, 136,44, 136,56, 157,04, 170,76, 172,52).

Na figura 13 apresenta-se o espectro de massa com um pico a 505,2456 correspondente ao dipeptídeo (L-triptofano-L-triptofano) protegido.

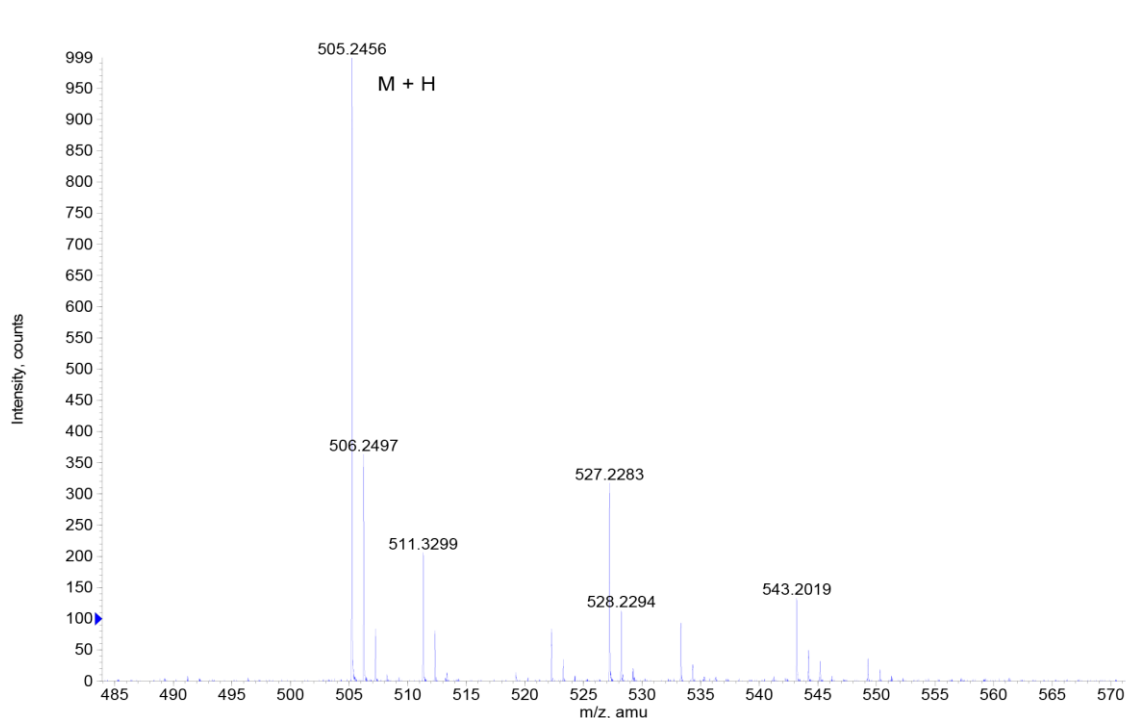


Figura 13- TOF-MS L-triptofano-L-triptofano.

#### D. Desproteção do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano protegido

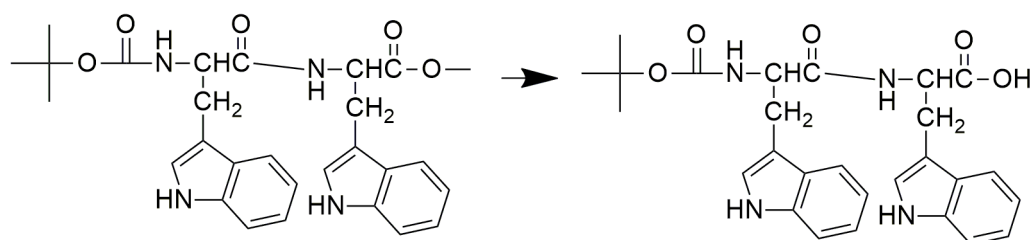


Figura 14- Reação de hidrólise do grupo metilo.

A desproteção do grupo metilo do dipeptídeo foi baseada no protocolo de desproteção já descrito na literatura (38). Ao dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano protegido (0,051g,  $1,01 \times 10^{-4}$  mol) adicionou-se 5mL de etanol e deixou-se a agitar à temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente adicionou-se gota a gota de solução de hidróxido de sódio (0.03M) até atingir o pH 10 a 12. A solução ficou a agitar durante 48 h, mediu-se o pH e basificou-se novamente a mistura até pH 10-12. Após 24 h verificou-se que o pH manteve o valor 12. Evaporou-se e secou-se a amostra na estufa obtendo-se o produto final (0,035g,  $\eta=70,90\%$ ,  $^1\text{H}$  espectro RMN (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1,40 s (9H, CH<sub>3</sub>), 3,05-3,19 m (2H, CH<sub>2</sub>), 4,60 m (H, CH), 4,76 m (H, CH), 6,92 s (H, CH), 6,97 s (H, CH), 7,07 m (2H, CH), 7,12 m (2H, CH), 7,35 m (2H, CH), 7,48 m (2H, CH).  $^{13}\text{C}$  espectro RMN (DMSO),  $\delta_c$ , ppm: 24,83, 25,48, 25,32, 26,75, 32,56, 53,45, 54,75, 67,68, 109,42, 109,75, 111,32, 111,46, 118,17, 118,68, 118,43, 119,24, 121,21, 121,47, 124,12, 124,32, 127,74, 127,82, 136,56, 136,78, 157,23, 170,47, 172,68).

#### E. Desproteção do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano

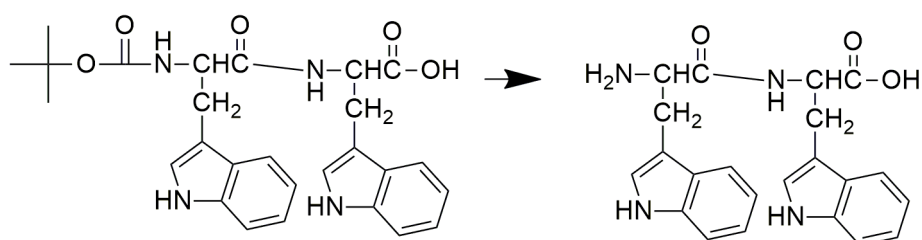


Figura 15- Reação de acidificação com TFA do dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano.

A reação de desproteção do grupo ditetrabutílic dicarbonato (BOC) foi baseada em protocolos já descritos para a remoção deste grupo protetor em dipeptídeos (Sorokina *et al.*, 2012). Dissolveu-se o dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano protegido em diclorometano. A esta solução adicionou-se ácido trifluoroacético (2,5 mL), e deixou-se agitar durante a noite a temperatura ambiente. A solução foi concentrada e neutralizada com hidróxido de sódio (5M), extraída com diclorometano (3×30 mL). Por fim evaporou-se e secou-se na estufa de vacuo. ( $^1\text{H}$  espectro RMN (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 3,10-3,23 m (2H, CH<sub>2</sub>), 4,20 m (H, CH), 4,76 m (H, CH), 6,95 s (H, CH), 6,99 s (H, CH), 7,06 m (2H, CH), 7,13 m (2H, CH), 7,31 m (2H, CH), 7,40 m (2H, CH).  $^{13}\text{C}$  espectro RMN (DMSO),  $\delta_c$ , ppm: 25,47, 26,59, 55,63, 67,68, 109,42, 109,34, 111,25, 111,76, 118,21, 118,67, 118,32, 119,56, 121,32, 121,68, 124,19, 124,47, 127,25, 127,86, 136,42, 136,69, 172,57, 174,66), após análise por RMN verificou-se que a remoção do BOC não foi completa.

## F. Síntese do dipeptídeo L-triptofano-L-arginina protegido

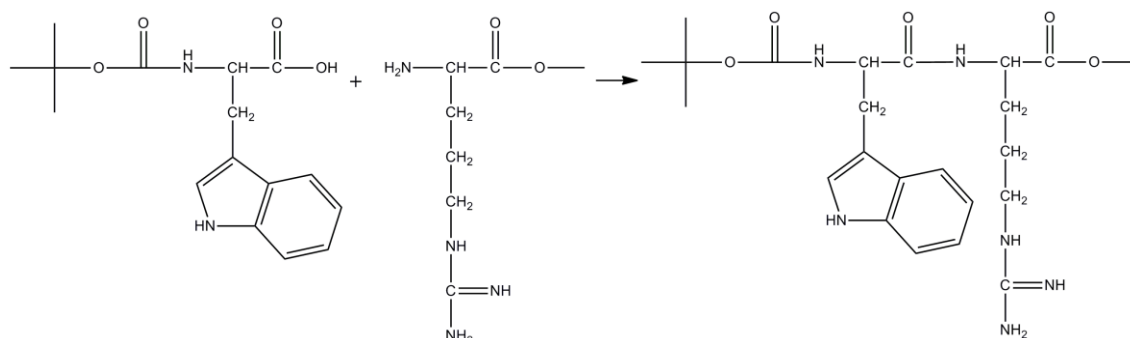


Figura 16- Formação da ligação peptídica.

A síntese do dipeptídeo L-triptofano-L-arginina foi similar à síntese anteriormente descrita para o dipeptídeo L-triptofano-L-triptofano. Neste caso foi adicionado Boc-L-triptofano e L-arginina metil éster em tetrahydrofurano (THF) e utilizando o 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente de condensação para formar a ligação peptídica.

## G. Desproteção do dipeptídeo L-triptofano-L-arginina

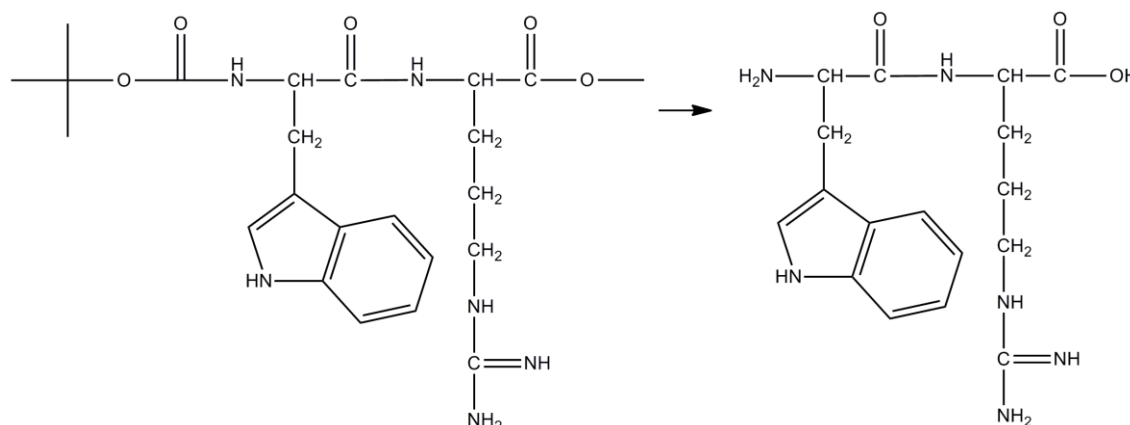


Figura 16- Reação de desproteção do dipeptídeo L-triptofano-L-arginina.

A desproteção do dipeptídeo L-triptofano-L-arginina foi idêntica ao L-triptofano-L-triptofano e consistiu na hidrólise com o hidróxido de sódio para remover o grupo metilo e acidificação com ácido trifluoroacético (TFA) para remover o ditertabutílico dicarbonato (BOC). Através da análise por RMN verificou-se que a remoção do BOC não foi completa. ( $^1\text{H}$  espectro RMN ( $\text{DMSO-}d_6$ ),  $\delta$ , ppm: 1,49 m (2H,  $\text{CH}_2$ ), 1,81 m (2H,  $\text{CH}_2$ ), 2,59 m (2H,  $\text{CH}_2$ ), 3,15-3,26 m (2H,

CH<sub>2</sub>), 4,02 m (H, CH), 4,52 m (H, CH), 7,00 s (H, CH), 7,08 t (H, CH,  $J = 7,35$  Hz), 7,16 t (H, CH,  $J = 7,56$  Hz), 7,33 d (H, CH,  $J = 8,20$  Hz), 7,52 d (H, CH,  $J = 7,67$  Hz). <sup>13</sup>C espectro RMN (DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta_c$ , ppm: 24,65, 27,68, 29,65, 42,65, 56,35, 57,68, 107,65, 111,32, 118,24, 121,20, 123,78, 127,28, 136,56, 158,65, 172,65, 173,48).

## 1.2. Síntese e caracterização dos suportes sefarose L-triptofano-L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina

Os suportes sefarose L-triptofano- L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina foram preparados através da imobilização dos dois dipeptídeos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina na sefarose previamente ativada. A sefarose foi previamente lavada com H<sub>2</sub>O Mili-Q, e para cada 3g de sefarose adicionou-se 5mL de NaOH (1 M). Deixou-se a agitar durante 4 h à temperatura ambiente. Seguidamente adicionou-se gota a gota (5mL) de butano-1,4-diol em 10 mL de NaBH<sub>4</sub>. Após ativação da sefarose lavou-se com H<sub>2</sub>O Mili-Q e adicionou-se os ligandos (7.5g L-triptofano, 70 mg de L-triptofano-L-arginina e 70 mg de L-triptofano-L-triptofano). Deixou-se a agitar durante a noite a 50°C, e por fim lavou-se novamente com H<sub>2</sub>O Mili-Q.

### 1.2.1. Caracterização dos suportes sefarose L-triptofano- L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina por HR-MAS

Estes ensaios foram realizados no espectrómetro Bruker Avance III 400MHz equipado com a sonda HR-MAS. Cerca de 12 mg de cada suporte foi inserido num rotor de zircónica com capacidade de 12  $\mu$ L. O swelling foi realizado com CDCl<sub>3</sub> e DMSO-*d*<sub>6</sub> durante 12 h. O rotor foi colocado no ângulo mágico (54,7 graus), rodando a 4000 Hz. Depois de ajustados alguns parâmetros de aquisição como *tunning*, o *matching*, o *lock* (para este solvente em específico) e o *shim*, iniciou-se a aquisição de espectros de 1D e 2D. Estes espectros foram depois processados com o software Topspin 3.1.

## 1.3. Produção de DNA plasmídico

As isoformas do pVax-*LacZ* foram obtidas a partir da lise de *E. coli DH5a*. Este plasmídeo contém 6050 pares de bases e possui o gene de resistência à canamicina. Para se obter as isoformas são necessários efetuar vários passos, em primeiro efetua-se a pré-fermentação em

*E. coli*, de seguida passa-se para a fermentação quando esta atinge a densidade ótica desejada e por fim efetua-se a lise celular. Para isso foi usado o kit Qiagen. Nesta fase obtém-se a isoforma super enrolada, para esta isoforma passar para circular aberta ou linear necessita de mais um passo adicional.

### 1.3.1. Pré-fermentação

Num erlenmyer (125 mL) adicionou-se a triptona (20 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (24 g L<sup>-1</sup>), glicerol (4 mL L<sup>-1</sup>). O erlenmyer com a solução preparada foi esterilizado na autoclave. De seguida adicionou-se a canamicina (30 µg L<sup>-1</sup>) e deixou-se em incubação durante a noite a agitar num agitador orbital a 37°C e 250 rpm.

### 1.3.2. Fermentação

As fermentações foram realizadas num erlenmyer (250 mL) com uma solução de triptona (20 g L<sup>-1</sup>), extrato de levedura (24 g L<sup>-1</sup>), glicerol (4 mL L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,17M), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,72M). O erlenmyer com a solução preparada foi esterilizado na autoclave. De seguida adicionou-se a canamicina (30 µg L<sup>-1</sup>) e a solução da pré-fermentação para obter-se uma densidade ótica de 0,6. De seguida foi realizada a incubação durante a noite num agitador orbital a 37°C e 250 rpm. Quando o erlenmyer tem a densidade ótica desejada, centrifuga-se a solução de forma a obter-se as células e armazena-se a -20°C.

### 1.3.3. Lise celular do DNA plasmídico usando o kit Qiagen (Maxi)

Para se obter o DNA plasmídico procedeu-se à lise da *E. coli*. Neste trabalho foi usado o kit Qiagen. Resuspendeu-se a massa obtida no passo anterior na *buffer* P1 (2x10 mL) e dividiu-se por dois tubos. De seguida adicionou-se a *buffer* P2 (2x10 mL) e deixou-se a agitar lentamente durante 5 minutos. Por fim adicionou-se a *buffer* P3 (2x10 mL) agitou-se os tubos que foram colocados a 0°C durante 20 minutos. De seguida centrifugou-se durante 30 minutos nas condições de 4°C e 20.000G. Adicionou-se sobrenadante às novas colunas e voltou-se a centrifugar durante 15 minutos nas mesmas condições. Na coluna de filtração aplicou-se a *buffer* QBT (6 mL) e deixou-se esvaziar por fluxo de gravidade. De seguida ao sobrenadante que resultou da centrifugação foi adicionado à *buffer* QF (32 mL). Seguidamente elui-se para um tubo de centrífuga com a *buffer* ME (15 mL) e deixou-se a *buffer* passar na coluna por ação da gravidade. Adicionou-se isopropanol (10,5 mL) ao tubo de centrífuga e homogeneizou-se cuidadosamente. O tubo foi posteriormente colocado a 0°C durante 30

minutos, e centrifugou-se durante 30 minutos a 4°C e 15.000G. Descartou-se o sobrenadante e colocou-se o tubo a secar. Por fim lavou-se o tubo com H<sub>2</sub>O Mili-Q (2 mL) e armazenou-se a -80°C.

Para se obter a isoforma pDNA circular aberta, deixou-se à temperatura ambiente durante três dias e foi seguindo-se por eletroforese. Para obter a isoforma linear adicionou-se Hind III e deixou-se durante a noite na estufa a 37°C.

## **1.4. Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação (RMN-STD)**

Preparou-se uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,17M) e K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,72M) a pH 7,70. Esta solução foi o tampão utilizado para dissolver os suporte ligando-se os 5'-mononucleótidos.

Preparou-se 3 soluções, cada uma com um suporte. Uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 mL) e suporte L-triptofano (71,5mM) com um pH de 7,77, outra de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 mL) e suporte L-triptofano-L-triptofano (75mM) com um pH de 7,7 e outra de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2 mL) e suporte L-triptofano-L-arginina (46,5mM) com um pH de 7,77.

De seguida preparou-se as soluções com os 5'-mononucleotídeos, uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2 mL) e 5'-AMP (375 mM) com um pH de 7,84, outra solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2 mL) e 5'-CMP (375 mM) com um pH de 7,00, outra solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2 mL) e 5'-GMP (300 mM) com um pH de 7,7 e por fim uma solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2 mL) e 5'-TMP (136 mM) com um pH de 7,48.

Na tabela 3 estão indicados os volumes das soluções preparadas nos tubos de RMN de 5mm.

Tabela 3- Preparação das soluções para RMN-STD.

L-triptofano	
1	300 µL de suporte + 300 µL da solução $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 10µL TSP
2	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-AMP + 10µL TSP
3	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-CMP + 10µL TSP
4	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-GMP + 10µL TSP
5	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-TMP + 10µL TSP
L-triptofano-L-triptofano	
1	300 µL de suporte + 300 µL da solução $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 10µL TSP
2	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-AMP + 10µL TSP
3	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-CMP + 10µL TSP
4	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-GMP + 10µL TSP
5	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-TMP + 10µL TSP
L-triptofano-L-arginina	
1	300 µL de suporte + 300 µL da solução $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ + 10µL TSP
2	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-AMP + 10µL TSP
3	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-CMP + 10µL TSP
4	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-GMP + 10µL TSP
5	300 µL de suporte + 300 µL da solução 5'-TMP + 10µL TSP

Para cada solução de suporte prepararam-se 5 tubos, um deles é o branco e os outros 4 tubos contem um 5'-mononucleotídeo. Cada tubo vai conter 300 µL de suporte, 10µL TSP e 300 µL de 5'-mononucleotídeo.

Para cada amostra foram obtidos os espectros de RMN-STD. Foram analisados os vários espectros e escolhidas as irradiações dos três suportes que não coincidem com os sinais dos 5'-mononucleótidos. A saturação seletiva do suporte (espectro *on-resonance*) foi realizada entre 400 Hz e 4506 Hz, dependendo dos sinais do suporte. Foram realizadas experiências de controlo com as amostras de referência, a fim de otimizar a frequência de saturação do suporte e a irradiação *off-resonance*. Este procedimento foi executado de forma a assegurar que os sinais dos 5'-mononucleótidos não eram afetados. Utilizou-se o programa Eburp2.1000, com pulsos de 90° (50 ms, 1 ms de intervalo entre os pulsos), para um tempo total de saturação de 2,0 s. Para o espectro de referência (*off-resonance*) as amostras foram irradiadas a 30000 Hz.

## 1.5. Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) baseada no biosensor ótico

Para efetuar a imobilização dos ligandos foi preparada a solução tampão de borato (100 mM). Os ligandos L-triptofano (125 mM) L-triptofano-L-triptofano (90 mM) e L-triptofano-L-arginina (120 mM) foram solubilizados na solução de borato e o pH foi ajustado a 9,91, 9,85, e 9,73, respectivamente.

O *chip* onde foram imobilizados os ligandos é o CM5 o qual tem uma superfície constituída por uma matriz de dextrano caboximetilado. Esta foi posteriormente ativada com mistura de EDC (0,4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) e NHS (0,1 M N-hidroxisucinimida) a uma velocidade de fluxo de 10  $\mu\text{L} / \text{min}$  e tempo de contato de 420 s, formando-se os esteres reativos. De seguida, injetou-se cada ligando (L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano, L-triptofano-L-arginina nas três células de fluxo) à velocidade de fluxo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  e tempo de contato de 420 s. Posteriormente bloqueou-se os esteres reativos que não reagiram com o grupo  $-\text{NH}_2$  do ligando com a solução 1 M etanolamina-HCl a  $\text{pH}=8,5$ . O protocolo foi efetuado para cada um dos ligandos em separado. A célula de fluxo 1 foi transformada como referência, isto é, a ativação foi igual às das restantes células de fluxo mas sem imobilização de ligando.

O perfil de associação/dissociação das isoformas do plasmídeo pVax-LacZ com os ligandos L-triptofano e os dipeptídeos L-triptofano-L-triptofano, L-triptofano-L-arginina imobilizados foi avaliado em dois tampões de corrida (Tris-HCl 10 mM,  $\text{pH}$  8 e Hepes ácido 10 mM,  $\text{pH}$  7,4) e a duas temperaturas diferentes  $T=10^\circ\text{C}$  e  $25^\circ\text{C}$ . As concentrações injetadas de cada isoforma foram escolhidas tendo em conta a saturação da superfície dos ligandos em cada célula de fluxo.

Os valores de  $K_D$  foram obtidos através da aplicação do modelo de Langmuir e traçado da curva linear dos valores RU selecionados entre 300-400 s. A equação do modelo que permite calcular o  $K_D$  é:  $R_{\text{eq}} = R_{\text{máx}} \cdot (1 / (1 + K_D / [A]))$ , em que  $R_{\text{eq}}$  representa a quantidade de pDNA complexado com o ligando,  $R_{\text{máx}}$  representa a capacidade máxima de ligação do pDNA, e  $[A]$  é a concentração do pDNA). O valor  $K_D$  é inversamente proporcional à afinidade, ou seja, quanto maior o valor, menor a afinidade da isoforma do plasmídeo para o ligando, e vice-versa. O cálculo dos parâmetros foi realizado com o *software BIAevaluation* versão 4.1. Os sensogramas obtidos para pDNA-ligando revelaram um perfil de afinidade.

# Capítulo 3- Resultados e Discussão

## *Síntese química dos ligandos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina*

Na figura 17 apresentam-se as estruturas químicas do L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e do L-triptofano-L-arginina. A síntese química dos dipeptídeos foi realizada através da condensação dos L-triptofano metil éster e L-arginina metil éster com Boc-L-triptofano, em 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) formando-se os dipeptídeos protegidos L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina. A desproteção dos grupos metilo e BOC foi realizada por hidrólise com hidróxido de sódio e TFA, respectivamente.

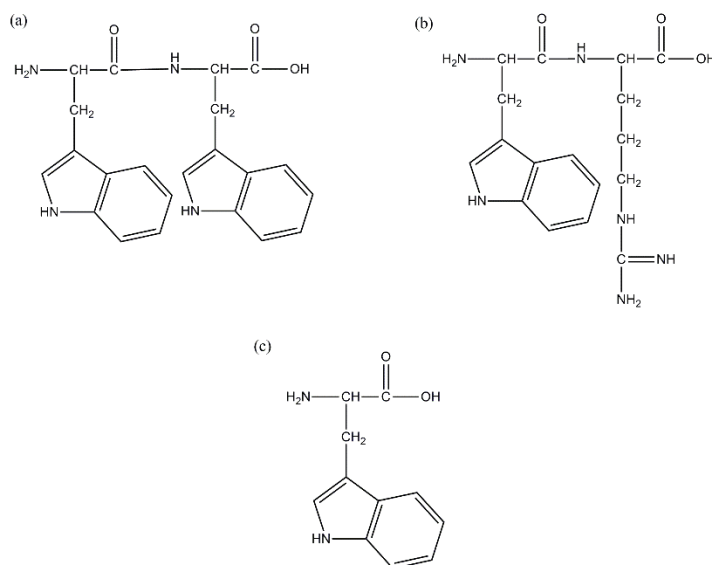


Figura 17- Estruturas químicas dos (a) L-triptofano-L-triptofano, (b) L-triptofano-L-arginina e (c) L-triptofano.

## *Análise da Interação entre os suportes e os 5' mononucleótidos por RMN-STD*

As experiências de Ressonância Magnética Nuclear - Diferença de Transferência de Saturação (RMN-STD) permitiram identificar os locais de ligação dos 5'-CMP, 5'-GMP, 5'-TMP, 3'-AMP e 5'-AMP aos suportes sefarose L-triptofano, sefarose L-triptofano-L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina. O efeito STD foi calculado por  $(I_0 - I_{SAT}) / I_0$ , em que  $(I_0 - I_{SAT})$  é a intensidade do pico no espectro de STD e  $I_0$  é a intensidade do pico no espectro *off-resonance*. A intensidade STD do maior efeito STD foi fixada em 100%, e usada como referência. Na figura 18 apresentam-se os resultados das % de STD para o suporte sefarose L-triptofano com os 5'-mononucleotídeos. Verifica-se que o 5'-AMP e o 5'-TMP interagem preferencialmente pela base (100% de saturação), nomeadamente pelo protão H<sub>8</sub> e grupo metilo, respetivamente. Enquanto que o 5'-GMP e o 5'-CMP interagem com o suporte pelos protões H<sub>5</sub> e H<sub>5'</sub> adjacentes ao grupo fosfato. Havendo também interação fraca com os protões da desoxirribose e da base.

De estudos anteriormente realizados (39), foi relatado interações do L-triptofano com os mononucleótidos pelos protões H<sub>5</sub> e H<sub>5'</sub>, como foi detetado com o 5'-GMP e o 5'-CMP. De acordo com a literatura, o tipo de interações podem ser ligacoes de hidrogénio ou *van der Waals* e empilhamento pi-pi. O 5'-TMP interagia preferencialmente pelo grupo metilo sugerindo interações hidrofobicas. as que eles estabelecem podem ser através de

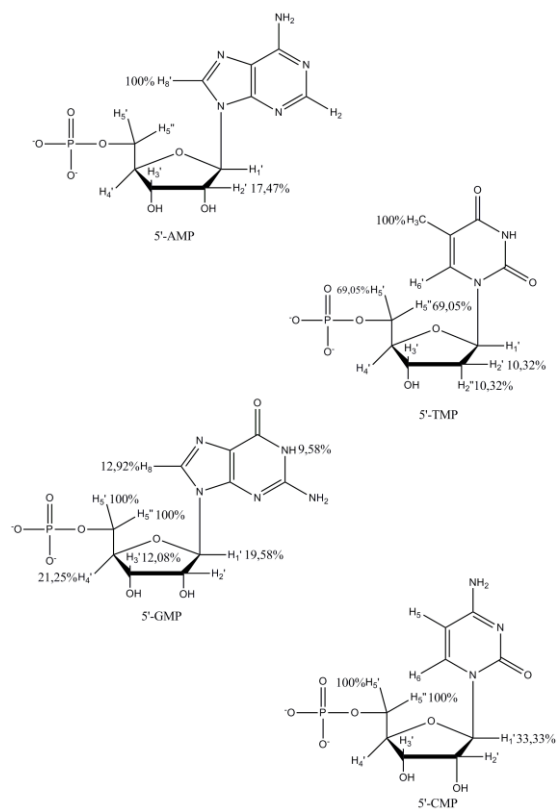


Figura 18- % de STD dos 5'-mononucleótidos com o suporte sefarose L-triptofano.

Na figura 19 representam-se as % de STD dos 5'-mononucleotídeos com o suporte sefarose L-triptofano-L-triptofano. Verificou-se que o 5'-TMP interage apenas pelo grupo metilo (100% de saturação), resultado similar ao do suporte L-triptofano. Enquanto que o local preferencial do 5'-AMP é com o protão  $H_2$  da desoxirribose (100% de saturação) e menor intensidade com  $H_1'$ , seguido do protão  $H_8$  da base. Este resultado é diferente do anterior com o suporte sefarose L-triptofano. Com o 5'-GMP e o 5'-CMP o resultado é similar ao suporte anterior, no qual a interação é maioritariamente pelos protões  $H_5'$  e  $H_5''$  adjacentes ao grupo fosfato.

Na literatura (39), foi relatado as interações do L-triptofano com os mononucleotídeos pelos protões  $H_5'$  e  $H_5''$ , como foi visto com 5'-GMP, e o 5'-CMP estas interações podem ser pontes de hidrogénio ou *Van der Waals*.

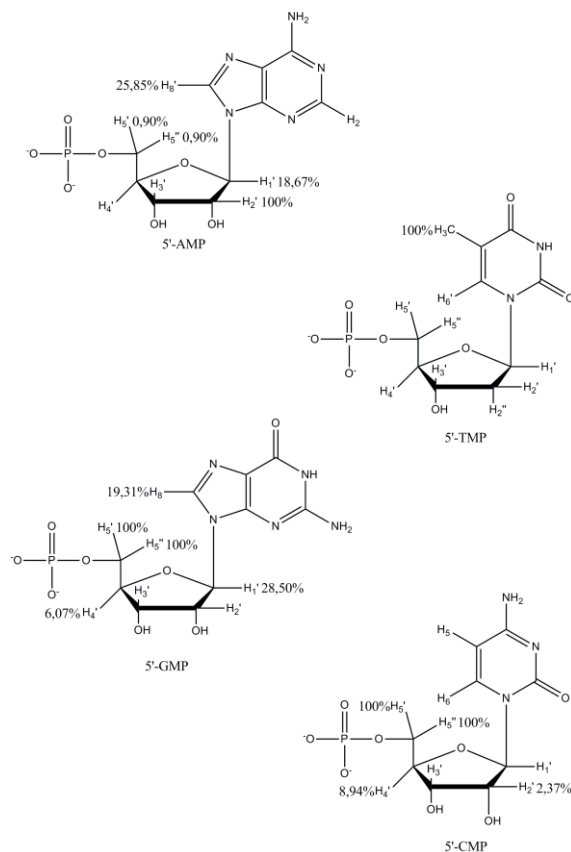


Figura 19- % de STD dos 5'-mononucleótidos com o suporte sefarose L-triptofano-L-triptofano.

As % de STD do suporte L-triptofano-L-arginina com os 5'-mononucleótidos apresentam-se na Figura 20. O resultado com o 5'-TMP é similar aos anteriores, a interação preferencial é pelo grupo metilo da timina (100% de saturação). Nenhum sinal de STD foi detetado com os prótons adjacentes ao grupo fosfato e da desoxirribose. Ao contrário com os suportes anteriores o 5'-GMP interage preferencialmente pelo próton H<sub>8</sub> da base havendo também STD com intensidades moderadas através do próton H<sub>1'</sub> (54% de saturação) da desoxirribose e H<sub>5'</sub> e H<sub>5''</sub> (46% de saturação) adjacentes ao grupo fosfato. O resultado do STD para o 5'-CMP é idêntico aos suportes anteriores, isto é, a interação envolve maioritariamente os prótons H<sub>5'</sub> e H<sub>5''</sub> (100% de saturação) adjacentes aos grupos fosfato, seguido de % STD moderadas com os prótons da desoxirribose. O resultado do 5'-AMP é idêntico ao do suporte sefarose L-triptofano-L-triptofano e é através do próton H<sub>2'</sub> (100% de saturação) da desoxirribose, havendo sinais de STD de fraca intensidade com os restantes prótons do açúcar.

Segundo a literatura (39) a L-arginina interage com a base preferencialmente com 5'-GMP por pontes de hidrogénio, por meio de múltiplos doadores.

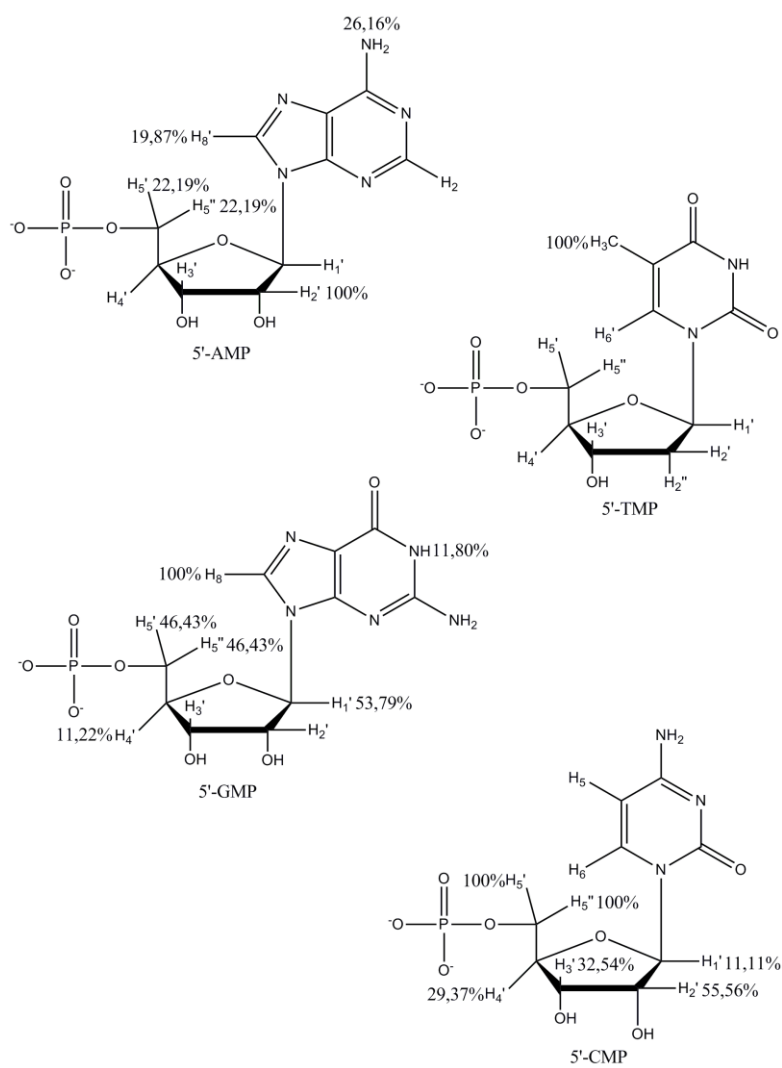
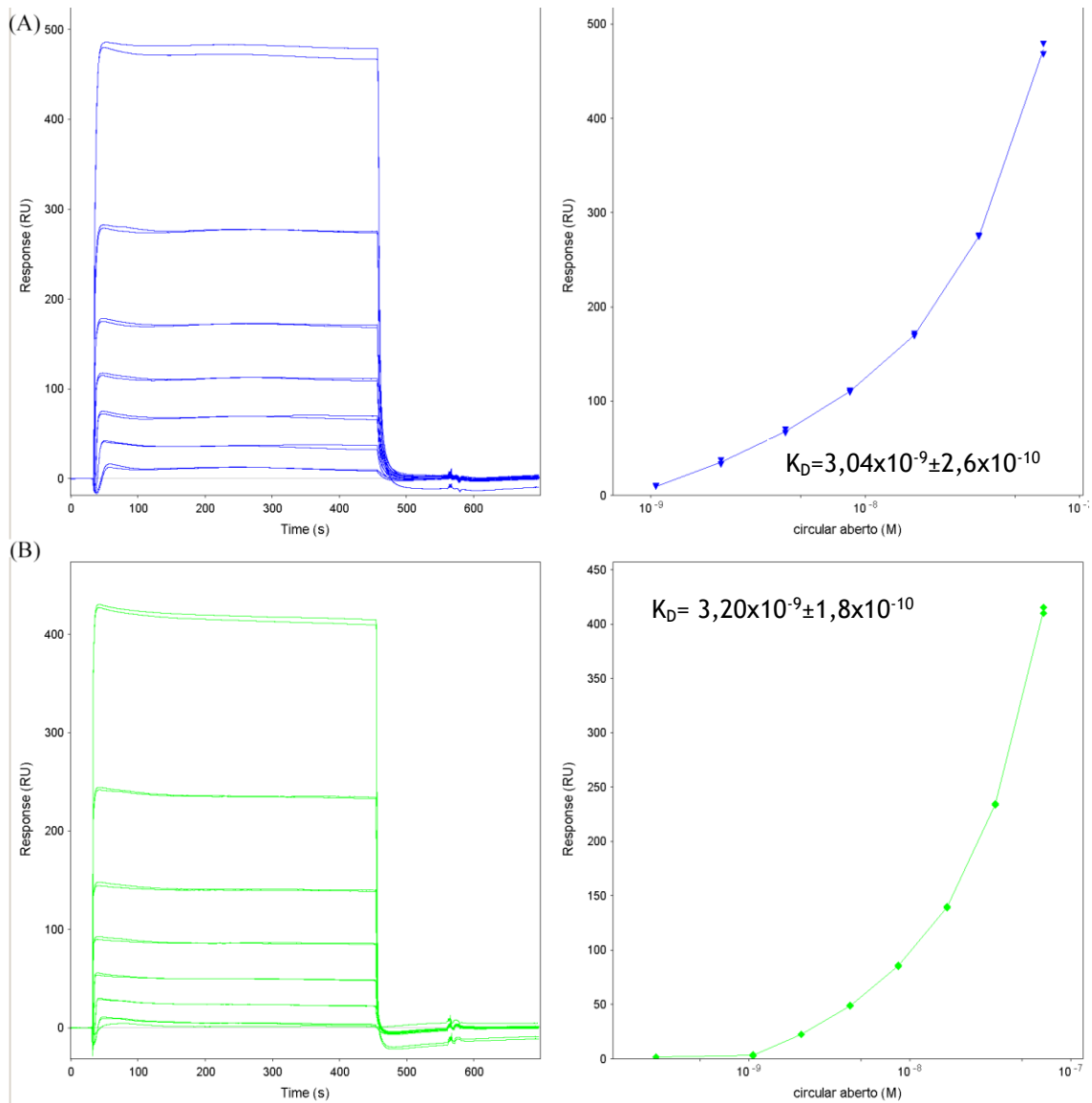


Figura 20- % de STD dos 5'-mononucleótidos com o suporte sefarose L-triptofano-L-arginina.

## *Análise da afinidade das isoformas do plasmídeo pVax-LacZ com os ligandos por Ressonância Plasmónica de Superfície (RPS)*

Os ensaios de afinidade entre as isoformas do pVax-LacZ e os ligandos (L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano, L-triptofano-L-arginina) foram realizados no biosensor ótico Biacore T200, tecnologia baseada no fenómeno RPS e com um sensor chip CM5. Os ligandos, neste caso, foram imobilizados numa matriz de dextrano carboximetilado covalentemente ligada à superfície de ouro, através da interação dos grupos amina. Como foi referido no capítulo *Materiais e Métodos* foram utilizados dois tampões de corrida, Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e Hepes 10 mM pH 7,4 e analisada a afinidade ligando/plasmídeo a duas temperaturas, T=10°C e 25°C. O perfil obtido para todos os ensaios ligando/plasmídeo foi de afinidade e não cinético. Isto significa que as isoformas do plasmídeo se associam e dissociam rapidamente não sendo possível determinar  $k_{on}$  e  $k_{off}$ . Nas Figuras 21 e 22 apresentam-se exemplos de sensogramas e das curvas resposta (RU) vs concentração do pDNA. O cálculo da constante de dissociação de equilíbrio só é possível quando existe saturação da superfície do ligando.



**Figura 21-** Sensogramas e curva resposta (RU) vs concentração da isoforma oc em Tris-HCl a  $T=10^{\circ}\text{C}$  com o ligando L-triptofano-L-triptofano (A) e em (B) temperatura  $T= 25^{\circ}\text{C}$  com o ligando L-triptofano.

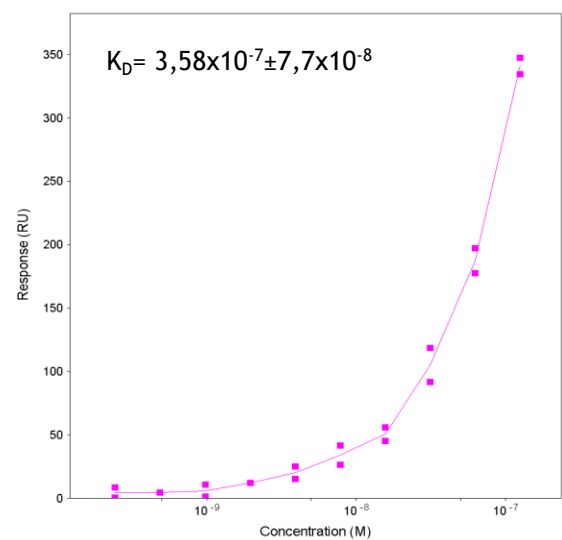
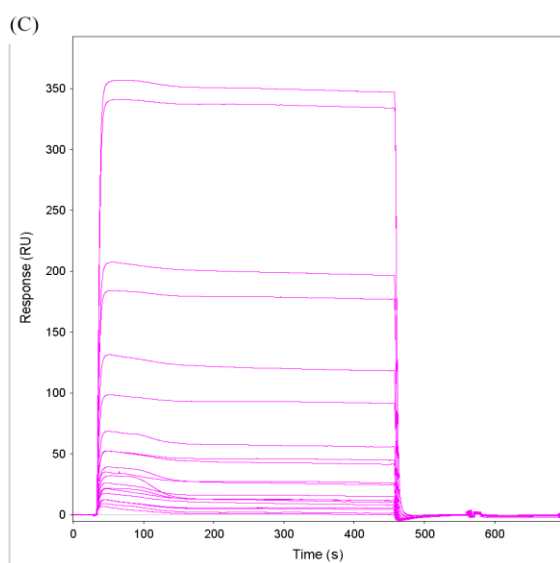
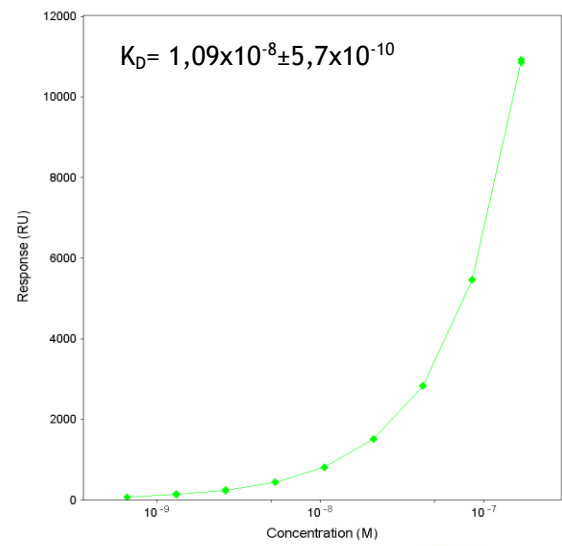
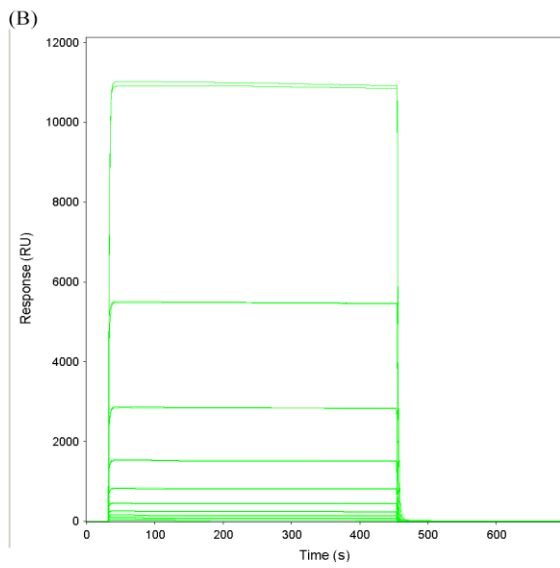
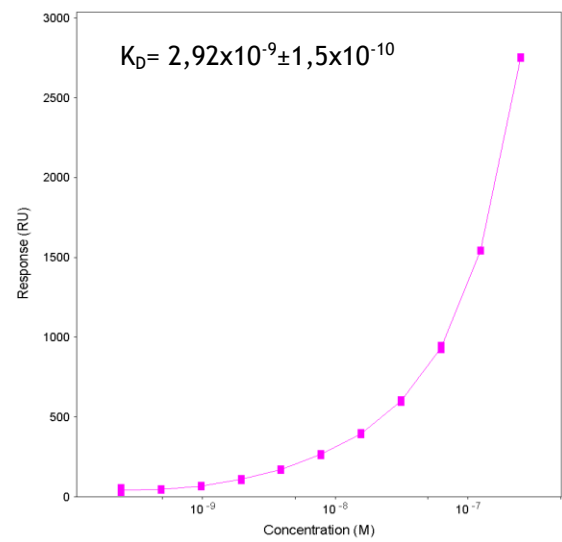
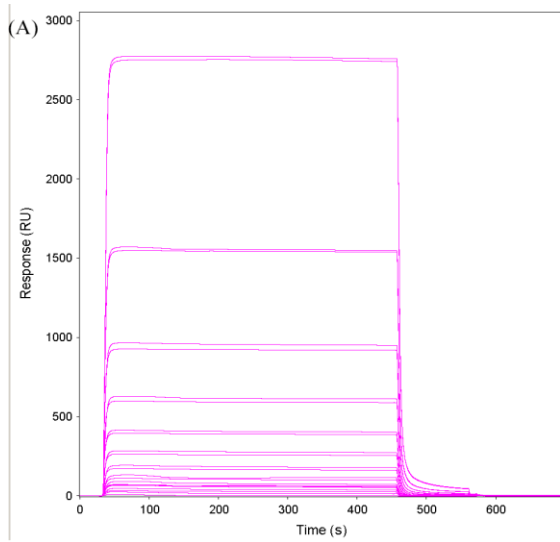


Figura 22- Sensogramas e curva resposta (RU) vs concentração em Hepes a T=25°C. (A) usando a isoforma circular aberto(oc) com o ligando L-triptofano-L-arginina, (B) isoforma linear (ln) e o ligando L-triptofano e (C) isoforma superenrolada (sc) e o ligando L-triptofano-L-arginina.

Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os valores das constantes de dissociação ( $K_D$ ) obtidas para os ensaios com os tampões Tris-HCl e Hepes a T=10°C e 25°C. O valor  $K_D$  é inversamente proporcional à afinidade, ou seja, quanto maior o valor, menor a afinidade da isoforma do plasmídeo com o ligando.

Tabela 4- Constantes de dissociação ( $K_D$ ) obtidas para os ensaios com o tampão Tris-HCl 10 mM a T=10°C e 25°C.

		T=25°C	T=10°C
Isoforma	Ligando	$K_D$	$K_D$
Oc	L-triptofano	$3,20 \times 10^{-9} \pm 1,8 \times 10^{-10}$	$3,35 \times 10^{-9} \pm 2,6 \times 10^{-10}$
	L-triptofano-L-triptofano	$3,22 \times 10^{-9} \pm 8,7 \times 10^{-11}$	$3,04 \times 10^{-9} \pm 2,6 \times 10^{-10}$
	L-triptofano-L-arginina	$3,44 \times 10^{-9} \pm 7,8 \times 10^{-11}$	$3,38 \times 10^{-9} \pm 1,3 \times 10^{-10}$

Tabela 5- Constantes de dissociação ( $K_D$ ) obtidas para os ensaios com o tampão Hepes ácido 10 mM a T=10°C e 25°C.

		T=25°C	T=10°C
Isoforma	Ligando	$K_D$	$K_D$
oc	L-triptofano	$3,52 \times 10^{-9} \pm 1,7 \times 10^{-10}$	$4,67 \times 10^{-9} \pm 3,2 \times 10^{-10}$
	L-triptofano-L-triptofano	$4,15 \times 10^{-9} \pm 1,7 \times 10^{-10}$	$7,34 \times 10^{-9} \pm 4,4 \times 10^{-10}$
	L-triptofano-L-arginina	$2,92 \times 10^{-9} \pm 1,5 \times 10^{-10}$	$5,23 \times 10^{-9} \pm 5,23 \times 10^{-9}$
ln	L-triptofano	$1,09 \times 10^{-8} \pm 5,7 \times 10^{-10}$	$1,27 \times 10^{-8} \pm 6,6 \times 10^{-10}$
	L-triptofano-L-triptofano	$6,65 \times 10^{-9} \pm 4,3 \times 10^{-10}$	$1,81 \times 10^{-8} \pm 1,5 \times 10^{-9}$
	L-triptofano-L-arginina	$2,84 \times 10^{-9} \pm 1,3 \times 10^{-9}$	$2,51 \times 10^{-9} \pm 6,5 \times 10^{-10}$
sc	L-triptofano	-	$1,14 \times 10^{-8} \pm 4,7 \times 10^{-9}$
	L-triptofano-L-triptofano	$4,50 \times 10^{-7} \pm 1,7 \times 10^{-7}$	$8,33 \times 10^{-7} \pm 7,1 \times 10^{-7}$
	L-triptofano-L-arginina	$3,58 \times 10^{-7} \pm 7,7 \times 10^{-8}$	$2,50 \times 10^{-7} \pm 5,7 \times 10^{-8}$

De acordo com os resultados apresentados na tabela 4 apenas houve sinal de RPS em tampão Tris-HCl 10 mM para ambas as temperaturas com a isoforma oc do pVax-LacZ. As constantes

de dissociação de equilíbrio correspondem a elevada afinidade ( $10^{-9}$  M) e são muito similares com todos os ligandos L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina a ambas as temperaturas. Este resultado sugere que a presença de um segundo aminoácido não promove a afinidade.

Os resultados apresentados na tabela 5 em Hepes ácido 10 mM também revelam alta afinidade ( $10^{-7}$  a  $10^{-9}$  M) com todos os ligandos e neste caso já há diferenças nas constantes de dissociação de equilíbrio. A isoforma ln é a que apresenta maior afinidade com o suporte L-triptofano-L-arginina a ambas as temperaturas, enquanto que a isoforma sc é a que apresenta a menor afinidade ( $10^{-7}$  M) com os ligandos a ambas as temperaturas, nomeadamente com o L-triptofano-L-arginina. No geral e a  $T=10^{\circ}\text{C}$ , a isoforma sc tem maior afinidade com os ligandos L-triptofano e L-triptofano-L-triptofano. No caso da isoforma oc os valores de  $K_D$  obtidos são da mesma ordem de grandeza  $10^{-9}$  M e apresentando maior afinidade a  $T=25^{\circ}\text{C}$  e com o ligando L-triptofano-L-arginina. Neste caso verificou-se que a presença do L-triptofano diminui ligeiramente a afinidade.

Resumindo, e no geral os resultados obtidos por RPS com o tampão Hepes ácido 10 mM, revelaram que o L-triptofano-L-arginina apresenta maior afinidade para as isoformas ln e oc do que o L-triptofano-L-triptofano, nomeadamente, a  $T=25^{\circ}\text{C}$ . Existe uma maior afinidade da isoforma sc a  $T=10^{\circ}\text{C}$  com o ligando L-triptofano do que com os dipeptídeos. A  $T=25^{\circ}\text{C}$  não houve sinal de RPS entre a isoforma sc e o L-triptofano. A afinidade entre a isoforma ln e o L-triptofano-L-arginina é maior do que com o L-triptofano-L-triptofano a ambas as temperaturas. Em todos os ensaios realizados, os valores de  $K_D$  obtidos apresentaram ordens de grandeza que demonstraram elevada afinidade para qualquer um dos ligandos testados, independentemente da isoforma utilizada. Deste modo, estes ligandos podem ser testados em AC manipulando as condições de ligação e eluição das isoformas com Hepes e Tris-HCl.

## Capítulo 4- Conclusão

O desenvolvimento de novos ligandos para a purificação de ácidos nucleicos é extremamente importante, pois possibilita efetuar terapias genicas mais seguras, que contenham o menor número possível de contaminantes.

Neste estudo averiguou-se a capacidade de três ligandos (L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina) de se ligarem às isoformas (superenrolado, circular aberto e linear) do pVax-LacZ. O estudo da interação dos suportes sefarose L-triptofano, L-triptofano-L-arginina com os 5'-mononucleotídeos (5'-AMP, 5'-GMP, 5'-CMP e 5'-TMP) foi realizado por RMN-STD para identificar quais os grupos funcionais dos 5'-mononucleotídeos que interagem com os suportes.

Desta forma o 5'-TMP interagiu preferencialmente pelo grupo metilo com os três suportes, enquanto que o 5'-GMP interagiu com os suportes o L-triptofano e o L-triptofano-L-triptofano pelos prótons H5' e H5'' adjacentes ao grupo fosfato. Com o suporte L-triptofano-L-arginina a interação preferencial do 5'-GMP foi com a base. O 5'-CMP interage com os três suportes majoritariamente pelos prótons H5' e H5'' adjacentes ao grupo fosfato. Relativamente ao 5'-AMP a interação com os dipeptídeos é similar apresentado maior sinal de STD com a desoxirribose, enquanto que com o suporte sefarose L-triptofano a interação é preferencial pela base. Pela RPS só houve sinal com a isoforma ocem tampão Tris-HCl. As constantes de dissociação de equilíbrio não diferem significativamente com os ligandos e não variam com a temperatura. A afinidade entre os três ligandos e as isoformas nos dois tampões é elevada. Em Hepes, a isoforma sc teve menor valor de afinidade que as restantes isoformas a ambas as temperaturas, nomeadamente com os dipeptídeos. A afinidade entre as isoformas ln e oc e o L-triptofano-L-arginina é maior do que com o L-triptofano-L-triptofano. Deste modo, os resultados obtidos por RPS e RMN-STD permitiram identificar as interações entre os ligandos e 5'-mononucleotídeos e determinar as constantes de dissociação de equilíbrio com as isoformas do pVax-LacZ, demonstrando que os ligandos L-triptofano, L-triptofano-L-triptofano e L-triptofano-L-arginina são promissores para serem utilizados na purificação de pDNA em cromatografia de afinidade.

## Capitulo 5- Perspetivas futuras

Como perspectivas futuras para este trabalho sera utilizar os suportes sintetizados sefarose L-triptofano, sefarose L-triptofano-L-triptofano e sefarose L-triptofano-L-arginina em cromatografia de afinidade, para na purificação e separacao das isoformas de DNA plasmídico de varios tamanhos, manipulando condicoes experimentais, tais como, temperatura, pH, forca ionica.

## Capítulo 6- Bibliografia

1. Bråve A, Ljungberg K, Wahren B, Liu MA. Vaccine delivery methods using viral vectors. *Molecular pharmaceutics*. 2007;4(1):18-32.
2. Otten GR, Schaefer M, Doe B, Liu H, Megede Jz, Donnelly J, et al. Potent immunogenicity of an HIV-1 gag-pol fusion DNA vaccine delivered by in vivo electroporation. *Vaccine*. 2006;24(21):4503-9.
3. Wang S, Farfan-Arribas DJ, Shen S, Chou T-hW, Hirsch A, He F, et al. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*. 2006;24(21):4531-40.
4. Kant R, de Vos WM, Palva A, Satokari R. Immunostimulatory CpG motifs in the genomes of gut bacteria and their role in human health and disease. *Journal of medical microbiology*. 2014;63(Pt 2):293-308.
5. Sinden RR. *DNA structure and function*: Gulf Professional Publishing; 1994.
6. Schleef M, Schmidt T. Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research and clinical applications. *The journal of gene medicine*. 2004;6(S1):S45-S53.
7. Prazeres D, Monteiro G, Ferreira G, Diogo M, Ribeiro S, Cabral J. Purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Biotechnology annual review*. 2001;7:1-30.
8. Diogo M, Queiroz J, Prazeres D. Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*. 2005;1069(1):3-22.

9. Sousa F, Queiroz J. Supercoiled plasmid quality assessment by analytical arginine-affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2011;1218(1):124-9.
10. Nitiss JL. DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer*. 2009;9(5):327-37.
11. Sousa A, Sousa F, Queiroz J. Impact of lysine-affinity chromatography on supercoiled plasmid DNA purification. *Journal of Chromatography B*. 2011;879(30):3507-15.
12. Prather KJ, Sagar S, Murphy J, Chartrain M. Industrial scale production of plasmid DNA for vaccine and gene therapy: plasmid design, production, and purification. *Enzyme and microbial technology*. 2003;33(7):865-83.
13. Stadler J, Lemmens R, Nyhammar T. Plasmid DNA purification. *The journal of gene medicine*. 2004;6(S1):S54-S66.
14. Novakova L, Vlckova H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. *Analytica chimica acta*. 2009 Dec 10;656(1-2):8-35. PubMed PMID: 19932811.
15. Sousa F, Prazeres DM, Queiroz JA. Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol*. 2008 Sep;26(9):518-25. PubMed PMID: 18675479.
16. Li L-Z, Liu Y, Sun M-S, Shao Y-M. Effect of salt on purification of plasmid DNA using size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007;1139(2):228-35.
17. Ferreira GN, Monteiro GA, Prazeres DM, Cabral J. Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications. *Trends in biotechnology*. 2000;18(9):380-8.

18. Prazeres DMF, Schluep T, Cooney C. Preparative purification of supercoiled plasmid DNA using anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998;806(1):31-45.
19. Eon-Duval A, Burke G. Purification of pharmaceutical-grade plasmid DNA by anion-exchange chromatography in an RNase-free process. *Journal of chromatography B*. 2004;804(2):327-35.
20. Prazeres DM, Ferreira GN, Monteiro GA, Cooney CL, Cabral J. Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks. *Trends in biotechnology*. 1999;17(4):169-74.
21. Iuliano S, Fisher J, Chen M, Kelly W. Rapid analysis of a plasmid by hydrophobic-interaction chromatography with a non-porous resin. *Journal of Chromatography A*. 2002;972(1):77-86.
22. Xiao Y, Rathore A, O'Connell JP, Fernandez EJ. Generalizing a two-conformation model for describing salt and temperature effects on protein retention and stability in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007;1157(1):197-206.
23. Jungbauer A, Machold C, Hahn R. Hydrophobic interaction chromatography of proteins: III. Unfolding of proteins upon adsorption. *Journal of Chromatography A*. 2005;1079(1):221-8.
24. Murphy JC, Jewell DL, White KI, Fox GE, Willson RC. Nucleic acid separations utilizing immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology progress*. 2003;19(3):982-6.
25. Cano T, Murphy JC, Fox GE, Willson RC. Separation of genomic DNA from plasmid DNA by selective renaturation with immobilized metal affinity capture. *Biotechnology progress*. 2005;21(5):1472-7.
26. Hasche A, Voß C. Immobilisation of a repressor protein for binding of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*. 2005;1080(1):76-82.

27. Sousa F, Tomaz C, Prazeres D, Queiroz J. Separation of supercoiled and open circular plasmid DNA isoforms by chromatography with a histidine-agarose support. *Analytical biochemistry*. 2005;343(1):183-5.
28. Sousa F, Matos T, Prazeres D, Queiroz J. Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Analytical biochemistry*. 2008;374(2):432-4.
29. Sousa F, Freitas S, Azzoni AR, Prazeres DMF, Queiroz J. Selective purification of supercoiled plasmid DNA from clarified cell lysates with a single histidine-agarose chromatography step. *Biotechnology and applied biochemistry*. 2006;45(3):131-40.
30. Hoffman MM, Khrapov MA, Cox JC, Yao J, Tong L, Ellington AD. AANT: The amino acid-nucleotide interaction database. *Nucleic acids research*. 2004;32(suppl 1):D174-D81.
31. Pattnaik P. Surface plasmon resonance. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2005;126(2):79-92.
32. Blaesing F, Weigel C, Welzeck M, Messer W. Analysis of the DNA-binding domain of *Escherichia coli* DnaA protein. *Molecular microbiology*. 2000;36(3):557-69.
33. Brogioni B, Berti F. Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review. *MedChemComm*. 2014.
34. Wagstaff JL, Taylor SL, Howard MJ. Recent developments and applications of saturation transfer difference nuclear magnetic resonance (STD NMR) spectroscopy. *Molecular BioSystems*. 2013;9(4):571-7.
35. Cruz C, Cabrita EJ, Queiroz JA. Analysis of nucleotides binding to chromatography supports provided by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of chromatography A*. 2011 Jun 3;1218(22):3559-64. PubMed PMID: 21501844.

36. Song Q-H, Tang W-J, Hei X-M, Wang H-B, Guo Q-X, Yu S-Q. Efficient Photosensitized Splitting of Thymine Dimer by a Covalently Linked Tryptophan in Solvents of High Polarity. *European Journal of Organic Chemistry*. 2005;2005(6):1097-106.
37. Sorokina YM, Sladkova A, Popova L, Shadyro O, Knizhnikov V. Synthesis of dipeptides based on valine and threonine. *Russian Journal of Organic Chemistry*. 2012;48(10):1297-301.
38. Lukk T, Sakai A, Kalyanaraman C, Brown SD, Imker HJ, Song L, et al. Homology models guide discovery of diverse enzyme specificities among dipeptide epimerases in the enolase superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(11):4122-7.
39. Luscombe NM, Laskowski RA, Thornton JM. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic acids research*. 2001;29(13):2860-74.